

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования "Российский Университет Дружбы  
Народов имени Патриса Лумумбы "**

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

Вишнякова Полина Александровна,

кандидат биологических наук;

Гордон Константин Борисович,

кандидат медицинских наук

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	14
1.1. Факторы риска ПРГШ .....	17
1.2. Клеточная гетерогенность ПРГШ .....	21
1.3. Молекулярно-генетические изменения характерные для ПРГШ .....	32
1.4. Место протонной терапии в лечении плоскоклеточного рака головы и шеи и ее биологические эффекты .....	40
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1. Характеристика пациентов .....	46
2.2. Дизайн исследования.....	49
2.3. Облучение пациентов сканирующим пучком протонов.....	50
2.4. Забор опухолевой ткани и ткани перитуморальной области .....	52
2.5. Транспортировка биоматериала и его хранение .....	52
2.6. Гистологическое исследование и иммуногистохимическое исследование.....	53
2.6. Первичная обработка биоптата ткани для изолирования культуры клеток .....	56
2.7. Проточная цитофлюориметрия .....	57
2.8. Исследование транскриптома ПРГШ до и после протонного облучения.....	58
2.8.1. РНК-секвенирование биопсийного материала ПРГШ, полученного от пациентов до и после облучения сканирующим пучком протонов.....	58
2.8.2. Биоинформатический анализ.....	59

2.9. Оценка клинических эффектов ПТ .....	61
2.10. Полимеразная цепная реакция .....	61
2.11. Статистические методы обработки данных.....	63
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Сравнение клеточного состава опухолевой ткани и ткани перитуморальной области методами гистологического, иммуногистохимического анализа и проточной цитофлуориметрии до и после облучения сканирующим пучком протонов .....	64
3.1.1. Сравнение клеточного состава опухолевой ткани ПРГШ и ткани перитуморальной области до облучения сканирующим пучком протонов..	64
3.1.2. Оценка изменений клеточного состава опухолевой ткани после облучения сканирующим пучком протонов .....	83
3.1.3. Оценка изменений клеточного состава ткани перитуморальной области пациентов после облучения сканирующим пучком протонов .....	91
3.2. Исследование транскриптома опухолевой и перитуморальной тканей до и после облучения сканирующим пучком протонов методом секвенирования нового поколения.....	98
3.2.1. Исследование транскриптома опухолевой ткани до и после облучения пучком протонов методом NG-секвенирования.....	98
3.2.2. Исследование транскриптома ткани перитуморальной области до и после облучения пучком протонов методом NG-секвенирования.....	109
3.3. Клинико-инструментальная оценка эффектов протонной терапии для определения групп пациентов с хорошим и плохим ответом на лечение.....	118
3.4. Сравнение транскриптомного профиля клеток опухолевой и перитуморальной тканей в зависимости от клинического прогноза и поиск дифференциальных сигнатур.....	123

3.5. Верификация выявленных биомаркеров-предикторов ответа на ПТ, дифференциально экспрессирующихся в ткани перитуморальной области у пациентов с хорошим и плохим прогнозом .....	135
4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	160
ВЫВОДЫ.....	164
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	166
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	168

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [Näsman 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. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году., 2024]. Клинически ПРГШ характеризуется поздней диагностикой, высокой частотой рецидивов и относительно низкой 5-летней выживаемостью как при локализованной, так и при распространенной стадии заболевания (69 и 34% соответственно)[Sung и др., 2021].

Большинству (около 75%) пациентов с ПРГШ назначается лучевая терапия (ЛТ) в качестве основного или в составе комплексного противоопухолевого 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 оказался сопряженным с увеличением частоты и выраженности острых лучевых реакций [Gutiontov и др., 2016]. Это

обуславливает актуальность поиска оптимального варианта ЛТ для улучшения результатов лечения 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]. При облучении протонами интегральная доза практически всегда оказывается ниже, а облучение здоровых тканей — меньше, чем при ФТ [Jumaniyazova и др., 2023a; Vitti, Parsons, 2019]. Данные эффекты ПТ основаны на явлении пика Брэгга—максимальной отдаче энергии в точке, с резким спадом дозы за мишенью. Особенно это значимо в лечении онкологических заболеваний у детей и молодых пациентов с точки зрения возникновения вторых опухолей, вероятность появления которых растет с увеличением интегральной дозы и временем жизни после лечения [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 одними из основных факторов 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 ситуации же с ЛТ— снижает этот показатель с 88% до 55% ( $p=0,003$ ). Геворков А. Р. и соавторы в исследовании 2020 года опубликовали схожие результаты [Gevorkov и др., 2020]. В их работе показатель пятилетней

безрецидивной выживаемости в группе, где перерыв в ЛТ превышал тридцатидневный период был на 27% ниже, чем в группе, где перерывов в процессе лечения 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 позволят 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 на ткани перитуморальной области. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии у нас представления о том, что происходит с тканями опухоли и перитуморальной области на клеточном и молекулярно-генетическом 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.

## **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 выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены *KR1*, *KR6B* и *KR16* у пациентов 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 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, иммуногистохимического анализа, а также методом проточной цитометрии.

Облучение пациентов проводили в Медицинском радиологическом научном центре им А. Цыба (филиал НМИЦ Радиологии) на комплексе протонного излучения «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 биоинформатической обработкой полученных данных. Выявленные дифференциально экспрессированные гены были верифицированы с помощью полимеразной цепной реакции.

Клинические эффекты ПТ оценивали с помощью инструментальных методов исследования таких как, компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ), результаты которых оценивали с помощью критериев 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.

### **Степень достоверности и внедрение результатов исследования в клиническую практику**

Достоверность результатов работы подтверждена объемом проведенных исследований с помощью большого набора современных методов и репрезентативностью выборки пациентов (80 пациентов с ПРГШ). Полученные результаты подвергнуты критической оценке и анализу с помощью современных методов статистически.

Результаты исследования внедрены в образовательную программу кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского Института РУДН, исследовательскую деятельность НИИ молекулярной и клеточной медицины РУДН.

### **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.

### **Апробация диссертации**

Апробация диссертации состоялась 17 октября 2025 года на заседании кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского Института Российского Университета Дружбы Народов имени Патриса Лумумбы (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).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 203 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (368 источника, включающих работы отечественных и зарубежных исследователей). Диссертация содержит 49 рисунков и 29 таблиц.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Злокачественные новообразования (ЗНО) занимают лидирующие позиции среди ведущих причин смертности в развитых странах после сердечно-сосудистых заболеваний [Bray и др., 2021]. Снижение смертности от ЗНО в последние годы в большей степени связано с усовершенствованием методов диагностики, которые позволяют выявить заболевание на ранних стадиях, чем с улучшением в лечении, даже несмотря на значительные достижения в сфере противоопухолевой лекарственной терапии [Siegel, Miller, Jemal, 2019]. При этом успех ранней диагностики и противоопухолевого лечения значительно варьирует в зависимости от типа ЗНО [Falzone, Salomone, Libra, 2018].

Для опухолей области головы и шеи характерно разнообразие первичных локализаций: ротовая полость, язык, ротоглотка, гортань, гортаноглотка, носоглотка. Для каждой локализации характерны особенности этиологии, эпидемиологии, клинического течения и методов лечения. Однако, примерно в 90% случаев опухоли этой области гистологически представлены плоскоклеточным раком. Это позволяет сгруппировать их в одну категорию и обуславливает относительно одинаковые паттерны поведения опухолей и схемы их лечения [Petrova и др., 2023]. ПРГШ входит в десятку наиболее распространенных ЗНО во всем мире, которое характеризуется поздней диагностикой, быстрым локорегионарным прогрессированием и относительной резистентностью к противоопухолевым методам лечения [Barsouk и др., 2023]. Неблагоприятное течение ПРГШ связано с особенностями анатомического расположения, которое усложняет выполнение радикального хирургического вмешательства, а также обуславливает вариабельность ответа на противоопухолевые препараты и лучевую терапию (ЛТ). Как правило, пациентам с поздними стадиями (при местнораспространенной стадии, или при наличии отдаленных метастазов) ПРГШ назначается комплексное

противоопухолевое лечение, включающее хирургическое вмешательство, ЛТ и противоопухолевую лекарственную терапию. Но даже при комбинировании трех видов противоопухолевого лечения, частота рецидивов ПРГШ достигает 50% [Nissi и др., 2021]. Лекарственная устойчивость и токсичность ограничивают эффективность химиотерапевтических препаратов, которые используются для лечения ПРГШ, таких как цис- или карбоплатин, 5-фторурацил и таксаны [Albers и др., 2017; Jin и др., 2019]. Внедрение новых препаратов – таргетных агентов (цетуксимаба) и иммунопрепаратов (ниволумаба, пембролизумаба) немного улучшило исходы, но не решило проблему первичной или приобретенной резистентности к лечению у большинства пациентов с ПРГШ [Seiwert и др., 2016; Vermorken и др., 2008]. Говоря об эффективности ЛТ, стоит отметить, что примерно 75% пациентов с ПРГШ назначается ЛТ в качестве основного или в составе комплексного лечения [Alfouzan, 2021]. Так, на ранних стадиях ПРГШ ЛТ может заменить необходимость хирургического вмешательства. При местнораспространенных формах может быть рекомендована ЛТ в сочетании с химиотерапией (ХЛТ), или в качестве адъювантной терапии после хирургической резекции. В некоторых сложных клинических ситуациях, например, при опухолевом поражении гортани, ЛТ позволяет проводить противоопухолевое лечение, сохраняя орган, что для ряда пациентов является принципиально важным аспектом с психологической точки зрения.

Считают, что классическая ЛТ ПРГШ берет свое начало в 1950-х годах с появлением кобальтовых установок и линейных ускорителей [Rocha и др., 2022]. Современная ЛТ прочно связана с понятием конформности облучения, при котором достигается максимальная концентрация дозы в опухоли, при минимальном воздействии на окружающие ткани. Гиперфракционирование и ускоренное фракционирование являются потенциальными средствами для увеличения терапевтического эффекта ЛТ. Поиск технологий, позволяющих повысить дозу облучения в опухоли, нанося более интенсивное повреждение опухолевой ткани и сохраняя высокий градиент падения дозы на границе

опухоли и здоровой ткани, привел к открытию метода модуляции интенсивности пучка (IMRT). Однако, дозиметрический выигрыш при IMRT сопровождается острыми лучевыми реакциями, что связано с увеличением объема здоровых тканей, подвергающихся облучению низкими дозами [Gutierrez и др., 2016]. Протонная терапия (ПТ) является одним из наиболее многообещающих вариантов ЛТ частицами (корпускулярного вида облучения), физические особенности которого позволяют свести к минимуму количество постлучевых осложнений. Накопленный клинический опыт, во многом опережающий фундаментальные радиобиологические исследования, уже привел к устойчивому росту числа протонных центров [Jumaniyazova и др., 2023a]. Так, в марте 2023 года в мире уже насчитывалось 106 действующих протонных центров [Yan и др., 2023]. Однако до сих пор в литературе фигурирует лишь небольшое число работ, посвященных исследованию биологических эффектов ПТ. В рамках данной работы впервые исследованы и описаны радиоиндуцированные ответы ПРГШ на клеточном и транскриптомном уровнях после воздействия активным сканирующим пучком протонов.



### 1.1. Факторы риска ПРГШ

Злокачественная трансформация нормальной слизистой оболочки в плоскоклеточный рак – это многофакторный процесс. Эпидемиологические исследования выявили широкий спектр факторов риска ПРГШ, классифицированных Международным агентством по изучению рака (МАИР) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [IARC, 2018]. Эти факторы риска включают употребление табака, употребление алкоголя, воздействие загрязнений окружающей среды и инфицирование вирусными агентами, а именно вирусом папилломы человека (ВПЧ) для раков ротоглотки и вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) для рака носоглотки, дополнительными предрасполагающими факторами выступают жевание бетеля (вид древовидных растений из рода *Areca* семейства Пальмовые), недостаточное питание, плохая гигиена полости рта [Johnson и др., 2020; Sun и др., 2022]. Интересно, что некоторые факторы риска характерны для определенной географической местности и/или культуры, например, жевание бетеля в странах Юго-Восточной Азии.

Канцерогенное влияние табака признано одной из основных причин возникновения различных типов ЗНО, включая ПРГШ (ВПЧ-негативный подтип) [McQueen и др., 2016; Munshi, Heckman, Darlow, 2015]. Так, примерно 80% пациентов с ПРГШ являются курильщиками с длительным стажем курения [Vigneswaran, Williams, 2014]. Табак включает в свой состав более 5000 химических соединений, десятки из которых признаны канцерогенными [Johnson и др., 2020], а в сигаретном дыме описано более 70 канцерогенных соединений [Khariwala, Hatsukami, Hecht, 2012]. Наиболее известными являются полициклические ароматические углеводороды, включая бензопирен, нитрозамины и др. Общий механизм действия большинства канцерогенов табака состоит в образовании аддуктов ДНК, которые, в свою очередь, приводят к

возникновению мутаций, связанных с активацией онкогенов (таких как *KRAS*) или инактивацией генов-супрессоров опухолевого роста, таких как *p53* [Alavanja и др., 2004; Jethwa, Khariwala, 2017; Khariwala, Hatsukami, Hecht, 2012].

Помимо индукции канцерогенеза, в многочисленных исследованиях было продемонстрировано негативное влияние соединений табака и на результаты лечения пациентов-курильщиков с ПРГШ. Так, пациенты, перенесшие хирургическое лечение по поводу ПРГШ, курившие когда-либо и/или курящие во время лечения, в 6 раз чаще имеют осложнения (сосудистые, легочные, почечные, острую кровопотерю, анемию, раневые осложнения и другие осложнения, такие как инфекция мочевыводящих путей или делирий) и более длительный период восстановления [Hatcher и др., 2016; Marin и др., 2008]. Chen и соавт. было показано, что пациенты с ПРГШ, которые продолжали курить во время ЛТ по сравнению с контрольной группой некурящих пациентов, демонстрировали значимо худшую 5-летнюю общую выживаемость (23% против 55%), локорегионарный контроль (58% против 69%) и безрецидивную выживаемость (42% против 65%) [Chen и др., 2011].

Hashibe и др. на протяжении нескольких лет изучали патогенез ПРГШ, индуцированный одновременным употреблением табака и алкоголя. По крайней мере, 75% случаев ПРГШ в Европе, США и других промышленно развитых странах обусловлены сочетанием этих вредных привычек [Hashibe и др., 2007], [Hashibe и др., 2009]. Прямая связь между интенсивностью употребления алкоголя и риском развития ПРГШ хорошо известна и описана [Bagnardi и др., 2015; Credico Di и др., 2020; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2010]. Основной компонент алкогольных напитков – этанол – окисляется до ацетальдегида, который является признанным канцерогеном [IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2010]. Алкоголь может также оказывать местное действие, выступая в роли растворителя клеточных мембран и усиливая проникновение в слизистую

оболочку канцерогенов, особенно содержащихся в табаке [Seitz, Stickel, Homann, 2004].

Помимо табакокурения и употребления алкоголя для ПРГШ характерна и вирусная этиология. Так, персистирующая инфекция ВПЧ и/или ВЭБ выступают известными факторами риска для развития плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротоглотки и носоглотки [Hennessey, Westra, Califano, 2009; Sturgis, Wei, Spitz, 2004; Tsang и др., 2020]. Начиная с 2000-х годов отмечена тенденция роста заболеваемости ПРГШ, особенно среди молодых пациентов и она все чаще ассоциирована с ВПЧ [Näsman и др., 2015]. ВПЧ представляет собой двуцепочечный ДНК-содержащий вирус, поражающий эпителиальные клетки [Hausen Zur, 2002]. На сегодняшний день известно более 150 различных подтипов ВПЧ, которые подразделяются на 2 типа: низкого и высокого онкогенного риска [Saini и др., 2010]. Инфицирование ВПЧ высокого онкогенного типа выступает пусковым фактором индуцирующим канцерогенез ряда ЗНО, в частности ПРГШ [Dietz, Wichmann, 2011]. Структурные белки ВПЧ Е6 и Е7 приводят к нарушению функции основных генов-супрессоров опухолей *p53* и *Rb1*, вызывая нарушение регуляции клеточного цикла и геномную нестабильность [Pytynia, Dahlstrom, Sturgis, 2014; Rampias и др., 2009]. Примечательно, что по сравнению с ВПЧ-негативной плоскоклеточной орофарингеальной карциномой, ВПЧ-положительные опухоли характеризуются отсутствием мутации *p53* [Monsjou Van и др., 2012; Shi и др., 2009] и меньшим количеством хромосомных аббераций [Smeets и др., 2006]. Многочисленные исследования показали, что ВПЧ-положительные (ВПЧ+) и ВПЧ-отрицательные (ВПЧ-) ПРГШ представляют собой отличающиеся друг от друга подтипы не только своей этиологией, но и клиническим течением, в частности, ответом на противоопухолевое лечение [Hsu и др., 2020; Leemans, Braakhuis, Brakenhoff, 2011; Slebos и др., 2006]. Обнаружение этиологической значимости ВПЧ в развитии плоскоклеточного рака ротоглотки привело к резкому увеличению количества исследований, направленных на изучение клинического течения и

прогноза заболевания, ассоциированного с этим вирусом. Сегодня известно, что пациенты с ВПЧ-положительными плоскоклеточными карциномами ротоглотки отличаются лучшими показателями общей выживаемости и ответом на проводимую противоопухолевую терапию по сравнению с ВПЧ-отрицательными пациентами [Hsu и др., 2020].

## 1.2. Клеточная гетерогенность ПРГШ

С точки зрения клеточного состава, ПРГШ представляет собой ткань, которая помимо опухолевых клеток на разной стадии дифференцировки включает фибробласты, ассоциированные с опухолью (ФАО), иммунокомпетентные клетки, а также внеклеточный матрикс (ВКМ), кровеносные и лимфатические сосуды [Jumaniyazova и др., 2023b; Plzák и др., 2019], (Рисунок 1).

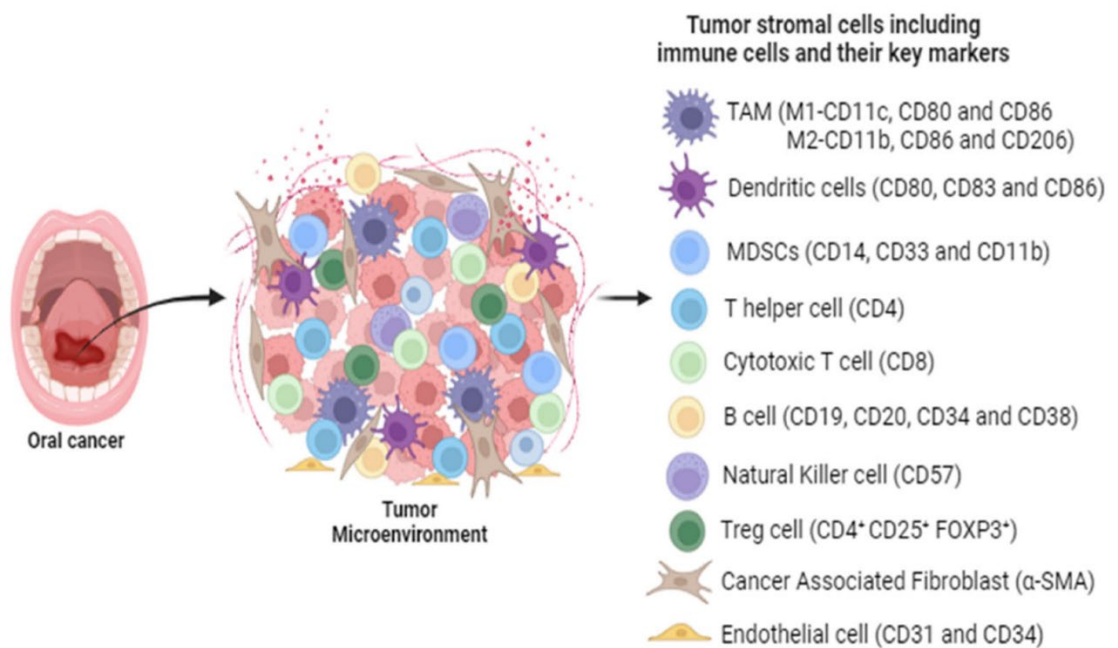


Рисунок 1 – Клеточный состав опухолевого микроокружения ПРГШ [Wang и др., 2024]

Внутриопухолевая гетерогенность и сложные межклеточные взаимодействия между опухолевыми и другими клетками микроокружения играют ключевую роль в прогрессировании ЗНО и его устойчивости к различным противоопухолевым методам лечения [Zhang и др., 2023]. В

исследовании Song и коллег, посвященном изучению клеточного состава ПРГШ, все клетки были разделены на пять основных кластеров. В результате подсчета разных типов клеток, было выявлено, что 54% составляют опухолевые клетки, 36,2%- иммунные клетки, 4,61% составили эпителиальные клетки, ФАО составили 3,42% и эндотелиальные клетки— 1,77% [Song и др., 2020].

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) представляют собой небольшую субпопуляцию (1-3%) анеуплоидных клеток с хромосомными перестройками, которые участвуют в индукции прогрессирования ЗНО [Kumar и др., 2023]. Несмотря на небольшую популяцию, присутствующую в опухолевой ткани, будучи истинно стволовыми клетками, ОСК способны к неограниченному числу делений и постоянному самоподдержанию или самовоспроизведению. Самоподдержание популяции ОСК обеспечивается асимметричным типом деления стволовых клеток, который заключается в том, что родительская стволовая клетка даёт начало двум клеткам. Одна из них — обладает стволовыми свойствами, как и материнская, а вторая способна лишь к ограниченному числу делений и называется частично дифференцированной. ОСК дают начало фенотипически разнообразным клеткам, что обуславливает агрессивный потенциал опухоли и резистентность к противоопухолевым лекарственным препаратам и ЛТ [Kuhn, Tuan, 2010]. Известны несколько молекулярных белковых биомаркеров ОСК ПРГШ, из которых наиболее значимы трансмембранный гликопротеин CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты, но способный взаимодействовать с другими факторами ВКМ) и альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1A1) [Curtarelli и др., 2018; Sawant и др., 2018]. Описано, что повышение экспрессии этих маркеров ассоциировано с неблагоприятным прогнозом ПРГШ [Szafarowski и др., 2020].

Еще одной важной клеточной популяцией, играющей ключевую роль в опухолевой прогрессии, являются ФАО. Они отличаются от нормальных фибробластов постоянным состоянием активации и экспрессией  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA) [Augsten, 2014]. Опухолевые клетки

постоянно продуцируют различные факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста-бета1 (TGF- $\beta$ 1) и фактор роста стромальных клеток-1 (SDF1), интерлейкин (IL) 1 $\beta$ , тромбоцитарный фактор роста A (PDGF-A), белок, активирующий фибробласты и фактор роста тромбоцитов, которые индуцируют трансформацию клеток-предшественников или нормальных фибробластов в ФАО [Fotsitzoudis и др., 2022; Ну и др., 2023]. В свою очередь, ФАО играют важную роль в канцерогенезе и регулируют пролиферацию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток путем изменения продукции цитокинов, хемокинов и компонентов ВКМ [Custódio, Biddle, Tavassoli, 2020; Jumaniyazova и др., 2023b; Li и др., 2014; Markwell, Weed, 2015], (Рисунок 2).

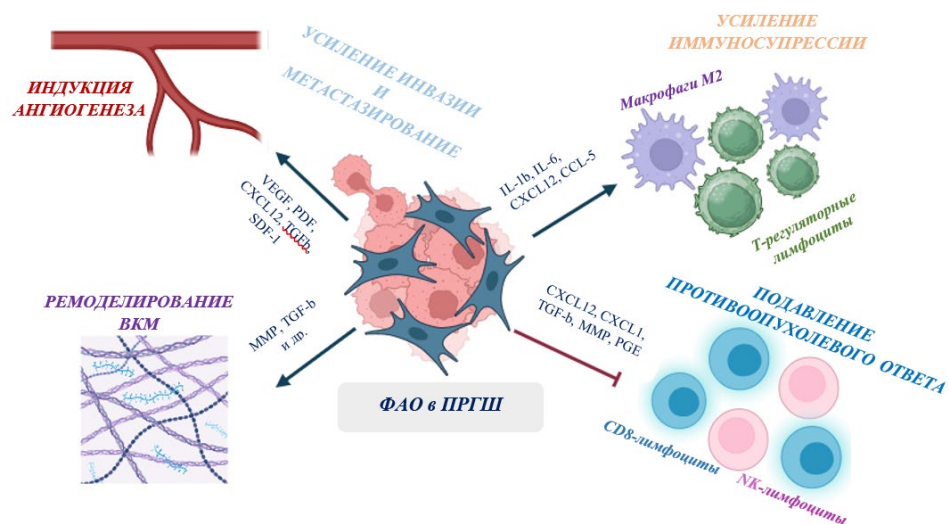


Рисунок 2 – Роль ФАО в прогрессировании ПРГШ

SDF-1, синтезируемый ФАО активирует неоваскуляризацию опухоли посредством рекрутирования эндотелиальных клеток-предшественников [Orimo и др., 2005]. ФАО секретируют широкий спектр факторов роста, таких как EGF, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и HGF; цитокинов, таких как IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 и хемокинов, индуцирующих деление опухолевых клеток, ангиогенез и

рекрутирование иммуносупрессивных иммунных клеток [Liu и др., 2019; Monteran, Erez, 2019].

В ПРГШ ФАО ингибируют пролиферацию Т-цитотоксических лимфоцитов через VEGF/TGF- $\beta$  и индуцируют апоптоз CD4 и CD8 Т-лимфоцитов [Custódio, Biddle, Tavassoli, 2020]; одновременно с этим активируют рекрутирование Т-регуляторных лимфоцитов [Kumar и др., 2019; Qin и др., 2021; Tong, Kao, Sikora, 2012], создавая тем самым иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Кроме этого, цитокины, секретируемые ФАО, способствуют привлечению опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) и способствуют их дифференцировке в направлении подтипа M2 (проопухолевого фенотипа), что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом при ПРГШ [Kumar и др., 2019; Takahashi и др., 2017; Troiano и др., 2019].

ФАО стимулируют приобретение опухолевыми клетками свойств, подобных свойствам ОСК, посредством продукции инсулиноподобного фактора роста (IGF)-II [Chen и др., 2014b]. В исследовании [Knops и др., 2020] продемонстрирована корреляция между высокой плотностью ФАО и распространенностью опухолевого процесса, включая процессы метастазирования, периневральной и интраваскулярной инвазии. При совместном культивировании опухолевых клеток ПРГШ и ФАО наблюдали увеличение скорости пролиферации и усиление инвазивного потенциала у первых [Young и др., 2018]. Кроме всего вышеперечисленного ФАО синтезируют BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Активация сигнального пути BDNF-TrkB (neurotrophin receptor tyrosine kinase B) приводит к прогрессированию заболевания [Tong, Benjamin Chun-Kit Tong, 2017], поскольку TrkB индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) опухолевых клетках [Kupferman и др., 2010]. В свою очередь, ЭМП представляет собой фенотипическую трансформацию эпителиальных клеток в мезенхимальные клетки, характеризующиеся изменениями апикобазальной полярности,



подвижности и клеточной адгезии, которые обеспечивают измененной клетке большую способность к миграции, инвазии и отдаленной колонизации [González-González и др., 2021]. Кроме того, ФАО являются основным источником матриксных металлопротеиназ (ММП) в опухолевом микроокружении [Peltanova, Raudenska, Masarik, 2019] – белков, которые участвуют в деградации и ремоделировании ВКМ, а также высвобождении и активации встроенных в матрикс факторов роста (таких как FGFs, VEGF и TGF- $\beta$ ), дополнительно стимулирующих процессы связанные с опухолевой прогрессией: пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и иммуносупрессию [Jumaniyazova и др., 2023b]. Роль ММП и других компонентов ВКМ в прогрессировании ПРГШ представлена в таблице 1 (Таблица 1).

Таблица 1 – Роль компонентов ВКМ в прогрессировании ПРГШ

Основные компоненты ВКМ	Роль в прогрессировании ПРГШ
Коллагены	Активируют PI3-киназы (PI3K) и инвазию опухолевых клеток [Utispan и др., 2020]. Способствуют пролиферации опухолевых клеток через активацию сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы/экстрацеллюлярной сигнал-регулируемой киназы (MEK/ERK) [Zhong и др., 2021]. Вызывают резистентность ПРГШ к ингибиторам тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) через активацию mTOR по АКТ-независимому пути [Juin и др., 2012].
Эластин	Усиленная деградация эластина, наблюдаемая при ПРГШ, положительно коррелирует со стадией заболевания.
Фибронектин	Стимулирует ангиогенез, увеличивая количество VEGF [Ray, Provenzano, 2021].

Продолжение таблицы 1

Фибронектин	Обеспечивает устойчивость опухолевых клеток к аноксису (форма гибели клетки, вызываемая утратой межклеточных контактов) через механизм, включающий фибронектин и сигнальный рецептор $\alpha_v$ /FAK integrin [Levental и др., 2009]. Активирует приобретение опухолевыми клетками фенотипа ОСК.
Ламинины	Активируют EGFR/MAPK-сигнальный каскад [Prabhudesai и др., 2023], как следствие индуцируют пролиферацию и инвазию опухолевых клеток. Повышенная экспрессия положительно коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [Degen и др., 2012].
Гиалуронан	Стимулирует миграцию, выживание и химиорезистентность опухолевых клеток [Bourguignon, Earle, Shiina, 2017].
Тенасцин-С	Индуцирует процесс эпителиально-мезенхимального перехода. Активирует сигнальные каскады в опухолевых клетках, такие как JNK, Wnt, Notch, АКТ/HIF1 $\alpha$ и TGF- $\beta$ . Создает барьер для проникновения Т-лимфоцитов в опухоль.
Интегрины	Активация сигнального пути MEK/ERK [Zhong и др., 2021]. При карциноме носоглотки уровни экспрессии мРНК и белка интегринов $\alpha_v$ положительно коррелируют с размером первичной опухоли и метастазированием в лимфатические узлы [Terry и др., 2014]. Высокая экспрессия ассоциирована с радиорезистентностью [Miller, Veale, 2001].

Продолжение таблицы 1

ММП	ММП2	Повышенная экспрессия ММП 2 в ПРГШ положительно коррелирует с агрессивной инвазией опухолевых клеток, метастазированием в лимфатические узлы и сниженной общей выживаемостью.
	ММП9	Разрушает коллаген IV типа, основной компонент базальной мембраны, способствуя инвазии и метастазированию [Terry и др., 2014]. Повышает биодоступность VEGF, тем самым увеличивая количество VEGF в микроокружении опухоли [Zhang, Liu, Wang, 2014]. Сверхэкспрессия ММП9 ассоциирована с рецидивом опухоли, метастазированием в лимфатические узлы и развитием синхронных ЗНО [Vilen и др., 2013].
	ММП13	Усиливает секрецию VEGF-A [Kudo и др., 2012].
	ММП14	Сверхэкспрессия положительно коррелирует с метастазированием и с плохим прогнозом заболевания [Ye и др., 2008].
	ММП17	Стимулирует рост инвадоподий у опухолевых клеток, что ведет к усилению инвазивного потенциала и метастазированию [Yan и др., 2020a].
	ММП20	Способствует ЭМП; облегчает миграцию опухолевых клеток через базальную мембрану [Aseervatham, Ogbureke, 2020].
Перлечан		Облегчает миграцию опухолевых клеток. Сверхэкспрессия связана с устойчивостью опухолевых клеток ПРГШ к цисплатину [Kawahara и др., 2014].

Иммунная компонента ПРГШ состоит из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные клетки-киллеры (NK)) и клеток миелоидного происхождения (включая макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки). В целом, ПРГШ считают иммунологически «горячей» (т.е. отличается обилием и разнообразием иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль) опухолью, однако, состав инфильтрата иммунных клеток варьирует в зависимости от анатомической области и этиологического агента, запустившего канцерогенез [Partlová и др., 2015]. Среди иммунных клеток одной из наиболее многочисленных выступает клеточная популяция макрофагов. Макрофаги представляют собой клетки иммунной защиты, которые характеризуются высокой пластичностью: под действием сигналов окружающей среды могут претерпевать функциональные изменения. В зависимости от функционального потенциала все макрофаги условно делят на два фенотипа: «классически активированные макрофаги или провоспалительные» (M1) и «альтернативно активированные макрофаги или противовоспалительные» (M2) [Cendrowicz и др., 2021]. Классические макрофаги M1 характеризуются поверхностной экспрессией TLR2, TLR4, CD80 и CD86 [Dalen Van и др., 2019; Wang и др., 2018]. M1 макрофаги обладают высокой антигенпрезентирующей способностью [Biswas, Mantovani, 2010]. Они секретируют активные формы кислорода (АФК) и провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 и TNF- $\alpha$ , которые модулируют Th1-опосредованные антигенспецифические воспалительные реакции [Murray и др., 2014; West и др., 2011; Zheng и др., 2017]. Также было продемонстрировано, что M1 макрофаги усиливают экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (NOS2 или iNOS), способствуя выработке NO из L-аргинина [Yao, Xu, Jin, 2019]. Инфильтрация M1 макрофагами считается благоприятным прогностическим фактором течения опухолевых процессов [Honkanen и др., 2019; Mills, 2012]. Для поляризации макрофагов в направлении M2 решающее значение имеет присутствие TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 и IL-13 [Jumaniyazova и др., 2022]. Роль макрофагов M2 в основном связана с продукцией VEGF, PDGF, фактора роста фибробластов (FGF) и TGF-

$\beta$ , а также с секрецией MMPs, что приводит к прогрессированию опухоли (Рисунок 3). TGF- $\beta$  и IL-10, продуцируемые макрофагами, ингибируют цитотоксические Т-лимфоциты, Th1 и Th2 CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты [Ng и др., 2013]. Термин «ОАМ» был введен для описания популяции зрелых макрофагов, рекрутированных в опухолевое микроокружение, и играющих важную роль в канцерогенезе, поскольку они обладают потенциалом как для снижения интенсивности развития ЗНО (макрофаги M1 поляризации), так и для индукции и поддержания развития опухоли (макрофаги M2 поляризации). Показано, что микроокружение ПРГШ содержит преимущественно ОАМ M2 фенотипа [Costa и др., 2013], которые играют ключевую роль в создании иммуносупрессивной среды с помощью различных механизмов (Рисунок 3), преимущественно метаболической репрессии Т-лимфоцитов, экспрессии PD-L1 и других молекул, подавления NK-клеток и синтеза иммуносупрессивных цитокинов, таких как IL-6, IL-10 и TGF- $\beta$  [Rashighi, Harris, 2017].

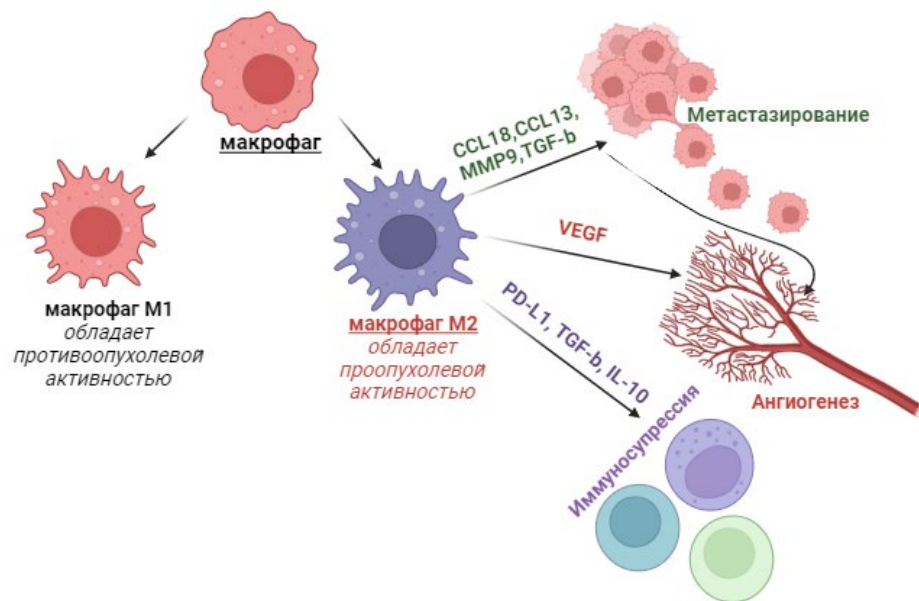


Рисунок 3 – Роль ОАМ в прогрессировании ПРГШ

Высокий уровень ОАМ в ПРГШ коррелирует с поздними стадиями заболевания, риском метастазирования в лимфатические узлы [Gao и др., 2018b; Kumar и др., 2019; Roszer, 2015; Yang, Zhang, 2017] и с неблагоприятным клиническим течением [He и др., 2014; Hu и др., 2016; Lezhnin и др., 2018; Seminerio и др., 2018; Y. и др., 2014]. В исследовании *He и др.*, в ходе сравнения количества ОАМ у пациентов с дисплазией слизистой оболочки и ПРГШ, было обнаружено, что процент ОАМ увеличивался с прогрессированием заболевания [He и др., 2014].

Нейтрофилы, инфильтрирующие опухолевую ткань, также претерпевают изменения фенотипа и функциональной активности в зависимости от цитокинов и факторов роста, присутствующих в микроокружении опухоли [Domnich и др., 2020]. Роль нейтрофилов неоднозначна: с одной стороны, они продуцируют молекулы, характерные для АПК (МНС и костимулирующие молекулы) и цитокины, активирующие Т-лимфоциты [Eruslanov и др., 2014]; с другой стороны, экспрессия ими лектиноподобного рецептора 1-го типа для окисленных липопротеинов низкой плотности (LOX-1) и аргиназы связана со снижением активности и пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов в опухолевой ткани [Si и др., 2019]. Кроме этого, показано, что нейтрофилы увеличивают количество инвадоподий опухолевых клеток ПРГШ и способствуют деградации ВКМ, что ведет к метастазированию [Glogauer и др., 2015]. Поэтому при ПРГШ повышенное количество нейтрофилов в опухолевом микроокружении является отрицательным прогностическим фактором [Domnich и др., 2020; Trellakis и др., 2011a].

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ЛИО), являются важным компонентом опухолевого микроокружения ПРГШ. Их роль в канцерогенезе и прогрессировании опухолей обсуждается на протяжении многих лет. Т-лимфоциты и особенно CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) считаются основными эффекторными клетками противоопухолевого иммунитета. Активируясь ЦТЛ начинают продуцировать перфорин, гранзимы и цитокины,

которые вызывают гибель опухолевых клеток. Подмножество CD4<sup>+</sup> Т-хелперных (Th) лимфоцитов необходимо для обеспечения цитокин-опосредованной поддержки экспансии и функций ЦТЛ [Whiteside, 2022]. Однако в ПРГШ основная доля Т-лимфоцитов представлена Т-регуляторными, которые создают иммуносупрессивный барьер, препятствуя пролиферации и активности эффекторных Т-лимфоцитов [Economidou и др., 2016; Elmsrati, Wang, Wang, 2021]. Регуляторные Т-лимфоциты с одной стороны, выполняют регуляторную функцию, осуществляя контроль за аутореактивными лимфоцитами; с другой стороны ингибируют иммунный ответ на опухолевые антигены. Различными научными группами было подтверждено не только высокое содержание регуляторных Т-лимфоцитов в микроокружении ПРГШ, но и повышение их уровня в периферической крови пациентов [Elmsrati, Wang, Wang, 2021; Jie и др., 2013; Rothschild и др., 2018]. NK-клетки, которые не ограничены МНС и не требуют предварительной сенсibilизации к антигенам, также могут распознавать и уничтожать опухолевые клетки с помощью механизмов, включающих высвобождение перфорины, гранзимов и цитокинов [Fregni и др., 2012]. В-лимфоциты, активирующиеся поступлением антигена, в тканях дифференцируются в плазматические клетки и продуцируют антитела, опосредуя гуморальный противоопухолевый иммунитет. С другой стороны, регуляторные В-лимфоциты, локализующиеся в микроокружении опухоли, секретируя иммуносупрессорные цитокины, такие как IL-10 и TGF- $\beta$ , могут способствовать опухолевой прогрессии [Horikawa и др., 2011].

Рядом авторов было отмечено важное прогностическое значение количества ЛИО при ПРГШ [Ruiter de и др., 2017; Spector и др., 2019; Xu и др., 2017]. Xu и др. было продемонстрировано, что пациенты с ПРГШ, у которых в опухолевой ткани отмечено обилие ЛИО имеют благоприятный прогноз; при этом количество ЛИО связано как с (Т-стадией) размером первичной опухоли, так и с вероятностью экстракапсулярного распространения в лимфатических узлах [Xu и др., 2017]. Faraji и др. обнаружили, что течение заболевания

пациентов с карциномой ротоглотки, ассоциированной с ВПЧ, зависит от плотности ЛИО, авторы предложили учитывать данный критерий в дополнение к стадии опухоли для прогнозирования исхода ПРГШ [Faraji и др., 2020]. В другом метаанализе (2021 г.), посвященном ЛИО в ткани ПРГШ, Borsetto *и др.* обнаружили, что высокие уровни CD4+ и CD8+ клеток связан со снижением уровня смертности пациентов от данного ЗНО [Borsetto и др., 2021]. Hanna *и др.* сообщили, что эффективность препаратов блокаторов PD-1/PD-L1 была выше у пациентов с ПРГШ, у которых в опухоли был выявлен высокий уровень CD8+ лимфоцитов [Hanna и др., 2018]. Поэтому оценка ЛИО может служить важным предиктором ответа на иммунотерапию в дополнение к определяемому статусу PD-1 [Almangush и др., 2022].

В зависимости от статуса ВПЧ степень и характер внутриопухолевой инфильтрации иммунными клетками у пациентов с ПРГШ может значительно варьировать. По сравнению с ВПЧ-отрицательной опухолевой тканью, ВПЧ-положительная демонстрирует более высокое содержание различных типов иммунных клеток, включая плазматические клетки, базофилы, Т-клетки, В-клетки и другие [Mortezaee, Majidpoor, 2022; Partlová и др., 2015].

### 1.3. Молекулярно-генетические изменения характерные для ПРГШ

Гетерогенность ПРГШ предполагает критическую значимость генетических изменений, инициирующих канцерогенез и способствующих опухолевому прогрессированию [Liang и др., 2008]. Подавляющее большинство случаев ПРГШ являются спорадическими и вызваны известными этиологическими факторами, описанными выше (табакокурение, употребление алкоголя, инфицирование ВПЧ и ВЭБ). В настоящее время недостаточно данных о возможной роли семейного анамнеза [Gingerich и др., 2018]. Однако, несмотря на подтвержденную роль экзогенных факторов риска, существуют также



доказательства семейной агрегации и повышенного риска развития ЗНО среди родственников первой линии родства [Jefferies и др., 1999], что позволяет предположить существование факторов генетической предрасположенности для ПРГШ [Lasko и др., 2014]. О роли генетических факторов риска ПРГШ свидетельствует и тот факт, что лица с анемией Фанкони, редким наследственным генетическим заболеванием, характеризующимся нарушением системы репарации ДНК (из-за мутаций в любом из 22 генов FANC), имеют в 500–700 раз повышенный риск развития данного ЗНО, в первую очередь рака слизистой оболочки ротовой полости [Velleuer, Dietrich, 2014]. В ходе исследования консорциума INHANCE 2015 года была проанализирована роль факторов риска возникновения ПРГШ: среди 25 исследований «случай-контроль» была выявлена связь между семейным анамнезом рака с ранним началом и возникновением ПРГШ у курильщиков в возрасте до 45 лет [Торогсов и др., 2015].

В ходе канцерогенеза накопление генетических мутаций из-за повреждения ДНК, клеточного стресса и старения вызывает нарушение регуляции ключевых молекул, участвующих во внутриклеточных сигнальных каскадах. Активация или инактивация сигнальных каскадов влияет на экспрессию генов через нижестоящие факторы транскрипции и их регуляторные гены, например,  $\beta$ -катенин/TCF в пути Wnt и онкогенный Мус в пути RAS. Таким образом, характер изменений экспрессии генов, наблюдаемых в опухолевых клетках, является отражением внутриклеточной сигнальной активности, вовлеченной в канцерогенез и/или чувствительность к противоопухолевым методам лечения [Itadani, Mizuarai, Kotani, 2008]. Измененные гены и сигнальные каскады опухолевых клеток мы обобщили понятием молекулярно-генетические сигнатуры. Идентификация надежных генетических сигнатур необходима как с целью определения прогноза ПРГШ у пациентов, так и персонализированного подхода к терапии. В ряде исследований выявлены и описаны биомаркеры, связанные с патогенезом и клиническим течением ПРГШ [Fernández-Mateos и

др., 2019; Gao и др., 2018a; Maiti и др., 2015; Ong и др., 2017; She и др., 2020], однако далеко не все они используются в рутинной клинической практике. Рассмотрим наиболее известные молекулярно-генетические сигнатуры ПРГШ.

Как и для большинства солидных опухолей, для ПРГШ характерны мутации в гене *TP53*, [Sullivan и др., 2018], играющем важную роль в поддержании геномной стабильности, регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, апоптозе и процессе клеточного старения [Bykov и др., 2018],[Kaiser, Attardi, 2018]. При этом p53 (белок, кодируемый *TP53*) выступает основным «сенсором» повреждения ДНК и активации онкогенов в клетке [Aubrey и др., 2018]. Более 80% ВПЧ-отрицательных ПРГШ характеризуются мутациями p53, ведущими к потере его функции [Lawrence и др., 2015], при этом эти изменения появляются на ранних стадиях канцерогенеза. Мутации p53 при любых подтипах ПРГШ ассоциированы с низкой общей выживаемостью, резистентностью к терапии и повышенной частотой рецидивов [Lawrence и др., 2015].

Мутации в гене-супрессоре опухолевого роста *NOTCH1* также часто встречаются при ПРГШ. Рецепторы *NOTCH* регулируют важные клеточные функции, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [Leong, Karsan, 2006]. Геномный анализ, проведенный в 2015 году Атласом генома рака (TCGA), показал, что инактивирующие мутации в *NOTCH 1-3* присутствуют в 17% ВПЧ-положительных и 26% ВПЧ-отрицательных ПРГШ [Alsahafi и др., 2019; Lawrence и др., 2015]. Эти aberrации преимущественно встречаются в *NOTCH1* и включают ошибочные мутации в функциональных областях, нонсенс-мутации, приводящие к укороченным белкам и инсерциям или делециям со сдвигом рамки [Nowell, Radtke, 2017]. В клетках ПРГШ отмечено повышение активности составляющих сигнального пути *NOTCH*, а их ингибирование приводит к снижению пролиферации и инвазии опухолевых клеток [Fukusumi, Califano, 2018]. Передача сигналов *NOTCH1* может способствовать поддержанию свойств ОСК, ответственных за рецидивы и метастазы посредством передачи сигналов Wnt.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, HER1 или ErbB1) представляет собой трансмембранный рецептор, обладающий тирозинкиназной активностью [Chung и др., 2017]. Повышенная экспрессия данного рецептора наблюдается в 80–90% случаев ПРГШ и коррелирует с неблагоприятным прогнозом и результатами лечения [Solomon, Young, Rischin, 2018]. С EGFR связываются лиганды семейства HER, включая эпидермальный фактор роста (EGF), гепарин-связывающий EGF, амфирегулин, трансформирующий фактор роста-альфа (TGF- $\alpha$ ), эпирегулин и бетацеллюлин, что приводит к каскаду сигнальной трансдукции [Li и др., 2023; Xu, Johnson, Grandis, 2017]. Связывание одного из лигандов с EGFR запускает гомо- или гетеродимеризацию с другими членами HER и последующее фосфорилирование остатков тирозина, активируя нижестоящие сигнальные каскады: JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK, PLC $\gamma$ /PKC и Src [Byeon, Ku, Yang, 2019]. Эти сигнальные пути контролируют пролиферацию, дифференцировку, выживаемость, ангиогенез, инвазию и метастазирование при раке [Sigismund, Avanzato, Lanzetti, 2018]. EGFR также может перемещаться в ядро, где он функционирует, как фактор транскрипции. Было обнаружено, что такая транслокация может быть вызвана ионизирующим излучением и это приводит к резистентности к ЛТ [Alsaħafi и др., 2019]. Интересно, что механизмы активации EGFR при ПРГШ разнообразны и зависят, например, от этиологии. Так, в ответ на табачный дым наблюдается увеличение выработки амфирегулина, который связывается с EGFR [Byeon, Ku, Yang, 2019].

Прицельное воздействие на EGFR с помощью моноклональных антител (например, таких как цетуксимаб) является одобренной FDA опцией при ПРГШ. В свою очередь, ингибирование EGFR повышает радиочувствительность опухолевых клеток. Повышенная экспрессия других рецепторных тирозинкиназ (RTK), включая HER2 и MET способствуют устойчивости к агентам, нацеленным на EGFR [Alsaħafi и др., 2019; Madoz-Gúrpide и др., 2015].

Нарушения в сигнальном каскаде PI3K/AKT/mTOR при ПРГШ-распространенное явление и в 90% случаев наблюдается его активация

[Marquard, Jücker, 2020]. PI3K представляют собой класс ферментов, жизненно необходимых для роста, дифференцировки и выживания клеток, активируемых RTK, такими как EGFR. Другими членами пути являются комплексы mTOR (mTORC1 и mTORC2) и Akt. mTORC2 необходим для фосфорилирования Akt и активации других сигнальных молекул пути PI3K, включая SGK1 [Broek Vander и др., 2015]. Посредством фосфорилирования активированная АКТ активирует нижестоящий mTOR или ингибирует Bad, каспазу 9 и другие белки, регулируя пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и миграцию клеток. Предполагается, что PI3K фосфорилирует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) и превращает его в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3)[Engelman, Luo, Cantley, 2006]. PIP3 может быть дефосфорилирован с помощью фосфатазы и гомолога тензина (PTEN), что, в свою очередь, блокирует путь PI3K/АКТ/mTOR [Maehama, Dixon, 1998; Zhang, Steinberg, 2000]. Активация сигнального каскада PI3K/АКТ/mTOR при ПРГШ связана с терапевтической резистентностью, в частности с резистентностью к ЛТ [Su и др., 2022], что обусловлено индукцией механизмов репарации ДНК в опухолевых клетках [Glorieux, Dok, Nuyts, 2020].

Сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) играет ключевую роль в процессах пролиферации, дифференцировки, метастазирования и лекарственной резистентности опухолевых клеток [Braicu и др., 2019; Ullah и др., 2022]. Путь МАРК состоит из RAS (H/K/NRAS), RAF (A-/B-/C-RAF), митоген-активируемой протеинкиназы-киназы (MEK, MEK1/2), внеклеточной сигнальной регулируемые киназы (ERK, ERK1/2), адаптерных молекул (GRB2, SHC1/2/3/4) и фосфатазы двойной специфичности (DUSP3/5/6/7/9), которые являются специфическими негативными регуляторами ERK [Ngan и др., 2022]. Было продемонстрировано, что активация нескольких киназ, включая BRAF, KRAS, HRAS и ERK1/2, индуцирует канцерогенез и способствуют усилению инвазивного потенциала опухолевых клеток различных типов ЗНО клеток [Samatar, Poulidakos, 2014]. При ПРГШ мутации в сигнальном пути МАРК встречаются примерно в 18% случаев [Ngan и др., 2020]. Эти

мутации преимущественно встречаются в генах *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *ERK* [Zhang и др., 2017], почти половина мутаций пути MAPK при ПРГШ выступают ключевыми индукторами канцерогенеза. Для пациентов ПРГШ с высокой внутриопухолевой экспрессией p-MAPK1/3 (p-ERK1/2) характерна худшая выживаемость [Theocharis и др., 2014]. В пути p38/MAPK сверхэкспрессия митоген-активируемой протеинкиназы-киназы 6 (MAP2K6) связана с резистентностью к ЛТ и неблагоприятным прогнозом у пациентов с ПРГШ [Li, Li, Shen, 2018].

Еще одним сигнальным каскадом, связанным с развитием ПРГШ является сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин [Cui и др., 2018; Iwai и др., 2005; Liu, Millar, 2010]. Активация Wnt/ $\beta$ -катенин способствует пролиферации опухолевых клеток, поддерживает фенотип ОСК и увеличивает инвазивный потенциал клеток ПРГШ [Xie и др., 2021]. Данный сигнальный каскад состоит из лигандов Wnt (Wnt1, 2, 3, 3a), трансмембранных рецепторов, внутриклеточных соединений,  $\beta$ -катенина и факторов транскрипции [Yu и др., 2021]. Wnt соединяется с рецепторами клеточной мембраны и контролирует последующую передачу сигналов  $\beta$ -катенина. Активированный внутриклеточный  $\beta$ -катенин транспортируется в ядро клетки и регулирует экспрессию генов, как фактор транскрипции [Valenta, Hausmann, Basler, 2012]. Активация путей Wnt1 и Wnt связана с высокой частотой метастазирования и неблагоприятным прогнозом у пациентов с ПРГШ [Katase и др., 2012]. Кроме этого, за счет повышения активности ОСК, Wnt ассоциирован с противоопухолевой лекарственной устойчивостью при ПРГШ [Warrier и др., 2014]. Интересным является взаимодействие между сигнальными каскадами Wnt/ $\beta$ -катенин и Notch, которое способствует прогрессированию заболевания [Patni и др., 2021].

VEGF, ответственный за неоангиогенез также высоко экспрессируется при ПРГШ и связан с неблагоприятным прогнозом [Micaily, Johnson, Argiris, 2020; Zang и др., 2013]. VEGF (VEGF-A) является членом суперсемейства факторов роста тромбоцитов (PDGF). VEGF стимулирует выживаемость эндотелиальных

клеток и подавляет их апоптоз, активирует миграцию предшественников эндотелиоцитов из костного мозга в очаги ангиогенеза и увеличивает сосудистую проницаемость. Помимо стимуляции ангиогенеза в опухоли, лиганды сигналов VEGF активируют VEGFR1, VEGFR-2, VEGFR-3 и корецепторные нейропилины (NRP-1, NRP-2)[Christopoulos и др., 2011] на клеточной мембране опухолевых клеток. Активация этих рецепторов запускает фосфорилирование белков, участвующих в трансдукции сигнала и запуску сигнальных каскадов таких как: PI3K/АКТ/mTOR и MAPK, что влечет за собой пролиферацию, повышение миграционной активности опухолевых клеток и их резистентность к противоопухолевым методам лечения (химиотерапии и ЛТ)[Hsu и др., 2014].

Мутации *c-MET* при ПРГШ встречаются нечасто, примерно в 2-13% случаев, в то время как увеличение числа копий MET и повышенная экспрессия его лиганда HGF довольно распространены при ПРГШ [Cho и др., 2016] и связаны с низкой общей выживаемостью пациентов [Rothenberger, Stabile, 2017]. Повышение экспрессии *c-MET* ассоциировано с метастазированием в лимфатические узлы при ПРГШ, а сверхэкспрессия HGF связана с резистентностью к апоптозу [Szturz и др., 2017]. Активация *c-Met* способствует повышенной экспрессии домена плексина, содержащего 2 (PLXDC2), посредством активации передачи сигналов ERK1/2-ELK1. Это приводит к пластичности опухолевых клеток за счет индукции ЭМП и обогащению опухоли ОСК, что приводит к резистентности клеток ПРГШ к ЛТ. Инактивация *c-Met* путем генетического нокдауна или фармакологического агента не только обращает вспять процесс ЭМП, но и существенно замедляет прогрессирование опухоли [Lang и др., 2023]. EGFR и *c-MET* имеют общие нижележащие пути, включая пути RAS-RAF-MAPK и PI3K-АКТ-mTOR. Следовательно, ось MET-HGF представляет собой ценную терапевтическую мишень при ПРГШ и имеет важное значение для пациентов с резистентностью к терапии, нацеленной на EGFR [Madoz-Gúrpide и др., 2015]. Предполагается, что путь HGF/MET

взаимодействует с другими сигнальными путями, включая PI3K/AKT, MEK/ERK, STAT и путь Wnt, способствуя прогрессированию опухоли [Liu и др., 2020a]. В свою очередь взаимодействия, возникающие между путем HGF/MET и EGFR и/или VEGFR способствуют развитию терапевтической резистентности [Raj и др., 2022].

Несмотря на изобилие уже известных генетических изменений при ПРГШ, описанных в источниках литературы (Рисунок 4), немногие из них обладают специфичностью (в отношении данного ЗНО) и могут быть использованы в качестве диагностического или прогностического биомаркера ответа на тот или иной вид противоопухолевого лечения. Это обуславливает острую необходимость в поиске молекулярно-генетических сигнатур, которые могут быть использованы для прогнозирования выживаемости пациентов с ПРГШ или ответа на лечение. Усилия, направленные на разработку таргетной терапии ПРГШ, затруднены геномным ландшафтом этого ЗНО, в котором преобладает потеря или инактивация генов-супрессоров опухоли; отсутствием описания молекулярно-генетических сигнатур специфичных для данного ЗНО [Pickering и др., 2013; Shah и др., 2020; Stransky и др., 2011].

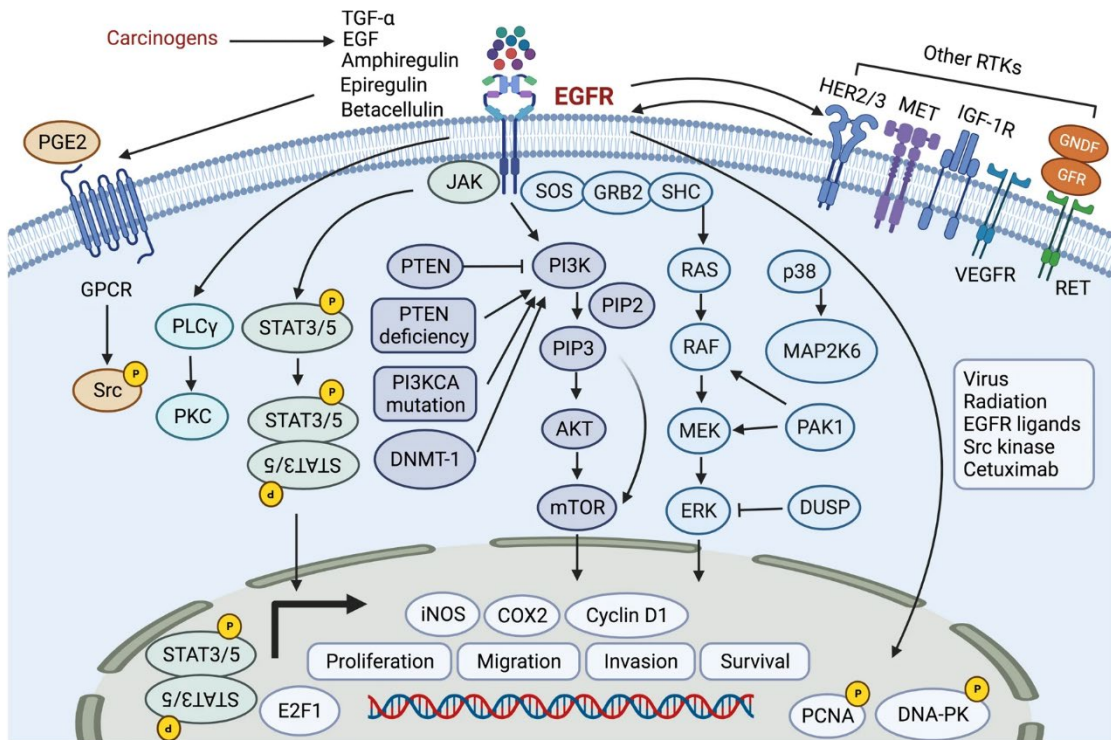


Рисунок 4 – Основные сигнальные каскады ПРГШ [Li и др., 2023]

#### 1.4. Место протонной терапии в лечении плоскоклеточного рака головы и шеи и ее биологические эффекты

Согласно данным, опубликованным Британским Обществом Исследования Рака порядком 75%-85% пациентов с ПРГШ назначается ЛТ. При этом дозы облучения значительны и составляют в среднем 50 Гр при профилактическом облучении лимфатических узлов, и 66 Гр и более при облучении первичной опухоли и пораженных лимфатических коллекторов. Ввиду высоких доз облучения и особенностей анатомически близкого расположения критических структур риск возникновения осложнений довольно высок, что обуславливает необходимость поиска лучших вариантов облучения или модификации имеющихся. На сегодняшний день одним из основных путей повышения эффективности ЛТ считается сочетание максимального повышения дозы в опухоли-мишени при ее минимизации в окружающих здоровых тканях. С



этой точки зрения ПТ обладает выраженным преимуществом по сравнению с различными видами фотонного облучения [Newhauser, 2008; Nuyts и др., 2022].

ПТ представляет собой перспективный вариант ЛТ, от широкого применения которого ожидают решения многих проблем. Протоны — это положительно-заряженные частицы, проникающие в ткань на ограниченную глубину и отдающие большую часть своей энергии в конце своего пробега. Такое физическое явление протонов было названо пиком Брэгга [Bragg, Kleeman, 1904]. Выраженный пик ионизирующего излучения, или пик Брэгга, возникающий в конце пробега протонов через вещество, обуславливает то, что интегральная доза практически всегда оказывается ниже, а облучение здоровых тканей — меньше, чем при фотонной терапии. Благодаря такому распределению дозы в веществе удастся проводить облучение высокими эффективными дозами, на фоне сниженной лучевой нагрузки на окружающие здоровые ткани, что позволяет говорить о возможности улучшения переносимости лечения и снижении количества постлучевых осложнений у пациентов с ПРГШ [Beddok и др., 2020; Water и др., 2011].

Считают, что терапевтический эффект ПТ соответствует ФТ и заключается в повреждении генетического материала опухолевых клеток, которое приводит к нарушению нормального клеточного цикла и, в конечном итоге, к клеточной гибели [Jumaniyazova и др., 2023a; Vitti, Parsons, 2019]. Прямой эффект протонного облучения заключается в индукции повреждения ДНК разного рода: повреждения оснований ДНК, участки потери оснований (abasic сайты), одноцепочечные и двуцепочечные разрывы ДНК, которые наблюдаются наиболее часто. В дополнение к прямому повреждающему действию ПТ свойственен косвенный эффект, усиливающий повреждающее действие на ДНК и обеспечивающий цитотоксичность за счет образования активных форм кислорода (АФК) [Bernier, Hall, Giaccia, 2004]. При этом ПТ отличается индукцией более стойкого апоптоза клеток, что обусловлено сильным расщеплением каспазы-3 протонами [Alan Mitteer и др., 2015]. Кроме этого,

протоны оказывают антиинвазивный и антимиграционный эффекты на опухолевые клетки. Girdhani и др. показали более низкие уровни миграции и инвазии раковых клеток после протонного облучения по сравнению с фотонным [Girdhani, Sachs, Hlatky, 2015]. ПТ может индуцировать и иммуногенную гибель опухолевых клеток. В первую очередь, это связано с рекрутированными АПК (дендритными клетками) [Meng и др., 2010], которые под действием облучения начинают процессинг опухоль-ассоциированных антигенов и перекрестную презентацию антигенных пептидов на главном комплексе гистосовместимости класса I (МНС I), (экспрессия которого является радиоиндуцированной) [Galluzzi и др., 2020]. Перекрестная презентация опухолевых антигенов ведет к активации опухолеспецифических Т-лимфоцитов и их проникновению в толщу опухоли [Lugade и др., 2005]. Также может происходить другой тип активации, характеризующийся повышением продукции интерферона типа I (IFN), которая способствует активации как ДК, так и Т-клеток [Mirjolet и др., 2021; Zhang и др., 2020].

В исследовании Lupu-Plesu M. et al. на модели ПРГШ было показано, что ПТ приводила к снижению экспрессии факторов, участвующих в лимфо- и ангиогенезе, воспалении и иммунной толерантности [Lupu-Plesu и др., 2017]. Это предполагает выживание опухолевых клеток с менее агрессивным фенотипом после облучения протонами. Клетки, выжившие после трех циклов облучения протонами, продемонстрировали пониженную экспрессию проангиогенных/провоспалительных генов, за исключением *VEGF-c*, в то время как большинство других генов были, напротив, активированы после облучения фотонами. Это наблюдение показывает, что ПТ приводит к менее выраженному лимфангиогенезу и метастазированию, по сравнению с классической фотонной ЛТ. Исследователи показали, что протонные и фотонные излучения по-разному модулируют экспрессию провоспалительных генов в клетках ПРГШ. Среди оцененных генов самый высокий уровень мРНК был выявлен у гена *IL-8* [Fujita и др., 2014]. Концентрация IL-8 оказывает значительное влияние на

безрецидивную выживаемость пациентов с ранней стадией ПРГШ [Huang и др., 2010]. Поэтому понимание механизмов ингибирования эффектов передачи сигналов IL-8 при облучении протонами может иметь потенциальную терапевтическую значимость. В отличие от фотонного, протонное облучение снижает экспрессию IL-6 на уровне мРНК. В свою очередь, экспрессия IL-6 ассоциирована с плохим ответом на ХЛТ и неблагоприятным прогнозом у пациентов с ПРГШ [Lupu-Plesu и др., 2017]. В целом же, в доступной литературе не так много сведений об иммуномодулирующем потенциале протонов. Однако были опубликованы отчеты о повышении [Ando и др., 2013; Shimokawa и др., 2016] или, как минимум сопоставимых с фотонами [Gameiro и др., 2016], иммуностимулирующих свойствах.

Кроме иммуномодулирующего эффекта ПТ может оказывать и иммуносупрессивное воздействие, путем индукции инфильтрации опухоли регуляторными Т-лимфоцитами, или стимулируя макрофаги М2 фенотипа и другие клетки миелоидного происхождения, обладающие иммуносупрессивным потенциалом [Wennerberg и др., 2017]. Данные об известных биологических эффектах ПТ приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Обобщение эффектов ПТ [Jumaniyazova и др., 2023a]

Критерии оценки воздействия	Эффекты протонного облучения
Физические особенности	Протоны осаждают относительно низкую дозу вблизи поверхности тела и испускают максимальную энергию непосредственно перед тем, как достигают «мишени» [Bernier, Hall, Giaccia, 2004; Vitti, Parsons, 2019]; Способствуют образованию АФК, которые усиливают цитотоксическое действие облучения.

## Продолжение таблицы 2

ДНК		Неоднородные, частые повреждения ДНК, преимущественно двуцепочечные разрывы.
Клетки микроокружения опухоли	ФАО	Повреждает ДНК ФАО, индуцирует активацию p53 с последующей остановкой клеточного цикла [Diegeler, Hellweg, 2017]
	Макрофаги	Способствует перепрограммированию макрофагов M2 в M1 фенотип (посредством активации NFκB, MAPK и IRF/STAT)[Genard и др., 2018].
	NK-клетки	ПТ индуцирует экспрессию лигандов NKG2D - активирующего рецептора для NK-клеток.
	Дендритные клетки	Активация активного процессинга опухоль-ассоциированных генов. Стимулирует миграцию АПК в регионарные лимфатические узлы, где усиливается праймирование Т-клеток для инициации цитотоксического иммунного ответа
	Т-клетки	Индукция Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа [Mirjolet и др., 2021]
	Эндотелиальные клетки	Дисфункция эндотелиальных клеток и апоптоз [Bernardo и др., 2023; Jang и др., 2008].
Ангио/лимфогенез	Протонное облучение приводит к снижению экспрессии факторов, участвующих в лимфо\ангиогенезе [Jang и др., 2008].	

Нельзя не отметить преимущество ПТ с точки зрения токсического профиля, которое связано с физическими особенностями протонов, которые обеспечивают уменьшение повреждения здоровых окружающих опухоль тканей, а значит и

меньшее количество нежелательных явлений, и не только локальных, но и системных [Khmelevsky и др., 2018; Lautenschlaeger и др., 2019; Uemura и др., 2022] Минимизация количества нежелательных явлений обеспечивает повышение качества жизни и сокращение перерывов между курсами противоопухолевого лечения у пациентов, получающих ЛТ.

Растет интерес к сочетанию ПТ с иммунотерапевтическими агентами для использования потенциального синергизма в лечении ПРГШ. Как было сказано выше, ПТ индуцирует иммуногенную гибель опухолевых клеток, которая может быть дополнительно усилена анти-PDL1 препаратами [Lee, Zeng, Rengan, 2018; Abstracts 869, 2022]. Кроме этого, была продемонстрирована способность ПТ значительно увеличивать экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани дозозависимым образом *in vitro* и *in vivo* [Chen и др., 2023].

Расширение представления о биологических эффектах ПТ позволит в дальнейшем лучше понимать механизмы взаимодействия с опухолевой и перитуморальной тканями, что в свою очередь, позволит оптимизировать стратегии лечения онкологических заболеваний.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика пациентов

Работа выполнена на образцах ткани (опухолевой и ткани перитуморальной области), полученных 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). Всем участникам исследования была предоставлена информация о предстоящем исследовании, всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Перед включением пациентов в исследование протокол исследования, информация для пациента и форма согласия были одобрены независимым комитетом по этике (протокол №634 заседания этического комитета от 17.11.2021 г., протокол № 684 заседания этического комитета от 02.03.2022г.) Исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской 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. Участников идентифицировали только по номеру пациента.

#### *Критерии включения пациентов в исследование*

Пациенты были включены в исследование только в том случае, если они удовлетворяли нижеперечисленным критериям:

1. мужчины и женщины старше 18 лет;

2. морфологически и/или рентгенологически верифицированный диагноз плоскоклеточного рака в области головы и шеи (C00-C14, C30-C33);
3. общее состояние по шкале Карновского не менее 70 баллов;
4. наличие информированного согласия на участие в клиническом исследовании (для этапа нейтронного облучения).

#### *Критерии не включения пациентов*

Пациенты были исключены из исследования по любой из следующих причин:

1. острое инфекционное заболевание;
2. беременность или период лактации;
3. тяжелые конкурирующие заболевания, несовместимые по мнению исследователя с возможностью взятия биоматериала и/или проведением нейтронной терапии;
4. психические заболевания;
5. невозможность соблюдения предельных лучевых нагрузок на критические структуры.

#### *Критерии исключения пациентов из клинического исследования*

Пациент имеет право в любое время отозвать свое согласие на участие в клиническом исследовании без ущерба для дальнейшего лечения. Участие больного может быть прекращено по решению лечащего врача и заведующего отделением; при появлении нежелательных явлений, не связанных с проведением протонной терапии; при несоблюдении правил нахождения в лечебном учреждении; иным причинам по усмотрению врача.

Среди пациентов преобладали мужчины 56,25%, доля пациентов женского пола составила 43,75%. Средний возраст пациентов составил 57,3 года (от 19 до 83 лет). Все пациенты ранее не получали ЛТ (Таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика пациентов

Параметры	Пациенты n (%)
<i>Общее количество</i>	80 (100%)
<i>Пол</i>	
Мужчины	45 (56,25%)
Женщины	35 (43,75%)
<i>Возраст (годы)</i>	
Медиана	57,3
Диапазон	19-83
<i>Степень злокачественности</i>	
<i>G1</i>	39 (48,75%)
<i>G2</i>	36 (45%)
<i>G3</i>	5 (6,25%)
<i>Кератинизация</i>	
<i>Неороговевающий</i>	53 (66,25%)
<i>Ороговевающий</i>	27 (33,75%)
<i>T стадия</i>	
1	3 (3,75%)
2	15 (18,75%)
3	36 (45%)
4	26 (32,5%)
<i>N стадия</i>	
0	63 (78,75%)
1	8 (10%)
2	9 (11,25%)
<i>M стадия</i>	
0	77 (96,25%)
1	3 (3,75%)
<i>Локализация</i>	
<i>Ротовая полость</i>	25 (31,25%)
<i>Язык</i>	25 (31,25%)
<i>Гортань</i>	20 (25%)
<i>Верхнечелюстная пазуха</i>	6 (7,5%)
<i>Глазница</i>	
<i>Кожные покровы (ушная раковина и кожа затылочной области)</i>	2 (2,5%) 2 (2,5%)
<i>Эпизод заболевания</i>	63 (78,75%)
<i>Впервые выявленная опухоль</i>	
<i>Рецидив</i>	17 (21,25%)



## 2.2. Дизайн исследования

В рамках данной работы проведено комплексное сравнительное исследование клеточных и молекулярно-генетических сигнатур опухолевой ткани ПРГШ и ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов. В ходе последующего сопоставления клинических эффектов и транскриптомных профилей пациентов выявлены дифференциальные молекулярно-генетические сигнатуры-потенциальные предикторы ответа на ПТ (Рисунок 5).

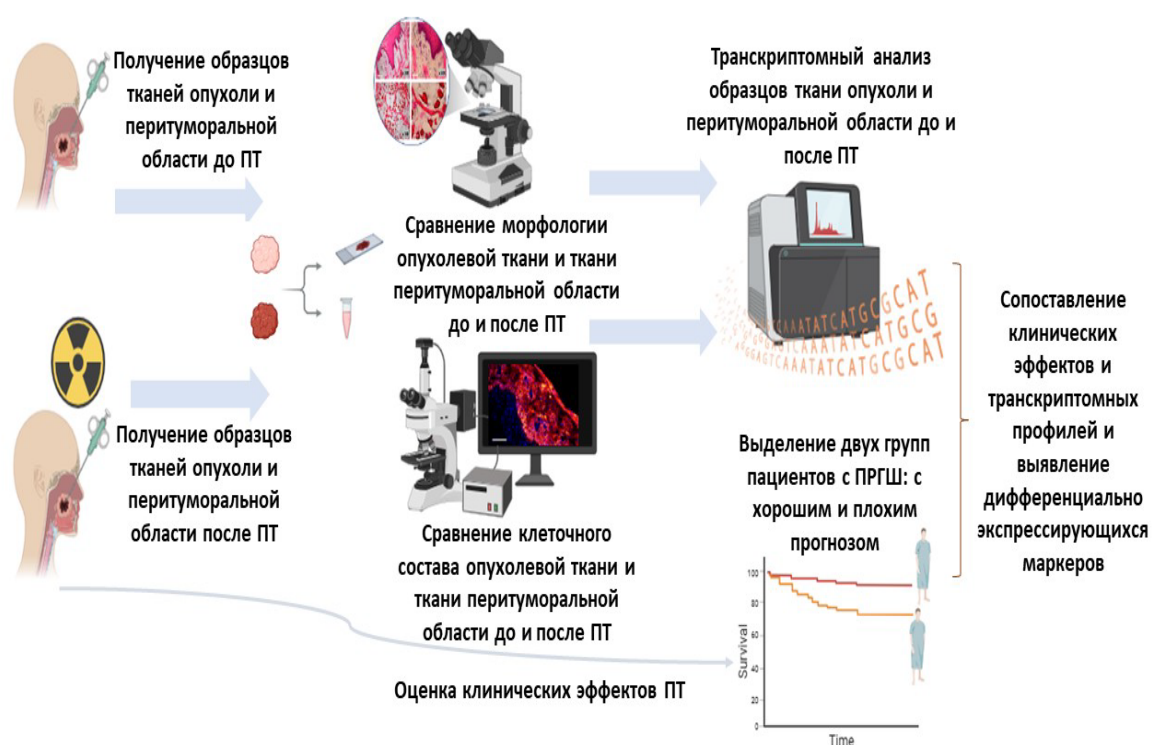


Рисунок 5 – Дизайн исследования

### 2.3. 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 «Протом», Россия), (регистрационное удостоверение РЗН 2015/3242 от 28.12.2017). Комплекс включает синхротрон и системы формирования терапевтического пучка, укладки и фиксации пациента, рентгеновской томографии для точного позиционирования пациента и 3D-планирования терапии (Рисунок 6). Облучение пациентов проводилось по протоколу «DAHANCA Radiotherapy Guidelines 2020». Реализованная методика облучения узким карандашным пучком и система выбора энергии облучения обеспечивают точность, недоступную классической ЛТ. Шаг выбора энергии на ускорителе «Прометеус» составляет 0,1 МэВ, что делает возможным планирования процедуры облучения в направлении распространения пучка с субмиллиметровой точностью. Размер пучка в ортогональной плоскости составляет не более 3 мм для 150 МэВ. 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 [Gordon и др., 2024], (Рисунок 7). 100% выпущенного пучка достигает опухоли. Процедура облучения происходит довольно быстро: 1-2 минут уходит на иммобилизацию и верификацию положения пациента, 1-5 минут длится облучение. Общее время процедуры составляет 7-10 минут.



Рисунок 6 – Внешний вид протонного синхротрона комплекса протонной терапии «Прометеус» г.Обнинск



А



Б

Рисунок 7 – А–Процесс подготовки пациента к процедуре облучения протонным пучком ускорительной системы «Прометеус» в МРНЦ им. Цыба в Обнинске;

Б–Внешний вид термопластической маски

## **2.4. Забор опухолевой ткани и ткани перитуморальной области**

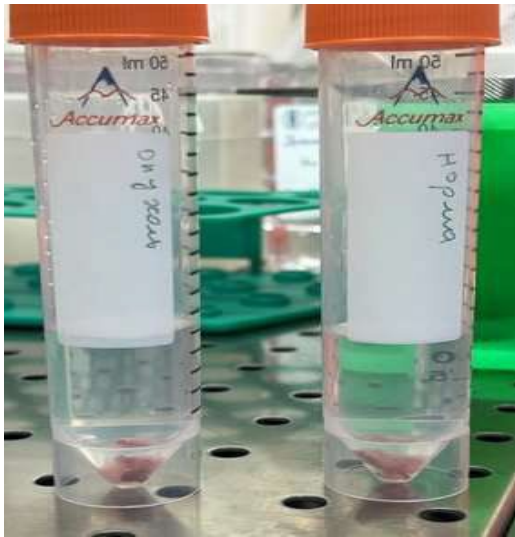
Материал для проведения запланированного объема исследований был получен от пациента путем забора диагностической щипковой биопсии или получен в ходе проведения хирургического этапа лечения.

За 8-12 часов пациентом осуществляется прием противорвотных средств (метоклопрамид). За 30 минут до взятия биопсии – повторный прием метоклопрамида, введение инъекционных нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. При необходимости премедикация наркотическим седативными препаратами. Биопсия проводилась врачом-онкологом в условиях операционной. В качестве образцов перитуморальной ткани использовались биоптаты визуально неизменной ткани на расстоянии от 0.8-1.5 см от видимого края опухоли. Забор ткани опухоли и перитуморальной области осуществлялся в объеме не менее 3-5 мм<sup>3</sup>. Образцы ткани помещались в маркированные пробирки с транспортной средой.

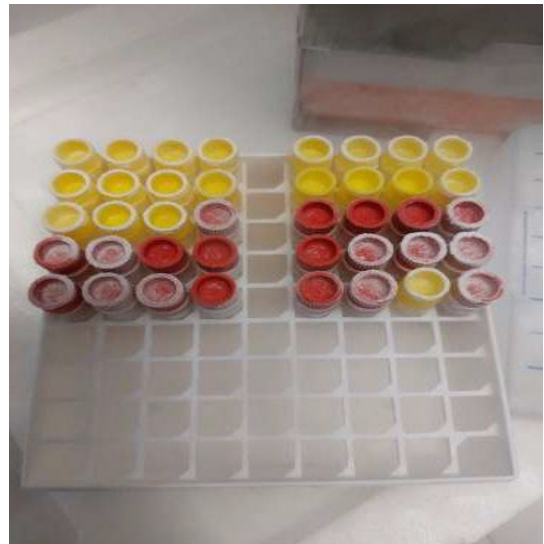
## **2.5. Транспортировка биоматериала и его хранение**

Биопсийные образцы опухолевой ткани, полученные в ходе биопсии или операционного вмешательства, в течение 3 часов доставлялись в лабораторию. Транспортировка образцов ткани осуществлялась в стерильном контейнере с транспортной средой (DMEM/F12 с антибиотиком-антимикотиком) 4°C, с холодоэлементами. С целью лучшей сохранности структуры ткани и антигенов нами был выбран метод криофиксации образцов. Для этого образец ткани помещали в заранее изготовленную форму из фольги и заливали Tissue-Tek OCT Compound (Sakura, США), после чего замораживали, погружая в изопентан,

охлаждаемый жидким азотом. Замороженные образы хранились в морозильнике при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для проведения секвенирования и ПЦР-РВ образцы ткани замораживали в растворе RNA-later (QIAGEN), (Германия) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения исследований (Рисунок 8).



А



Б

Рисунок 8 – А–Операционный материал (опухолевая и перитуморальная ткань пациента с ПРГШ), доставленный в культуральную лабораторию;

Б–Криоконсервированные образцы, подготовленные для исследования: 10 наборов по 4 биоптата от каждого пациента (опухолевая ткань до и после облучения + перитуморальная ткань до и после облучения). Макрофотографии

## 2.6. Гистологическое исследование и иммуногистохимическое исследование

Для изготовления криосрезов (толщина 7 мкм) использовали криотом CM1900 (Leica, Германия) и стекла SuperFrost, (Менцель, Германия). Препараты

были зафиксированы 4% параформальдегидом (Panreac), (Барселона, Испания), а затем окрашены гематоксилином и эозином или по методу Маллори (все реактивы Bio-Optica), (Милан, Италия). После проводки препаратов и их просветления ксилолом завершали процесс заключением препарата в бальзам (монтирующую среду) Витрогель (BioVitrum), (Россия).

Результат окрашивания оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Leica Microsystems), (Германия). 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  $\times 400$ . Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США), различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

С целью проведения ИГХ исследования и идентификации маркеров различных клеток, согласно протоколу производителя Abcam (Великобритания), срезы были окрашены антителами, указанными в Таблице 4. 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 клеточных ядер. DAPI (4',6-диамидино-2'-фенилиндо́л, дигидрохлорид) представляет собой нуклеотидспецифичный флуорохром, при окраске которым наблюдается свечение хроматина в клеточных ядрах. Препараты, покрытые раствором DAPI (Sigma, Япония), инкубировали при 37°C в течение получаса, после чего отмывали в фосфатно-солевом буфере. Для заключения препаратов использовали среду Aqua-PolyMount (Polysciences), (США). Полученные препараты исследовали на прямом флуоресцентном микроскопе Leica DM 4000 B (Leica Microsystems, Германия) и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587.

Таблица 4 – Антитела, используемые для ИГХ исследования

№	Наименование	Каталожный номер	Производитель
1	mouse to human Vimentin	ab8978	Abcam
2	mouse to human E Cadherin	ab1416	Abcam
3	rabbit to human KR 17	ab53707	Abcam
4	rabbit to human KR 5	ab52635	Abcam
5	rabbit to human KR 10	ab76318	Abcam
6	rabbit to human Ki-67	ab15580	Abcam
7	rabbit to human p63	ab53039	Abcam
8	rabbit to human CD44	ab243894	Abcam
9	rabbit to human KR 13	PAB875Hu01	Cloud Clone
10	rabbit to human ALDH1A1	PAE824Hu01	Cloud Clone
11	rabbit to human Pdpn	PAC719Hu01	Cloud Clone
12	rabbit to human SCCA1/SCCA2	PAB814Hu02	Cloud Clone
13	rabbit to human CD68	DF7518	Affinity

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.

## **2.6. Первичная обработка биоптата ткани для изолирования культуры клеток**

Материал тщательно отмывали от возможных контаминирующих агентов в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,02% ЭДТА (растворе Версена), затем в фосфатно-солевом буфере, содержащем  $1 \times$  антибиотик-антимикотик, затем в фосфатно-солевом буфере или растворе Хенкса без добавок. В каждом растворе ткань промывали 3 раза. Затем ткань с помощью хирургических инструментов максимально полно очищали от окружающих ее тканей, а также участков обугленной ткани. Оставшийся материал еще раз промывали в фосфатно-солевом буфере без добавок, небольшой фрагмент замораживали для дальнейшего гистологического исследования, основную часть измельчали с помощью ножниц.

Диссоциирующий раствор готовили непосредственно перед использованием. В культуральную среду DMEM/F12 добавляли коллагеназы I, II и IV до концентрации 1 мг/мл, 5 мМ  $\text{Ca}^{++}$  (из раствора  $\text{CaCl}_2$ ) и ДНКазу I до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Перед использованием готовый раствор подогревали на водяной бане до  $37^\circ\text{C}$ . В пробирку вносили измельченную ткань и добавляли 5-кратный объем диссоциирующего раствора. Инкубацию проводили при  $37^\circ\text{C}$  в условиях постоянного перемешивания с помощью орбитального шейкера (режим 50 об/мин). Инкубацию останавливали после диссоциации всех визуализируемых фрагментов ткани либо через 60 минут после начала.

Суспензию изолированных из ткани клеток разбавляли раствором Хенкса или фосфатно-солевым буфером в 10 раз и пропускают через нейлоновое сито с размером ячеек 100 мкм, после чего осаждали центрифугированием при 200g.



Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса, добавляли 10-кратный объем лизирующего эритроциты буфера и инкубировали в соответствии с протоколом, предлагаемым производителем, после чего снова осаждали центрифугированием при 200g. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл охлажденного до 4°C 2% параформальдегида. Перед измерением промывали фосфатно-солевым буфером 5 мин при 1500 g.

## **2.7. Проточная цитофлюориметрия**

Метод проточной цитофлюориметрии использовали с целью оценки экспрессии специфических поверхностных и внутриклеточных маркеров. Выявляли антигены при помощи антител конъюгированных с флуорохромами путем детекции флуоресцентного сигнала специальным прибором- проточным цитофлюориметром.

С целью детекции внутриклеточных маркеров (Vimentin) осуществляли пермеабиллизацию и фиксацию клеток при помощи набора Inside Stain (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, предложенной 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 отбирали и ресуспензировали 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 2.

## **2.8. Исследование транскриптома ПРГШ до и после протонного облучения**

### **2.8.1. РНК-секвенирование биопсийного материала ПРГШ, полученного от пациентов до и после облучения сканирующим пучком протонов**

Биоптаты опухолевой ткани и ткани перитуморальной области были получены от 30 пациентов с ПРГШ до и после протонного облучения 2 Гр 5 фракций, СОД 10 изоГр (коэффициент относительной биологической эффективности, ОБЭ, 1,1). Биоматериал был обработан и измельчен в асептических условиях стерильными хирургическими инструментами. Далее ткань подвергали гомогенизации с тefлоновыми бусинами в QIAzol (Qiagen), (Германия) с последующей очисткой и концентрацией набором RNA Clean & Concentrator (Zymo Research, США). С использованием того же набора выделяли тотальную РНК, ее количество 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 инструкции 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 (ПЦР) в реальном времени на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Финальные варианты библиотек объединяли в эквимоллярных 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 RTA 1.17.21.3 и Casava 1.8.2 (Illumina).

### 2.8.2. Биоинформатический 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. Hobotnica – инструмент для оценки качества инструментов вычисления дифференциальной экспрессии [Stupnikov и др., 2022]. Инструмент основан на подходе количественной оценки качества на основе способности к разделению данных разных экспериментов на основе матриц расстояний. Порогом дифференциальной экспрессируемости считались значения  $|\log_2FC| > 1$ , статистической значимости  $p < 0.05$  для DESeq2, limma-voom и edgeR,  $q > 0.9$  для NOISeq и  $|\log_2FC| > 1$ , PPDE  $> 0.95$  для EBSeq (Таблица 5). Для множественного сравнения для расчета p-value использовалась поправка

Бонферрони совместно с максиминным критерием Вальда (критерий крайнего пессимизма). По итогам сравнения DESeq2 показал лучшие результаты при сравнении образцов до и после облучения [Jumaniyazova и др., 2024b]. Анализ обогащения был выполнен с помощью программного обеспечения PANTHER 17.0 и Enrichr. PANTHER представляет собой инструмент для классификации генов на основе их функций, а также для анализа обогащения генов в биологических путях, процессах и функциях. Enrichr – это веб-инструмент для анализа обогащения генов, который предоставляет информацию о биологических путях, онтологии, регуляторных мотивах и фенотипах, связанных с набором генов. Для анализа были использованы списки значимо повышенных и значимо пониженных генов после ПТ в ткани перитуморальной области и опухолевых биоптатах у пациентов с ПРГШ. После проведения анализа программой PANTHER и Enrichr были получены списки обогащенных биологических путей, процессов и функций с учетом значимо повышенных и значимо пониженных генов. Результаты анализа интерпретировали с учетом биологической значимости обогащенных функций и путей относительно изучаемой биологической системы. Порогом статистической значимости для включения сигнального пути в список обогащенных являлось значение  $p < 0.05$ .

Таблица 5 – Значение оценки качества инструмента дифференциальной экспрессии, полученной с помощью инструмента Hobotnica

Инструмент	Hobotnica score
DESeq2	1
EBSeq	0.96
edgeR	0.5
limma-voom	0.5
NOISeq	0.67

## 2.9. 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. В течение наблюдения за пациентами оценивалась общая выживаемость, болезнь-неспецифическая выживаемость.

## 2.10. Полимеразная цепная реакция

На первом этапе выделяли тотальную РНК, затем на матрице зрелой матричной РНК, используя случайные праймеры и РНК-зависимую ДНК-полимеразу синтезировали одноцепочечную молекулу кДНК. Полученную кДНК использовали для приготовления реакционной смеси для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для оценки уровней экспрессии выбранных генов *KR1*, *KR6b*, *KR16* были подобраны праймеры, при этом использовали онлайн-ресурс Primer-BLAST, интегрированный в базу данных национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Праймеры сконструированы с соблюдением общепринятых требований: соотношение GC оснований, температура плавления в пределах 59-63<sup>0</sup>С, отсутствие самокомплементарных участков в последовательности.

Праймеры были синтезированы коммерческой компанией Евроген (Россия). Олигонуклеотидные последовательности праймеров приведены в Таблице 6.

Таблица 6 – Характеристика праймеров

Название	Последовательность праймеров	Размер продукта
keratin 1 ( <i>KR1</i> )	Forward primer AAAGCTGAGGCCGAGTCCTT Reverse primer CTGATGGACTGCTGCAAGTTGG	185 п.н.
keratin 16 ( <i>KR16</i> )	Forward primer AGCAGAGCCAGGAGTACCAGA Reverse primer ACGGCTCGAAGAGGACGAG	176 п.н.
keratin 6b ( <i>KR6b</i> )	Forward primer GGGGGAACGGGGTCGTC Reverse primer CAGGTTGCGGTTGTTGTCCAT	298 п.н.
Референсный ген		
GAPDH	Forward primer GCACCGTCAAGGCTGAGAAC Reverse primer TGGTGAAGACGCCAGTGGA	198 п.н.

Экспрессию генов определяли методом ПЦР-РВ с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (ДНК-Технология), (Россия). Для анализа относительной экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу Pfaffl [Pfaffl, 2001] с учетом рекомендаций Vandesompele [Vandesompele и др.,

2002]. Полученные данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism v.8.4.3. (GraphPad Software LLC, США).

### 2.11. Статистические методы обработки данных

В результате статистического анализа данных было выявлено, что исходные данные подчиняются нормальному закону и дисперсии по критерию Левена не различаются, поэтому для сравнения данных были применены параметрические методы (t-критерии) с записью центральных показателей выборок в виде среднего арифметического плюс среднеквадратическое отклонение ( $M \pm s$ ).

Для проверки различий средних изучаемых признаков в исследуемых группах использовали t-критерий, который заключается в проверке нулевой гипотезы о том, что средние значения в группах не различаются. Полученные данные интерпретировали следующим образом:

- если  $p > 0,05$ , то нулевая гипотеза об отсутствии различий групп по изучаемому признаку не отклоняется;
- если  $p < 0,05$ , то нулевая гипотеза отклоняется, и принимается альтернативная гипотеза о существовании различий групп по изучаемому признаку.

Для установления значимости данные, полученных в ходе транскриптомного анализа, подвергали анализу с помощью парного критерия Стьюдента с использованием статистического пакета программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Критерий значимости был установлен на уровне  $p \leq 0,05$ . Для множественного сравнения использовалась поправка Бонферрони совместно с критерием Вальда (критерий крайнего пессимизма), который принято считать самым «осторожным».

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

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

##### **3.1.1. Сравнение клеточного состава опухолевой ткани ПРГШ и ткани перитуморальной области до облучения сканирующим пучком протонов**

##### **Гистологическое и ИГХ исследование**

На первом этапе работы была охарактеризована морфология полученных образцов 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. Опухолевую паренхиму составляли клетки, преимущественно крупные с оксифильной цитоплазмой и округлыми базофильными ядрами, среди которых часто встречались гиперхромные, с удвоенным количеством ядрышек. Поскольку дифференцировка клеток идет с избыточным отложением кератинов (KR), появляются специфические для плоскоклеточного рака морфологические фигуры-раковые жемчужины, представляющие собой очаги гиперкератоза округлой формы с признаками незавершенной кератинизации в центре (Рисунок 9).



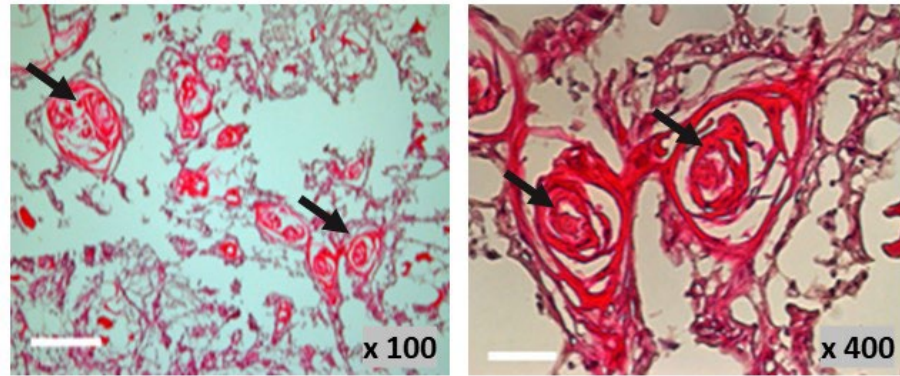


Рисунок 9 – Высокодифференцированный рак языка, раковые жемчужины (обозначены стрелками). Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 100 мкм, 400 мкм

В области инфильтрирующего роста вокруг островков опухолевых клеток отмечается воспалительная реакция в прилежащей строме. Различные формы ПРГШ в зависимости от степени дифференцировки и анатомической локализации опухоли представлены на рисунках 10, 11.

В 66,25% исследованных случаев (53/80) был диагностирован неороговевающий рак, в 33,75% (27/80) – ороговевающий рак, хорошо визуализируемый на препаратах, окрашенных по методу Маллори (Рисунок 12). Среди образцов преобладали опухоли высокодифференцированные, их количество составило 39 (48,75%). Инфильтрирующий рост в образцах высокодифференцированного ПРГШ представлен значительными в размерах участками и, как правило, без признаков периневральной и/или лимфоваскулярной инвазии. В менее дифференцированных образцах инфильтрирующий рост был представлен ограниченными пальцевидными выростами или островками, располагающимися диффузно, отмечались признаки периневральной и/или лимфоваскулярной инвазии.

На рисунке 10 представлен препарат высокодифференцированного плоскоклеточного ороговевающего рака гортани, с обширными полями некроза,

выраженной лимфоплазмочитарной инфильтрацией. В качестве перитуморальной области представлен интактный надгортанник, покрытый многослойным неороговевающим плоским эпителием (Рисунок 10).

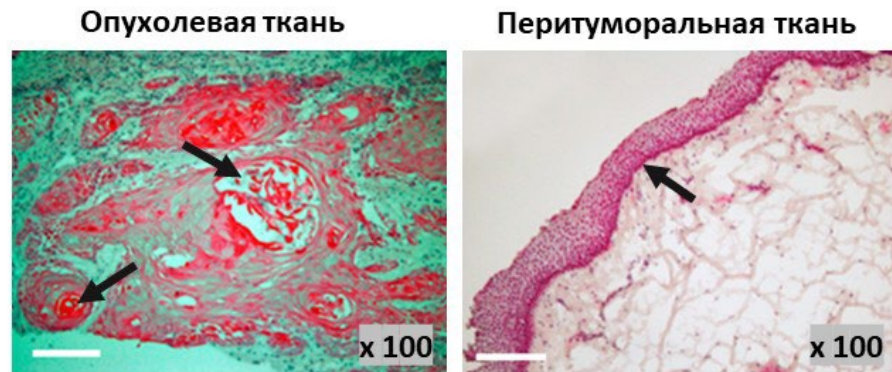


Рисунок 10 – Высокодифференцированный рак гортани. Инвазивный рост в подлежащие ткани плоского эпителия (клетки с эозинофильной цитоплазмой) в виде крупных округлых скоплений, отграниченных от окружающей рыхлой волокнистой соединительной ткани. Формирование раковых жемчужин (указано стрелками). Многослойный плоский неороговевающий эпителий, покрывающий слизистую оболочку гортани в области надгортанника. Целая базальная мембрана (указана стрелкой). Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия,  $\times 100$ . Длина масштабного отрезка 100 мкм

На рисунке 11 представлен высокодифференцированный ороговевающий плоскоклеточный рак языка. В качестве перитуморальной области представлен многослойный плоский ороговевающий эпителий, покрывающий слизистую оболочку боковой поверхности языка (Рисунок 11).

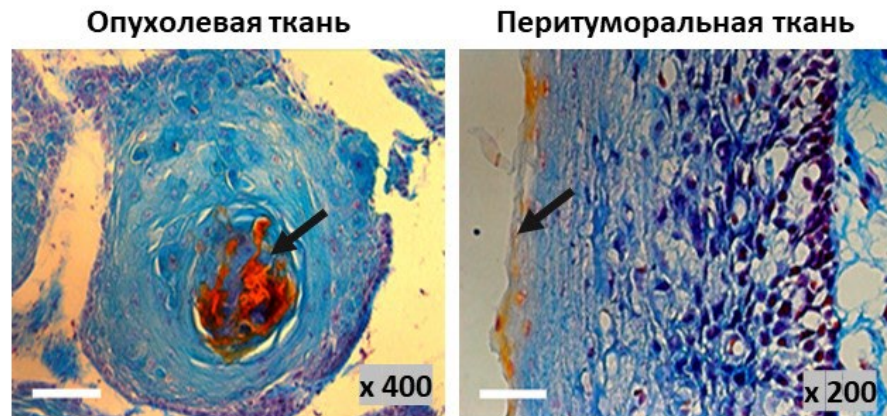


Рисунок 11 – Плоскоклеточный ороговевающий рак языка. В центре раковой жемчужины видны окрашенные в желтый цвет роговые чешуйки (указано стрелкой),  $\times 400$ . Длина масштабного отрезка 50 мкм; многослойный плоский ороговевающий эпителий перитуморальной области, покрывающий слизистую оболочку боковой поверхности языка. Роговые чешуйки желтого цвета (указаны стрелкой),  $\times 200$ . Окрашивание по Маллори. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 200 мкм

Во всех случаях в опухолевой ткани подтверждена обширная инвазия опухолевых клеток в собственную пластинку слизистой оболочки, базальная мембрана частично или полностью разрушена (Рисунок 12 и 13).

Большинство предоставленных образцов ткани перитуморальной области были представлены фрагментами слизистой оболочки различных органов, покрытых многослойным ороговевающим или неороговевающим эпителием. Во всех случаях в перитуморальной ткани сохранена нормальная архитектоника, многослойный эпителий отграничен от собственной пластинки слизистой оболочки сохранной базальной мембраной (Рисунок 12 и 13).



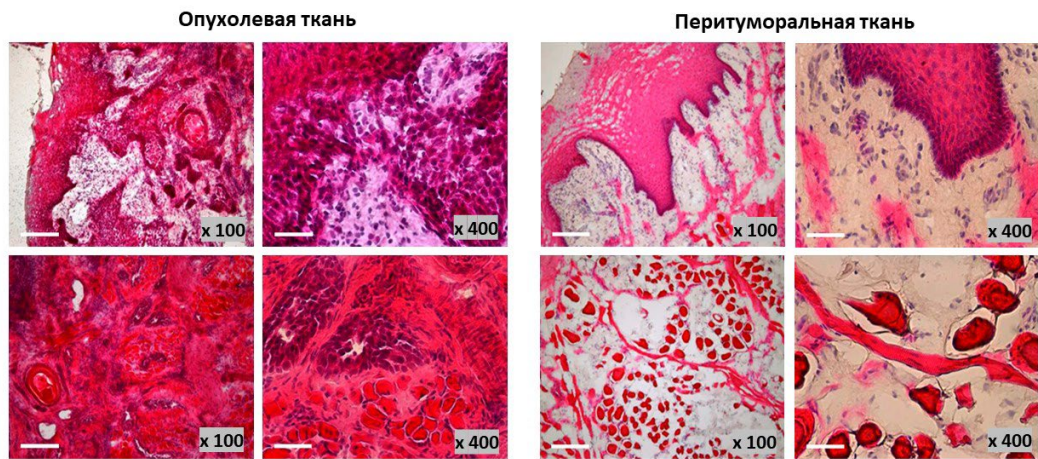


Рисунок 12 – Плоскоклеточный рак боковой поверхности языка и Перитуморальная ткань, срез боковой поверхности тела языка. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 100 мкм и 50 мкм

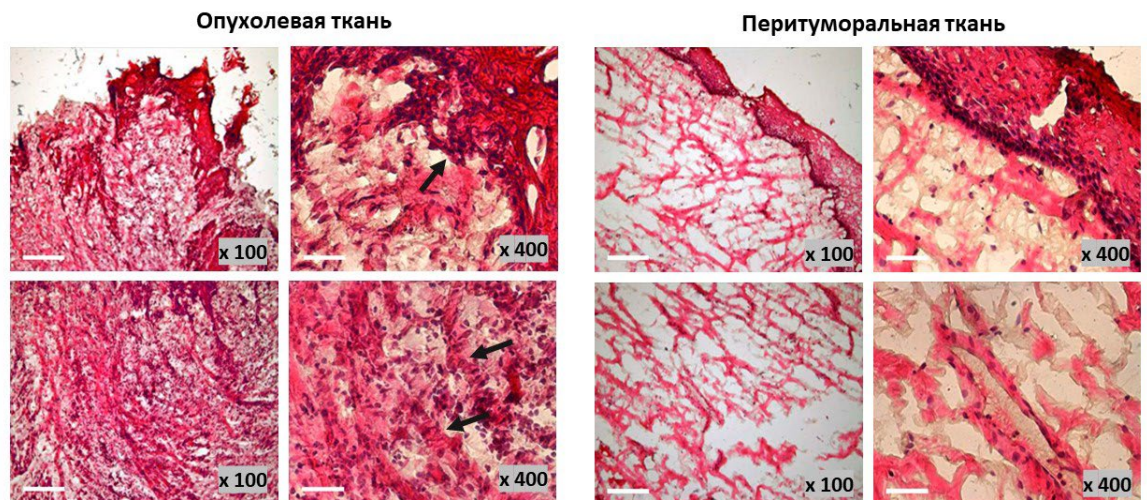


Рисунок 13 – Плоскоклеточный рак дна полости рта и перитуморальная ткань дна полости рта. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 100 мкм и 50 мкм

Для подтверждения происхождения и исследования фенотипа клеток, составляющих ПРГШ и ткань перитуморальной области, на следующем этапе работы было проведено ИГХ исследование. В ходе ИГХ исследования было подтверждено эпителиальное происхождение новообразований: клетки, экспрессирующие Vimentin (маркер клеток мезенхимального происхождения), располагались только в прослойках соединительной ткани, окружающих скопления инвазирующих клеток, а клетки внутри скоплений экспрессировали белок адгезии эпителиальных клеток Е-кадгерин (Рисунок 14). В образцах опухолевой ткани ПРГШ доля клеток, экспрессировавших Vimentin составила  $18,9\% \pm 3,6\%$ , в то время как в образцах перитуморальной области  $-22,4 \pm 1,7\%$ . Количество клеток экспрессирующих Е-кадгерин в образцах опухолевой ткани составляло  $77,6 \pm 4,7\%$ , в ткани перитуморальной области  $83,4 \pm 2,4\%$  (Рисунок 14).

В образцах ПРГШ было выявлено значительное количество клеток, экспрессирующих KR5, количество положительных клеток составило  $95,4 \pm 3,4\%$  и KR17, количество положительных клеток составило  $97,1 \pm 2,1\%$  (Рисунок 14). При этом KR5-положительные (количество положительных клеток составило  $98,0 \pm 1,5\%$ ) и KR17-положительные (количество положительных клеток составило  $94,0 \pm 2,3\%$ ) популяции клеток были выявлены и в ткани перитуморальной области (Рисунок 14), (Таблица 8). KR10 содержался в цитоплазме только высокодифференцированных опухолевых клеток, их количество составляло  $22,2 \pm 3,3\%$ , в то время как в слизистой оболочке органов пациентов с умеренно дифференцированной карциномой KR10+ были только единичные скопления клеток. В многослойном плоском эпителии KR10 экспрессировался в основном в поверхностном слое клеток, их количество составляло  $13,6 \pm 2,4\%$  (Рисунок 14), (Таблица 8).

Далее оценивалась экспрессия двух ядерных маркеров Ki-67 и p63. В опухолевых клетках был выявлен высокий уровень экспрессии маркера пролиферации Ki-67 (экспрессируется во всех фазах – G1, S, G2 и M – клеточного цикла, кроме фазы покоя G0), количество Ki-67+ клеток составило  $52,1 \pm 3,6\%$ . В ткани перитуморальной области около  $25,7 \pm 3,8\%$  клеток многослойного плоского эпителия экспрессировали Ki-67, располагаясь при этом преимущественно в базальном и промежуточном слоях (Рисунок 14). В ядрах опухолевых клеток была выявлена экспрессия опухолевого белка p63 (иначе TP63 от англ. tumor protein 63 или transformation-related protein 63), используемого для дифференциальной диагностики плоскоклеточных карцином [Wang и др., 2020a]; количество p63 положительных клеток в опухолевой ткани составило  $49,3 \pm 1,4\%$  (Рисунок 14). В ткани перитуморальной области p63+ клетки располагались также преимущественно в базальном и промежуточном слоях (Рисунок 16), их количество составило  $21,0 \pm 3,9\%$  (Рисунок 14), (Таблица 7).

Была оценена экспрессия маркеров ОСК. Инвазирующие клетки опухолевой ткани ПРГШ демонстрировали положительную экспрессию маркеров ОСК CD44 (количество положительных клеток составило  $85,6 \pm 2,4\%$ ) и ALDH1A1 (количество положительных клеток составило  $87,2 \pm 2,8\%$ ). Примечательно, что все субпопуляции эпителиальных клеток образцов ткани перитуморальной области экспрессировали поверхностный маркер CD44 также, количество положительных клеток составило  $68,4 \pm 1,5\%$  и количество положительных клеток экспрессировавших ALDH1A1 составило  $63,3 \pm 2,6\%$  (Рисунок 14), (Таблица 7).

В ходе оценки иммунной компоненты опухолевого микроокружения было отмечено, что в подавляющем количестве образцов ПРГШ лимфогистиоцитарная инфильтрация выражена слабо. При этом CD206+ ОАМ были обнаружены как среди инвазирующих опухолевых клеток ( $13,1 \pm 2,4\%$ ), так и в перитуморальной ткани ( $17,5 \pm 2,7\%$ ). А количество CD68+ макрофагов



превалировало в образцах ткани перитуморальной области и составляло  $26,7 \pm 4,1\%$ , тогда как в опухолевой ткани количество  $CD68^+$  клеток составляло  $12,3 \pm 1,6\%$  (Рисунок 14), (Таблица 7).

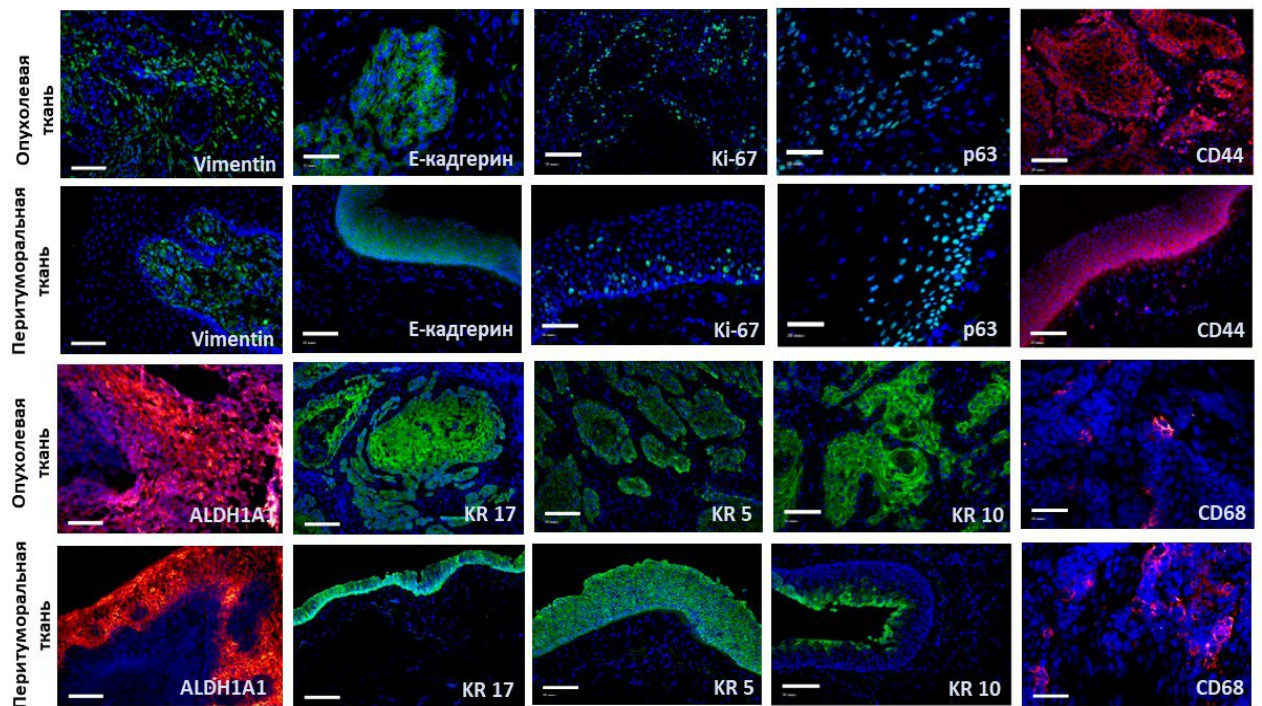


Рисунок 14 – Экспрессия маркеров в тканях опухоли и перитуморальной области. Ядра клеток докрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия,  $\times 200$  и  $\times 400$ . Длина масштабного рисунка 200 мкм и 50 мкм

В ходе сравнения клеточного состава опухолевой ткани и ткани перитуморальной области была оценена экспрессия 11 маркеров. Выявлены статистически значимые различия экспрессии  $CD44$ ,  $ALDH1A1$ ,  $Ki-67$ ,  $p63$ ,  $CD68$  (Таблица 7), (Рисунок 15).

Таблица 7 – Сравнение экспрессии маркеров между опухолевой тканью плоскоклеточного рака головы и шеи и перитуморальной тканью

Экспрессия	Опухолевая ткань, %  M±s n=50	Перитуморальная ткань, %  M±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

Примечание: \* - различия статистически значимы при  $p < 0,05$

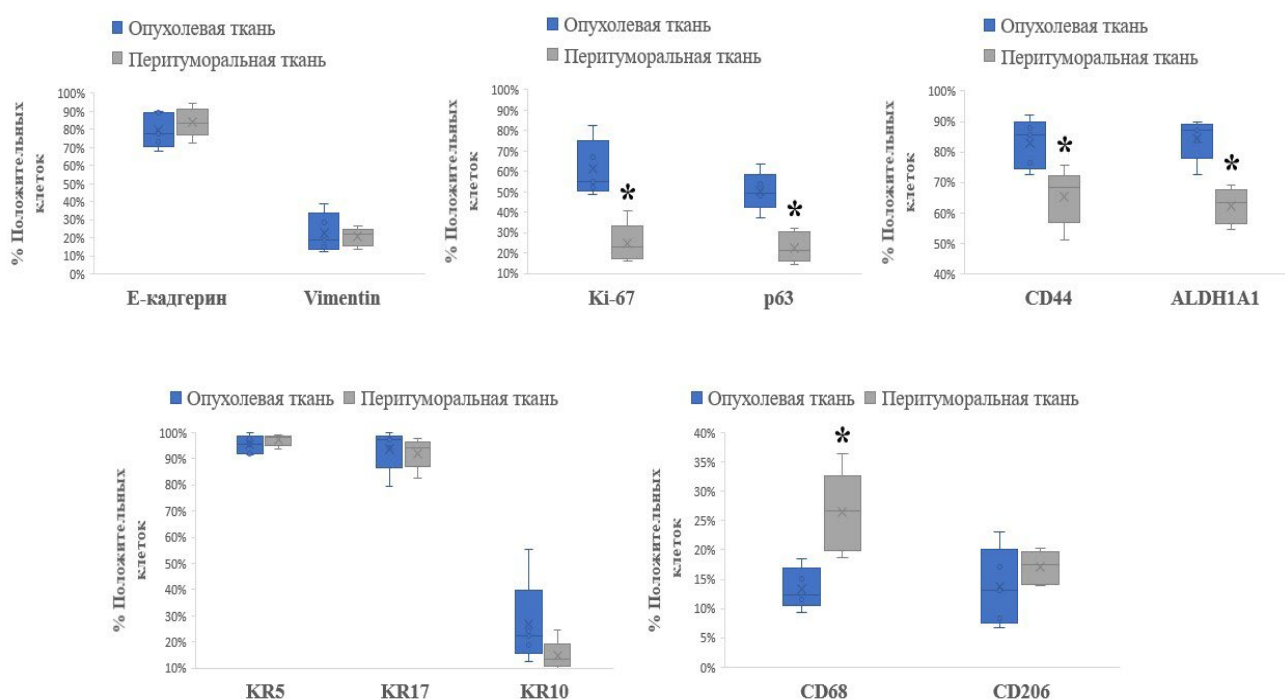


Рисунок 15 – Результирующие данные ИГХ исследования образцов ткани ПРГШ и ткани перитуморальной области. \* –  $p < 0,05$

Во всех случаях в ходе исследования биоптатов опухолевой ткани был подтвержден диагноз «плоскоклеточный рак органов головы и шеи»:



инвазирующие слизистую оболочку опухолевые клетки имели фенотип E-кадгерин+, KR5+, KR17+, CD44+, ALDH1A1+, а стромальные клетки Vimentin+ окружали очаги инвазии. Количество Ki-67+ и p63+ опухолевых клеток варьирует в зависимости от донора, но значительно превышает количество таковых в ткани перитуморальной области.

Исследование образцов ткани перитуморальной области подтвердило корректность забора биоптатов: образцы представляли собой ткань слизистой оболочки различных органов области головы и шеи, покрытых многослойным неороговевающим эпителием с сохранной архитектоникой, без признаков инфильтрации опухолевыми клетками. Во всех случаях в перитуморальной ткани клетки имели фенотип E-кадгерин+, KR5+, KR17+, а Ki-67+ и p63+ клетки локализованы только в базальном слое эпителия, стромальные Vimentin+ клетки находятся в собственной пластинке слизистой оболочки, CD44+, ALDH1A1+ клетки расположены преимущественно в базальном слое эпителия, а также встречаются под базальной мембраной [Soboleva и др., 2024]. Полученные данные подтверждают тот факт, что ни один из вышеназванных маркеров не является опухоль-специфическим и не может изолированно использоваться на этапе диагностики данного ЗНО.

Далее образцы опухолевой и перитуморальной тканей были исследованы методом проточной цитофлуориметрии.

### **Проточная цитофлуориметрия**

Биопсийный материал ткани опухоли и перитуморальной области, полученный до протонного облучения был исследован методом проточной цитофлуориметрии. Была подобрана широкая панель антител против маркеров, отражающих основные клеточные популяции, которые могут присутствовать в полученном биоматериале. На основании параметров прямого и бокового светорассеяния в регион интереса R1 был помещен наиболее многочисленный

пул клеток каждой пробы, исключая клеточный дебрис (Рисунок 16). Иммунофенотипический анализ изолированной культуры клеток биоптата, попавших в регион интереса R1, был проведен на предмет следующих маркеров: CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, Vimentin, CD40, CD86, CD206, CD68, CD56.

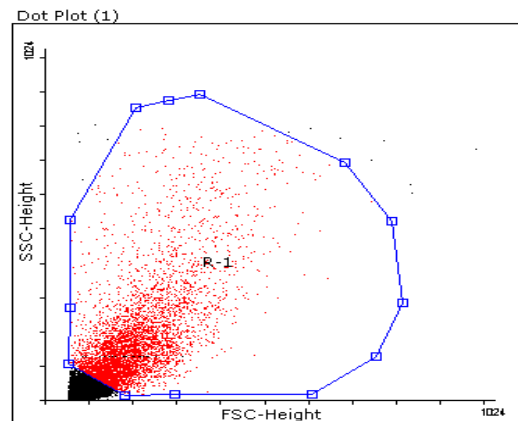


Рисунок 16 – Данные проточной цитофлуориметрии. Репрезентативные дот-плот диаграммы прямого и бокового рассеяния биопсийных образцов. На основании параметров прямого и бокового рассеяния основная популяция клеток была помещена в область интереса (R1), исключаящую клеточный дебрис

### ***Фенотипический анализ клеток ткани ПРГШ***

Было выяснено, что анализируемые культуры клеток биопсии опухолевой ткани были отрицательны по CD146. В среднем лишь 0,24% клеток несли на поверхности маркер CD146 (Рисунок 17). Однако, культуры клеток, полученные из опухолевой ткани, были положительны по маркеру CD90 (в среднем 9,3% CD90+ клеток, соответственно) (Рисунок 17). Полученные результаты позволяют с осторожностью утверждать, что исследуемые биоптаты опухолевой ткани содержат до 10% CD90+ клеток, предположительно, находящихся на стадии ЭМП.

Схожий процент положительно-окрашенных клеток в опухолевой ткани наблюдался по маркеру HLA-DR: в среднем около 13% HLA-DR+ (Рисунок 17). Максимальный процент положительно-окрашенных клеток был получен образцах опухолевой ткани в случае маркера EpCAM (14,7% EpCAM+). Несмотря на эпителиальную природу ткани получаемых биоптатов, процент EpCAM+ клеток оказался не так высок, как ожидалось. Это может быть объяснено особенностями пробоподготовки ткани, претерпевающей энзиматическую дезагрегацию и как следствие – расщепление ряда поверхностных белков-эпитопов антител, в том числе молекул клеточной адгезии, к которым и относится EpCAM.

В среднем 4,9% ткани опухоли были положительны по маркеру Vimentin (Рисунок 17). Так же, как и в случае маркера CD90, полученные результаты, касательно Vimentin+ клеток, указывают на присутствие в пробах мезенхимальных стромальных клеток.

В опухолевых пробах процент клеток, положительных по маркеру CD40, был крайне низок, в среднем 0,7% CD40+ клеток (Рисунок 17).

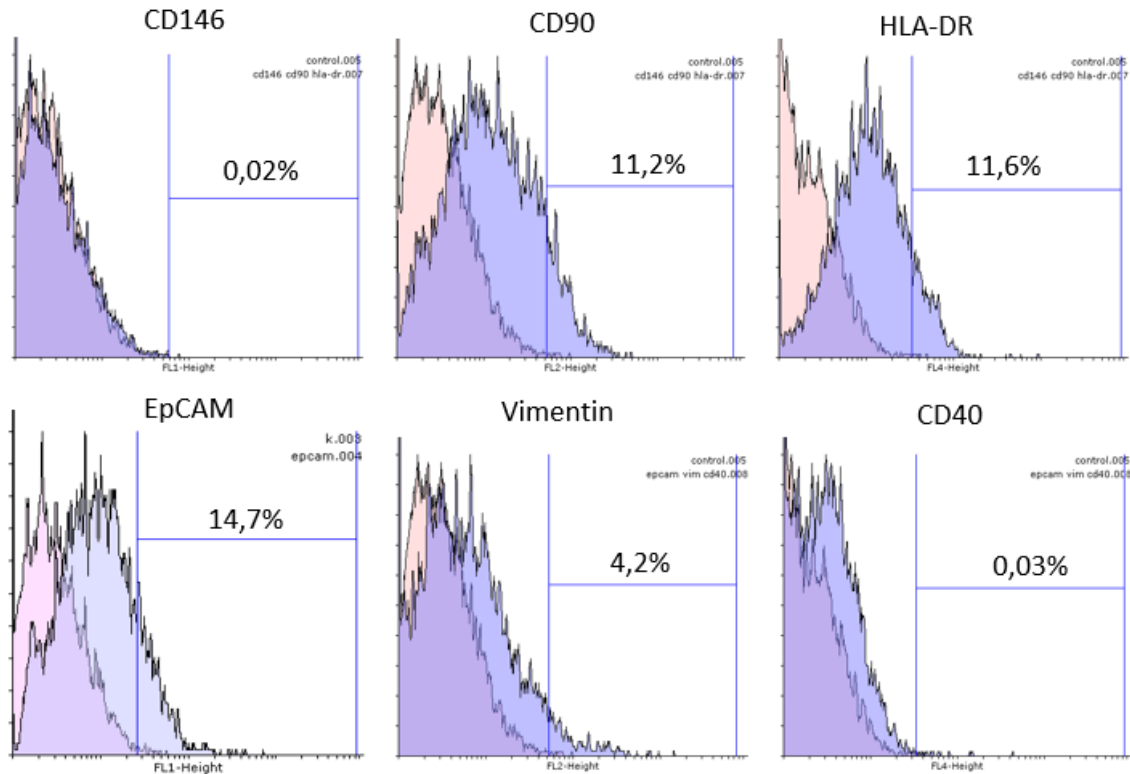


Рисунок 17 – Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии для образцов опухолевой ткани после окрашивания клеток антителами к CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, Vimentin, CD40. Розовый контур – контроль окрашивания. Процентное содержание положительных клеток (голубой контур), указано над маркером

Далее клетки, полученные из биоптата ПРГШ, были исследованы на общий маркер макрофагов CD68 и маркеры провоспалительного (CD86) и противовоспалительного (CD206) макрофагальных фенотипов (Рисунок 20). Было обнаружено, что лишь единичные проценты клеток были положительны по маркерам CD68, CD86 и CD206. Количество клеток, положительных по маркеру NK-клеток – CD56 также не превышало 3% во всех исследуемых образцах (Рисунок 18). На основании этих результатов можно сделать вывод о низком содержании этих иммунных клеток в опухолевой ткани ПРГШ.

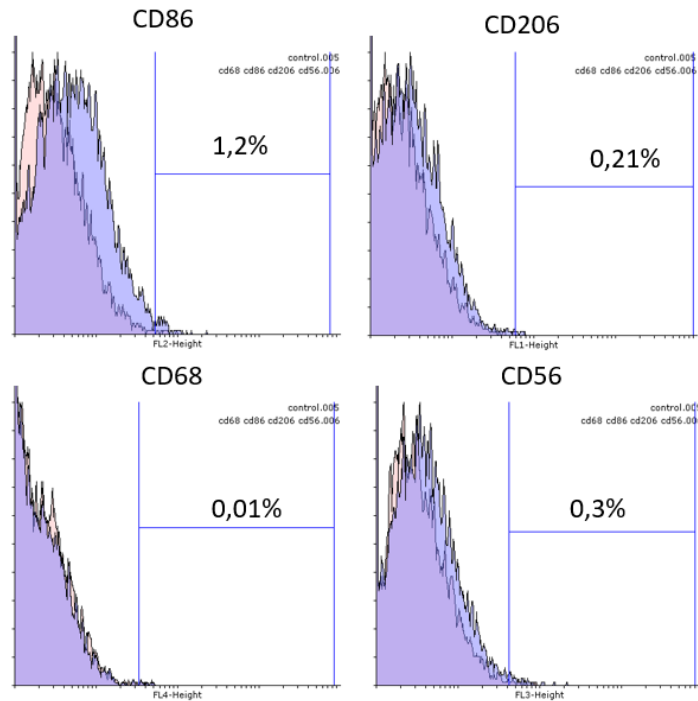


Рисунок 18 – Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии для образца опухолевой ткани. Результаты анализа методом проточной цитометрии после окрашивания клеток антителами к CD86, CD206, CD68, CD56. Розовый контур – контроль окрашивания. Процентное содержание положительных клеток (голубой контур), указано над маркером

Таким образом, изолированные культуры клеток, полученные из биоптатов опухолевой ткани, представляли собой гетерогенную популяцию, содержащую преимущественно эпителиальные клетки, мезенхимальные стромальные клетки и антигенпредставляющие клетки (Рисунок 19).

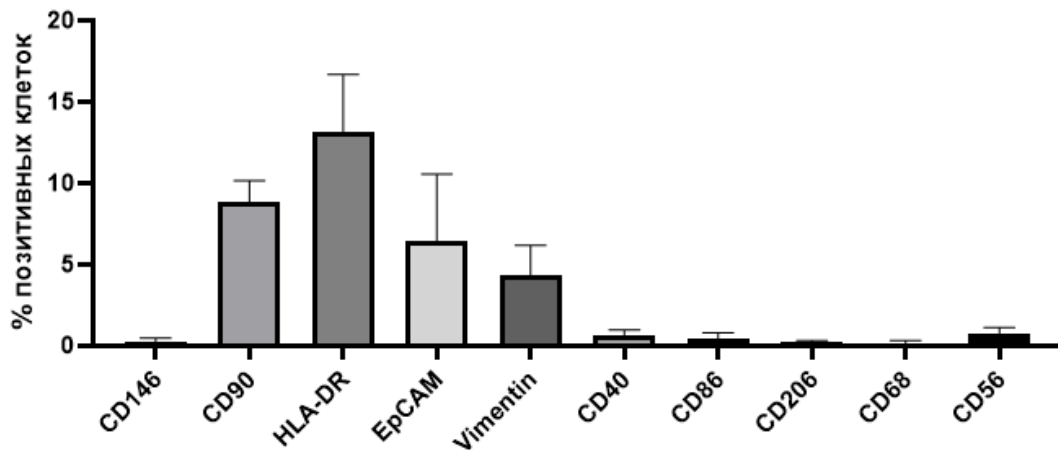


Рисунок 19 – Результирующие данные проточной цитофлуориметрии при анализе иммунофенотипа образцов опухолевой ткани

#### ***Фенотипический анализ клеток ткани перитуморальной области***

По аналогии с исследованием иммунофенотипа клеток опухолевых биоптатов был проведен фенотипический анализ клеток ткани перитуморальной области, взятой у пациентов в ходе операции. Полученные образцы нормальной ткани перитуморальной области были проанализированы по тем же маркерам, что и опухолевая ткань: CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, Vimentin, CD40, CD86, CD206, CD68, CD56. В ходе данного этапа работы было выяснено, что в среднем лишь 0,29% клеток были CD146-позитивны. По мезенхимальному маркеру CD90 в среднем 8,2% клеток были положительны. Процент HLA-DR-позитивных клеток составил также, как и в опухолевой ткани, порядка 13%. Маркер эпителиальных клеток EpCAM характеризовался высокой экспрессией 18,6%, а в отдельных образцах его уровень достигал максимума по сравнению с остальными исследуемыми маркерами. Такой результат был ожидаем и обусловлен локализацией клеток, поскольку EpCAM является молекулой клеточной адгезии и межклеточных взаимодействий эпителиальных клеток. Процент клеток, выделенных из нормальной ткани, положительных по маркеру промежуточных филаментов клеток мезенхимального происхождения Vimentin,

в среднем составил 5,2%, однако в некоторых образцах значение достигало 10,5%. Такой результат говорит о присутствии мезенхимальных стромальных клеток в ткани перитуморальной области. Процент клеток положительных по маркеру CD40 (Рисунок 20) был выше, чем в опухолевой ткани и составил 1,8%. Однако разница между опухолевой тканью и тканью перитуморальной области не была статистически значимой.

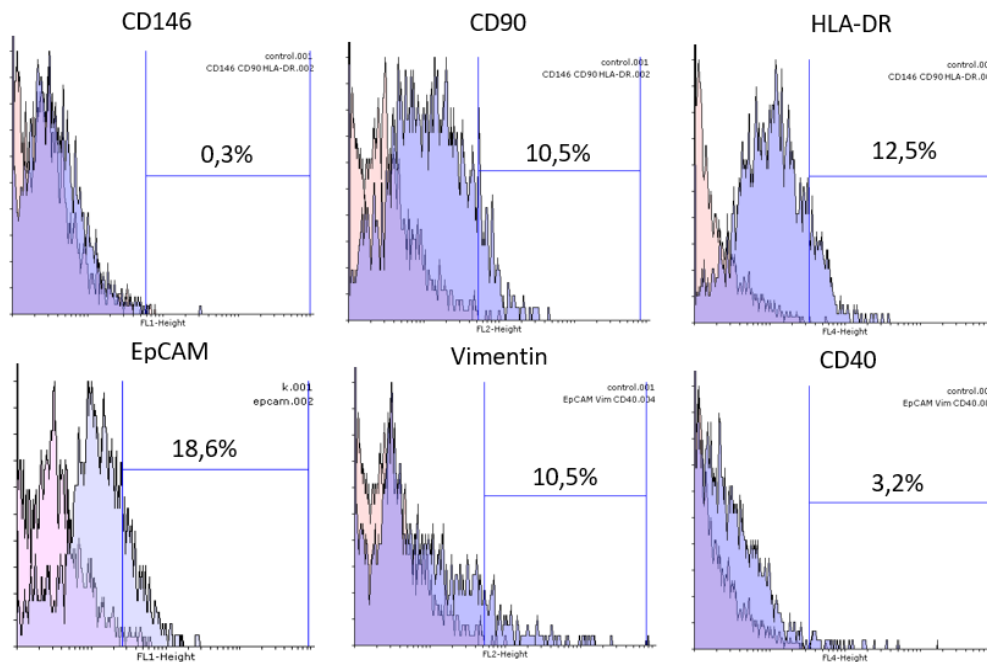


Рисунок 20 – Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии для образца нормальной ткани. Результаты анализа методом проточной цитометрии после окрашивания клеток антителами к CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, Vimentin, CD40. Розовый контур – контроль окрашивания. Процентное содержание положительных клеток (голубой контур), указано над маркером

Что касается исследования иммунной компоненты (CD68, CD86, CD206, CD56), как и в случае опухолевых клеток, был получен малый процент CD68+, CD86+, CD206+, CD56+ положительных клеток (Рисунок 21).

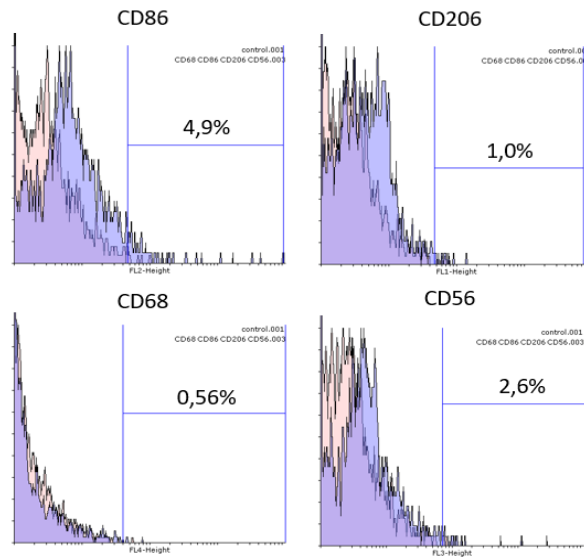


Рисунок 21 – Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии для ткани перитуморальной области. Результаты анализа методом проточной цитометрии после окрашивания клеток антителами к CD86, CD206, CD68, CD56. Розовый контур – контроль окрашивания. Процентное содержание положительных клеток (голубой контур), указано над маркером

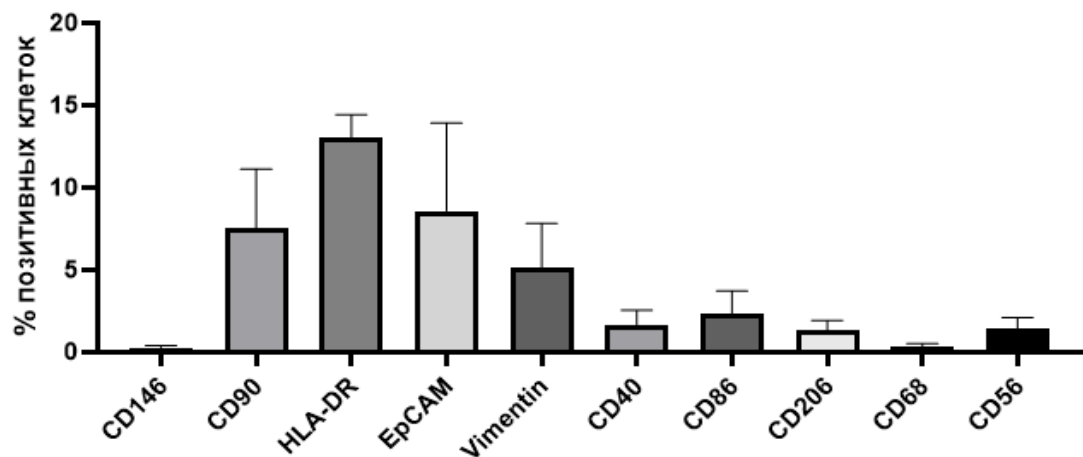


Рисунок 22 – Результирующие данные проточной цитофлуориметрии при анализе иммунофенотипа образцов ткани перитуморальной области.



### *Сравнение клеточного состава опухолевой ткани и ткани перитуморальной области*

Сравнение процента клеток, положительных по всем исследуемым маркерам, выделенных из ткани перитуморальной области и опухолевой ткани, представлено на рисунках 23 и 24.

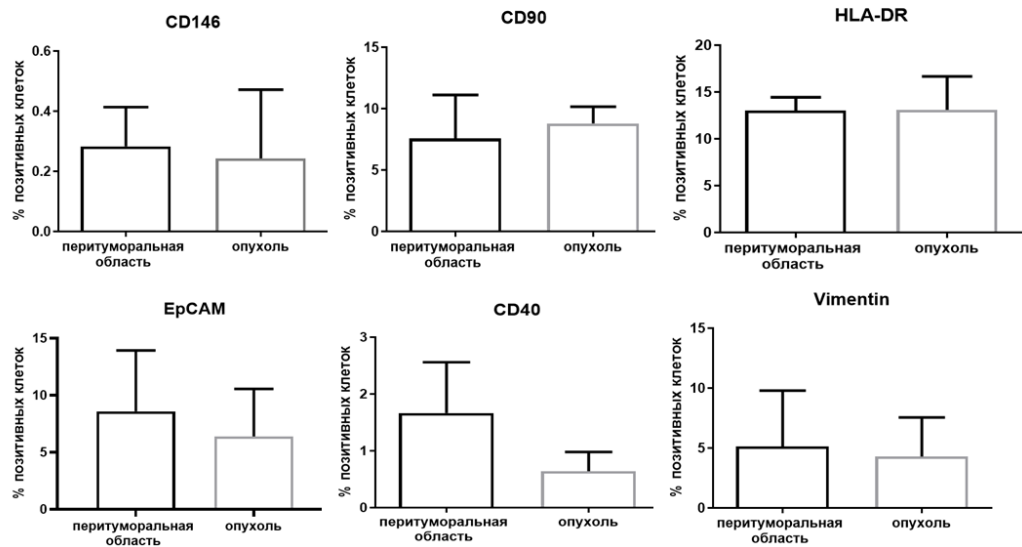


Рисунок 23 – Сравнение процента клеток, положительных по маркерам CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, Vimentin, CD40 в ткани перитуморальной области и опухолевой ткани

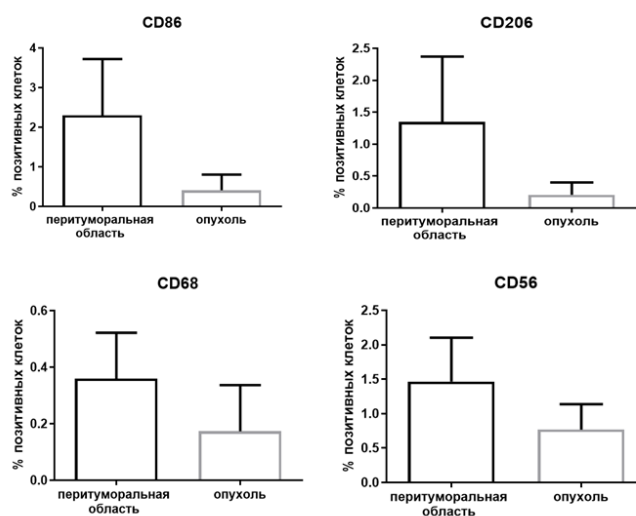


Рисунок 24 – Сравнение процента клеток, положительных по маркерам CD86, CD206, CD68, CD56 в ткани перитуморальной области и опухолевой ткани

В ходе сравнения полученных иммунофенотипов клеток образцов ПРГШ и образцов ткани перитуморальной области значимых различий выявлено не было. 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.

Обобщая результаты, вне зависимости от анатомической локализации все образцы ПРГШ имели одинаковое морфологическое строение. Образцы ткани перитуморальной области представляли собой слизистую оболочку различных органов области головы и шеи, покрытых многослойным неороговевающим эпителием с сохранной архитектоникой, без признаков инфильтрации опухолевыми клетками. В ходе сравнительной оценки экспрессии 11 маркеров: Е-кадгерина, Vimentin, KR5, KR17, KR10, CD44, ALDH1A1, Ki-67, p63, CD68, CD206, было подтверждено, что ни один из них не является опухоль-специфическим и не может изолированно использоваться на этапе диагностики данного ЗНО. Однако, экспрессия CD44, ALDH1A1, Ki-67, p63 статистически значимо была выше в образцах ПРГШ, а ткань перитуморальной области отличалась большей экспрессией CD68.

### 3.1.2. Оценка изменений клеточного состава опухолевой 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. Характерные примеры приведены на рисунках 25-27. На рисунке 25 представлен гистологический препарат неороговевающего плоскоклеточного рака боковой поверхности языка до и после облучения сканирующим протонным пучком. После облучения отмечено изменение соотношения опухолевая паренхима/строма, площадь незанятая опухолевой паренхимой увеличилась в 2,2 раза (Рисунок 25).

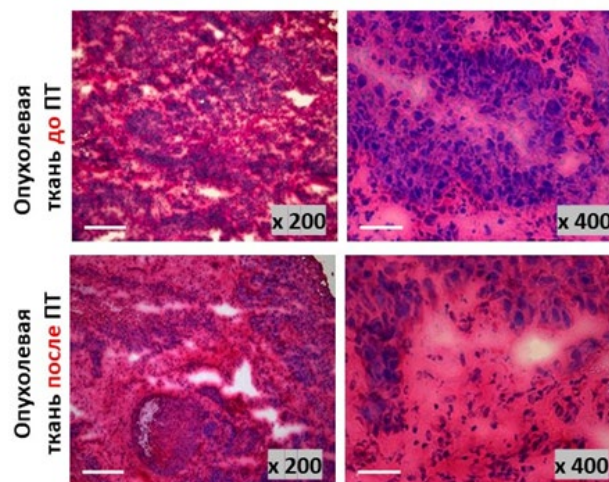


Рисунок 25 – Неороговевающий плоскоклеточный рак боковой поверхности языка до и после ПТ: изменение соотношения опухолевая паренхима/строма, увеличение стромального компонента на единицу площади среза с 17,2% до 38,9%. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 200 мкм и 50 мкм

На рисунке 26 продемонстрированы гистологические препараты неороговевающего рака ротоглотки до и после облучения сканирующим

протонным пучком. Отмечено уменьшение площади занятой опухолевой паренхимой в 1,2 раза после облучения (Рисунок 26).

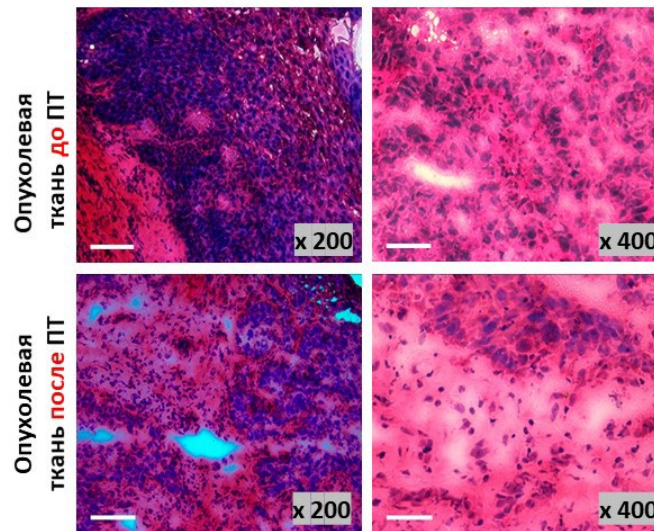


Рисунок 26 – Плоскоклеточный рак ротоглотки до и после ПТ: отмечается тенденция к изменению соотношения опухоль/паренхима, отмечено увеличение площади незанятой опухолевой паренхимой с 33,6% до 41,7%. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 200 мкм и 50 мкм

На рисунке 27 представлены гистологические препараты плоскоклеточного рака слизистой оболочки альвеолярного отростка верхней челюсти до и после облучения сканирующим пучком протонов. Отмечается увеличение площади незанятой опухолевой паренхимой в 1,17 раз (Рисунок 27).

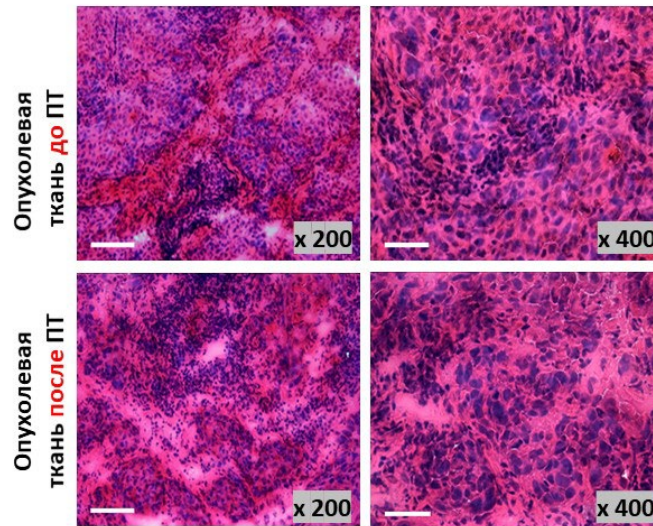


Рисунок 27 – Плоскоклеточный рак слизистой оболочки альвеолярного отростка верхней челюсти до и после ПТ: отмечается тенденция к изменению соотношения опухоль/строма, отмечено увеличение площади незанятой опухолевой паренхимой с 26,5% до 31,15%. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 200 мкм и 50 мкм

Как продемонстрировано на рисунках 25, 26, 27 после ПТ СОД 10 Гр отмечается изменение соотношение 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 28).

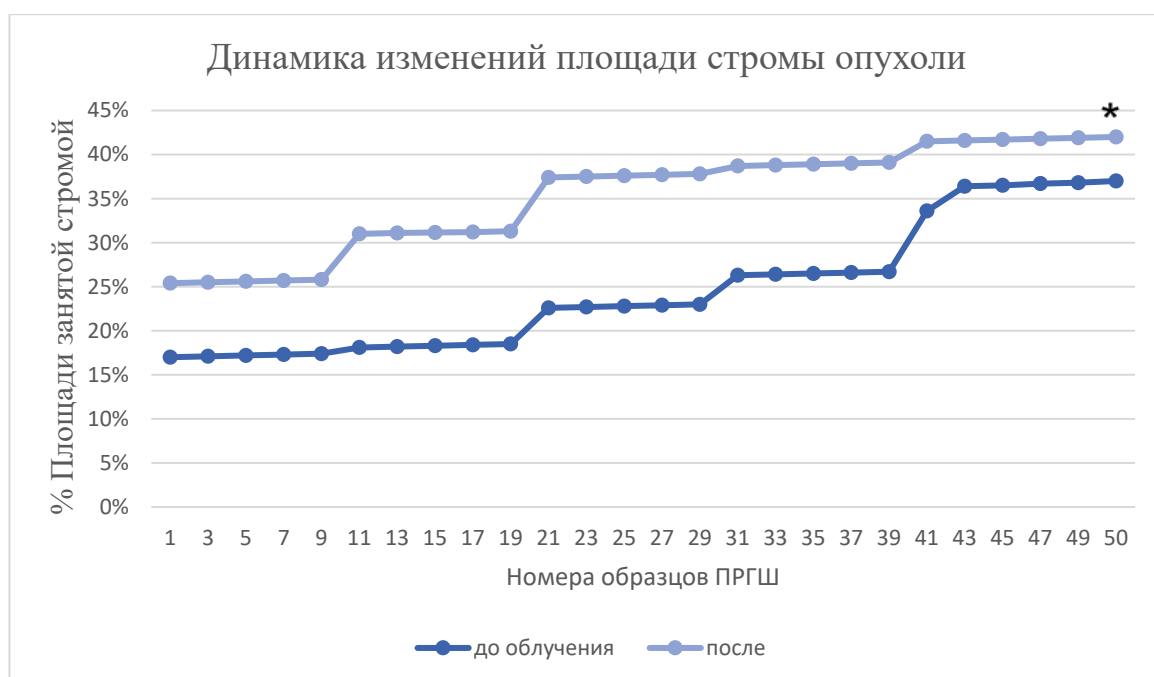


Рисунок 28 – Оценка динамики изменения площади стромы ПРГШ после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр (n=50). \* –  $p < 0,05$

Поскольку на гистологических препаратах опухолевая паренхима представлена скоплением большого количества клеток гетерогенных по морфологии, следующим этапом было клеточное типирование опухолевой ткани до и после облучения протонным сканирующим пучком с целью выявления изменения экспрессии специфических маркеров с помощью ИГХ исследования.

Необычно, но в ходе ИГХ исследования в опухолевой ткани было отмечено снижение количества клеток, экспрессирующих Vimentin: с  $18,9 \pm 3,6\%$  до  $15,0 \pm 1,1\%$  клеток. (Рисунок 29), (Таблица 8).

Доля клеток, экспрессирующих подоплатин (Pdpn) в образцах ПРГШ до облучения составила  $51,0 \pm 4,8\%$  и  $46,0 \pm 2,0\%$  положительных клеток после облучения протонами (Рисунок 29), (Таблица 8).

Далее в исследуемых образцах оценили изменение экспрессии KR: KR17, KR5, KR10, KR13 в образцах ПРГШ после протонного облучения. Как уже было

сказано в предыдущей главе в исследуемых образцах ПРГШ до ПТ было выявлено значительное количество клеток экспрессирующих KR17, составляющее  $97,1 \pm 0,5\%$  и доля клеток, экспрессирующих KR5  $95,4 \pm 2,4\%$ . После ПТ доля KR17+ клеток составила  $93,4 \pm 1,6\%$ , доля KR5+ клеток составила  $89,1 \pm 1,7\%$ . В исследуемых образцах ПРГШ KR10 был выявлен в цитоплазме клеток только высокодифференцированных опухолей, доля положительных клеток составила  $22,2 \pm 1,8\%$ , после облучения сканирующим пучком протонов, количество положительных клеток уменьшалось до  $14,7 \pm 1,1\%$  (Рисунок 29), (Таблица 8). В опухолевых клетках ПРГШ в образцах до и после протонного облучения наблюдалось отсутствие экспрессии KR13.

Далее оценено изменение экспрессии маркеров ОСК, наделяющих опухоль свойством резистентности к ЛТ – CD44 и ALDH1A1. Количество клеток положительных по маркеру CD44 до облучения составило  $85,6 \pm 2,4\%$ , их количество уменьшалось до  $80,1 \pm 1,2\%$  после облучения сканирующим пучком протонов. Количество положительных клеток по маркеру ALDH1A1 до облучения составило  $87,2 \pm 1,2\%$  и  $78,1 \pm 3,6\%$  после облучения сканирующим пучком протонов (Рисунок 29), (Таблица 8).

Среди ядерных маркеров для оценки эффектов ПТ были выбраны Ki-67, p63 и антиген плоскоклеточной карциномы (SCCA). После облучения доля клеток, положительных по Ki-67 снижалась в 2,3 раза и составляла  $37,1 \pm 2,2\%$ . Менее выраженные изменения после облучения сканирующим пучком протонов были отмечены в экспрессии другого ядерного маркера p63, после облучения доля положительных клеток по данному маркеру составила  $45,2 \pm 4,1\%$ . Количество SCCA+ клеток до облучения составляло  $72,4 \pm 1,6\%$ , а после протонного облучения количество положительных клеток снижалось до  $44,3 \pm 4,7\%$  (Рисунок 29), (Таблица 8).



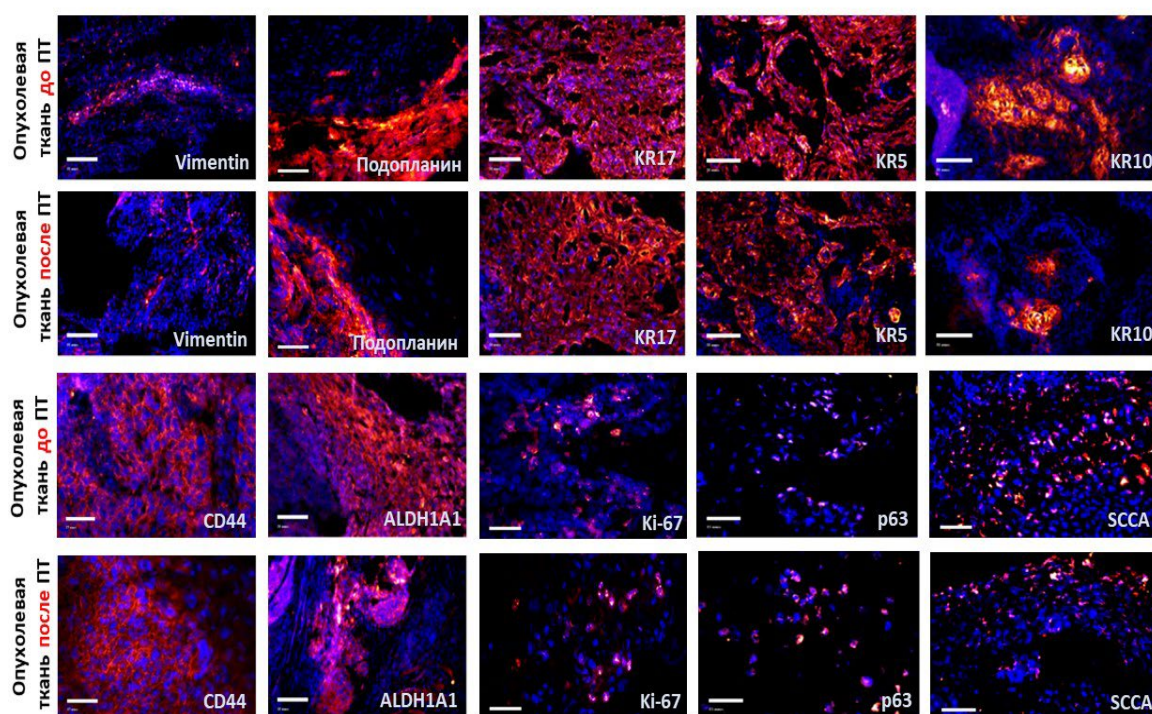


Рисунок 29 – Экспрессия маркеров в опухолевой ткани ПРГШ до и после ПТ

После облучения протонами наблюдалось увеличение количества CD68+ макрофагов в опухолевой ткани ПРГШ до  $24,9 \pm 4,3\%$  (Рисунок 30), (Таблица 9).

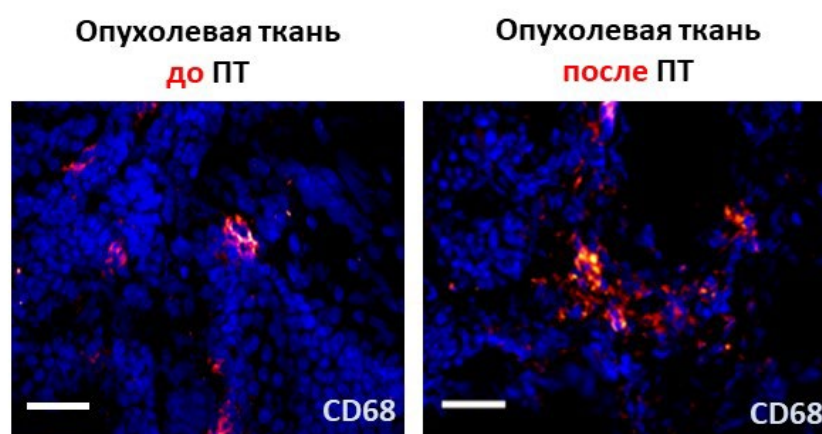


Рисунок 30 – Экспрессия CD68 в опухолевой ткани до и после ПТ



Таким образом, в опухолевой ткани после ПТ отмечено снижение уровня экспрессии маркеров Vim, KR17, KR5, KR10, ALDH1A1, Ki-67, p63, Pdpn, SCCA и увеличение CD68 (Рисунок 31), (Таблица 8).

Таблица 8 – Оценка изменений уровня маркеров в опухолевой ткани ПРГШ

Маркер	До облучения, % M±s n=50	После облучения, % M±s n=50	p (уровень значимости 0,05)
Vimentin	18,9±3,6	15,0±1,1	0,0016*
Pdpn	51,0±4,8	46,0±2,0	0,0001*
KR5	95,4±2,4	89,1±1,7	0,0003*
KR17	97,1± 0,5	93,4±1,6	0,0001*
KR10	22,2±1,8	14,7± 1,1	0,00001*
CD44	85,6±2,4	80,1±1,2	0,21840
ALDH1A1	87,2±1,2	78,1±3,6	0,00001*
Ki-67	55,2±3,1	37,1±2,2	0,00001*
p63	49,3±3,5	45,2±4,1	0,00001*
CD68	12,3±2,9	24,9± 4,3	0,00001*
SCCA	72,4±1,6	44,3±4,7	0,00001*

Примечание: \* - различия данных до и после облучения статистически значимы при  $p < 0,05$

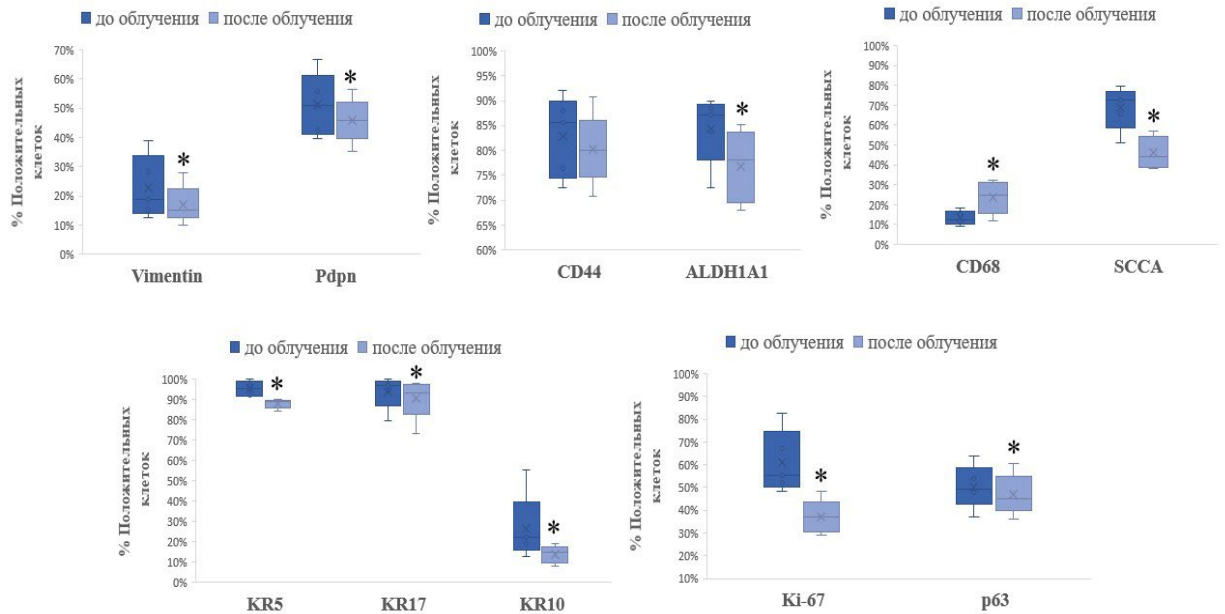


Рисунок 31 – Результирующие данные ИГХ исследования образцов ПРГШ до и после облучения сканирующим пучком протонов. \* –  $p < 0,05$

Облучение сканирующим пучком протонов в СОД 10 изoГр индуцировало изменение строения ткани опухоли: уменьшилась площадь, занимаемая опухолевой паренхимой. После облучения ПРГШ отмечено снижение экспрессии маркеров: Vimentin, Pdpn, SCCA, KR5, KR17, KR10, ALDH1A1, Ki-67, p63 и увеличение CD68.

Отмеченное снижение Ki-67+ и p63+ клеток свидетельствует о подавлении пролиферативного потенциала опухолевых клеток, а снижение экспрессии Pdpn и SCCA указывает на снижение активности инвазии и миграции опухолевых клеток. Протонное облучение также привело к уменьшению количества ОСК, о котором свидетельствует уменьшение процента ALDH1A1+клеток; и к усилению инфильтрации опухоли ОАМ, на которое указывает увеличение доли CD68+ клеток, (что соответствует данным литературы).

### **3.1.3. Оценка изменений клеточного состава ткани перитуморальной области пациентов после облучения сканирующим пучком протонов**

В образцах облученной ткани 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. Характерные примеры приведены на рисунках 32-33.

На рисунке 32 представлен гистологический препарат слизистой оболочки гортани в области надгортанника, покрытой многослойным плоским неороговевающим эпителием, до и после облучения сканирующим протонным пучком. В ходе исследования образца после облучения отмечено изменение соотношения клеточная составляющая/межклеточное вещество, что особенно выражено в рыхлой соединительной ткани, прилежащей к базальной мембране: площадь, занятая межклеточным веществом, увеличилась после облучения в 1,8 раз (Рисунок 32).

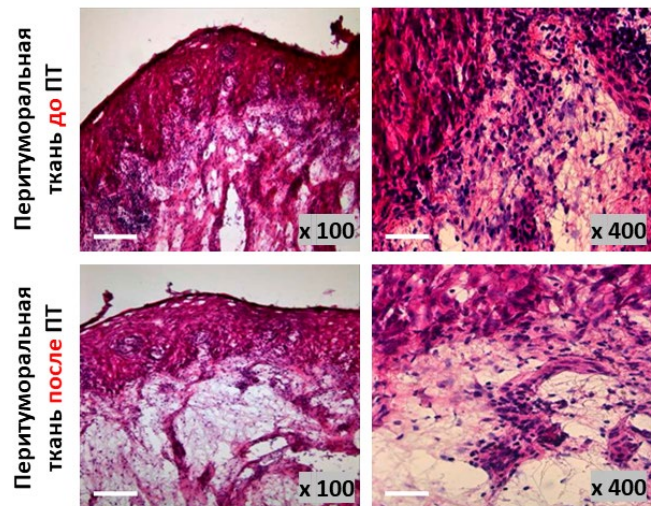


Рисунок 32 – Слизистая оболочка гортани в области надгортанника, покрытая многослойным плоским неороговевающим эпителием, до и после облучения протонами. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия,  $\times 100$  и  $\times 400$ . Длина масштабного отрезка 100мкм и 50мкм

На рисунке 33 представлена ткань перитуморальной области ротоглотки до и после облучения сканирующим пучком протонов. Наиболее выраженные изменения локализованы под базальной мембраной в прилежащей рыхлой волокнистой соединительной ткани. Отмечено отложение волокнистого компонента межклеточного вещества, окрашивающегося оксифильно, а также снижение доли клеток (Рисунок 33).

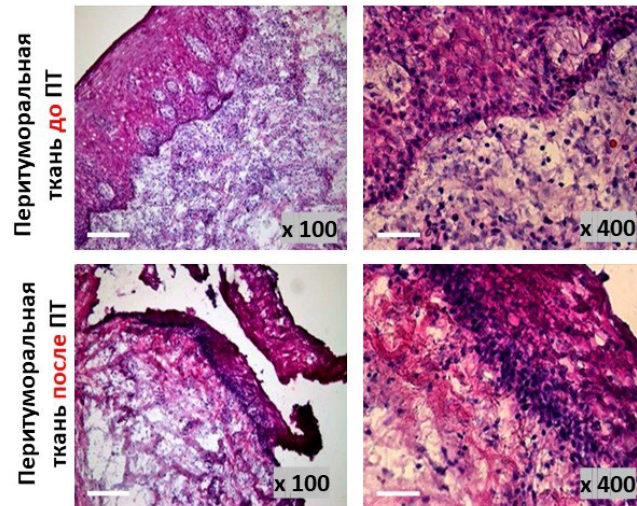


Рисунок 33 – Слизистая оболочка ротоглотки, покрытая многослойным плоским неороговевающим эпителием, до и после ПТ. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия,  $\times 100$ ,  $\times 400$ . Длина масштабного отрезка 100 мкм и 50 мкм.

Во всех образцах ткани перитуморальной области отмечено статистически значимое увеличение площади стромы (Рисунок 34).



Рисунок 34 – Сравнительная оценка площади стромы в ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр.

\* –  $p < 0,05$

Далее с помощью ИГХ исследования оценили изменения уровней маркеров в ткани перитуморальной области.

После ПТ в ткани перитуморальной области была отмечена тенденция к увеличению экспрессии Vimentin: доля положительных клеток увеличилась с  $22,4 \pm 1,3\%$  до  $37,9 \pm 2,6\%$  (Рисунок 35), (Таблица 9).

Доля CD68<sup>+</sup> клеток в перитуморальной ткани также, как и в опухолевой ткани, увеличилась с  $26,7 \pm 2,3\%$  до  $35,7 \pm 2,7$  после облучения сканирующим пучком протонами (Рисунок 35), (Таблица 9).

Экспрессия KR17 после облучения сканирующим пучком протонов в ткани перитуморальной области менялась незначительно. При этом экспрессия KR5 значительно изменялась после облучения сканирующим пучком протонов: количество KR5 положительных клеток составило  $98,0 \pm 0,5\%$  до и  $90,2 \pm 0,9\%$  после облучения (Рисунок 35), (Таблица 9). Экспрессия KR13 клетками ткани перитуморальной области после облучения сканирующим пучком протонов не менялась.

Облучение сканирующим пучком протонов вызывало снижение количества ОСК в ткани перитуморальной области, поскольку было отмечено значимое снижение уровня экспрессии CD44 (с  $68,4 \pm 2,4\%$  до  $40,2 \pm 4,8\%$ ) и ALDH1A1 (с  $63,3 \pm 2,6\%$  до  $35,3 \pm 4,2\%$ ), (Рисунок 35), (Таблица 9).

Тенденция изменений экспрессии ядерных маркеров совпадала с таковой в опухолевой ткани. После облучения количество Ki67<sup>+</sup> клеток в образцах ткани перитуморальной области снижалась в среднем в 2 раза. Экспрессия p63 составляла  $21,0 \pm 3,6\%$  до облучения сканирующим пучком протонов и снижалась до  $13,1 \pm 2,2\%$  после облучения (Рисунок 35), (Таблица 9).



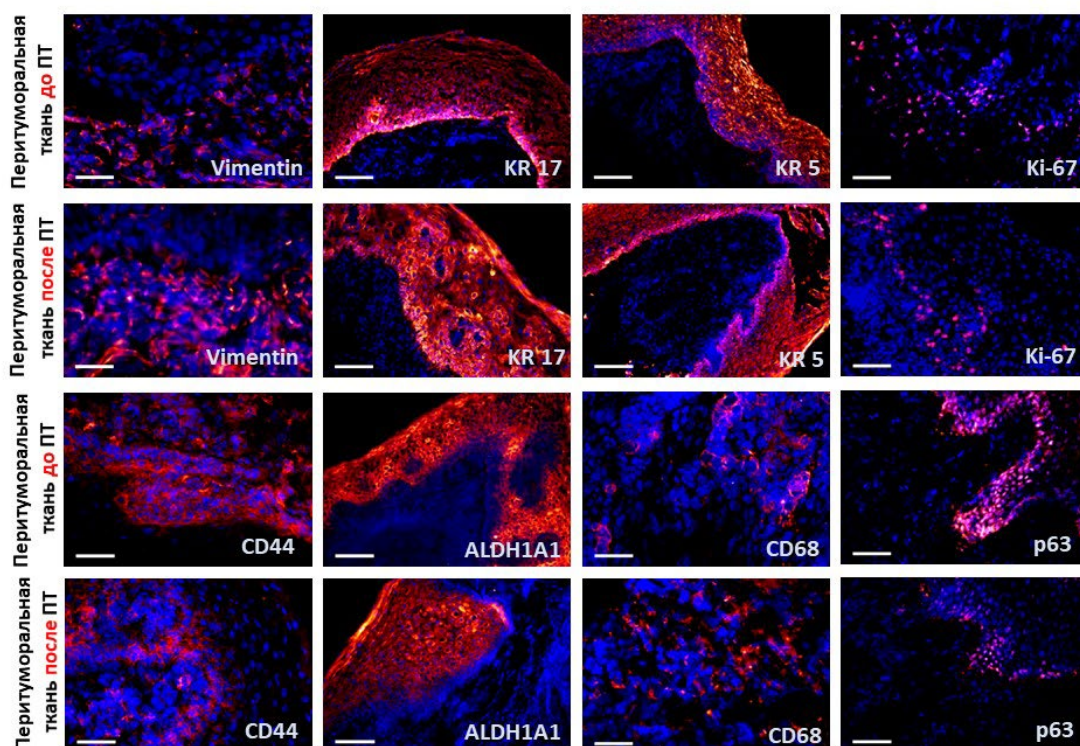


Рисунок 35 – Сравнение уровня маркеров в ткани перитуморальной ткани до и после ПТ

Обобщая полученные результаты в ходе ИГХ исследования, после ПТ отмечено статистически значимое снижение уровня маркеров KR 5, CD44, ALDH1A1, Ki-67, p63 и увеличение экспрессии Vimentin и CD68 (Рисунок 36), (Таблица 10).

Таблица 10 – Оценка изменения маркеров в ткани перитуморальной области после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изoГр

Маркер	До облучения, % M±s n=50	После облучения, % M±s n=50	p (уровень значимости 0,05)
Vimentin	22,4±1,3	37,9±2,6	0,0001*
KR 5	98,0±0,5	90,2±0,9	0,0003*
KR 17	94,0±1,5	92,4±1,2	0,3983

## Продолжение таблицы 10

CD44	68,4±2,4	40,2±4,8	0,00001*
ALDH1A1	63,3±2,6	35,3±4,2	0,00001*
Ki-67	25,7±3,8	13,0±3,9	0,00001*
p63	21,0±3,6	13,1±2,2	0,00001*
CD68	26,7±2,3	35,7±2,7	0,00001*

Примечание: \* - различия данных до и после облучения статистически значимы при  $p < 0,05$

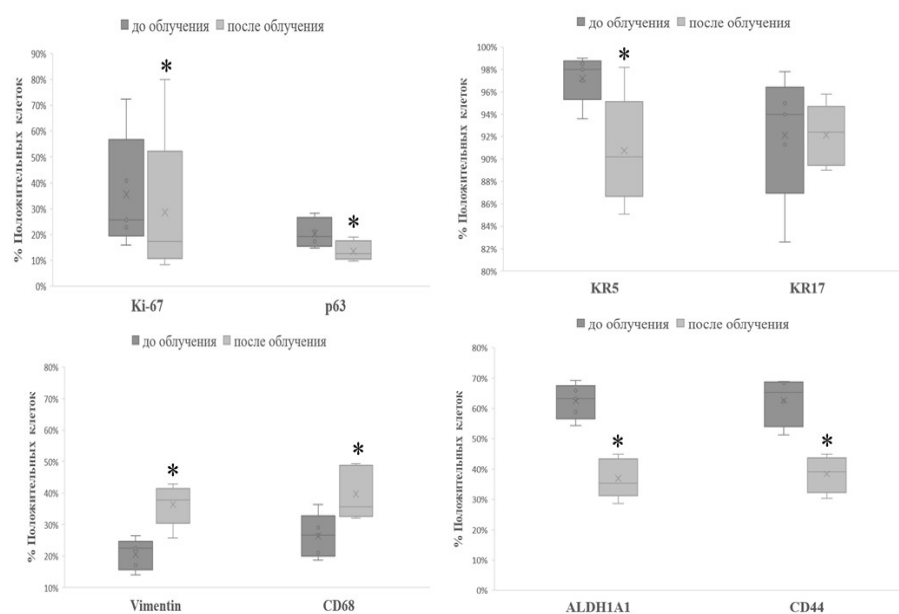


Рисунок 36 – Результирующие данные ИГХ исследования образцов ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр. \* –  $p < 0,05$

В образцах облученной ткани перитуморальной области не было обнаружено ярко выраженных изменений таких как: атрофия эпителиальных клеток, очаги некроза, разрастание фибриновых волокон, кровоизлияний в



результате повреждения стенок сосудов, обширная лимфо-гистиоцитарной инфильтрации и т.д.) по сравнению с необлученными образцами. Можно предположить, что доза 10 изоГр не вызывает значимых изменений, регистрируемых патоморфологами в ткани перитуморальной области после облучения СОД 60 Гр.

Однако облучение сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр индуцировало в ткани перитуморальной области выраженные изменения экспрессии KR5, Ki-67, p63, CD44, ALDH1A1, Vimentin, CD68. Экспрессия KR17 и KR13 осталась неизменной. Отмеченное снижение количества Ki-67+, p63+, KR5+ клеток, что свидетельствует о снижении пролиферативной активности эпителиальных клеток, снижение CD44+, ALDH1A1+ указывает на снижение количества ОСК. Одновременно с этим, после облучения сканирующим пучком протонов отмечено увеличение мезенхимальных клеток, экспрессирующих Vimentin и ОАМ положительных по маркеру CD68.

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

#### **3.2.1. Исследование транскриптома опухолевой ткани до и после облучения пучком протонов методом NG-секвенирования**

Следующим этапом работы стал анализ транскриптомных сигнатур образцов ПРГШ до и после ПТ. Изначально в данный этап работы были взяты образцы опухоли от 30 пациентов с ПРГШ ввиду того, что это минимальная репрезентативная выборка. Однако, сохранная РНК была обнаружена в 24 образцах. 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* (Таблица 11).

Таблица 11 – Наиболее низкоэкспрессируемые гены в образцах биопсий  
ПРГШ после протонного облучения

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>CLEC4E</i>	1,89E-06	-4,9551	Кодирует член суперсемейства лектинов С-типа/лектиноподобных доменов (CTL/CTLD), участвующего в клеточной адгезии, передаче сигналов между клетками, в иммунном ответе
<i>IGHV2-70</i>	8,57E-06	-5,098903	Обеспечивает антигенсвязывающую активность и активность связывания рецепторов иммуноглобулинов; участвует в активации иммунного ответа, защитной реакции на другой организм и фагоцитоз
<i>P2RX1</i>	3,99E-05	-5,157808	Белок, кодируемый этим геном, принадлежит к семейству P2X-рецепторов, связанных с G-белком. Функционирует, как АТФ-управляемый ионный канал и обеспечивает быструю и селективную проницаемость для катионов
<i>SLC5A3</i>	2,37E-05	-5,164646	Участвует в метаболическом процессе инозитола; трансмембранном транспорте моносахаридов.

Продолжение таблицы 11

<i>MYBPC1</i>	0,000185	-5,214009	Участвует в сокращении поперечно-полосатой мускулатуры
<i>SPI</i>	0,011218	-5,318071	Участвует в клеточной дифференцировке апоптозе, иммунных реакциях.
<i>FCRLA</i>	0,000857	-5,322271	Участвует в гуморальном иммунитете: разрушение покрытых IgG антигенов и клеток, индуцированное антителами
<i>KIAA0125</i>	0,000853	-5,326239	Точная функция неизвестна, однако его активацию связывают с опухолевыми заболеваниями
<i>IGHV2-26</i>	0,002372	-5,382554	Принимает участие в активации иммунного ответа.
<i>IGHV2-5</i>	0,018504	-5,417312	Обеспечивает антигенсвязывающую активность., активацию иммунного ответа; защитную реакцию на другой организм; фагоцитоз.

Наибольшая экспрессия в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения была отмечена в генах: *PIK3R2*; *CTD-307407,11*; *GOLGA6L9*; *GP1BB*; *NPIPA2*; *RP11-96O20,4*; *AC008132,13*; *SNX31*; *RP1-127D3,4*; *RPL21P119* (Таблица 12).

Таблица 12 – Наиболее высокоэкспрессируемые гены в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>PIK3R2</i>	0,001165114	4,933332565	Фосфорилирует фосфатидилинозитол и подобные соединения, создавая вторичные мессенджеры, важные в сигнальных каскадах клеточного роста
<i>CTD-307407,11</i>	2,72E-06	4,616974115	Принимает участие в развитии глаз, конечностей, сердца и репродуктивной системы.
<i>GOLGA6L9</i>	1,59E-07	4,471769544	Нет данных
<i>GP1BB</i>	4,01E-10	4,258120139	Опосредует адгезию тромбоцитов
<i>NPIA2</i>	8,65E-10	4,034189538	Участвует в транспорте мРНК и транспорте белков
<i>RP11-96O20,4</i>	3,93E-11	3,750788416	Нет данных
<i>AC008132,13</i>	1,07E-11	3,556712	Нет данных
<i>SNX31</i>	7,48E-13	3,431118009	Участвует во внутриклеточном транспорте белков
<i>RPI-127D3,4</i>	7,48E-13	3,431118009	Нет данных
<i>RPL21P119</i>	4,15E-12	3,425636308	Псевдоген

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 *SPI*, который сверхэкспрессируется в опухолевых клетках и, в большинстве случаев,

активирует гены, которые усиливают пролиферацию, инвазию и химиорезистентность [Jumaniyazova и др., 2024a].

***Сигнальные пути ассоциированные с низкоэкспрессированными генами в опухолевой ткани***

Для определения принадлежности значимо высоко- и низкоэкспрессированных генов к тем или иным сигнальным путям был проведен анализ обогащения для каждой из этих групп генов. В образцах опухолевой ткани после протонного облучения по сравнению с опухолевой тканью до протонного облучения среди низкоэкспрессируемых генов были обнаружены сигнальные пути, представленные в Таблице 13. В ходе анализа обогащения по классификатору GO- Biological Process Complete после протонного облучения в ПРГШ оказывалась подавлена активность процессов, ассоциированных с иммунными реакциями. Так, в образцах после протонного облучения обращают на себя внимание снижение активности процессов сборки пептидного антигена с белковым комплексом МНС класса II, выработки иммуноглобулинов, продукции цитокинов макрофагами, миграции нейтрофилов, снижение миграции В и Т лимфоцитов. Помимо вышеотмеченных процессов, в опухолевой ткани после протонного облучения отмечено подавление продукции фактора некроза опухоли. Анализ обогащения, проведенный по классификатору GO molecular function complete, выявил как уже обнаруженные, так и ряд новых сигнальных путей, ассоциированных с низкоэкспрессированными генами, представленными в Таблице 13. Так, например, обращает на себя внимание подавление активности рецептора МНС II, подавление активности рецепторов цитокинов. Кроме этого, отмечено наличие сигнальных путей, связанных с уплотнением внеклеточного матрикса в опухолевой ткани. По классификатору Panther Pathways в образцах ПРГШ после протонного облучения среди низкоэкспрессируемых генов было отмечено обогащение сигнальных путей, ассоциированных с интегринами и воспалением, опосредованным хемокинами и цитокинами (Таблица 13).

В ходе анализа обогащения по классификатору Reactome pathways в ПРГШ после облучения протонами были обнаружен ряд сигнальных путей, связанных с низкоэкспрессированными генами, таких как: сигнальный путь STAT5; сигнальный путь PD-1; отмечена MET-опосредованной активации сигнального пути PTK2, передача сигналов PDGF; CD22-опосредованная регуляция BCR; активация MAPK, опосредованная FCER1 [Jumaniyazova и др., 2024b]. Кроме вышеназванных сигнальных путей обращает на себя внимание процесс распада коллагена, активация FCGR3A-опосредованного фагоцитоза и FCGR3A-опосредованного синтеза IL10 (Таблица 13).

Таблица 13 – Сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения

Анализ обогащения по классификатору GO- Biological Process Complete					
Название процесса GO	У человека в норме	В представленных образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
сборка пептидного антигена с белковым комплексом МНС класса II <b>GO:0002503</b>	17	7	16.09	1.39E-06	5.04E-04
выработка иммуноглобулинов, участвующих в иммуноглобулин-опосредованном иммунном ответе <b>GO:0002381</b>	46	10	8.49	1.09E-06	2.91E-04
продукция цитокинов макрофагами <b>GO:0010935</b>	38	7	7.20	1.16E-04	1.38E-02
активация миграции нейтрофилов <b>GO:1902624</b>	35	6	6,70	5.03E-04	3.77E-02

Продолжение таблицы 13

сигнальный путь В-рецептора клеток <b>GO:0050853</b>	58	9	6.06	4.14E-05	6.31E-03
позитивная регуляция дифференцировки CD4-позитивных Т-лимфоцитов <b>GO:0043372</b>	56	8	5,58	1.85E-04	1.94E-02
подавление продукции фактора некроза опухоли <b>GO:0032720</b>	62	8	5.04	3.47E-04	2.92E-02
продукция иммуноглобулинов <b>GO:0002377</b>	141	18	4,99	9.93E-08	5.71E-05
процесс образования активных форм кислорода <b>GO:2000379</b>	69	8	4,53	6.63E-04	4.58E-02
Анализ обогащения по классификатору GO molecular function complete					
активность рецептора МНС класса II <b>GO:0032395</b>	10	5	19.53	2.32E-05	1.68E-02
уплотнение внеклеточного матрикса <b>GO:0030020</b>	45	13	11.29	1.42E-09	7.20E-06
связывание белкового комплекса МНС класса II <b>GO:0023026</b>	28	8	11.16	2.33E-06	2.36E-03
связывание антигена <b>GO:0003823</b>	201	24	4,66	2.47E-09	6.25E-06



## Продолжение таблицы 13

Анализ обогащения по классификатору Panther Pathways					
Интегриновый сигнальный путь <b>P00034</b>	200	17	3.32	3.42E-05	2.73E-03
Воспаление, опосредованное сигнальным путем хемокинов и цитокинов <b>P00031</b>	261	21	3.14	9.22E-06	1.48E-03
Анализ обогащения по классификатору Reactome pathways					
Активация STAT5 <b>R-HSA-9702518.2</b>	10	4	15,63	3.15E-04	1.60E-02
Сигнальный путь PD-1 <b>R-HSA-389948.3</b>	29	7	9.43	2.58E-05	2.22E-03
Распад коллагена <b>R-HSA-1442490.4</b>	64	14	8,55	7.25E-09	6.03E-06
MET - опосредованная активация сигнального пути PTK2 <b>R-HSA-8874081.2</b>	30	6	7,81	2.42E-04	1.31E-02
Передача сигналов PDGF <b>R-HSA-186797.5</b>	54	8	5.79	1.48E-04	9.44E-03
Сигнальный путь AKT1 E17K при раке <b>R-HSA-5674400.2</b>	26	5	7,51	9.44E-04	4.13E-02
CD22-опосредованная регуляция BCR <b>R-HSA-5690714.3</b>	67	9	5,25	1.13E-04	7.43E-03
Сигналинг интерферона-гамма <b>R-HSA-877300.6</b>	91	12	5.15	1.00E-05	1.09E-03
Активация MAPK, опосредованная FCER1 <b>R-HSA-2871796.3</b>	89	11	4,83	4.03E-05	3.14E-03
FCGR3A-опосредованный синтез IL10 <b>R-HSA-9664323.2</b>	100	12	4,69	2.37E-05	2.11E-03

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, аминокислот (Рисунок 37).

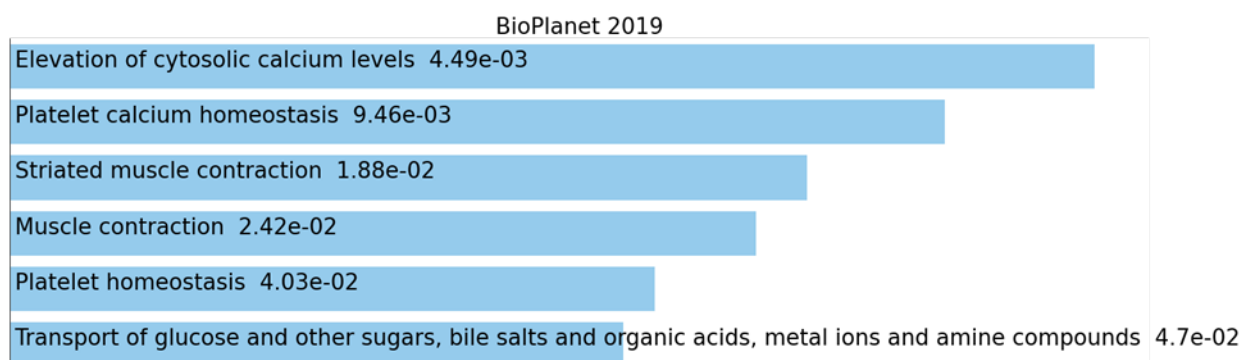


Рисунок 37 – Сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения Enrichr), приведены значения p

### *Сигнальные пути, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами*

В ходе анализа обогащения высокоэкспрессируемых генов, было выявлено ограниченное количество сигнальных путей, ассоциированных с ними. Так, в ходе анализа обогащения по классификатору Panther Pathways в образцах ПРГШ после облучения протонами выявил активацию сигнального пути, ассоциированного с белками клеточных контактов – кадгеринами (Таблица 14). При анализе обогащения по классификатору Reactome pathways среди высокоэкспрессируемых генов в ткани ПРГШ после протонного облучения были активированы процессы ороговения и биологического окисления (Таблица 14).

Таблица 14 – Сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения

<i>Анализ обогащения по классификатору Panther Pathways</i>					
PANTHER Pathways	У человека в норме	В представленных образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Сигнальный путь кадгерина <b>P00012</b>	166	14	5.41	7.90E-07	1.26E-04
<i>Анализ обогащения по классификатору Reactome pathways</i>					
Формирование ороговевающей оболочки <b>R-HSA-6809371.5</b>	129	14	6,96	4.57E-08	1.14E-04
Биологическое окисление <b>R-HSA-211859.3</b>	220	15	4,37	3.83E-06	4.77E-03

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, CD 28-зависимая активация PI3K/Akt, взаимодействия с нефрином, активация сигнального пути TRAIL (Рисунок 38).

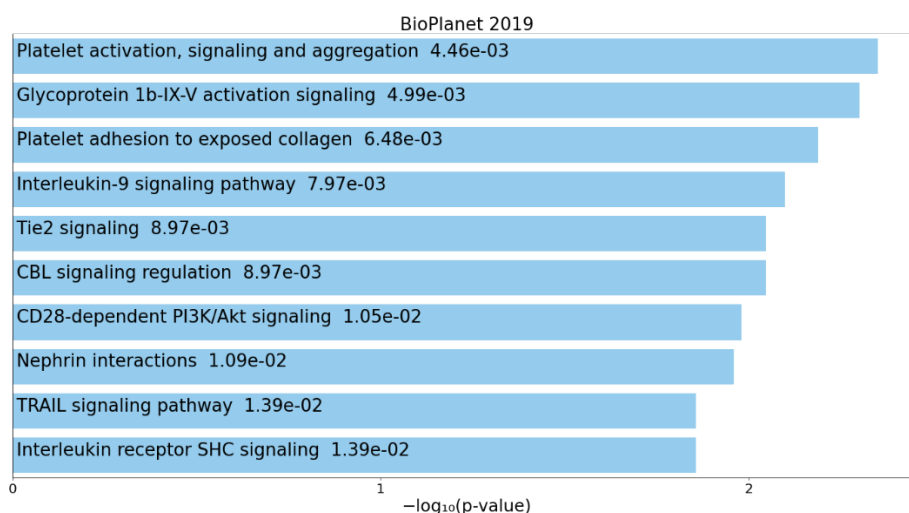


Рисунок 38 – Сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения Enrichr), приведены значения  $p$

Таким образом, транскриптомный анализ клеток опухолевой ткани до и после ПТ продемонстрировал подавление ряда сигнальных путей, ассоциированных с миграцией и хемотаксисом нейтрофилов и лимфоцитов; подавление активации МНС класса II; подавление продукции TNF и IL-10; подавление интегринового, PDGF, STAT5 и PTK2 сигнальных каскадов. Облучение протонами вызвало подавление транспорта глюкозы, аминокислот и солей в опухолевых клетках. Одновременно с подавлением вышеперечисленных сигнальных каскадов в клетках ПРГШ отмечена активация кадгеринового сигнального пути; биологического окисления; активация сигнальных каскадов IL-9, PI3K/Akt, TRAIL и Tie2.

В ходе транскриптомного анализа клеток опухолевой ткани ПРГШ до и после облучения сканирующим пучком протонов СОД 10 изОГр обращает на себя внимание преобладание количества подавленных сигнальных путей. Это свидетельствует о снижении функционального потенциала клеток опухолевой ткани.

### 3.2.2. Исследование транскриптома ткани перитуморальной области до и после облучения пучком протонов методом NG-секвенирования

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*; *DNAI1*; *PPBP*; *RPL36A-HNRNPH2*; *AC020663,1* (Таблица 15).

Таблица 15 – Наиболее низкоэкспрессируемые гены в образцах ткани перитуморальной области после протонного облучения

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>OR2B11</i>	6,60E-11	-3,747849	Кодирует белок-обонятельного рецептора, взаимодействующего с молекулами одоранта в носовой полости
<i>TNFSF12-TNFSF13</i>	6,88E-14	-3,841174	Кодирует член суперсемейства факторов некроза опухоли.
<i>AC012615,1</i>	3,07E-11	-3,860963	Некодирующий участок РНК (lncRNA), задействованный в процессе ЭМП

Продолжение таблицы 15

<i>GYS2</i>	8,01E-13	-4,005043	Белок-гликогенсинтаза печени, катализирует синтез гликогена
<i>AC009469,1</i>	4,88E-10	-4,022372	Функция не выявлена, однако обнаружено его подавление при ряде онкологических заболеваний.
<i>RP11-96O20,4</i>	6,07E-12	-4,232884	Нет данных
<i>DNAI1</i>	2,33E-12	-4,303006	Кодирует члена семейства промежуточных цепей динеина.
<i>PPBP</i>	3,54E-05	-4,312871	Белок, кодируемый этим геном, является тромбоцитарным фактором роста, который принадлежит к семейству хемокинов СХС. Этот фактор роста является мощным хемоаттрактантом и активатором нейтрофилов.
<i>RPL36A-HNRNPH2</i>	1,62E-11	-4,330341	Кодирует большую рибосомальную субъединицу белка EL42
<i>AC020663,1</i>	1,10E-08	-4,437929	Псевдоген

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* (Таблица 16).

Таблица 16 – Наиболее высокоэкспрессируемые гены в образцах ткани перитуморальной области после протонного облучения

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>UGT1A10</i>	0,000322	4,81698	Кодирует UDP-глюкуронозилтрансферазу, фермент пути глюкуронирования, который преобразует небольшие липофильные молекулы, такие как стероиды, билирубин, гормоны в водорастворимые, выводимые метаболиты.
<i>AC008738,1</i>	1,68E-08	4,57975	Смысловой интрон к LRP3, уодирующий белок, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности
<i>SEPT1</i>	1,97E-10	4,35587	Кодирует филаментообразующую цитоскелетную ГТФазу, которая играет роль в цитокинезе
<i>CTD-307407,11</i>	2,19E-11	4,06591	Информация отсутствует, однако встречаются упоминания о его повышенной экспрессии при некоторых типах злокачественных новообразований.
<i>RP11-1012A1,4</i>	6,31E-12	3,94269	Нет данных
<i>BIVM-ERCC5</i>	6,67E-11	3,88063	Кодирует слитый белок. Заболевания, связанные с BIVM-ERCC5, включают пигментную ксеродерму
<i>GPR89B</i>	1,76E-12	3,73467	Обеспечивает активность потенциалзависимых анионных каналов. Участвует в снижении внутриклеточного pH.
<i>SAP25</i>	8,05E-13	3,70849	Кодирует Sin3A ассоциированный белок 25. Подавляет транскрипцию.

Продолжение таблицы 16

<i>AC037459,4</i>	1,63E-12	3,58913	Кодирует члена подсемейства ALP доменных белков PDZ-LIM. Кодируемый белок подавляет рост, зависящий от прикрепления, и способствует миграции и адгезии клеток посредством взаимодействия с актиновым цитоскелетом через домен PDZ. Кодируемый белок также является предполагаемым белком-супрессором опухолей
<i>RP11-1084J3,4</i>	1,05E-12	3,45072	Ген РНК, относящийся к классу lncRNA. Заболевания, связанные с геном, включают дефицит альфа-метилацил-КоА-рацемазы и дефект синтеза желчных кислот, врожденный

***Сигнальные пути ассоциированные с низкоэкспрессированными генами в ткани перитуморальной области после протонного облучения***

По аналогии с опухолевой тканью, для определения принадлежности значимо высоко- и низкоэкспрессированных генов ткани перитуморальной области к тем или иным сигнальным путям был проведен анализ обогащения для каждой из этих групп генов по-отдельности. В образцах ткани перитуморальной области после протонного облучения по сравнению с таковой до протонного облучения среди низкоэкспрессируемых генов были обнаружены сигнальные пути, представленные в Таблице 17. В ходе анализа обогащения по классификатору GO- Biological Process Complete после протонного облучения в ткани перитуморальной области ПРГШ также, как и в опухолевой ткани, оказывалась подавлена активность процессов, ассоциированных с иммунными



реакциями. Так, в образцах после протонного облучения обращают на себя внимание снижение активности противомикробного гуморального ответа, воспалительной реакции, адаптивного иммунного ответа. Помимо вышеотмеченных процессов, в ткани перитуморальной области после протонного облучения отмечено подавление клеточной подвижности, сшивка пептидов, кератинизации, негативной регуляции активности транспортеров. Анализ обогащения, проведенный по классификатору GO molecular function complete, выявил снижение активности цитокинов. Анализ обогащения по классификатору PANTHER Protein class среди низкоэкспрессируемых генов было отмечено обогащение сигнальных путей, ассоциированных с цитокинами и иммуноглобулинами (Таблица 17).

В ходе анализа обогащения по классификатору Reactome pathways в ткани перитуморальной области ПРГШ после облучения протонами было выявлено подавление формирования ороговевающей оболочки (Таблица 17).

Таблица 17 – Сигнальные пути клеток ткани перитуморальной области, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения

Биологические процессы GO	У человека в норме	В представленных образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Анализ обогащения по классификатору GO- Biological Process Complete					
Сшивка пептидов <b>GO:0018149</b>	22	6	9.58	2.63E-05	1.27E-02
Кератинизация <b>GO:0031424</b>	82	15	6.42	9.41E-09	1.41E-04
Негативная регуляция активности транспортеров <b>GO:0032410</b>	53	8	5.30	1.18E-04	3.77E-02

Продолжение таблицы 17

Противомикробный гуморальный ответ <b>GO:0019730</b>	167	16	3,36	2.40E-05	1.24E-02
Воспалительная реакция <b>GO:0006954</b>	570	38	2.34	1.27E-06	1.91E-03
Адаптивный иммунный ответ <b>GO:0002250</b>	681	39	2.01	4.94E-05	2.00E-02
Клеточная подвижность <b>GO:0048870</b>	1143	55	1.69	1.53E-04	4.50E-02
Транспорт белков <b>GO:0015031</b>	1100	12	.38	7.99E-05	2.86E-02
Анализ обогащения по классификатору GO molecular function complete					
Активность цитокинов <b>GO:0005125</b>	233	20	3.02	1.19E-05	1.52E-02
Связывание РНК (-) <b>GO:0003723</b>	1675	23	.48	5.84E-05	4.98E-02
Анализ обогащения по классификатору PANTHER Protein class					
Цитокины <b>PC00083</b>	103	11	3.76	1.65E-04	8.07E-03
Иммуноглобулины <b>PC00123</b>	189	16	2.98	1.03E-04	1.01E-02
Анализ обогащения по классификатору Reactome pathways					
Формирование ороговевающей оболочки <b>R-HSA-6809371.6</b>	129	16	4.36	8.29E-07	2.17E-03

Далее был проведен анализ обогащения низкоэкспрессированных генов на платформе Enrichr, в ходе которого было выявлено 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 (Рисунок 39).

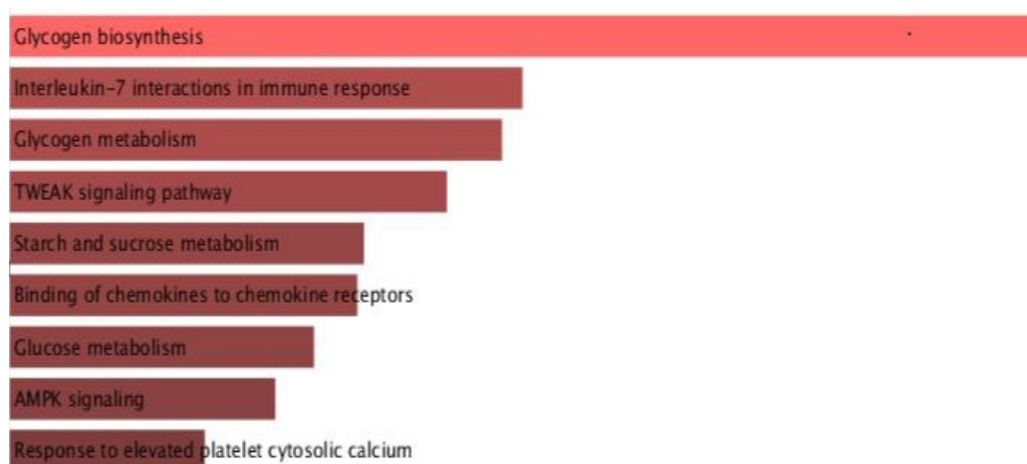


Рисунок 39 – Сигнальные пути ткани перитуморальной области, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения Enrichr)

*Сигнальные пути ассоциированные с высокоэкспрессированными генами в клетках ткани перитуморальной области после протонного облучения*

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. Лишь по классификатору Reactome pathways удалось выявить один активированный процесс -биологическое окисление (Таблица 18).

Таблица 18 – Сигнальные пути клеток ткани перитуморальной области, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения

<i>Анализ обогащения по классификатору Reactome pathways</i>					
Биологические процессы GO	У человека в норме	В представленных образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Биологическое окисление <b>R-HSA-211859.4</b>	220	14	3.90	1.66E-05	4.35E-02

В ходе анализа обогащения высокоэкспрессированных генов на платформе Enrichr, была выявлена активация сигнальных путей, связанных с метаболизмом лекарственных препаратов-иринотекана и метаболизма тамоксифена; метаболизма аскорбата и альдарата; процесса глюкуронирования; пентозных и глюкуронатных превращений; обмена порфиринов и хлорофилла; метаболизм крахмала, сахарозы и ретинола; активирован биосинтез стероидных гормонов (Рисунок 40).

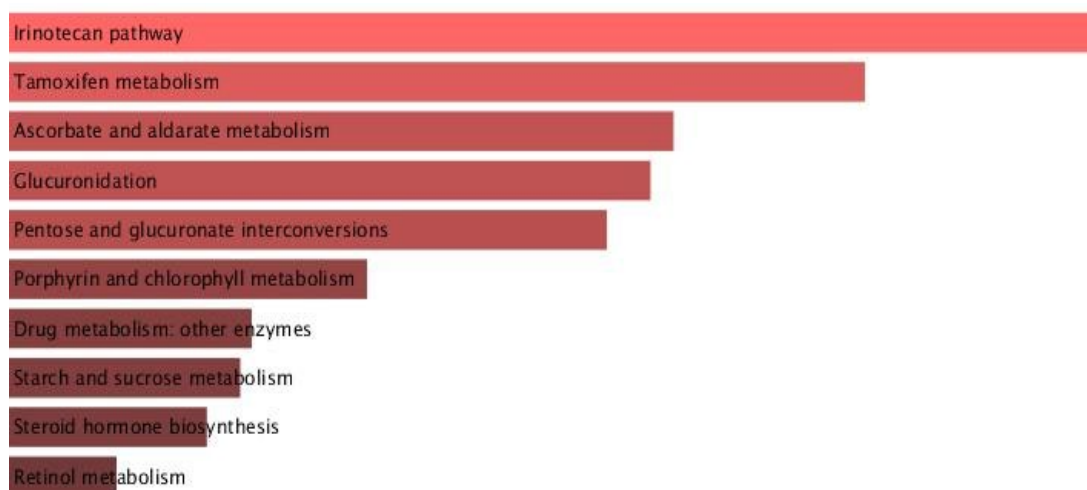


Рисунок 40 – Сигнальные пути ткани перитуморальной области, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения Enrichr)

Транскриптомный анализ клеток ткани перитуморальной области позволил выявить подавление сигнальных путей, ассоциированных с процессами кератинизации, клеточной подвижности, сборки пептидов, подавление воспалительной реакции и активности цитокинов, хемокинов; снижение биосинтеза и метаболизма гликогена, крахмала, сахарозы, глюкозы; активности IL-7 в иммунном ответе; связывание хемокинов с хемокиновыми рецепторами; обогащение сигнального пути TWEAK и AMPK. Выявлена активация сигнальных путей, связанных с метаболизмом лекарственных препаратов; активированы метаболизм аскорбата и альдарата; процесс глюкуронирования; активированы метаболизм крахмала, сахарозы и ретинола и биосинтез стероидных гормонов. При этом обращает на себя внимание обогащение сигнальных путей, ассоциированных с процессами иммунного ответа и биологического окисления, которые также были активированы после протонного облучения в опухолевой ткани, а также схожая тенденция с опухолевой тканью снижения метаболических процессов в клетках.

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

Ввиду того, что сохранный 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. Среди локализаций наиболее часто встречался рак гортани (63%), а также рак слизистой полости рта (17%). Все пациенты ранее не получали ЛТ и лекарственного противоопухолевого лечения. На момент постановки диагноза у всех пациентов отдаленные метастазы выявлены не были. Первичные конечные точки анализа – локальный контроль и общая выживаемость.

Перед началом лечения всем пациентам проводился ряд консультативно-диагностических мероприятий, включающий физикальный осмотр специалиста-онколога, пальпаторное обследование лимфоузлов шеи, ультразвуковое исследование органов шеи, спиральную КТ и/или МРТ, и при необходимости дополнительные методы обследования для выявления сопутствующей патологии. Также перед определением тактики лечения оценивался общий соматический статус пациентов с помощью шкалы оценки общего функционального состояния больного по Карновскому. Среднее значение составило 70 баллов (Таблица 19). Тяжесть состояния пациентов связана прежде всего с наличием опухоли, которая имеет большие размеры и нарушает нормальную жизнедеятельность человека, изменяя функцию пораженного опухолью органа и принося эстетический дискомфорт.

Таблица 19 – Общий соматический статус пациентов (n=24)

Индекс Карновского (в баллах)	70	80	90	Всего
Число пациентов	16	4	4	24
%	66,6	16,6	16,6	100

Первый этап лечения ПРГШ заключался в самостоятельной ЛТ протонами или ХЛТ. На данном этапе СОД ПТ составила 40-50 Гр.

Таблица 20 – Распространенность ПРГШ по критериям Т и N (n=24)

Распространенность опухоли по Т и N	T1	T2	T3	T4	Общее
N0	-	-	1	-	1 4,1%
N1	-	2	1	1	4 16,6%
N2	-	-	2	4	6 25%
N3	-	6	4	3	13 54,1%
Всего	0 0,0%	8 33,3%	6 25%	8 33,3%	24 100%

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 ряда пациентов после проведенного курса ПТ опухоль становилась резектабельной и пациентам выполнялось хирургическое удаление остаточной опухоли.

Была произведена оценка локорегионарного контроля и общей выживаемости пациентов в период от 1 года до 3 лет, оценена степень регрессии опухоли, токсичность лечения. Непосредственная эффективность лечения была оценена через 4-6 недель после завершения ПТ. Степень резорбции первичного очага после проведенного лечения оценивалась в соответствии с клиническими рекомендациями. 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% (Рисунок 41), 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, однако общий период наблюдения еще недостаточен для корректной оценки.

При расчёте корреляционных взаимосвязей между ответом опухоли на лечение и общей выживаемостью больных методом попарной корреляции Пирсона было установлено, что у пациентов с наличием объективного ответа



опухоли общая выживаемость выше, чем при стабилизации или прогрессии новообразования ( $r=0,7$ ,  $p<0,05$ ).

За всеми пациентами осуществлялось динамическое наблюдение с периодичностью, рекомендованной клиническими рекомендациями. В целом же за 3-летний временной период локорегионарный рецидив или продолженный рост отмечен у 16 пациентов. Лечение чаще всего заключалось в проведении адъювантных курсов химиотерапии, реже проводили повторное облучение.

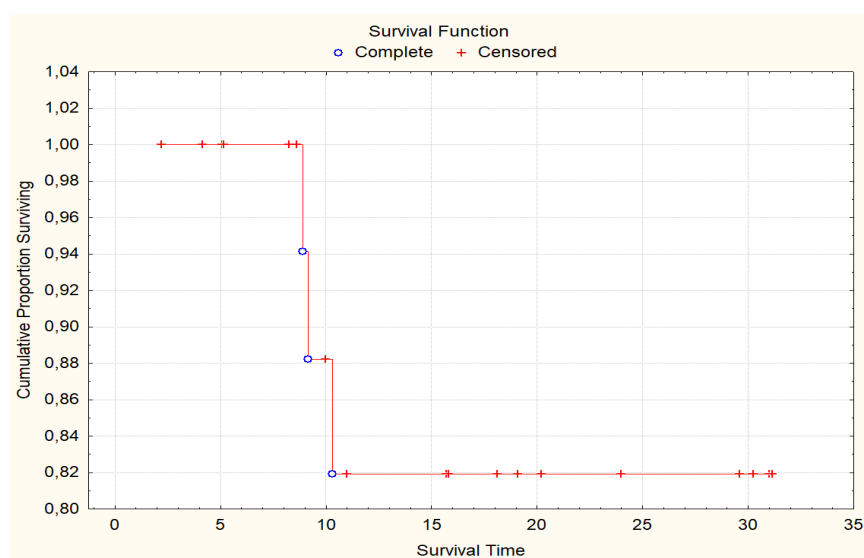


Рисунок 41 – Кривая общей выживаемости, построенная методом Каплана-Мейера

За время наблюдения от прогрессирования опухолевого заболевания или иных причин умерли 3 человека, 6 человек выбыли на разных сроках наблюдения, 15 пациентов живы.

Оценена токсичность проводимой ПТ. Лучевые реакции со стороны слизистых оболочек-мукозиты 1 степени были отмечены у 9 пациентов, 2 степени- у 11, третьей- 4. Ксеротомия наступила у 12 человек. Лучевые реакции со стороны кожи-эпидермит 1 степени наблюдались у 14 пациентов, 2 степени - у 4, 3 степени- у 1, у 5 пациентов признаков эпидермита не наблюдалось.

Таким образом, после проведенной ПТ общая выживаемость пациентов с ПРГШ без привязки к сроку наблюдения составляет 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, однако общий период наблюдения еще недостаточен для корректной оценки.

Ввиду высокой стоимости ПТ было принято решение о необходимости выявления дифференциальных сигнатур (маркеров ответа) у пациентов с разными ответами на проводимую терапию. Выявленные маркеры позволят направлять на ПТ тех пациентов, которые ответят на данный вариант ЛТ. 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.

### **3.4. Сравнение транскриптомного профиля клеток опухолевой и перитуморальной тканей в зависимости от клинического прогноза и поиск дифференциальных сигнатур**

После сбора клинико-анамнестических данных у пациентов, принявших участие в исследовании, вся когорта была разделена на 2 группы: группа пациентов с неблагоприятным онкологическим прогнозом и группа пациентов с благоприятным онкологическим прогнозом. Далее было проведено сравнение транскриптомных профилей пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом после воздействия протонного излучения. При этом дифференциально экспрессирующиеся сигнатуры 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 гена, из которых получены значимые различия в случае 134 гена по данным алгоритма DESeq2 R (Рисунок 42).

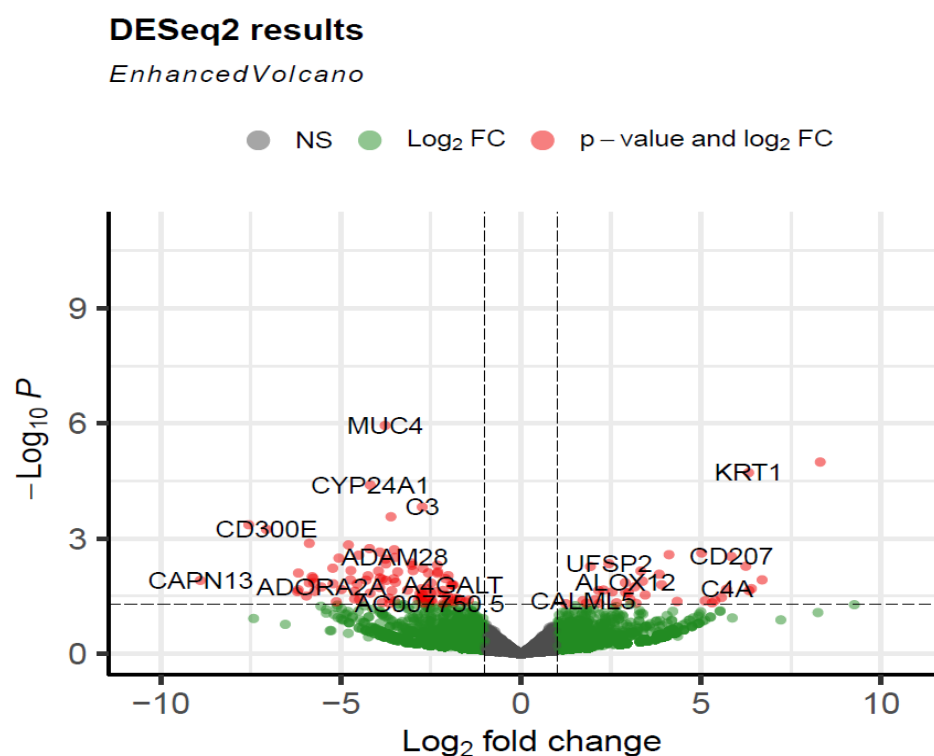


Рисунок 42 – Volcano-plot, отражающий значимые дифференциально экспрессированные гены (красные точки) по данным DESeq2 R

Перечень значимо экспрессированных генов с максимально повышенной (зеленым) и максимально сниженной (красным) экспрессией по данным DESeq2 R представлен в Таблице 21.

Таблица 21 – Список генов с максимально повышенной и пониженной экспрессией в образцах ткани перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения по данным DESeq2 R.

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>CAPN13</i>	0,012305	-8,89944	Кодирует кальций-активируемую нейтральную протеиназу 13, связанную с организацией ВКМ.

Продолжение таблицы 21

<i>CXCL13</i>	0,000437	-7,55547	Ген, кодирующий хемоаттрактант В-лимфоцитов.
<i>CD300E</i>	0,000575	-7,06491	Кодирует член семейства гликопротеинов CD300 клеточных поверхностных белков, экспрессируемых на миелоидных клетках.
<i>TMEM256-PLSCR3</i>	0,024182	-6,20374	Ген РНК, относящийся к классу lncRNA.
<i>MS4A14</i>	0,021532	-6,17967	Кодирует белок клеточной мембраны, участвующий в передаче сигнала внутрь клетки как компонент мультимерного рецепторного комплекса.
<i>KR1</i>	1,92E-05	6,324468	Кодирует кератин 1, белок промежуточных филаментов
<i>WFDC12</i>	0,022713	6,336193	Кодирует белок - ингибитор протеазы WAP12.
<i>MYOZ1</i>	0,020229	6,403388	Кодирует белок, связывающий филамин, актинин и телетонин.
<i>KR76</i>	0,011928	6,6992	Кодирует кератин 76, белок промежуточных филаментов
<i>LUZP6</i>	1,01E-05	8,312919	Ассоциирован с миелопролиферативными заболеваниями

Для более детального рассмотрения и выбора генов-кандидатов, чья экспрессия, ассоциированная с неблагоприятным прогнозом у пациентов, анализ обогащения генов проводился отдельно для генов с повышенной и пониженной экспрессией. Было продемонстрировано, что высокоэкспрессированные гены были классифицированы в следующие сигнальные пути (Таблица 22), (Рисунок 43): ороговение, кеританизация, организация промежуточных филаментов, защитная реакция на другой организм и т.д.

Таблица 22 – Список сигнальных путей высокоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения по данным PANTHER

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

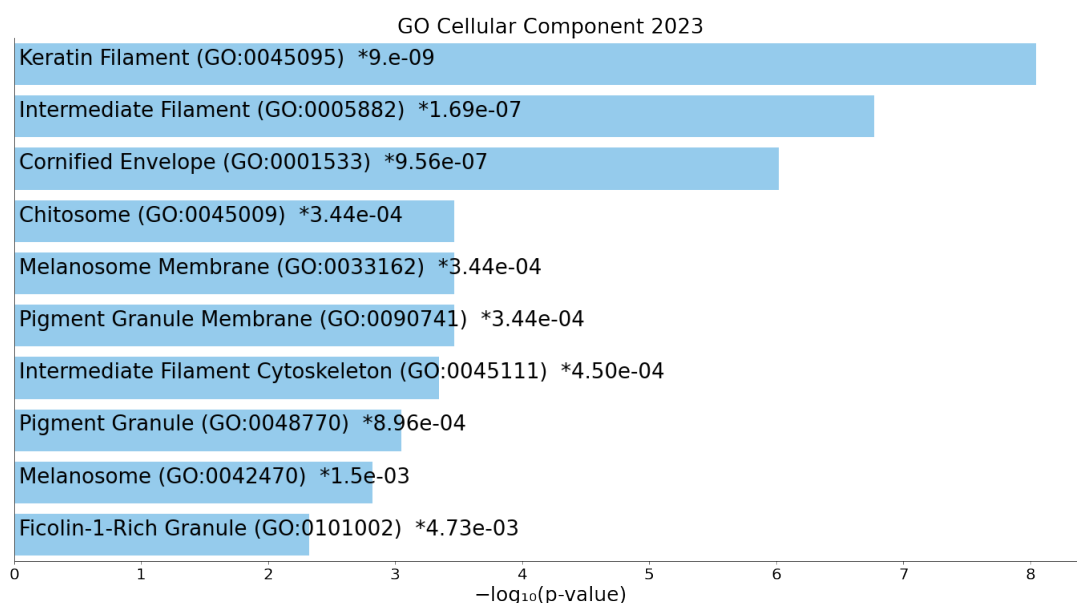


Рисунок 43 – Анализ обогащения высокоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения по данным Enrichr, приведены значения  $p$

Далее был проведен анализ низкоэкспрессированных генов: они были классифицированы в следующие сигнальные пути (Таблица 23), (Рисунок 44): регуляция уничтожения клеток другого организма, активация комплемента, альтернативный путь, хемотаксис нейтрофилов, клеточная защитная реакция, уничтожение клеток другого организма, воспалительная реакция, ответ на липополисахарид и т.д.

Таблица 23 – Список сигнальных путей низкоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения по данным PANTHER

Наиболее значимый процесс	Наиболее значимый процесс	Наиболее значимый процесс
Активация комплемента, альтернативный путь	<i>C3, CFH, CFB</i>	GO biological process complete

## Продолжение таблицы 23

Хемотаксис нейтрофилов	<i>CXCL13, PDE4B, IL1B, IL8, CXCL6, PPBP, CSF3R, CXCL1</i>	GO biological process complete
Клеточная защитная реакция	<i>LILRB2, ADORA2A, NCF1, CLEC5A</i>	GO biological process complete
Уничтожение клеток другого организма	<i>CXCL13, IL8, LTF, PPBP, CXCL1</i>	GO biological process complete
Воспалительная реакция	<i>C3, CXCL13, FPR1, FN1, IL1B, NOS2, ADORA2A, CLU, AGR2, IL8, CXCL6, PPBP, ITGB6, CD163, MDK, CXCL1</i>	GO biological process complete
Активность хемокинов	<i>CXCL13, IL8, CXCL6, PPBP, CXCL1</i>	GO molecular function complete
Сигнальный путь ИЛ-10	<i>FPR1, IL1B, IL8, CXCL1, IL1R2</i>	Reactome pathways

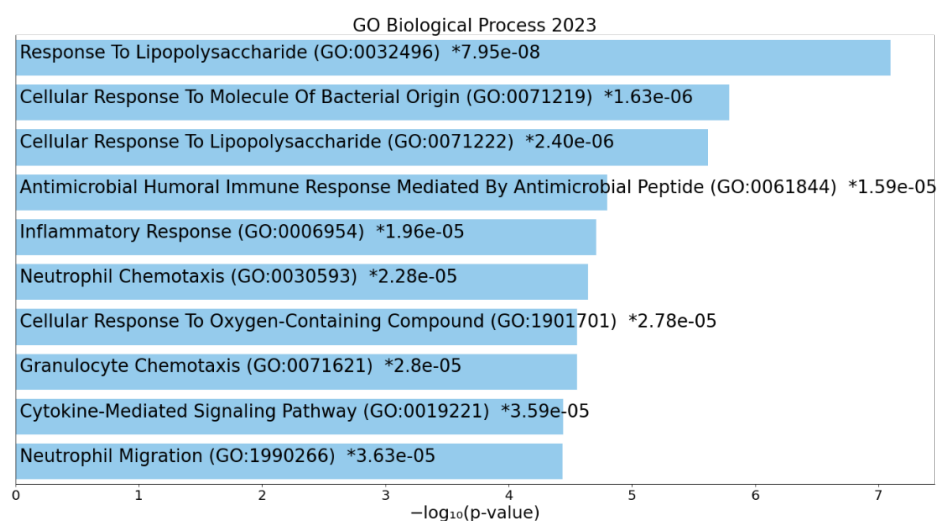


Рисунок 44 – Анализ обогащения низкоэкспрессированных генов в



образцах перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения по данным Enrichr, приведены значения  $p$

При сравнении ткани перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом после облучения по сравнению с образцами до облучения было получено 19822 гена, из которых получены значимые различия в случае лишь 48 генов по данным алгоритма DESeq2 R (Рисунок 45).

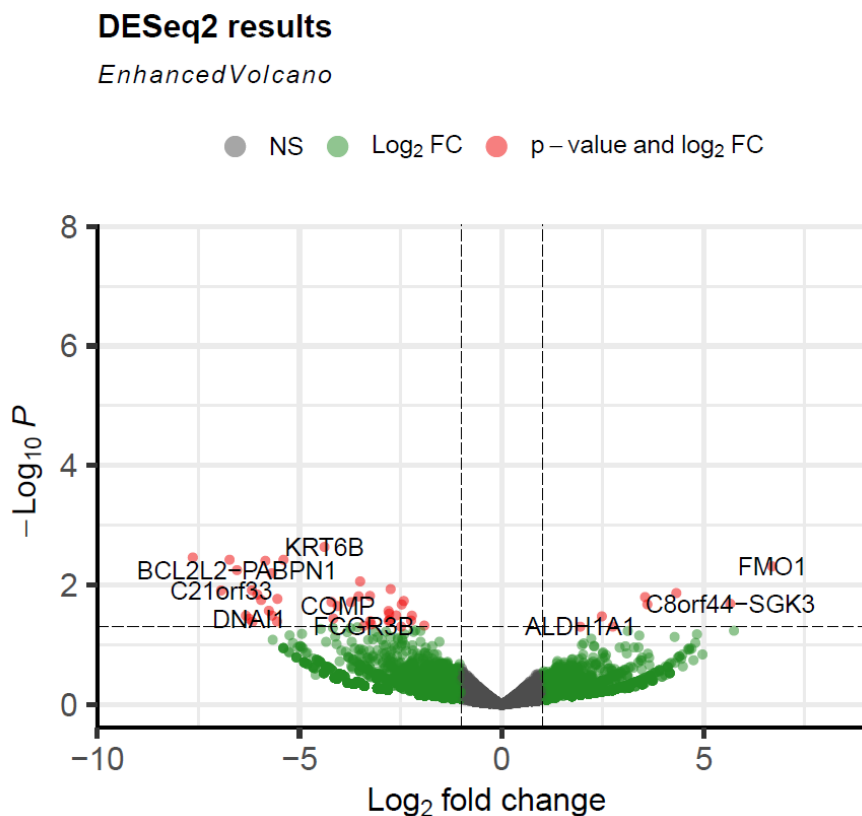


Рисунок 45 – Volcano-plot, отражающий значимое дифференциально экспрессированные гены (красные точки) по данным DESeq2 R

Перечень значимо экспрессированных генов с максимально повышенной (зеленым) и максимально сниженной (красным) экспрессией по данным DESeq2 R представлен в Таблице 24.

Таблица – 24 Список генов с максимально повышенной и пониженной экспрессией в образцах ткани перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения по данным DESeq2 R

Ген	Значение p	LOG <sub>2</sub> FC	Функция
<i>SERF2-C15ORF63</i>	0,003448	-7,64019	Ген кодирует слитый (readthrough) белок, который образуется из генов <i>SERF2</i> и <i>C15ORF63</i> , и его функция связана с регуляцией экспрессии генов, отвечающих за клеточный рост, развитие и апоптоз
<i>C21orf33</i>	0,012284	-6,93745	Ген кодирует митохондриальный белок, входящий в семейство DJ-1/PfpI.
<i>TNFSF12-TNFSF13</i>	0,003758	-6,72956	Участвует в регуляции роста опухолевых клеток и может быть вовлечён в иммунологические процессы, связанные с моноцитами/макрофагами.
<i>BCL2L2-PABPN1</i>	0,005607	-6,5461	Химерный транскрипт, обнаруженный в жировой ткани
<i>NDUFC2-KCTD14</i>	0,032438	-6,3265	Кодирует белок, участвующий в работе митохондриального комплекса I – ключевого фермента в цепи переноса электронов, отвечающего за клеточное дыхание.
<i>GSTA1</i>	0,01582	3,547269	Ген кодирует фермент альфа-1 глутатион-S-трансфераза, который является ключевым звеном в системе детоксикации организма.

Продолжение таблицы 24

<i>MT1X</i>	0,020972	3,603928	Ген кодирует металлотионеин 1X, белок, участвующий в гомеостазе металлических ионов, регуляции окислительного стресса и модуляции выживаемости клеток.
<i>LUZP6</i>	0,013567	4,321353	Белок, кодируемый этим геном, связан с хроническим миелоидным лейкозом и раком предстательной железы
<i>C8orf44-SGK3</i>	0,020488	5,65347	Белок, кодируемый этим геном, связан с раком предстательной железы
<i>FMO1</i>	0,004853	6,691848	Ген кодирует флавинсодержащую монооксигеназу 1

Было продемонстрировано, что высокоэкспрессированные гены были классифицированы в следующие сигнальные пути (Рисунок 46): биологическое окисление, катаболизм фруктозы, метаболизм фруктозы, окисление этанола, металлотионеин-связывающие металлы т.д.

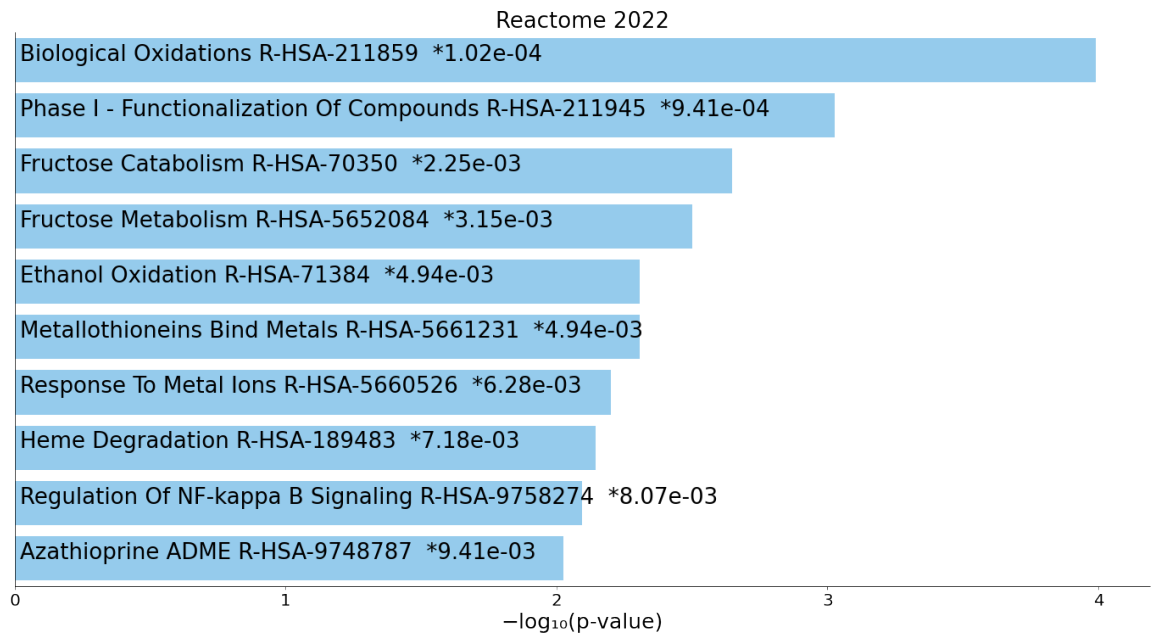


Рисунок 46 – Анализ обогащения высокоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом: после облучения по данным Enrichr, приведены значения  $p$

Далее был проведен анализ низкоэкспрессированных генов: они были классифицированы в следующие сигнальные пути (Таблица 25), (Рисунок 47): организация промежуточных филаментов, структурные составляющие цитоскелета, кератиновые нити, коллагенсодержащий внеклеточный матрикс, промежуточные филаменты и т.д.

Таблица 25 – Список сигнальных путей низкоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения по данным PANTHER

Наиболее значимый процесс	Гены	Классификатор
Организация промежуточных филаментов	<i>EPPK1</i> , <b><i>KR6B</i></b> , <b><i>KR16</i></b> , <i>KR14</i> , <i>KR6C</i>	GO biological process complete
Структурный компонент цитоскелета	<b><i>KR6B</i></b> , <b><i>KR16</i></b> , <i>KR14</i> , <i>TUBB3</i>	GO molecular function complete
Кератиновые филаменты	<i>EPPK1</i> , <b><i>KR6B</i></b> , <b><i>KR16</i></b> , <i>KR14</i> , <i>KR6C</i>	GO cellular component complete
Коллагенсодержащий внеклеточный матрикс	<i>TNXB</i> , <i>COMP</i> , <i>CPA3</i> , <i>EFEMP1</i> , <i>TPSAB1</i>	GO cellular component complete
Промежуточные филаменты	<i>EPPK1</i> , <b><i>KR16</i></b> , <i>KR14</i>	PANTHER Protein Class

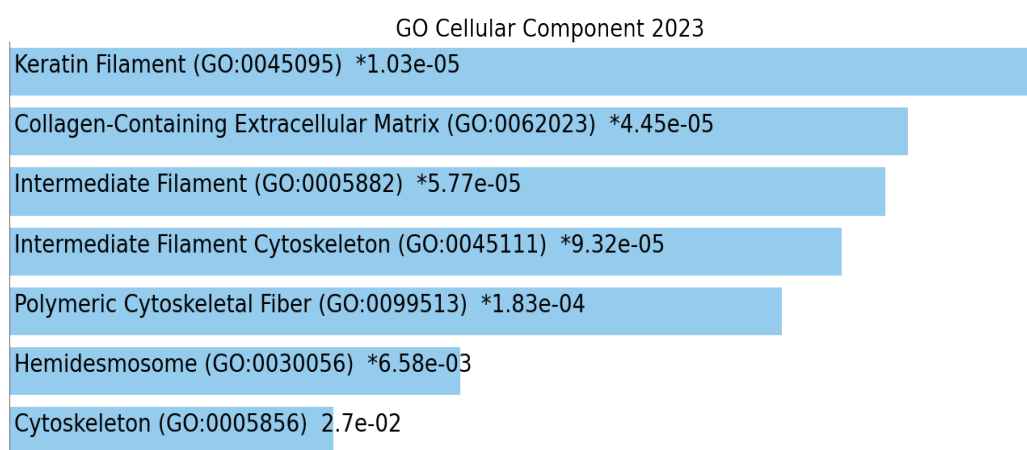


Рисунок 47 – Анализ обогащения низкоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом: после облучения по данным Enrichr, приведены значения p

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.

### **3.5. Верификация выявленных биомаркеров-предикторов ответа на ПТ, дифференциально экспрессирующихся в ткани перитуморальной области у пациентов с хорошим и плохим прогнозом**

Для анализа уровня экспрессии *KR1*, *KR6b* и *KR16* в перитуморальной ткани у пациентов с хорошим и плохим прогнозом были взяты следующие контрольные точки: до облучения (число, округленное до минимального целого) и после облучения протонами в дозе 10 изоГр. Мультиплексный ПЦР-РВ тест оценки относительной экспрессии выбранных генов до и после облучения был успешно выполнен у 10 пациентов (5 пациентов с плохим прогнозом и 5 пациентов с хорошим прогнозом).

В ходе оценки результатов ПЦР-РВ у пациентов с плохим прогнозом наблюдалось увеличение экспрессии *KR1*, *KR6b* и *KR16* после облучения сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр. Отмечено в среднем почти трехкратное увеличение экспрессии *KR1* и *KR16*, экспрессия *KR6b* увеличивалась в 2,5 раза (Рисунок 48), (Таблица 28).



Рисунок 48 – Экспрессия *KR1*, *KR6b*, *KR16*, до и после облучения сканирующим пучком протонов в ткани перитуморальной области у пациентов с плохим прогнозом

Таблица 28 – Оценка изменения экспрессии *KR* в ткани перитуморальной области после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр у пациентов с плохим клиническим прогнозом

Гены	Уровень экспрессии до ПТ; M±s n=5	Уровень экспрессии после ПТ; M±s n=5
<i>KR1</i>	0,33±0,03	0,95±0,07
<i>KR6b</i>	3,74±0,38	10,11±1,08
<i>KR16</i>	0,15±0,05	0,63±0,02

Перитуморальная ткань пациентов с хорошим прогнозом отличалась снижением экспрессии *KR1*, *KR6b* и *KR16* после облучения сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр. Отмечено пятикратное снижение экспрессии *KR1*, девятикратное снижение экспрессии *KR6b* и шестикратное снижение экспрессии *KR16* после ПТ. (Рисунок 49), (Таблица 29).



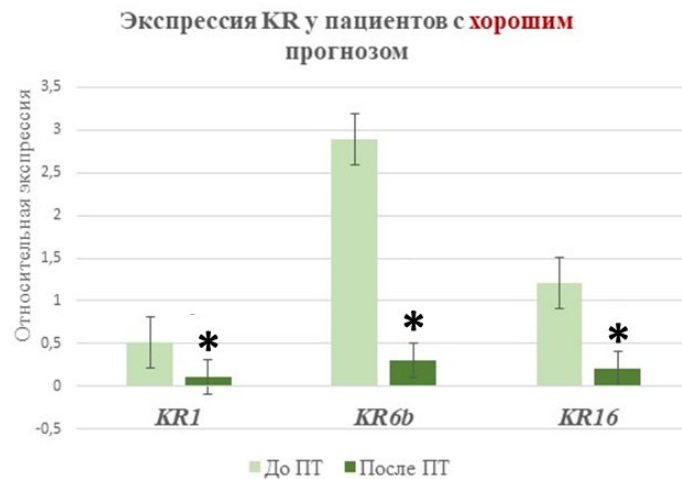


Рисунок 49 – Экспрессия *KR1*, *KR6b*, *KR16*, до и после облучения сканирующим пучком протонов в ткани перитуморальной области у пациентов с хорошим прогнозом

Таблица 29 – Оценка изменения экспрессии *KR* в ткани перитуморальной области после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр у пациентов с хорошим клиническим прогнозом

Гены	Уровень экспрессии до ПТ; $M \pm s$ (n=5)	Уровень экспрессии после ПТ; $M \pm s$ (n=5)
<i>KR1</i>	$0,51 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
<i>KR6b</i>	$2,89 \pm 0,11$	$0,3 \pm 0,01$
<i>KR16</i>	$1,2 \pm 0,14$	$0,21 \pm 0,02$

Таким образом, в ходе данного этапа работы методом ПЦР-РВ были подтверждены данные, полученные в ходе сравнения транскриптомных профилей пациентов с хорошим ответом на ПТ и пациентов с плохим ответом на ПТ. Перитуморальная ткань пациентов с неблагоприятным клиническим прогнозом демонстрирует повышение экспрессии выбранных генов после облучения сканирующим пучком протонов, тогда как в перитуморальной ткани

пациентов с хорошим прогнозом их экспрессия снижается. Проведенный анализ подтвердил возможность использования *KR1*, *KR6b* и *KR16* в качестве биомаркеров-предикторов ответа на ПТ.

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Современное представление о радиобиологии постепенно расширяется, однако до сих пор остается неясно, почему одни пациенты отвечают на ЛТ выраженным положительным ответом, а другие – прогрессированием заболевания. Именно это послужило стимулом для пристального изучения не только опухолевой, но и ткани перитуморальной области, которая рассматривается в качестве одного из основных источников прогрессирования и рецидивирования ПРГШ.

Считается, что в основе локального рецидива опухоли лежат три основных механизма: трансформация предраковых клеток, повторное заселение области персистирующими опухолевыми клетками или не прямое ремоделирование ткани перитуморальной области. Согласно первой гипотезе, прилегающая перитуморальная ткань может содержать первичный клон предопухолевых клеток, которые могут впоследствии трансформироваться и становиться источником новой опухоли [Fridman, Tainsky, 2008]. Именно она более всего подходит для объяснения локальных рецидивов ПРГШ [Braakhuis и др., 2003]. Сторонники второй гипотезы, считают, что перитуморальная ткань может содержать инфильтрирующие опухолевые клетки, которые впоследствии делятся и дают начало новому опухолевому очагу. Эта гипотеза была признана «рабочей» при опухолях головного мозга [Fratì и др., 2022; Mangiola и др., 2013]. Третья гипотеза объясняет участие перитуморальной ткани в рецидиве непрямым ремоделированием, посредством секретируемых сигналов, хемокинов и факторов роста, секретируемых рекрутированными иммунокомпетентными клетками и ФАО. До сих пор исследования ПРГШ в основном были сосредоточены на изучении особенностей строения опухоли, в то время как тканям перитуморальной области посвящено значительно меньшее количество работ. В рамках данной работе оценивался клеточный состав и транскриптом не только опухолевой, но и ткани перитуморальной области, а также описаны их изменения, индуцированные ПТ.

Гистологическое исследование образцов опухолевой ткани является обязательным для верификации диагноза и предоставляет информацию о структуре и архитектонике опухолевой ткани. В ходе гистологического исследования было выявлено, что все образцы ПРГШ состояли из паренхимы и стромы. При этом вне зависимости от анатомической локализации гистологическая картина во всех образцах была схожей. Образцы ткани перитуморальной области характеризовались морфологией нормальной эпителиальной ткани с сохранной архитектоникой. После облучения сканирующим пучком протонов в ткани и 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, который представляет собой состояние, при котором фибробласты остаются активированными, вследствие чего происходит чрезмерное накопление компонентов ВКМ [Fijardo и др., 2024].

Как правило, для постановки диагноза ПРГШ гистологического исследования достаточно. Однако, для определения фенотипа инвазирующих клеток необходимо проведение ИГХ исследования [Caruntu и др., 2021; Johnson и др., 2020]. В исследуемых образцах отсутствие Vimentin+ клеток в областях инвазии подтвердило принадлежность исследуемых опухолей к так называемой «классической», а не «мезенхимной» подгруппе карцином органов головы и шеи, которые отличаются по профилю экспрессии генов, в том числе вовлеченных в запуск ЭМП [Canning и др., 2019]. Vimentin является белком промежуточных филаментов клеток тканей мезодермального происхождения (в том числе соединительной ткани), участвующий в построении цитоскелета. Считается, что экспрессия Vimentin в опухоли служит одним из признаков ЭМП [Mogre и др., 2022]. Экспрессия Vimentin уже определяется на этапе предраковых изменений слизистой оболочки полости рта. При этом, повышенные уровни белка Vimentin и мРНК коррелируют со степенью прогрессирования заболевания от дисплазии до инвазивной карциномы [Sawant и др., 2014]. Необычно, но после облучения

сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр в опухолевой ткани и в ткани перитуморальной области отмечалась разная динамика изменения экспрессии данного маркера: в опухолевой ткани процент клеток положительных по данному маркеру снижался, а в перитуморальной -увеличивался. Такая динамика экспрессии Vimentin в опухолевой ткани после облучения протонами может свидетельствовать о снижении риска метастазирования ПРГШ [Liu и др., 2016]. Похожие результаты были получены в ходе протеомного анализа клеточной линии меланомы человека после протонного облучения сублетальной СОД 3 Гр [Kedraska-Krok и др., 2014].

Е-кадгерин представляет собой трансмембранный гликопротеин, принадлежащий к большому семейству кальций-зависимых молекул клеточной адгезии, играющий ключевую роль в формировании и поддержании межклеточных контактов между эпителиальными клетками [Wong и др., 2018]. Известно, что Е-кадгерин, действующий как белок-супрессор опухоли, обильно экспрессируется на клеточной мембране нормальных эпителиальных клеток, но его экспрессия постепенно снижается на стадиях эпителиальной дисплазии, карциномы *in situ* и инвазивного рака [Cheng и др., 2018]. Доказано, что потеря мембранной экспрессии Е-кадгерина ассоциирована со снижением клеточной адгезии и усилением инвазии опухолевых клеток, а снижение его экспрессии является признаком ЭМП, который часто выступает начальным событием в прогрессировании опухоли [Wong и др., 2018].

KR составляют группу белков, из которых построены промежуточные филаменты эпителиальных клеток. Основная роль этих белков заключается в том, чтобы действовать как упругая, но адаптируемая структура, которая наделяет эпителиальные клетки способностью выдерживать механические и немеханические стрессовые воздействия. Ввиду тканеспецифичной экспрессии KR, их используют в клинической практике для диагностирования опухолей эпителиального происхождения. Для ПРГШ характерна высокая экспрессия KR 5 и KR 17 [Yi, Zhai, Wang, 2017], поэтому для подтверждения этого типа ЗНО нередко используется оценка их экспрессии [Ху и др., 2018]. Выраженная

экспрессия KR 5 и KR17 при ПРГШ ассоциирована с активацией ЭМП и миграцией опухолевых клеток [Liu и др., 2020b; Raluca Ceausu и др., 2021]. Также KR17 активирует сигнальный каскад Akt/mTOR/гипоксия-индуцируемый фактор  $1\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), способствуя пролиферации опухолевых клеток и эффекту Варбурга, тем самым стимулируя рост опухоли [Yan и др., 2020b]. Кроме этого, KR17 принимает участие в процессе уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора: подавляет инфильтрацию опухолевой ткани CD8<sup>+</sup> Т-клетками [Delgado-Coka и др., 2024]. В исследованных образцах клетки, экспрессирующие KR 5 и KR 17, были выявлены как в опухолевой, так и в ткани перитуморальной области, что свидетельствует об отсутствии специфичности данных маркеров к опухолевой ткани ПРГШ и о том, что клетки перитуморальной области находятся в состоянии ЭМП. Дифференциальная экспрессия KR10, выявленная в рамках данной работы, коррелирует с результатами других авторов, которые при исследовании рака полости рта обнаружили экспрессию данного KR в нормальном, гиперплазированном и дисплазированном многослойном эпителии, покрывающем слизистую оболочку, а также в опухолевых клетках образцов высокодифференцированной карциномы [Ali, Al-Jandan, Suresh, 2018]. Полученные данные подтверждают возможность использования KR 13 в качестве чувствительного дифференциального маркера для разделения опухолевых клеток и нормальных эпителиальных клеток, в том числе находящихся на предшествующей развитию инвазивной карциномы стадии дисплазии [Boricić и др., 2022]. После облучения сканирующим пучком протонов экспрессия KR 5, KR 17 в опухолевой ткани снижалась, в ткани перитуморальной области снижалась экспрессия KR 5, а экспрессия KR 17 оставалась без изменений.

Для идентификации ОСК в ПРГШ была оценена экспрессия CD44 и ALDH1 [Peitzsch и др., 2019; Yi, Zhai, Wang, 2017]. Функциональная роль CD44 является плеiotропной и включает в себя индукцию ЭМП, перестройку клеточного цитоскелета, индукцию механизмов антиапоптоза. Также было обнаружено, что CD44 играет важную роль в деградации коллагена ВКМ,

инвазии опухолевых клеток и неоваскуляризации путем связывания с факторами роста и MMP9, тем самым способствуя метастазированию [Ghazi и др., 2021; Kumar и др., 2023]. В ходе ИГХ исследования выявлено, что данный маркер экспрессируется не только клетками опухоли, но и эпителиальными клетками ткани перитуморальной области. Похожие результаты были опубликованы в недавнем исследовании, свидетельствующем о том, что CD44+ эпителиальные клетки присутствуют и в нормальной ткани органов головы и шеи, а именно в лимфатических узлах и в многослойном эпителии, покрывающем слизистую оболочку глотки и гортани [Sharaf и др., 2021]. ALDH1A1 относится к внутриклеточным маркерам ОСК и принадлежит к семейству ферментов ALDH, катализирующих окисление альдегидов до карбоновых кислот. Большой процент положительных клеток по маркеру ALDH1A1 был обнаружен в опухоли и в ткани перитуморальной области. Подобные данные были получены другими научными группами, обнаружившими наличие ALDH1A1 в нормальных эпителиальных клетках фаллопиевых труб (как в секреторных, так и реснитчатых) и в поверхностном эпителии яичников [Chui и др., 2015], эпителиальных клетках ткани молочной железы [Eirew и др., 2012], в нормальной ткани органов пищеварительной системы (включая эпителий пищевода, желудка, кишечника, а также печени, поджелудочной и слюнных желез), эндокринной системы (включая надпочечники, гипофиз, щитовидную железу) и половой системы (эпителий яичников и яичек) [Deng и др., 2010]. Высокий уровень экспрессии CD44 и ALDH1A1 в ПРГШ ассоциирован с риском метастазирования, резистентностью к противоопухолевой лекарственной терапии и ЛТ [Chen и др., 2014a]. Облучение сканирующим протонным пучком СОД 10 изоГр индуцировало снижение количества ALDH1A1+ и CD44+ клеток в опухолевой ткани, в перитуморальной ткани снижалось количество ALDH1A1+ клеток, а экспрессия CD44 менялась незначительно. В исследовании Schniewind et al. проанализированы эффекты однократного облучения протонами СОД 4 Гр на популяции ОСК в шести линиях опухолевых клеток, в том числе линии ПРГШ. С помощью проточной цитометрии оценивалась

экспрессия CD44, ALDH1A1 до и после протонного облучения в различные временные точки в течение 14 дней. Все протестированные клеточные линии продемонстрировали повышенную активностью ALDH1A1 и экспрессию CD44 в первую неделю после облучения, а далее отмечалось их выраженное снижение [Schniewind и др., 2022].

Ki-67 — это ядерный антиген, связанный с пролиферацией клеток, высокий уровень экспрессии которого свидетельствует об агрессивном течении опухолевого процесса и неблагоприятном прогнозе ПРГШ [Dumitru и др., 2022]. В опухолевых клетках был выявлен высокий уровень экспрессии Ki-67 (экспрессируется во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя G0). В ткани перитуморальной области чуть больше трети клеток многослойного плоского эпителия экспрессировали Ki-67, располагаясь при этом преимущественно в базальном и промежуточном слоях. Облучение сканирующим пучком протонов вызывало выраженное снижение экспрессии данного маркера почти в два раза в опухолевой ткани ПРГШ, чуть менее выраженное снижение экспрессии выявлено в ткани перитуморальной области. Снижение доли Ki-67+клеток свидетельствует о подавлении пролиферации клеток, индуцированным протонным облучением. В исследовании Chung et al. на клеточной линии мышинной гепатоцеллюлярной карциномы продемонстрировано снижение скорости пролиферации клеток после протонного облучения в дозе 20 Гр. Скорость пролиферации была самой низкой на 1-й день после облучения и постепенно восстановилась на 7-й день [Chung и др., 2025].

Другой ядерный белок p63 относится к группе транскрипционных факторов, регулирующих активность множества генов, участвующих в росте и развитии эктодермы и ее производных. Оценка экспрессии p63 часто используется для дифференциальной диагностики опухолей: известно, что p63+ клетки присутствуют в 96-100% случаев плоскоклеточной карциномы независимо от ее происхождения [Steurer и др., 2021]. Доля p63+ опухолевых клеток, определенная в данной работе, оказалась очень близка к данным других исследователей, которые изучали плоскоклеточную карциному полости рта: в



соответствии с их данными доля p63<sup>+</sup> опухолевых клеток варьировала от 75,1% до 82,2% и не зависела от степени дифференцированности карциномы [Mestrinho и др., 2015]. Механизм регуляции уровня экспрессии белка p63 очень сложен и включает в себя Wnt, Hedgehog, Notch и EGFR-сигнальные пути [Yoh, Prywes, 2015], которые также регулируют пролиферацию, дифференцировку, метастазирование, а также устойчивость опухолевых клеток к противоопухолевой лекарственной терапии [Kumar и др., 2021], поэтому при исследовании p63<sup>+</sup> субпопуляции клеток опухолевой ткани для корректного анализа результатов необходимо учитывать ее исходную гетерогенность. Облучение протонами СОД 10 изoГр приводило к снижению доли клеток, экспрессирующих p63 в опухоли и в ткани перитуморальной области. Экспрессия изоформы  $\Delta$ Np63 $\alpha$  до и после ионизирующего излучения была изучена для клеточных линий ПРГШ (PCI-I-1, PCI-13, SCC-68 и SCC-4), а также первичных кератиноцитов слизистой оболочки полости рта. Уровень экспрессии  $\Delta$ Np63 $\alpha$  варьировал и зависел от дозы облучения во всех клеточных линиях [Kuchur и др., 2021].

Маркер CD68, (также известный как GP110, LAMP4 или SCARD1), представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 110 кДа, который выступает панмакрофагальным маркером, в частности ОАМ. Высокие уровни CD68 связаны с высокой степенью злокачественности опухоли, ее большим размером [Zhang и др., 2022a]. Данные о связи экспрессия CD68 в ткани ПРГШ с клиническим прогнозом противоречивы [Furgiuele и др., 2022], [Aydin и др., 2024]. Количество CD68<sup>+</sup> клеток превалировало в ткани перитуморальной области. Облучение сканирующим протонным пучком приводило к увеличению CD68<sup>+</sup> клеток в опухолевой ткани и в ткани перитуморальной области, что соответствует данным, опубликованным в литературе, при этом известно, что ОАМ M1 более устойчивы к протонному облучению, поэтому вероятнее всего то, что после ПТ увеличивается именно их количество [Genard и др., 2018].

Изучение строения ткани перитуморальной области может предоставить важную информацию для изучения процессов инициации туморогенеза,

метастазирования, изменения фенотипа клеток и т.д. Особое внимание при этом, следует уделять эпителиальным клеткам, поскольку поиск дифференциальных маркеров нормальных и опухолевых эпителиальных клеток необходим для корректной интерпретации результатов фундаментальных исследований, доклинических и клинических испытаний опухолей органов головы и шеи. Полученные результаты в ходе сравнения клеточного состава опухолевой ткани ПРГШ и ткани перитуморальной области свидетельствуют о схожем клеточном составе, а выявление маркеров ОСК в ткани перитуморальной области свидетельствует о присутствии этих клеток в данной области что соответствует понятию «поле канцеризации» и предположениям коллег об участии близлежащих тканей в процессах опухолевого прогрессирования и рецидивирования. Установленный фенотип клеток ткани перитуморальной области EpCAM+Vimentin+, KR5+ свидетельствует о наличии эпителиальных клеток, находящихся в трансформированном состоянии, в частности, в состоянии 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.

Превращение ПТ из концептуального инструмента в клинически эффективную терапевтическую опцию требует интеграции радиобиологических знаний и технологических достижений. В последние годы количество работ, посвященных применению ПТ для лечения ЗНО стало значительно больше. Это связано, во-первых, с увеличением количества протонных центров во всем мире; во-вторых, с увеличением потока больных, который позволяет быстро набрать пациентов в клинические исследования. Физикальные особенности ПТ обуславливают тот факт, что именно этому виду ЛТ все чаще отдается предпочтение особенно при необходимости повторного облучения, в том числе при рецидивах ПРГШ. Ретроспективный анализ, проведенный Phan и соавт. [Phan и др., 2016], включал 60 пациентов, которым проводились повторные курсы ПТ по поводу рецидива опухолей головы и шеи. Медиана наблюдения составила 13,6 месяцев, а медиана времени между двумя курсами лечения -47,1

месяц. Тридцать пять пациентов (58%) на первом этапе были прооперированы, 44 пациента (73%) проходили повторный курс ЛТ в сочетании с препаратами платины. Медиана СОД при повторном облучении составила 61,5 изоГр (в группе послеоперационного облучения и 66 изоГр в группе без хирургического этапа лечения. Показатели годовичного и двухгодичного локорегионарного контроля и общей выживаемости составили 80,8% и 72,8%, 81,3% и 69% соответственно. У 12 пациентов (20%) развились поздние лучевые реакции 3 степени. Частота развития реакций на первом году составила 11,9%, на втором 26%. При анализе факторов риска возникновения ранних и поздних лучевых осложнений было отмечено, что при облучении объема CTV>50 см<sup>3</sup> риск возникновения токсичности третьей степени выше ( $p<0,05$ ). Схожие результаты были опубликованы Romesser и соавт. [Romesser и др., 2016]. В их исследование были включены 92 пациента с рецидивами опухолей области головы и шеи. Частота возникновения локорегионарных рецидивов на первом году наблюдения составила 25,1%, и частота развития лучевых осложнений  $\geq 3$  степени составила 21,7% случаев.

В рамках исследования [Dionisi и др., 2019] были проанализированы результаты лечения ПТ 17 пациентов с рецидивами опухолей носоглотки. Медиана наблюдения составила 10 месяцев. Большинству пациентов (53%) проводилась одновременная ХЛТ. Всеми пациентами лечение было перенесено удовлетворительно, не было отмечено ни одного случая острой лучевой токсичности 3 степени и выше. Показатели общей выживаемости и локального контроля в период 18 месяца составили 54,4% и 66,6% соответственно. В 23,5% случаев были отмечены поздние лучевые осложнения 3 степени и выше. Чаще всего (в 17,6% случаев) у пациентов наблюдалось снижение слуха. Также был зарегистрирован 1 случай фатального разрыва сонной артерии (6%).

Интересной с точки зрения достижения локального контроля выглядят результаты исследования 2023 года, в котором СОД повторной ПТ приравнивалась к дозе первичного лечения. В исследование были включены

результаты лечения 154 пациентов, пролеченных до медианы дозы в 70 изоГр(66-70 изоГр), которая является стандартной для облучения пациентов с впервые выявленными опухолями головы и шеи. Показатели одногодичной общей выживаемости составили 66,6%, а локальный контроль был равен 71,8%. Но повышение СОД до радикальных значений ожидаемо привело и к увеличению частоты возникновения лучевых осложнений 3 степени и выше - она составила 32,6%, из которых 5 случаев были предположительно связаны с развитием разрыва сонной артерии [Lee и др., 2023].

Внимания заслуживает еще одна работа, в которой сравнивали результаты лечения пациентов с помощью IMRT и ПТ. В исследование были включены всего 55 пациентов (23 проводилась IMRT, 22 проводилась ПТ), которым проводился повторный курс ЛТ с медианой дозы на объем CTV в 66 Гр. При статистическом анализе и сравнении двух методик было выявлено значимое различие в одно- и двухгодичном показателях выживаемости без прогрессирования, которые составили 9,1%/9,1% для IMRT и 50%/22,2% для ПТ ( $p=0,031$ ). Также стоит отметить, что имелась тенденция к увеличению показателей общей выживаемости и локального контроля в группе ПТ, но вероятно из-за маленькой выборки они были статистически незначимы ( $p=0,16$  и  $p=0,17$ , соответственно) [Beddok и др., 2022].

В исследовании Dale и соавт. проведено сравнение 25 планов лечения с помощью ПТ пациентов с раком орофарингеальной зоны, с IMRT планами [Dale и др., 2016]. При анализе полученных результатов было отмечено, что дозы, приходящиеся на передний и задний отделы ротовой полости, средние и нижние констрикторы глотки, пищевод, ствол мозга, мозжечок и другие органы ЦНС были значимо ниже в планах ПТ, что в перспективе должно снизить частоту дисфагий и уменьшить количество пациентов, питающихся с помощью назогастральных зондов [Dale и др., 2016].

В данной работе в ходе оценки клинических эффектов ПТ также была отмечена низкая частота встречаемости постлучевых реакций выше 2 степени,

что обуславливает отсутствие необходимости перерывов в лечении. Принимая во внимание благоприятный профиль безопасности ПТ, закономерно возникает вопрос о возможном полном переходе на нее при необходимости проведения ЛТ. Однако широкое применение ПТ ограничено высокой стоимостью синхротронных установок. Рациональное применение дорогостоящих методов лечения одна из наиболее актуальных задач лечебных учреждений. На сегодняшний день единственным способом определения показаний к ПТ является модель, предложенная голландскими исследователями, основанная на сравнении дозиметрических планов фотонного и протонного облучения, с моделированием рисков развития тех или иных осложнений. Данная методика имеет ряд существенных недостатков, так как очевидно, что протоны всегда будут заведомо «выигрывать» по дозному распределению, что в общем не позволяет достоверно определить категорию больных, нуждающихся именно в ПТ. Это обуславливает необходимость разработки тест-системы для оценки радиочувствительности опухолей еще до начала противоопухолевого лечения.

Для обнаружения каких-либо дифференциальных сигнатур, позволяющих спрогнозировать ответ пациента на ПТ, были оценены изменения, индуцированные ПТ в клетках опухоли и клетках ткани перитуморальной области. В качестве объекта исследования был выбран именно транскриптом, поскольку это динамически изменяющаяся система под действием различных факторов окружающей среды.

Далеко не каждый ген в геноме клеток многоклеточного организма транскрипционно активен. Кроме того, один ген может продуцировать несколько вариантов РНК благодаря альтернативному сплайсингу, редактированию РНК или альтернативным сайтам инициации и терминации транскрипции. Суммарная транскрипционная активность, то есть весь спектр экспрессируемых молекул РНК, отражается в клеточном транскриптоме. Транскриптом может быть представлен как процент генетического кода, транскрибированного в молекулы РНК, который, по оценкам, составляет менее 5% генома человека [Frith, Pheasant, Mattick, 2005; Tsimberidou и др., 2022]. В

качестве прецизионного онкологического исследования транскрипционный анализ начал применяться сравнительно недавно [Rodon и др., 2019; Worst и др., 2016]. В свою очередь, понимание транскрипционной гетерогенности ПРГШ, возможно, поспособствует выявлению диагностических и прогностических биомаркеров, которые позволят осуществлять подбор терапии персонализировано, что приведет к увеличению положительных ответов на противоопухолевую терапию и улучшит исходы/увеличит число положительных ответов на лечение.

Изменения транскриптома клеток после ПТ в СОД 10 изоГр были также оценены в опухолевой и перитуморальной тканях. Сведения о биологических эффектах, индуцированных облучением протонами, в частности о действии на иммунные клетки микроокружения опухоли, остаются ограниченными. Считается, что ПТ инициирует реакции иммунного ответа за счет активации инфильтрации опухоли различными иммунными клетками [Mirjolet и др., 2021]. В рамках данного исследования в ходе оценки изменения транскриптома, было выявлено подавление сигнальных путей, ассоциированных с миграцией и хемотаксисом нейтрофилов и лимфоцитов. Кроме этого, было отмечено значимое подавление активации МНС класса II. Наблюдаемое в данном исследовании снижение активности МНС-II и подавление продукции цитокинов макрофагами может указывать на снижение функциональной активности клеток АПК, находящихся непосредственно в опухолевой ткани и попавших под воздействие протонного пучка. Принимая во внимание тот факт, что среди АПК в ПРГШ превалируют ОАМ M2 фенотипа, ассоциированные с прогрессированием опухоли и метастазированием [Hu и др., 2016; She и др., 2018], подавление их активности выступает в качестве благоприятного признака воздействия ПТ. Нейтрофилы также могут быть поляризованы в сторону противоопухолевого фенотипа N1 и проопухолевого фенотипа N2, в зависимости от факторов роста, присутствующих в опухолевой ткани [Giese, Hind, Huttenlocher, 2019; Masucci, Minopoli, Carriero, 2019]. В ряде исследований, была продемонстрирована корреляция между высокой плотностью нейтрофилов

в опухолевой ткани и неблагоприятным исходом (из-за роста первичного очага и метастазирования в лимфатические узлы) [Trellakis и др., 2011b], поэтому выявленное снижение миграционной активности нейтрофилов после ПТ в СОД 10изоГр, скорее, положительное явление. CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты распознают антигены, ассоциированные со злокачественной опухолью и, в некоторых случаях, распознают больший набор антигенов, чем CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты. Субпопуляции Th2 и Th17 CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, играют неоднозначную роль в противоопухолевом иммунитете, при этом сообщалось как о про-, так и о противоопухолевых эффектах [Kim, Cantor, 2014]. В одном из исследований после ПТ наблюдалась значительная инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками, CD4<sup>+</sup> Т-клетками и ОАМ М1(провоспалительного) типа. В нашем исследовании после облучения протонами отмечено снижение активности позитивной регуляции дифференцировки CD4-позитивных Т-лимфоцитов. Имеются сведения о том, что субпопуляция Т-клеток CD4, приобретающая цитолитическую способность, обладает ярко выраженной противоопухолевой активностью и перенос небольшого количества опухолереактивных клеток CD4 лимфопеническим реципиентам с последующим облучением и лечением антителами против CTLA-4 приводит к регрессии сформировавшихся опухолей [Quezada и др., 2010]. Помимо подавления процессов, связанных с вышеперечисленными иммунными клетками микроокружения опухоли было отмечено и снижение активности В-лимфоцитов, которые принимают участие в ряде иммунных процессов, включая презентацию антигена и секрецию цитокинов в микроокружение опухоли, усиливая антигенспецифический противоопухолевый ответ [Fremd и др., 2013]. При ПРГШ высокая плотность в опухолевой ткани В-лимфоцитов ассоциирована с благоприятным прогнозом [Pretscher и др., 2009]. Снижение активности В-лимфоцитов и CD-4 Т-лимфоцитов, может быть объяснена высокой радиочувствительностью данных клеток [Grossman и др., 2015; Meir van и др., 2017; Nakamura, Kusunoki, Akiyama, 1990; Wang и др., 2020b]. Кроме этого, Pecaet et al. облучали головы крыс Sprague-Dawley протонами в СОД 1, 5, 3 и 4 Гр. В ходе исследования,

наблюдалось значительное дозозависимое снижение массы тимуса, а также было обнаружено значительное снижение количества лимфоцитов и тромбоцитов в крови. Анализ методом проточной цитометрии показал низкое количество и значительно измененные пропорции CD3 +, CD4 + и CD8 + Т-клеток в крови и селезенке мышей после ПТ [Pescut и др., 2003]. В недавнем биоинформатическом 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].

Роль фактора некроза опухоли (TNF) в противоопухолевом иммунитете противоречива. С одной стороны, он принимает участие в противоопухолевом иммунном ответе, с другой, стимулирует пролиферацию, ангиогенез, выживание и миграцию опухолевых клеток, устойчивых к TNF-индуцированной цитотоксичности, что приводит к прогрессированию опухоли [Wang, Lin, 2008]. Облучение протонами в данном исследовании привело к подавлению продукции TNF в ткани ПРГШ. Это можно объяснить тем, что TNF экспрессируется не только опухолевыми клетками, но и ОАМ преимущественно [Wang и др., 2022b], поэтому выявленное снижение функциональной активности этих клеток в опухоли после ПТ приводит и к снижению продукции и TNF. В литературных источниках имеются данные о том, что экспрессия TNF $\alpha$  в значительной степени положительно связана с риском рецидива ПРГШ, риском метастазирования в лимфатические узлы, особенно у пациентов с ПРГШ ассоциированным с ВПЧ 16 типа [Manuscript, 2015; Zhang и др., 2014].

Интегрины представляют собой рецепторы адгезии, участвующие во взаимодействии клеток с ВКМ и друг с другом, а в опухолевой ткани играют важную роль в регуляции процессов выживания, пролиферации, онкогенеза и миграции опухолевых клеток [Aumailley, Gayraud, 1998]. Высокие уровни экспрессии ITGA3, ITGA5 и ITGA6 связаны с худшей общей выживаемостью пациентов с ПРГШ, а более высокие уровни ITGA3 коррелировали с худшей безрецидивной выживаемостью пациентов [Feng и др., 2020]. Кроме этого,



известно, что за счет изменения экспрессии интегринов опухолевые клетки улучшают свою выживаемость в неподходящей среде [Henke, Nandigama, Ergün, 2020]. В литературе описано подавление экспрессии интегринов в опухолевой ткани после облучения протонами [На и др., 2015]. В данном исследовании облучение протонами ПРГШ оказывало также подавляющее воздействие на интегриновый сигнальный путь.

Кадгерины, в свою очередь, отвечают за межклеточную адгезию и участвуют в процессах роста, межклеточных взаимодействий и дифференцировки клеток, а также поддерживают нормальную архитектуру тканей. Нарушение межклеточной сигнализации с участием кадгеринов наблюдается при развитии и прогрессировании злокачественных опухолей [Yu и др., 2019]. Так, высокая экспрессия E-кадгерина является положительным прогностическим фактором при ПРГШ и ассоциирована с увеличением общей выживаемости и безрецидивной выживаемости пациентов [Ren и др., 2016]. В данном исследовании протонное облучение индуцировало активность кадгеринового сигнального пути в ПРГШ, что в свою очередь, может указывать на снижение риска метастазирования.

Роль активации STAT5 отлична в разных типах ЗНО. В большинстве случаев активация STAT5 способствует пролиферации клеток плоского эпителия, усиливает миграцию и инвазию клеток плоскоклеточного рака, вызывает фенотипические и молекулярные изменения, связанные с ЭМП [Korpiak и др., 2008a]. При ПРГШ активация STAT5 ассоциирована с ЭМП, инвазией опухолевых клеток и усилением роста опухоли [Korpiak и др., 2008b]. После протонного облучения ПРГШ отмечено подавление STAT5.

О роли PTK2 в клетках ПРГШ было сказано выше: активированная PTK2 участвует в регуляции адгезии, пролиферации и миграции опухолевых клеток [Zhang и др., 2022b; Zhou, Yi, Tang, 2019]. Протеомный анализ показал, что сверхэкспрессия PTK2/FAK является биомаркером радиорезистентности ПРГШ. Комбинации ингибирования PTK2/FAK с ЛТ в настоящее время изучаются в

качестве терапевтической стратегии для улучшения местного контроля при ВПЧ-негативном ПРГШ [Skinner и др., 2016]. Протонное облучение вызывало подавление РТК2 в клетках ПРГШ [Jumaniyazova и др., 2024b].

Активация сигнального пути PD-1/PD-L1 ассоциирована с индукцией и поддержанием иммунной толерантности в опухолевой ткани, путем подавления эффекторных функций Т-клеток [Chen, Han, 2015]. Уровни экспрессии PD-L1 при ПРГШ в значительной степени коррелируют с выраженным клиническим прогрессированием и плохой выживаемостью пациентов [Cui и др., 2020]. Активность PD-1 и его лигандов PD-L1 или PD-L2 отвечает за активацию, пролиферацию и цитотоксическую секрецию Т-лимфоцитов [Han, Liu, Li, 2020]. В ходе транскриптомного анализа выявлено подавление данного сигнального пути. Синтез интерлейкина 10 (IL-10) в опухолевой ткани ПРГШ также был снижен после облучения протонами. В процессе канцерогенеза IL-10 функционирует и как проонкогенный цитокин, ингибируя противоопухолевый иммунитет, и в качестве противоопухолевого цитокина, выполняя антиангиальную роль [Howell, Rose-Zerilli, 2007]. Важно отметить, что он участвует в контроле пролиферации и инвазии опухолевых клеток через сигнальный путь JAK/STAT [Béguelin и др., 2015; Han и др., 2022].

Сигнальный путь PDGF/PDGFR играет одну из ключевых ролей в прогрессировании опухолей [Heldin, 2013]. Гиперэкспрессия PDGF способствует росту опухолевых клеток [Pietras и др., 2003] и индуцирует ангиогенез [Lindahl и др., 1997], воздействуя на клетки микроокружения опухоли, тем самым провоцируя метастазирование. Кроме этого, имеются сведения о том, что повышенная активность PDGF в опухоли сопряжена с резистентностью к лекарственному лечению, вызванной нарушением капиллярного кровотока в опухоли из-за повышения давления интерстициальной жидкости [Heldin и др., 2004]. В данном исследовании облучение протонами вызвало подавление сигнального пути PDGF в ПРГШ.

Наиболее известным изменением энергетического метаболизма в опухолевых клетках является повышенный гликолиз, сопровождающийся интенсивным поглощением аминокислот, особенно глутамина, синтезом жирных кислот и окислительно-восстановительными реакциями [Olszewski и др., 2022]. Подавление транспорта глюкозы, аминокислот и солей в опухолевых клетках свидетельствует о снижении их метаболической активности после облучения сканирующим пучком протонов. Полученные данные совпадают с данными полученными коллегами в ходе биоинформатического анализа эффектов ЛТ на опухолевые клетки ПРГШ [Guan, Liu, Zheng, 2024]. Кроме этого, было выявлено снижение уровня кальция в опухолевых клетках после облучения протонами. В опухолевых клетках кальций играет важную роль в процессе ЭМП, уклонения от иммунной системы, а его повышенный уровень ассоциирован с резистентностью к противоопухолевым препаратам [Jones, Hazlehurst, 2021]. В литературе имеются сведения о том, что для пациентов ПРГШ характерна гиперкальциемия и она ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [Almuradova, Cicin, 2023; Bradley, Hoskin, 2006].

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, преимущественно связанных с иммунными реакциями: подавление активности цитокинов, иммуноглобулинов и хемокинов, развития воспалительной реакции. Это может свидетельствовать о снижении функционального потенциала иммунокомпетентных клеток перитуморальной области. В исследовании Mirjolet et al. в ходе оценки эффектов ПТ на транскриптомный профиль модели колоректального рака СТ26 после облучения одной фракцией протонов дозой 16,4 Гр была продемонстрирована активация сигнальных каскадов, связанных с иммунным ответом [Mirjolet и др., 2021]. В попытках найти объяснение полученным нами результатам, были найдены исследования, в которых

продемонстрировано, что изменения транскриптома клеток после воздействия различного типа ЛТ варьирует в зависимости от времени, прошедшего после облучения [Zhang и др., 2025].

Кроме этого, в клетках ткани перитуморальной области также, как и в опухолевой ткани отмечено снижение активности метаболизма сахарозы, глюкозы, крахмала, гликогена, внутриклеточного кальция.

Явление кератинизации связано с синтезом белков KR и накоплением кератиновых тонофиламентов в эпителиальных клетках. После фотонной ЛТ было отмечено снижение активности сигнальных путей в опухолевых клетках ПРГШ, ассоциированных с процессом кератинизации [Guan, Liu, Zheng, 2024], облучение протонами вызвало такие же изменения.

TWEAK — это связанный с поверхностью клеток трансмембранный белок II типа (249 аминокислот), принадлежащий к суперсемейству TNF. TWEAK обладает множественной биологической активностью, включая стимуляцию роста клеток, ангиогенеза и индукцию воспалительных цитокинов [Wang и др., 2022a]. После облучения протонами отмечено снижение активности сигнального пути, ассоциированного с данным белком.

Среди активированных сигнальных путей в клетках перитуморальной области обращает на себя внимание усиление метаболизма противоопухолевых лекарственных препаратов, например таких как, иринотекан. Усиление метаболизма лекарственных препаратов может служить объяснением относительной резистентности к противоопухолевым препаратам, часто наблюдаемой при ПРГШ. Метаболизм аскорбата и альдарата является важным путем метаболизма углеводов, который защищает клетки от окислительного повреждения, активация этого процесса может объясняться адаптацией клеток к повреждающему воздействию протонов [Peng и др., 2023].

Для всех клеток организма митохондрии являются основными органеллами, отвечающими за реакции на стресс, поскольку они в первую

очередь отвечают за удовлетворение энергетических потребностей. Поскольку ключевые ферменты стероидогенеза сосредоточены именно в митохондриях, активация биосинтеза стероидных гормонов может выступать показателем реакции клеток на стрессовое воздействие облучения протонами [Gak и др., 2015].

В ходе сравнения транскриптомных профилей пациентов с хорошим ответом на ПТ и с плохим ответом. В ткани перитуморальной области были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены *KR1*, *KR6B*, *KR16*.

*KR1* отвечает за обеспечение прочности и устойчивости клеток к негативным воздействиям [Magin, Vijayaraj, Leube, 2007]. Присутствие *KR 1* в опухолевых клетках было обнаружено в конце 2000-х годов, а сегодня он рассматривается в качестве потенциального кандидата для прогнозирования течения нескольких типов ЗНО: его повышенная экспрессия ассоциирована с худшей общей выживаемостью пациентов [Han и др., 2021; Ogunnigbagbe, Bunick, Kaur, 2022]. Tang et al. выявили повышенную экспрессию *KR 1* в клеточной линии назофарингеальной карциномы CNE2/cDDP, резистентной к цисплатину [Tang и др., 2012].

*KR6B* участвует в процессах метастазирования и инвазии опухоли [Hu и др., 2020; Song и др., 2022], его повышенная экспрессия ассоциирована с низкой общей выживаемостью пациентов с ЗНО [Han и др., 2021]. Lu et al. в своем исследовании продемонстрировали, что для ОСК рака мочевого пузыря характерна гиперэкспрессия *KR6B* [Liu и др., 2022]. *KR6* увеличивает экспрессию маркера стволовости *CD44* и способствует более агрессивному течению плоскоклеточного рака полости рта [Tsai и др., 2019].

*KR16* связан с процессом размножения клеток и ЭМП [Chen и др., 2019]. Экспрессия *KR16* ассоциирована с высокой агрессивностью рака молочной железы и короткой безрецидивной выживаемостью пациентов [Joosse и др., 2012]. При плоскоклеточном раке полости рта высокая экспрессия *KRT16*

коррелирует с низкой дифференцировкой опухоли, поздними стадиями, повышенным риском метастазирования в лимфатические узлы и, как следствие, сниженной общей выживаемостью пациентов [Huang и др., 2019]. Также KR16 был идентифицирован как маркер циркулирующих опухолевых клеток [Romashin и др., 2024].

На сегодняшний день в радиобиологии устоялось мнение о радиочувствительности и радиорезистентности тех или иных опухолей, во многом основанное на анализе механизмов радиоиндуцированного повреждения опухолевых клеток, наличия очагов гипоксии в опухоли и ряда других косвенных факторов. Также распространена методика апостериорного анализа, когда определения чувствительности к облучению оценивалось в процессе или по окончании лечения, что по сути является эмпирическим методом и не имеет никакой предикативной силы. Из-за отсутствия альтернативных способов определения данный подход имел свою, пусть и ограниченную, ценность. Тем не менее, эта парадигма не включает анализ перитуморальной области, которая играет существенную роль в обеспечении устойчивости к различным вариантам противоопухолевой терапий. Более того, при ПРГШ именно перитуморальная ткань источником рецидивов, несмотря на полный ответ опухоли на облучение или химиотерапию. Важно понимать, что перитуморальная область является одновременно отражением процессов как в опухолевых клетках, так и в здоровых тканях, где одновременно реализуются механизмы и противодействия опухоли, и сохранения ее жизнеспособности. В дополнение к этому, перитуморальная ткань отличается технической доступностью для взятия биопсии.

ПТ является одним из наиболее перспективных вариантов адронной терапии, толчком для бурного распространения которой за последние два десятилетия стал значительный технический прогресс, наряду с накопленным опытом ее клинического применения. Тем не менее, несмотря на существенные подвижки в вопросах доступности метода лечения, это по-прежнему

ограниченный вариант ЛТ с достаточно высокой стоимостью как оборудования, так и операционных затрат. Выявленные дифференциально экспрессирующиеся гены могут быть рассмотрены в качестве потенциальных биомаркеров - предикторов ответа на ПТ, которые послужат основой для создания диагностической тест-системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа посвящена изучению радиоиндуцированных эффектов ПТ в ткани опухоли ПРГШ, а также в ткани перитуморальной области. В ходе сравнения строения ткани опухоли и ткани перитуморальной области было 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 экспрессии 13 маркеров: Е-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. Поскольку все вышеперечисленные маркеры экспрессировались как в опухолевой, так и в перитуморальной ткани, можно сделать вывод, что ни один из них не является опухоль-специфическим и не может изолированно использоваться на этапе диагностики ПРГШ.

На следующем этапе работы была проведена оценка изменений, индуцированных облучением сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр, в опухолевой ткани и ткани перитуморальной области. В ходе оценки изменений в строении обеих тканей, была отмечена одинаковая тенденция -увеличение площади, занятой стромальным компонентом. При ИГХ исследовании образцов опухоли и ткани перитуморальной области после облучения протонами было отмечено выраженное снижение экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, снижение экспрессии маркеров ОСК: CD44 и ALDHA1. Чуть менее выраженное снижение экспрессии KR5, KR17, KR10 отмечено в образцах ПРГШ, в перитуморальной ткани экспрессия KR17 не менялась, что можно



связать с адаптационной реакцией клеток на повреждающее действие протонного облучения. В образцах опухолевой ткани отмечено снижение экспрессии Pdpn, SCCA, Vimentin 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. Протонное облучение СОД 10 изоГр в клетках опухолевой ткани индуцировало подавление активности сигнальных путей, ассоциированных с иммунным ответом. Например, отмечено подавление подавление сигнальных путей, ассоциированных с миграцией и хемотаксисом нейтрофилов и лимфоцитов, подавление активации МНС класса II, а также подавление продукции TNF и IL-10. В данном исследовании облучение протонами ПРГШ оказывало также подавляющее воздействие на интегриновый, PDGF, STAT5, PTK2 сигнальные каскады. Облучение протонами вызвало подавление транспорта 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 клеткахР перитуморальной области обращает на себя внимание усиление метаболизма противоопухолевых лекарственных препаратов. Метаболизм аскорбата и альдарата является важным путем метаболизма углеводов, который защищает клетки от окислительного повреждения, активация этого процесса может объясняться адаптацией клеток к повреждающему воздействию протонов.

Полученные результаты в ходе данного этапа исследовательской работы являются уникальными в своем роде, поскольку в литературных источниках информация об изменениях на уровне транскриптома, индуцированных ПТ, ограничена. Это связано, во-первых, со сложностью сбора биопсий пациентов, так как для такого анализа необходимо собрать материал до ПТ и после облучения с целью выявления значимо измененных сигнатур. Во-вторых, не во всех медицинских учреждениях в наличие дорогостоящее оборудование для проведения ПТ, и, зачастую клиницисты ограничиваются назначением классической фотонной ЛТ. В-третьих, сам транскрипционный анализ и биоинформатическая обработка данных довольно сложны, требуют высокой квалификационной подготовки специалистов.

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 были выявлены основные дифференциально экспрессирующиеся гены (*KR1*, *KR6B*, *KR16*), которые возможно, могут быть рассмотрены в качестве потенциальных предикторов ответа на ПТ. Клиническую значимость выявленных дифференциальные сигнатуры 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 результатам, повышенная экспрессия генов *KR1*, *KR6B* и *KR16* 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 изoГр 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* в перитуморальной ткани 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 СОКРАЩЕНИЙ

ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи

ЛТ – лучевая терапия

ФТ– фотонная терапия

ПТ– протонная терапия

СОД – суммарная очаговая доза

ХЛТ – химиолучевая терапия

КТ– компьютерная томография

МРТ– магнитно-резонансная томография

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЗНО – злокачественные новообразования

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

АФК – активные формы кислорода

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ФАО – фибробласты, ассоциированные с опухолью

ВКМ – внеклеточный матрикс

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги

ЛИО – лимфоциты, инфильтрирующие опухоль

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

KR – кератин

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

EGF – Epidermal Growth Factor

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

IL – Interleukin

HGF– Human Hepatocyte Growth Factor

PDGF– Platelet-Derived Growth Factor

MAPK– Mitogen-Activated Protein Kinase

RTK– Receptor Tyrosine Kinase

ALDH1A1– Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1

Pdpn– Podoplanin

SCCA– Squamous Cell Carcinoma associated Antigen

FDA– Food and Drug Administration

PI3K– Phosphoinositide 3-kinase

AKT– Protein Kinase B

mTOR– Mammalian Target of Rapamycin

KRAS– Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

PD1– Programmed Cell Death 1

PDL1– Programmed Death-Ligand 1

STAT–Signal Transducer and Activator of Transcription

RECIST– Responce. Evaluation Criteria in Solid Tumors

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alan Mitteer R. и др. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species // Sci. Rep. 2015. Т. 5. № September. С. 1–12.
2. Alavanja M. и др. Tobacco smoke and involuntary smoking // IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. , 2004.
3. Albers A. E. и др. Efficacy and toxicity of docetaxel combination chemotherapy for advanced squamous cell cancer of the head and neck // Mol. Clin. Oncol. 2017. Т. 7. № 1.
4. Alfouzan A. F. Radiation therapy in head and neck cancer // Saudi Med. J. 2021. Т. 42. № 3. С. 247–254.
5. Ali A. A., Al-Jandan B. A., Suresh C. S. The importance of ctokeratins in the early detection of oral squamous cell carcinoma // J. Oral Maxillofac. Pathol. 2018. Т. 22. № 3.
6. Almangush A. и др. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer: Ready for Prime Time? // Cancers (Basel). 2022. Т. 14. № 6.
7. Almuradova E., Cicin I. Cancer-related hypercalcemia and potential treatments // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2023. Т. 14.
8. Alsahafi E. и др. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges // Cell Death Dis. 2019. Т. 10. № 8.
9. Ando K. и др. Effective Suppression of Pulmonary Metastasis in Combined Carbon Ion Radiation Therapy With Dendritic-Cell Immunotherapy in Murine Tumor Models // Int. J. Radiat. Oncol. 2013. Т. 87. № 2.
10. Aran D. и др. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor



transcriptomes // Nat. Commun. 2017. T. 8. № 1.

11. Aseervatham J., Ogbureke K. U. E. Effects of DSPP and MMP20 silencing on adhesion, metastasis, angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition proteins in oral squamous cell carcinoma cells // Int. J. Mol. Sci. 2020. T. 21. № 13.

12. Aubrey B. J. и др. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? // Cell Death Differ. 2018. T. 25. № 1.

13. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment // Front. Oncol. 2014. T. 4 MAR.

14. Aumailley M., Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix // J. Mol. Med. 1998. T. 76. № 3–4. С. 253–265.

15. Aydin A. A. и др. The Prognostic Significance of CD47, CD68, and CD163 Expression Levels and Their Relationship with MLR and MAR in Locally Advanced and Oligometastatic Nasopharyngeal Carcinoma // Diagnostics. 2024. T. 14. № 23.

16. Bagnardi V. и др. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis // Br. J. Cancer. 2015. T. 112. № 3.

17. Barsouk A. и др. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // Med. Sci. 2023. T. 11. № 2.

18. Beddok A. и др. Proton therapy for head and neck squamous cell carcinomas: A review of the physical and clinical challenges // Radiother. Oncol. 2020. T. 147.

19. Beddok A. и др. Curative high-dose reirradiation for patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma using IMRT or proton therapy: Outcomes and analysis of patterns of failure // Head Neck. 2022. T. 44. № 11.

20. Béguelin W. и др. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs // Leukemia. 2015. T. 29. № 8.

21. Bernardo T. и др. Endothelial Cell Response to Combined Photon or Proton

Irradiation with Doxorubicin // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. T. 24. № 16.

22. Bernier J., Hall E. J., Giaccia A. Radiation oncology: A century of achievements // *Nat. Rev. Cancer.* 2004. T. 4. № 9.

23. Biswas S. K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm // *Nat. Immunol.* 2010. T. 11. № 10.

24. Boricic N. и др. Utility of CK8, CK10, CK13, and CK17 in Differential Diagnostics of Benign Lesions, Laryngeal Dysplasia, and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma // *Diagnostics.* 2022. T. 12. № 12.

25. Borsetto D. и др. Prognostic significance of cd4+ and cd8+ tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis // *Cancers (Basel).* 2021. T. 13. № 4.

26. Bourguignon L. Y. W., Earle C., Shiina M. Activation of matrix Hyaluronan-Mediated CD44 signaling, epigenetic regulation and chemoresistance in head and neck cancer stem cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. T. 18. № 9.

27. Braakhuis B. J. M. и др. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications // *Cancer Res.* 2003. T. 63. № 8.

28. Bradley P. J., Hoskin D. Hypercalcaemia in head and neck squamous cell carcinoma // *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006. T. 14. № 2.

29. Bragg W. H., Kleeman R. LXXIV. On the ionization curves of radium // London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci. 1904. T. 8. № 48.

30. Braicu C. и др. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer // *Cancers (Basel).* 2019. T. 11. № 10.

31. Bray F. и др. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide // *Cancer.* 2021. T. 127. № 16.

32. Broek R. Vander и др. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: Functions, aberrations, cross-talk, and therapies // *Oral Dis.* 2015. T. 21. № 7.

33. Byeon H. K., Ku M., Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer // *Exp. Mol. Med.* 2019. Т. 51. № 1.
34. Bykov V. J. N. и др. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* 2018. Т. 18. № 2.
35. Canning M. и др. Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. Т. 7. № APR.
36. Caruntu A. и др. Assessment of histological features in squamous cell carcinoma involving head and neck skin and mucosa // *J. Clin. Med.* 2021. Т. 10. № 11.
37. Cendrowicz E. и др. The role of macrophages in cancer development and therapy // *Cancers (Basel).* 2021. Т. 13. № 8.
38. Chen A. M. и др. Tobacco smoking during radiation therapy for head-and-neck cancer is associated with unfavorable outcome // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011. Т. 79. № 2.
39. Chen J. и др. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: A systemic review and meta-analysis // *BMC Cancer.* 2014a. Т. 14. № 1.
40. Chen J. G. и др. Silencing KRT16 inhibits keratinocyte proliferation and VEGF secretion in psoriasis via inhibition of ERK signaling pathway // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2019. Т. 35. № 5.
41. Chen L., Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future // *J. Clin. Invest.* 2015. Т. 125. № 9.
42. Chen M. F. и др. Effect of Proton Therapy on Tumor Cell Killing and Immune Microenvironment for Hepatocellular Carcinoma // *Cells.* 2023. Т. 12. № 2.
43. Chen W. J. и др. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung

cancer stemness via paracrine signalling // Nat. Commun. 2014b. T. 5.

44. Cheng S.-Y. и др. Double-staining of E-cadherin and podoplanin offer help in the pathological diagnosis of indecisive early-invasive oral squamous cell carcinoma. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2018. T. 11. № 1.

45. Cho Y. A. и др. Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma // J. Cancer. 2016. T. 7. № 15.

46. Christopoulos A. и др. Biology of vascular endothelial growth factor and its receptors in head and neck cancer: Beyond angiogenesis // Head Neck. 2011. T. 33. № 8.

47. Chui M. H. и др. Loss of ALDH1A1 expression is an early event in the pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma // Mod. Pathol. 2015. T. 28. № 3.

48. Chung C. H. и др. Genomic alterations in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/ERBB2) in head and neck squamous cell carcinoma // Head Neck. 2017. T. 39. № 1.

49. Chung Y. H. и др. Dynamic profiles of early biological responses to predict the treatment efficacy of proton therapy in liver cancer assessed with in vivo kinetic [18F]-FDG PET/MRI // Radiat. Oncol. . 2025. T. 20. № 1.

50. Costa N. L. и др. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma // Oral Oncol. 2013. T. 49. № 3.

51. Credico G. Di и др. Alcohol drinking and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration // Br. J. Cancer. 2020. T. 123. № 9.

52. Cui C. и др. Is  $\beta$ -Catenin a Druggable Target for Cancer Therapy? // Trends Biochem. Sci. 2018. T. 43. № 8.

53. Cui P. и др. Prognostic significance of pd-l1 expression and its tumor-

intrinsic functions in hypopharyngeal squamous cell carcinoma // *Cancer Manag. Res.* 2020. T. 12.

54. Curtarelli R. B. и др. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review // *Stem Cell Rev. Reports.* 2018. T. 14. № 6.

55. Custódio M., Biddle A., Tavassoli M. Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer // *Oral Oncol.* 2020. T. 110.

56. Dagan R. и др. Outcomes of Sinonasal Cancer Treated with Proton Therapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. T. 95. № 1.

57. Dale T. и др. Beyond mean pharyngeal constrictor dose for beam path toxicity in non-target swallowing muscles: Dose-volume correlates of chronic radiation-associated dysphagia (RAD) after oropharyngeal intensity modulated radiotherapy // *Radiotherapy and Oncology.* , 2016.

58. Dalen F. J. Van и др. Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages // *Molecules.* 2019. T. 24. № 1.

59. Degen M. и др. MAPK/ERK-dependent translation factor hyperactivation and dysregulated laminin  $\gamma 2$  expression in oral dysplasia and squamous cell carcinoma // *Am. J. Pathol.* 2012. T. 180. № 6.

60. Delgado-Coka L. и др. Keratin 17 modulates the immune topography of pancreatic cancer // *J. Transl. Med.* 2024. T. 22. № 1. C. 1–16.

61. Deng S. и др. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers // *PLoS One.* 2010. T. 5. № 4.

62. Diegeler S., Hellweg C. E. Intercellular communication of tumor cells and immune cells after exposure to different ionizing radiation qualities // *Front. Immunol.* 2017. T. 8. № JUN.

63. Dietz A., Wichmann G. Head and neck cancer: Effective prevention in youth and predictive diagnostics for personalised treatment strategies according to biological differences // EPMA J. 2011. T. 2. № 2.
64. Dionisi F. и др. Clinical results of proton therapy reirradiation for recurrent nasopharyngeal carcinoma // Acta Oncol. (Madr). 2019. T. 58. № 9.
65. Domnich M. и др. Oral Neutrophils: Underestimated Players in Oral Cancer // Front. Immunol. 2020. T. 11.
66. Dumitru C. S. и др. Loss of E-Cadherin Expression Correlates With Ki-67 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // In Vivo (Brooklyn). 2022. T. 36. № 3. C. 1150–1154.
67. Economopoulou P. и др. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma // Ann. Oncol. 2016. T. 27. № 9. C. 1675–1685.
68. Eirew P. и др. Brief report: Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells // Stem Cells. 2012. T. 30. № 2.
69. Elmusrati A., Wang J., Wang C. Y. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma // Int. J. Oral Sci. 2021. T. 13. № 1. C. 1–11.
70. Engelman J. A., Luo J., Cantley L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism // Nat. Rev. Genet. 2006. T. 7. № 8.
71. Eruslanov E. B. и др. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer // J. Clin. Invest. 2014. T. 124. № 12.
72. Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium // Front. Pharmacol. 2018. T. 9. № NOV.
73. Faraji F. и др. Computed tomography performance in predicting extranodal extension in HPV-positive oropharynx cancer // Laryngoscope. 2020. T. 130. № 6.
74. Feng C. и др. Expression and prognostic analyses of ITGA3, ITGA5, and

ITGA6 in head and neck squamous cell carcinoma // *Med. Sci. Monit.* 2020. T. 26.

75. Ferlay J. и др. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // *Int. J. Cancer.* 2019. T. 144. № 8.

76. Fernández-Mateos J. и др. Genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma in a spanish population // *Cancers (Basel).* 2019. T. 11. № 4.

77. Fijardo M. и др. The clinical manifestations and molecular pathogenesis of radiation fibrosis // *eBioMedicine.* 2024. T. 103. C. 105089.

78. Fotsitzoudis C. и др. Cancer-Associated Fibroblasts: The Origin, Biological Characteristics and Role in Cancer—A Glance on Colorectal Cancer // *Cancers (Basel).* 2022. T. 14. № 18.

79. Frati A. и др. Peritumoral Brain Edema in Relation to Tumor Size Is a Variable That Influences the Risk of Recurrence in Intracranial Meningiomas // *Tomography.* 2022. T. 8. № 4.

80. Fregni G. и др. NK cells sense tumors, course of disease and treatments: Consequences for NK-based therapies // *Oncoimmunology.* 2012. T. 1. № 1.

81. Fremd C. и др. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients // *Oncoimmunology.* 2013. T. 2. № 7. C. 1–9.

82. Fridman A. L., Tainsky M. A. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling // *Oncogene.* 2008. T. 27. № 46.

83. Frith M. C., Pheasant M., Mattick J. S. The amazing complexity of the human transcriptome // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. T. 13. № 8.

84. Fujita Y. и др. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma // *PLoS One.* 2014. T. 9. № 12.

85. Fukusumi T., Califano J. A. The NOTCH Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *J. Dent. Res.* 2018. T. 97. № 6.

86. Furgiuele S. и др. Immunoscore Combining CD8, FoxP3, and CD68-Positive Cells Density and Distribution Predicts the Prognosis of Head and Neck Cancer Patients // *Cells*. 2022. Т. 11. № 13.
87. Gak I. A. и др. Stress triggers mitochondrial biogenesis to preserve steroidogenesis in Leydig cells // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2015. Т. 1853. № 10.
88. Galluzzi L. и др. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death // *J. Immunother. Cancer*. 2020. Т. 8. № 1.
89. Gameiro S. R. и др. Tumor Cells Surviving Exposure to Proton or Photon Radiation Share a Common Immunogenic Modulation Signature, Rendering Them More Sensitive to T Cell-Mediated Killing // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. Т. 95. № 1.
90. Gao H. и др. Elevated DKK1 expression is an independent unfavorable prognostic indicator of survival in head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Manag. Res.* 2018a. Т. 10.
91. Gao L. и др. Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma // *Oncol. Rep.* 2018b. Т. 40. № 5.
92. Genard G. и др. Proton irradiation orchestrates macrophage reprogramming through NF $\kappa$ B signaling // *Cell Death Dis.* 2018. Т. 9. № 7.
93. Gevorgov A. R. и др. Results of implementation of a program of individual support of chemoradiation therapy in patients with head and neck tumors // *Opuholi Golovy i Sei*. 2020. Т. 10. № 4. С. 60–73.
94. Ghazi N. и др. Evaluation of CD44 and TGF-B Expression in Oral Carcinogenesis. // *J. Dent. (Shiraz, Iran)*. 2021. Т. 22. № 1.
95. Giese M. A., Hind L. E., Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment // *Blood*. 2019. Т. 133. № 20.



96. Gingerich M. A. и др. Comprehensive review of genetic factors contributing to head and neck squamous cell carcinoma development in low-risk, nontraditional patients // *Head Neck*. 2018. Т. 40. № 5.
97. Girdhani S., Sachs R., Hlatky L. Biological effects of proton radiation: An update // *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2015. Т. 166. № 1–4.
98. Glogauer J. E. и др. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway // *Cancer Immunol. Res.* 2015. Т. 3. № 11.
99. Glorieux M., Dok R., Nuyts S. The influence of PI3K inhibition on the radiotherapy response of head and neck cancer cells // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10. № 1.
100. González-González R. и др. Epithelial–mesenchymal transition associated with head and neck squamous cell carcinomas: A review // *Cancers (Basel)*. 2021. Т. 13. № 12.
101. Gordon K. и др. Upright proton therapy for esthesioneuroblastoma: a single-institution experience // *Front. Oncol.* 2024. Т. 14.
102. Gordon K. B., Smyk D. I., Gulidov I. Proton therapy in head and neck cancer treatment: State of the problem and development prospects (review) // *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2021. Т. 13. № 4. С. 70–81.
103. Grossman S. A. и др. Survival in patients with severe lymphopenia following treatment with radiation and chemotherapy for newly diagnosed solid tumors // *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2015. Т. 13. № 10.
104. Guan Z., Liu J., Zheng L. Effect of radiotherapy on head and neck cancer tissues in patients receiving radiotherapy: a bioinformatics analysis-based study // *Sci. Rep.* 2024. Т. 14. № 1.
105. Gutiontov S. и др. Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) for Head and Neck Surgeons // *Head Neck*. 2016. Т. 38. № 3.

106. Ha B. G. и др. Inhibitory effects of proton beam irradiation on integrin expression and signaling pathway in human colon carcinoma HT29 cells // *Int. J. Oncol.* 2015. Т. 46. № 6.

107. Han W. и др. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients // *Sci. Rep.* 2021. Т. 11. № 1.

108. Han Y. и др. A Novel Inflammatory Response–Related Gene Signature Improves High-Risk Survival Prediction in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Front. Genet.* 2022. Т. 13.

109. Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. // *Am. J. Cancer Res.* 2020. Т. 10. № 3. С. 727–742.

110. Hanna G. J. и др. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer // *JCI insight.* 2018. Т. 3. № 4.

111. Hashibe M. и др. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium // *J. Natl. Cancer Inst.* 2007. Т. 99. № 10.

112. Hashibe M. и др. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. Т. 18. № 2.

113. Hatcher J. L. и др. Tobacco use and surgical outcomes in patients with head and neck cancer // *Head Neck.* 2016. Т. 38. № 5.

114. Hausen H. Zur. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. Т. 2. № 5.

115. He K. F. и др. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma // *Biomed Res. Int.* 2014. Т. 2014.

116. Heldin C. H. и др. High interstitial fluid pressure - An obstacle in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. Т. 4. № 10.
117. Heldin C. H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment // *Cell Commun. Signal*. 2013. Т. 11. № 1.
118. Henke E., Nandigama R., Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy // *Front. Mol. Biosci*. 2020. Т. 6.
119. Hennessey P. T., Westra W. H., Califano J. A. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: Recent evidence and clinical implications // *J. Dent. Res*. 2009. Т. 88. № 4.
120. Honkanen T. J. и др. Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer // *Sci. Rep*. 2019. Т. 9. № 1.
121. Horikawa M. и др. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice // *J. Clin. Invest*. 2011. Т. 121. № 11. С. 4268–4280.
122. Howell W. M., Rose-Zerilli M. J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis // *J. Nutr*. 2007. Т. 137. № 1. С. 194S-199S.
123. Hsu H. W. и др. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers // *Oral Oncol*. 2014. Т. 50. № 1.
124. Hsu P. J. и др. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma // *Oral Oncol*. 2020. Т. 102.
125. Hu C. и др. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: opportunities and challenges // *Cell Death Discov*. 2023. Т. 9. № 1. С. 1–10.
126. Hu H. B. и др. High expression of keratin 6C is associated with poor prognosis and accelerates cancer proliferation and migration by modulating epithelial–mesenchymal transition in lung adenocarcinoma // *Genes and Genomics*. 2020. Т. 42.

№ 2.

127. Hu Y. и др. Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2016. Т. 35. № 1.

128. Huang C. и др. Distribution and Clinical Analysis of EpCAM+/Vimentin+ Circulating Tumor Cells in High-Risk Population and Cancer Patients // Front. Oncol. 2021. Т. 11.

129. Huang D. и др. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma // Cancer Res. 2010. Т. 70. № 3. С. 1063–1071.

130. Huang W. C. и др. A novel miR-365-3p/EHF/keratin 16 axis promotes oral squamous cell carcinoma metastasis, cancer stemness and drug resistance via enhancing  $\beta$ 5-integrin/c-met signaling pathway // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2019. Т. 38. № 1.

131. IARC. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 123 // IARC Monographs. 2018.

132. Itadani H., Mizuarai S., Kotani H. Can Systems Biology Understand Pathway Activation? Gene Expression Signatures as Surrogate Markers for Understanding the Complexity of Pathway Activation // Curr. Genomics. 2008. Т. 9. № 5.

133. Iwai S. и др. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2005. Т. 131. № 12.

134. Jang G. H. и др. Effect of proton beam on blood vessel formation in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos // Arch. Pharm. Res. 2008. Т. 31. № 6.

135. Jefferies S. и др. The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck // Br. J. Cancer. 1999. Т. 79. № 5–6.

136. Jethwa A. R., Khariwala S. S. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer // *Cancer Metastasis Rev.* 2017. T. 36. № 3.
137. Jie H. B. и др. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients // *Br. J. Cancer.* 2013. T. 109. № 10. С. 2629–2635.
138. Jin T. и др. Cisplatin and Fluorouracil Induction Chemotherapy With or Without Docetaxel in Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma // *Transl. Oncol.* 2019. T. 12. № 4.
139. Johnson D. E. и др. Head and neck squamous cell carcinoma // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2020. T. 6. № 1.
140. Jones C. A., Hazlehurst L. A. Role of calcium homeostasis in modulating emt in cancer // *Biomedicines.* 2021. T. 9. № 9.
141. Joosse S. A. и др. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: Impact on the detection of circulating tumor cells // *Clin. Cancer Res.* 2012. T. 18. № 4.
142. Juin A. и др. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes // *Mol. Biol. Cell.* 2012. T. 23. № 2.
143. Jumaniyazova E. и др. Immune Cells in Head-and-Neck Tumor Microenvironments // *J. Pers. Med.* 2022. T. 12. № 9.
144. Jumaniyazova E. и др. Photon- and Proton-Mediated Biological Effects: What Has Been Learned? // *Life.* 2023a. T. 13. № 1.
145. Jumaniyazova E. и др. Role of Microenvironmental Components in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *J. Pers. Med.* 2023b. T. 13. № 11.
146. Jumaniyazova E. и др. SP1 Gene Methylation in Head and Neck Squamous Cell Cancer in HPV-Negative Patients // *Genes (Basel).* 2024a. T. 15. № 3.
147. Jumaniyazova E. D. и др. Study of head and neck squamous cell carcinoma

transcriptome after proton therapy // Bull. Sib. Med. 2024b. T. 23. № 1. С. 37–47.

148. Kaiser A. M., Attardi L. D. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo // Cell Death Differ. 2018. T. 25. № 1.

149. Katase N. и др. Absence of Dickkopf (Dkk)-3 protein expression is correlated with longer disease-free survival and lower incidence of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma // Oncol. Lett. 2012. T. 3. № 2.

150. Kawahara R. и др. Agrin and perlecan mediate tumorigenic processes in oral squamous cell carcinoma // PLoS One. 2014. T. 9. № 12.

151. Kedracka-Krok S. и др. Proteomic analysis of proton beam irradiated human melanoma cells // PLoS One. 2014. T. 9. № 1.

152. Khariwala S. S., Hatsukami D., Hecht S. S. Tobacco carcinogen metabolites and DNA adducts as biomarkers in Head and Neck cancer: Potential screening tools and prognostic indicators // Head Neck. 2012. T. 34. № 3.

153. Khmelevsky E. V. и др. Morbidity dynamics in proton–photon or photon radiation therapy for locally advanced prostate cancer // Reports Pract. Oncol. Radiother. 2018. T. 23. № 1.

154. Kim H. J., Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful // Cancer Immunol. Res. 2014. T. 2. № 2. С. 91–98.

155. Knops A. M. и др. Cancer-Associated Fibroblast Density, Prognostic Characteristics, and Recurrence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis // Front. Oncol. 2020. T. 10.

156. Koca D. и др. Peritumoral tissue (PTT): increasing need for naming convention // Br. J. Cancer. 2024. № March.

157. Koppikar P. и др. Constitutive Activation of STAT5 Contributes to Tumor Growth, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Resistance to EGFR Targeting // Clin. Cancer Res. 2008a. T. 14. № 23. С. 7682–7690.

158. Koppikar P. и др. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting // *Clin. Cancer Res.* 2008b. Т. 14. № 23. С. 7682–7690.
159. Kuchur O. A. и др. The p53 Protein Family in the Response of Tumor Cells to Ionizing Radiation: Problem Development // *Acta Naturae.* 2021. Т. 13. № 3.
160. Kudo Y. и др. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis // *J. Biol. Chem.* 2012. Т. 287. № 46. С. 38716–38728.
161. Kuhn N. Z., Tuan R. S. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis // *J. Cell. Physiol.* 2010. Т. 222. № 2.
162. Kumar A. T. и др. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis // *Front. Oncol.* 2019. Т. 9.
163. Kumar H. A. и др. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2023. Т. 15. № 6.
164. Kumar V. и др. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Т. 9.
165. Kupferman M. E. и др. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma // *Oncogene.* 2010. Т. 29. № 14.
166. Lacko M. и др. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. Т. 89. № 1.
167. Lang L. и др. Adaptive c-Met-PLXDC2 Signaling Axis Mediates Cancer Stem Cell Plasticity to Confer Radioresistance-associated Aggressiveness in Head and Neck Cancer // *Cancer Res. Commun.* 2023. Т. 3. № 4.

168. Lautenschlaeger S. и др. Advantage of proton-radiotherapy for pediatric patients and adolescents with Hodgkin's disease // Radiat. Oncol. 2019. Т. 14. № 1.
169. Lawrence M. S. и др. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas // Nature. 2015. Т. 517. № 7536.
170. Lee A. и др. Proton Therapy for Non-Skull Base Head and Neck Adenoid Cystic Carcinoma // Int. J. Radiat. Oncol. 2020. Т. 106. № 5.
171. Lee A. и др. Evaluation of Proton Therapy Reirradiation for Patients With Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // JAMA Netw. open. 2023. Т. 6. № 1.
172. Lee H. J., Zeng J., Rengan R. Proton beam therapy and immunotherapy: An emerging partnership for immune activation in non-small cell lung cancer // Transl. Lung Cancer Res. 2018. Т. 7. № 2. С. 180–188.
173. Leemans C. R., Braakhuis B. J. M., Brakenhoff R. H. The molecular biology of head and neck cancer // Nat. Rev. Cancer. 2011. Т. 11. № 1.
174. Leong K. G., Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis // Blood. 2006. Т. 107. № 6.
175. Levental K. R. и др. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling // Cell. 2009. Т. 139. № 5.
176. Lezhnin Y. N. и др. Cellular immunotherapy: A modern approach to treatment of oncological diseases // Med. Immunol. 2018. Т. 20. № 3. С. 313–340.
177. Li Q. и др. Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies // Signal Transduct. Target. Ther. 2023. Т. 8. № 1.
178. Li X. и др. A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma // Carcinogenesis. 2014. Т. 35. № 6.
179. Li Z., Li N., Shen L. MAP2K6 is associated with radiation resistance and



adverse prognosis for locally advanced nasopharyngeal carcinoma patients // *Cancer Manag. Res.* 2018. T. 10.

180. Liang X. H. и др. Prevalence and Significance of Human Papillomavirus in Oral Tongue Cancer: The Mayo Clinic Experience // *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008. T. 66. № 9.

181. Lin S. H. и др. Randomized phase IIB trial of proton beam therapy versus intensity-modulated radiation therapy for locally advanced esophageal cancer // *J. Clin. Oncol.* 2020. T. 38. № 14.

182. Lindahl P. и др. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice // *Science* (80-. ). 1997. T. 277. № 5323.

183. Liu D. и др. Roles of the HGF/Met signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Focus on tumor immunity (Review) // *Oncol. Rep.* 2020a. T. 44. № 6.

184. Liu F., Millar S. E. Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Oral Tissue Development and Disease // *J. Dent. Res.* 2010. T. 89. № 4.

185. Liu L. и др. Expression and regulation of keratin 6B in CD44<sup>+</sup> bladder cancer stem cells // *Chinese J. Tissue Eng. Res.* 2022. T. 26. № 1. С. 76–83.

186. Liu S. и др. High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma // *Sci. Rep.* 2016. T. 6.

187. Liu T. и др. Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy // *J. Hematol. Oncol.* 2019. T. 12. № 1.

188. Liu Z. и др. Keratin 17 activates AKT signalling and induces epithelial-mesenchymal transition in oesophageal squamous cell carcinoma // *J. Proteomics.* 2020b. T. 211.

189. Lugade A. A. и др. Local Radiation Therapy of B16 Melanoma Tumors Increases the Generation of Tumor Antigen-Specific Effector Cells That Traffic to the

Tumor // J. Immunol. 2005. T. 174. № 12. С. 7516–7523.

190. Lupu-Plesu M. и др. Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma // Oncogenesis. 2017. T. 6. № 7.

191. Madoz-Gúrpide J. и др. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer // J. Transl. Med. 2015. T. 13. № 1.

192. Maehama T., Dixon J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate // J. Biol. Chem. 1998. T. 273. № 22.

193. Maiti G. P. и др. Frequent inactivation of SLIT2 and ROBO1 signaling in head and neck lesions: Clinical and prognostic implications // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 2015. T. 119. № 2.

194. Mangiola A. и др. Gene Expression Profile of Glioblastoma Peritumoral Tissue: An Ex Vivo Study // PLoS One. 2013. T. 8. № 3.

195. Manuscript A. Definitive Radiotherapy // 2015. T. 134. № 8. С. 1907–1915.

196. Manzar G. S. и др. Comparative analysis of acute toxicities and patient reported outcomes between intensity-modulated proton therapy (IMPT) and volumetric modulated arc therapy (VMAT) for the treatment of oropharyngeal cancer // Radiother. Oncol. 2020. T. 147.

197. Marin V. P. и др. Serum cotinine concentration and wound complications in head and neck reconstruction // Plast. Reconstr. Surg. 2008. T. 121. № 2.

198. Markwell S. M., Weed S. A. Tumor and stromal-based contributions to head and neck squamous cell carcinoma invasion // Cancers (Basel). 2015. T. 7. № 1.

199. Marquard F. E., Jücker M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer // Biochem. Pharmacol. 2020. T. 172.

200. Masucci M. T., Minopoli M., Carriero M. V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy // Front. Oncol. 2019. T. 9.
201. McQueen N. и др. Smoking Cessation and Electronic Cigarette Use among Head and Neck Cancer Patients // Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States). , 2016.
202. Meir H. van и др. Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients // Oncoimmunology. 2017. T. 6. № 2.
203. Meng Y. и др. Ad.Egr-TNF and local ionizing radiation suppress metastases by Interferon- $\gamma$ -Dependent Activation of Antigen-specific CD8 T Cells // Mol. Ther. 2010. T. 18. № 5. С. 912–920.
204. Mestrinho L. A. и др. p63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma // Vet. Pathol. 2015. T. 52. № 4.
205. Micaily I., Johnson J., Argiris A. An update on angiogenesis targeting in head and neck squamous cell carcinoma // Cancers Head Neck. 2020. T. 5. № 1.
206. Michot A. и др. Analysis of the Peritumoral Tissue Unveils Cellular Changes Associated with a High Risk of Recurrence // Cancers (Basel). 2023. T. 15. № 13.
207. Miller S. E., Veale R. B. Environmental modulation of  $\alpha_v$ ,  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  integrin subunit expression in human oesophageal squamous cell carcinomas // Cell Biol. Int. 2001. T. 25. № 1.
208. Mills C. D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease // Crit. Rev. Immunol. 2012. T. 32. № 6.
209. Mirjolet C. и др. Impact of proton therapy on antitumor immune response // Sci. Rep. 2021. T. 11. № 1. С. 1–9.

210. Mogre S. и др. Biomarker Potential of Vimentin in Oral Cancers // *Life*. 2022. Т. 12. № 2.
211. Mollnar S. и др. Decrease in treatment intensity predicts worse outcome in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma undergoing radiochemotherapy // *Clin. Transl. Oncol.* 2021. Т. 23. № 3.
212. Monsjou H. S. Van и др. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma // *Int. J. Cancer*. 2012. Т. 130. № 8.
213. Monteran L., Erez N. The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment // *Front. Immunol.* 2019. Т. 10. № AUG.
214. Mortezaee K., Majidpoor J. (Im)maturity in Tumor Ecosystem // *Front. Oncol.* 2022. Т. 11.
215. Munshi T., Heckman C. J., Darlow S. Association between tobacco waterpipe smoking and head and neck conditions: A systematic review // *J. Am. Dent. Assoc.* 2015. Т. 146. № 10.
216. Murray P. J. и др. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines // *Immunity*. 2014. Т. 41. № 1.
217. Nakamura N., Kusunoki Y., Akiyama M. Radiosensitivity of CD4 or CD8 positive human T-lymphocytes by an in vitro colony formation assay // *Radiat. Res.* 1990. Т. 123. № 2.
218. Näsman A. и др. Incidence of human papillomavirus positive tonsillar and base of tongue carcinoma: A stabilisation of an epidemic of viral induced carcinoma? // *Eur. J. Cancer*. 2015. Т. 51. № 1.
219. Newhauser W. Proton and Charged Particle Radiotherapy // *Med. Phys.* 2008. Т. 35. № 5.
220. Ng T. H. S. и др. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-

10 // Front. Immunol. 2013. T. 4. № MAY.

221. Ngan H. L. и др. MAPK pathway mutations in head and neck cancer affect immune microenvironments and ErbB3 signaling // Life Sci. Alliance. 2020. T. 3. № 4.

222. Ngan H. L. и др. Precision drugging of the MAPK pathway in head and neck cancer // npj Genomic Med. 2022. T. 7. № 1.

223. Nissi L. и др. Recurrence of head and neck squamous cell carcinoma in relation to high-risk treatment volume // Clin. Transl. Radiat. Oncol. 2021. T. 27.

224. Nowell C. S., Radtke F. Notch as a tumour suppressor // Nat. Rev. Cancer. 2017. T. 17. № 3.

225. Nuyts S. и др. Proton Therapy for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Early Clinical Experience and Current Challenges // Cancers (Basel). 2022. T. 14. № 11.

226. Ogunnigbagbe O., Bunick C. G., Kaur K. Keratin 1 as a cell-surface receptor in cancer // Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 2022. T. 1877. № 1.

227. Olszewski K. и др. Inhibition of glucose transport synergizes with chemical or genetic disruption of mitochondrial metabolism and suppresses TCA cycle-deficient tumors // Cell Chem. Biol. 2022. T. 29. № 3.

228. Ong H. S. и др. PDGFRA mRNA is overexpressed in oral cancer patients as compared to normal subjects with a significant trend of overexpression among tobacco users // J. Oral Pathol. Med. 2017. T. 46. № 8.

229. Orimo A. и др. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion // Cell. 2005. T. 121. № 3.

230. Partlová S. и др. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck

squamous cell carcinoma // Oncoimmunology. 2015. T. 4. № 1.

231. Patni A. P. и др. Comprehending the crosstalk between Notch, Wnt and Hedgehog signaling pathways in oral squamous cell carcinoma - clinical implications // Cell. Oncol. 2021. T. 44. № 3.

232. Pecaut M. J. и др. «Out-of-field» effects of head-localized proton irradiation on peripheral immune parameters // In Vivo (Brooklyn). 2003. T. 17. № 6.

233. Peitzsch C. и др. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: Identification, characterization and clinical implications // Cancers (Basel). 2019. T. 11. № 5.

234. Peltanova B., Raudenska M., Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review // Mol. Cancer. 2019. T. 18. № 1.

235. Peng L. и др. Single-cell transcriptomic landscape of immunometabolism reveals intervention candidates of ascorbate and aldarate metabolism, fatty-acid degradation and PUFA metabolism of T-cell subsets in healthy controls, psoriasis and psoriatic arthritis // Front. Immunol. 2023. T. 14.

236. Petrova A. A. и др. ROLE OF E-CADHERIN AND b-CATENIN IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA // Sib. J. Oncol. 2023. T. 22. № 6. С. 130–137.

237. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR // Nucleic Acids Res. 2001. T. 29. № 9.

238. Phan J. и др. Reirradiation of Head and Neck Cancers With Proton Therapy: Outcomes and Analyses // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2016. T. 96. № 1.

239. Pickering C. R. и др. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers // Cancer Discov. 2013. T. 3. № 7.

240. Pietras K. и др. PDGF receptors as cancer drug targets // *Cancer Cell*. 2003. Т. 3. № 5.
241. Plzák J. и др. The head and neck squamous cell carcinoma microenvironment as a potential target for cancer therapy // *Cancers (Basel)*. 2019. Т. 11. № 4.
242. Prabhudesai S. A. и др. Elastin remodeling: Does it play a role in priming the malignant phenotype of oral mucosa? // *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2023. Т. 66. № 2.
243. Pretscher D. и др. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+T-cells and CD20+B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma // *BMC Cancer*. 2009. Т. 9.
244. Pytynia K. B., Dahlstrom K. R., Sturgis E. M. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer // *Oral Oncol.* 2014. Т. 50. № 5.
245. Qin Y. и др. Tumor microenvironment and immune-related therapies of head and neck squamous cell carcinoma // *Mol. Ther. - Oncolytics*. 2021. Т. 20. № March. С. 342–351.
246. Quezada S. A. и др. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts // *J. Exp. Med.* 2010. Т. 207. № 3. С. 637–650.
247. Raj S. и др. Molecular mechanism(s) of regulation(s) of c-MET/HGF signaling in head and neck cancer // *Mol. Cancer*. 2022. Т. 21. № 1.
248. Raluca Ceausu A. и др. Toward a Molecular Classification of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Surgical Management of Head and Neck Pathologies.* , 2021.
249. Rampias T. и др. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells // *J. Natl. Cancer Inst.*

2009. T. 101. № 6.

250. Rashighi M., Harris J. E. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access // *Physiol. Behav.* 2017. T. 176. № 3. С. 139–148.

251. Ray A., Provenzano P. P. Aligned forces: Origins and mechanisms of cancer dissemination guided by extracellular matrix architecture // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2021. T. 72.

252. Ren X. и др. E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: Evidence from 19 published investigations // *Onco. Targets. Ther.* 2016. T. 9.

253. Rocha P. H. P. и др. Adverse Radiation Therapy Effects in the Treatment of Head and Neck Tumors // *Radiographics.* 2022. T. 42. № 3.

254. Rodon J. и др. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial // *Nat. Med.* 2019. T. 25. № 5.

255. Romashin D. D. и др. Keratins 6, 16, and 17 in Health and Disease: A Summary of Recent Findings // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024. T. 46. № 8. С. 8627–8641.

256. Romesser P. B. и др. Proton Beam Reirradiation for Recurrent Head and Neck Cancer: Multi-institutional Report on Feasibility and Early Outcomes // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. T. 95. № 1.

257. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms // *Mediators Inflamm.* 2015. T. 2015.

258. Rothenberger N. J., Stabile L. P. Hepatocyte growth factor/c-met signaling in head and neck cancer and implications for treatment // *Cancers (Basel).* 2017. T. 9. № 4.

259. Rothschild U. и др. Immunotherapy in head and neck cancer - scientific rationale, current treatment options and future directions // *Swiss Med. Wkly.* 2018. T.



148. № May. C. w14625.

260. Ruiter E. J. de и др. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis // *Oncoimmunology*. 2017. Т. 6. № 11.

261. Saini R. и др. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children // *Virol. J.* 2010. Т. 7.

262. Samatar A. A., Poulikakos P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014. Т. 13. № 12.

263. Sawant S. и др. Prognostic significance of elevated serum CD44 levels in patients with oral squamous cell carcinoma // *J. Oral Pathol. Med.* 2018. Т. 47. № 7.

264. Sawant S. S. и др. Clinical significance of aberrant vimentin expression in oral premalignant lesions and carcinomas // *Oral Dis.* 2014. Т. 20. № 5.

265. Schindelin J. и др. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Т. 9. № 7.

266. Schniewind I. и др. Cellular plasticity upon proton irradiation determines tumor cell radiosensitivity // *Cell Rep.* 2022. Т. 38. № 8.

267. Seitz H. K., Stickel F., Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics // *Int. J. Cancer*. 2004. Т. 108. № 4.

268. Seiwert T. Y. и др. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial // *Lancet Oncol.* 2016. Т. 17. № 7.

269. Seminerio I. и др. High infiltration of CD68<sup>+</sup> macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus // *Oncotarget*. 2018. Т. 9. № 13.

270. Shah P. A. и др. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell

Carcinoma // Cells. 2020. T. 9. № 12.

271. Sharaf K. и др. Discrimination of cancer stem cell markers *aldh1a1*, *bcl11b*, *bmi-1*, and *cd44* in different tissues of hnscc patients // Curr. Oncol. 2021. T. 28. № 4.

272. She L. и др. Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck // Cancer Cell Int. 2018. T. 18. № 1.

273. She Y. и др. Immune-related gene signature for predicting the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma // Cancer Cell Int. 2020. T. 20. № 1.

274. Shen Z. и др. Peritumoral ductular reaction can be a prognostic factor for intrahepatic cholangiocarcinoma // BMC Gastroenterol. 2020. T. 20. № 1.

275. Shi W. и др. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma // J. Clin. Oncol. 2009. T. 27. № 36.

276. Shimokawa T. и др. The Future of Combining Carbon-Ion Radiotherapy with Immunotherapy: Evidence and Progress in Mouse Models // Int. J. Part. Ther. 2016. T. 3. № 1.

277. Si Y. и др. Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector function by MDSC in human cancer tissue // Sci. Immunol. 2019. T. 4. № 40.

278. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2019 // CA. Cancer J. Clin. 2019. T. 69. № 1.

279. Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer // Mol. Oncol. 2018. T. 12. № 1.

280. Skinner H. D. и др. Proteomic profiling identifies PTK2/FAK as a driver of radioresistance in HPV-negative head and neck cancer // Clin. Cancer Res. 2016. T. 22. № 18. C. 4643–4650.

281. Slaughter D. P., Southwick H. W., Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin // *Cancer*. 1953. T. 6. № 5.

282. Slebos R. J. C. и др. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer Res*. 2006. T. 12. № 3 I.

283. Smeets S. J. и др. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus // *Oncogene*. 2006. T. 25. № 17.

284. Soboleva A. и др. 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. T. 12. № 3.

285. Solomon B., Young R. J., Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments // *Semin. Cancer Biol*. 2018. T. 52.

286. Song L. и др. Cellular heterogeneity landscape in laryngeal squamous cell carcinoma // *Int. J. Cancer*. 2020. T. 147. № 10.

287. Song Q. и др. Bladder cancer-derived exosomal KRT6B promotes invasion and metastasis by inducing EMT and regulating the immune microenvironment // *J. Transl. Med*. 2022. T. 20. № 1.

288. Spector M. E. и др. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *JAMA Otolaryngol. - Head Neck Surg*. 2019. T. 145. № 11.

289. Steurer S. и др. p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors // *Biomark. Res*. 2021. T. 9. № 1.

290. Stransky N. и др. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma // *Science (80-. )*. 2011. T. 333. № 6046.

291. Stupnikov A. и др. Hobotnica: Exploring molecular signature quality // F1000Research. 2022. Т. 10.
292. Sturgis E. M., Wei Q., Spitz M. R. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer // Semin. Oncol. 2004. Т. 31. № 6.
293. Su Y. C. и др. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway as a Radiosensitization in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 24.
294. Sullivan K. D. и др. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 // Cell Death Differ. 2018. Т. 25. № 1.
295. Sun Z. и др. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines // Int. J. Pept. Res. Ther. 2022. Т. 28. № 1.
296. Sung H. и др. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA. Cancer J. Clin. 2021. Т. 71. № 3.
297. Szafarowski T. и др. Assessment of cancer stem cell marker expression in primary head and neck squamous cell carcinoma shows prognostic value for aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) // Eur. J. Pharmacol. 2020. Т. 867.
298. Szturz P. и др. Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2017. Т. 111.
299. Takahashi H. и др. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages // Oncotarget. 2017. Т. 8. № 5.
300. Tang S. и др. Identification Keratin 1 as a cDDP-resistant protein in nasopharyngeal carcinoma cell lines // J. Proteomics. 2012. Т. 75. № 8.
301. Terry S. Y. A. и др. Imaging integrin  $\alpha\beta 3$  on blood vessels with  $^{111}\text{In}$ -

RGD2 in head and neck tumor xenografts // J. Nucl. Med. 2014. T. 55. № 2.

302. Theocharis S. и др. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) expression and activation in mobile tongue squamous cell carcinoma: Associations with clinicopathological parameters and patients survival // Tumor Biol. 2014. T. 35. № 7.

303. Tong B. C.-K., Benjamin Chun-Kit Tong. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access // Physiol. Behav. 2017. T. 176. № 5. C. 139–148.

304. Tong C. C. L., Kao J., Sikora A. G. Recognizing and reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of head and neck cancer // Immunol. Res. 2012. T. 54. № 1–3.

305. Toporcov T. N. и др. Risk factors for head and neck cancer in young adults: A pooled analysis in the INHANCE consortium // Int. J. Epidemiol. 2015. T. 44. № 1.

306. Trellakis S. и др. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011a. T. 24. № 3.

307. Trellakis S. и др. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease // Int. J. Cancer. 2011b. T. 129. № 9.

308. Troiano G. и др. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis // Oral Oncol. 2019. T. 93. № January. C. 66–75.

309. Tsai F. J. и др. Novel K6-K14 keratin fusion enhances cancer stemness and aggressiveness in oral squamous cell carcinoma // Oncogene. 2019. T. 38. № 26.

310. Tsang C. M. и др. Translational genomics of nasopharyngeal cancer // Semin. Cancer Biol. 2020. T. 61.

311. Tsimberidou A. M. и др. Transcriptomics and solid tumors: The next frontier in precision cancer medicine // Semin. Cancer Biol. 2022. T. 84.

312. Uemura S. и др. The comparison of acute toxicities associated with craniospinal irradiation between photon beam therapy and proton beam therapy in children with brain tumors // *Cancer Med.* 2022. Т. 11. № 6. С. 1502–1510.
313. Ullah R. и др. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment // *Semin. Cancer Biol.* 2022. Т. 85.
314. Usman S. и др. Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (Emt) mediated metastasis // *Cancers (Basel).* 2021. Т. 13. № 19.
315. Utispan K. и др. Ethanolic Extract of *Ocimum sanctum* Leaves Reduced Invasion and Matrix Metalloproteinase Activity of Head and Neck Cancer Cell Lines // *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2020. Т. 21. № 2.
316. Valenta T., Hausmann G., Basler K. Focus Review: The many faces and functions of  $\beta$ -catenin // *EMBO J.* 2012. Т. 31. № 12.
317. Vandesompele J. и др. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // *Genome Biol.* 2002. Т. 3. № 7.
318. Velleuer E., Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma // *Mol. Cell. Pediatr.* 2014. Т. 1. № 1.
319. Vermorken J. B. и др. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2008. Т. 359. № 11.
320. Vigneswaran N., Williams M. D. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis // *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 2014. Т. 26. № 2.
321. Vilen S. T. и др. Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma // *Sci. World J.* 2013. Т. 2013.
322. Vitti E. T., Parsons J. L. The radiobiological effects of proton beam therapy: Impact on DNA damage and repair // *Cancers (Basel).* 2019. Т. 11. № 7. С. 1–15.

323. Wang C. W. и др. The Use of Immune Regulation in Treating Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) // *Cells*. 2024. Т. 13. № 5.
324. Wang J. Y. и др. Expression and significance of CK5/6, P63, P40, CK7, TTF-1, napsinA, CD56, Syn and CgA in biopsy specimen of squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell lung carcinoma // *Int. J. Morphol.* 2020a. Т. 38. № 2.
325. Wang S. и др. A potential fate decision landscape of the TWEAK/Fn14 axis on stem and progenitor cells: a systematic review // *Stem Cell Res. Ther.* 2022a. Т. 13. № 1.
326. Wang W. и др. Macrophage inflammation, erythrophagocytosis, and accelerated atherosclerosis in JAK2V617F mice // *Circ. Res.* 2018. Т. 123. № 11.
327. Wang X. и др. A review of radiation-induced lymphopenia in patients with esophageal cancer: an immunological perspective for radiotherapy // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020b. Т. 12.
328. Wang X. и др. Tumor Necrosis Factor: What Is in a Name? // *Cancers (Basel)*. 2022b. Т. 14. № 21.
329. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? // *Acta Pharmacol. Sin.* 2008. Т. 29. № 11. С. 1275–1288.
330. Warriar S. и др. Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition // *Cancer Gene Ther.* 2014. Т. 21. № 9.
331. Water T. A. и др. The Potential Benefit of Radiotherapy with Protons in Head and Neck Cancer with Respect to Normal Tissue Sparing: A Systematic Review of Literature // *Oncologist*. 2011. Т. 16. № 3. С. 366–377.
332. Wennerberg E. и др. Immune recognition of irradiated cancer cells // *Immunol. Rev.* 2017. Т. 280. № 1.

333. West A. P. и др. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS // *Nature*. 2011. Т. 472. № 7344.
334. Whiteside T. L. Nihms-1795786.Pdf // 2022. № 412.
335. Wong S. H. M. и др. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. Т. 121.
336. Worst B. C. и др. Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients – The INFORM pilot study // *Eur. J. Cancer*. 2016. Т. 65.
337. Xie J. и др. Roles of the Wnt Signaling Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Front. Mol. Biosci.* 2021. Т. 7.
338. Xu E. S. и др. Decreasing cytokeratin 17 expression in head and neck cancer predicts nodal metastasis and poor prognosis: The first evidence // *Clin. Otolaryngol.* 2018. Т. 43. № 4.
339. Xu M. J., Johnson D. E., Grandis J. R. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era // *Cancer Metastasis Rev.* 2017. Т. 36. № 3.
340. Xu Q. и др. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with head and neck squamous cell carcinoma // *Transl. Oncol.* 2017. Т. 10. № 1.
341. Y. F. и др. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 12.
342. Yan S. и др. Global democratisation of proton radiotherapy // *Lancet Oncol.* 2023. Т. 24. № 6.
343. Yan X. и др. MT4-MMP promotes invadopodia formation and cell motility in FaDu head and neck cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020a. Т. 522. № 4.
344. Yan X. и др. Knockdown of KRT17 decreases osteosarcoma cell proliferation and the Warburg effect via the AKT/mTOR/HIF1 $\alpha$  pathway // *Oncol.*



Rep. 2020b. T. 44. № 1.

345. Yang L., Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application // J. Hematol. Oncol. 2017. T. 10. № 1.

346. Yao Y., Xu X. H., Jin L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy // Front. Immunol. 2019. T. 10. № MAR.

347. Ye H. и др. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma // BMC Genomics. 2008. T. 9.

348. Yi C. H., Zhai Q., Wang B. Y. Updates on immunohistochemical and molecular markers in selected head and neck diagnostic problems // Arch. Pathol. Lab. Med. 2017. T. 141. № 9.

349. Yoh K., Prywes R. Pathway regulation of p63, a director of epithelial cell fate // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2015. T. 6. № APR.

350. Young M. и др. A TRACER 3D Co-Culture tumour model for head and neck cancer // Biomaterials. 2018. T. 164.

351. Yu F. и др. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancers and targeted therapies // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. T. 6. № 1.

352. Yu W. и др. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target // Front. Oncol. 2019. T. 9. № October.

353. Zang J. и др. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer: A meta-analysis // Head Neck. 2013. T. 35. № 10.

354. Zhang A. и др. Immunological Effects of Proton Radiotherapy: New Opportunities and Challenges in Cancer Therapy // Cancer Innov. 2025. T. 4. № 2. C. 1–10.

355. Zhang C. и др. TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms and risk of recurrence in patients with squamous cell carcinomas of the nonoropharynx // Int. J. Cancer. 2014. T. 135. № 7. C. 1615–1624.

356. Zhang F. и др. Type I Interferon Response in Radiation-Induced Anti-Tumor Immunity // *Semin. Radiat. Oncol.* 2020. Т. 30. № 2.
357. Zhang J. и др. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer // *Sci. Rep.* 2022a. Т. 12. № 1.
358. Zhang J. и др. Constructing heterogeneous single-cell landscape and identifying microenvironment molecular characteristics of primary and lymphatic metastatic head and neck squamous cell carcinoma // *Comput. Biol. Med.* 2023. Т. 165.
359. Zhang L. и др. Genomic analysis of nasopharyngeal carcinoma reveals time-based subtypes // *Mol. Cancer Res.* 2017. Т. 15. № 12.
360. Zhang P., Steinberg B. M. Overexpression of PTEN/MMAC1 and decreased activation of Akt in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas // *Cancer Res.* 2000. Т. 60. № 5.
361. Zhang W., Liu Y., Wang C. W. S100A4 promotes squamous cell laryngeal cancer Hep-2 cell invasion via NF- $\kappa$ B/MMP-9 signal // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014. Т. 18. № 9.
362. Zhang Z. и др. Functional and clinical characteristics of focal adhesion kinases in cancer progression // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022b. Т. 10.
363. Zheng X. и др. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy // *Oncotarget.* 2017. Т. 8. № 29.
364. Zhong C. и др. Remodeling cancer stemness by collagen/fibronectin via the AKT and CDC42 signaling pathway crosstalk in glioma // *Theranostics.* 2021. Т. 11. № 4.
365. Zhou J., Yi Q., Tang L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: A focused review // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019. Т. 38. № 1.
366. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans //

IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans. 2010. T. 93.

367. Abstracts 869 // 2022. T. 10. № Suppl 2. С. 2022.

368. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году. , 2024.