

УДК 617.51/.53-006.61:615.849.12
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47>



Исследование транскриптома плоскоклеточного рака головы и шеи после протонного облучения

Джуманиязова Э.Д.¹, Вишнякова П.А.^{1,2}, Чиркова М.В.³, Карпулевич Е.А.³,
Еремина И.З.¹, Гордон К.Б.^{1,4}, Каприн А.Д.^{1,5}, Фатхудинов Т.Х.^{1,6}

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины Российского университета дружбы народов (НИИ МКМ РУДН)
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии (НМИЦ АПГ) им. акад. В.И. Кулакова
Россия, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, 4

³ Институт системного программирования им. В.П. Иванникова Российской академии наук (ИСП РАН)
Россия, 109004, г. Москва, ул. Александра Солженицына, 25

⁴ Медицинский радиологический научный центр (МРНЦ) им. А. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии (филиал «НМИЦ радиологии»)
Россия, 249036, г. Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) радиологии
Россия, 249036, г. Обнинск, ул. Королева, 4

⁶ Научно-исследовательский институт морфологии человека (НИИМЧ) им. акад. А.П. Авцына
Россия, 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, 3

РЕЗЮМЕ

Цель – оценить изменения транскриптома клеток ткани плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ) у пациентов после протонного облучения.

Материалы и методы. Биопсийный материал, полученный от трех пациентов ПРГШ до и после протонного облучения в суммарной дозе 10 изоГр, был подвергнут гомогенизации, очистке и концентрации. После чего была выделена тотальная РНК с последующей очисткой и концентрацией набором RNA Clean & Concentrator (Zymo Research), количество оценивали с помощью прибора Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies). После выделения тотальной РНК из 1 мкг для секвенирования на платформе Illumina были приготовлены библиотеки с использованием набора TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 с этапом обогащения в 10 циклов в соответствии с рекомендациями производителя. Качество РНК и полученных библиотек проверялось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Параметр RIN для РНК составлял не менее 7. Концентрацию библиотек оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Окончательные библиотеки объединяли в эквимольных пропорциях перед секвенированием на платформе Illumina HiSeq 2500 с использованием парно-концевых прочтений по 50 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). Анализ обогащения был выполнен с помощью программного обеспечения PANTHER 17.0.

Результаты. В ходе транскриптомного анализа ПРГШ после пятикратного облучения пациентов протонами (2 изоГр) в суммарной дозе 10 изоГр было обнаружено 1 414 значимо дифференциально экспрессированных генов. Выделены 10 наиболее и наименее экспрессируемых генов и ассоциированные с ними сигнальные пути. В ПРГШ после облучения протонами обнаружен ряд сигнальных путей, связанных с низкоэкспрес-

✉ Джуманиязова Энар Денисовна, enar2017@yandex.ru

сированными генами, таких как STAT5; сигнальный путь PD-1; отмечена MET-опосредованная активация сигнального пути PTK2, передача сигналов PDGF; CD22-опосредованная регуляция BCR; активация MAPK, опосредованная FCER1. Кроме вышеназванных сигнальных путей обращает на себя внимание активация процесса распада коллагена, FCGR3A-опосредованного фагоцитоза и FCGR3A-опосредованного синтеза интерлейкина-10 (IL10). При анализе обогащения среди высокоэкспрессируемых генов в ткани ПРГШ после протонного облучения были активированы процессы ороговения и биологического окисления.

Заключение. Облучение протонами при ПРГШ приводит к гиперэкспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов ороговения и биологического окисления; гипоекспрессии генов, связанных с подавлением сигнальных путей: STAT5, PD-1, MET-опосредованной активации сигнального пути PTK2, передачи сигналов PDGF; CD22-опосредованной регуляции BCR; активации MAPK, опосредованной FCER1, процесса распада коллагена, активации FCGR3A-опосредованного фагоцитоза и FCGR3A-опосредованного синтеза IL10. Все сигнальные пути гипоекспрессированных генов функционируют в клетках ПРГШ, если негативного влияния на опухоль не оказывается извне (облучение или поступление противоопухолевых препаратов). Преобладание подавленных сигнальных путей над активированными, вероятнее всего, свидетельствует о снижении функционального потенциала клеток после облучения протонами. Дозозависимость эффектов ПТ обуславливает необходимость дальнейшего изучения изменений клеточных и молекулярно-генетических сигнатур ПРГШ после протонного облучения разными дозами.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, транскриптом, протонное облучение, сигнальные пути

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1356 от 7.10.2021 (идентификатор РФ 0951.61321X0012, № 15.СИН.21.0011)). Обчеты выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-294 от 15.04.2022).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено независимым комитетом по этике (протокол № 634 от 17.11.2021, протокол № 684 от 02.03.2022).

Для цитирования: Джуманиязова Э.Д., Вишнякова П.А., Чиркова М.В., Карпулевич Е.А., Еремина И.З., Гордон К.Б., Каприн А.Д., Фатхудинов Т.Х. Исследование транскриптома плоскоклеточного рака головы и шеи после протонного облучения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(1):37–47. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47>.

Study of head and neck squamous cell carcinoma transcriptome after proton therapy

Jumaniyazova E.D.¹, Vishnyakova P.A.^{1,2}, Chirkova M.V.³, Karpulevich E.A.³, Eremina I.Z.¹, Gordon K.B.^{1,4}, Kaprin A.D.^{1,5}, Fatkhudinov T.H.^{1,6}

¹ *Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the Peoples' Friendship University of Russia (RUDN Research Institute of MCM)*

6, Miklukho-Maklaya Str., Moscow, 117198, Russian Federation

² *National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov*

4, Akademika Oparina Str., Moscow, 117997, Russian Federation

³ *Ivannikov Institute for System Programming of the Russian Academy of Sciences (ISP RAS)*
25, Aleksandra Solzhenitsyna Str., Moscow, 109004, Russian Federation

⁴ *A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FGBU National Medical Research Center of Radiology (a branch of FGBU National Medical Research Center of Radiology)*
10, Marshala Zhukova Str., Obninsk, 249036, Russian Federation

⁵ National Medical Research Center of Radiology (NMC Radiology of the Ministry)
4, Koroleva Str., Obninsk, 249036, Russian Federation

⁶ Avtsyn Research Institute of Human Morphology
3, Tsyurupy Str., Moscow, 117418, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate changes in the transcriptome of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tissue cells in patients after proton therapy.

Materials and methods. Biopsy material obtained from 3 HNSCC patients before and after proton therapy at a total dose of 10 isoGy was homogenized, purified, and concentrated. Then total RNA was isolated with further purification and concentration with the RNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research). Library quantitation was assessed using the Qubit 2.0 instrument (Invitrogen, Life Technologies). After isolation of 1 µg total RNA for sequencing, libraries were prepared on the Illumina platform using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 with a 10-cycle enrichment step according to the manufacturer's recommendations. The quality of RNA and the resulting libraries was checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Tec. Inc., USA). The RIN parameter for RNA was at least 7. The library concentration was assessed by real-time PCR on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). Final libraries were pooled in equimolar ratios before sequencing on the Illumina HiSeq 2500 platform using 50 base-pair paired-end reads. The Q20 parameter for all samples was > 97%, and the number of reads averaged 60.2 million per sample. Raw reads were processed using the RTA 1.17.21.3 and Casava 1.8.2 (Illumina). The enrichment analysis was performed using the PANTHER 17.0 software.

Results. The transcriptome analysis of HNSCC after proton radiation therapy (5 x 2 isoGy) at a total dose of 10 isoGy revealed 1,414 significantly differentially expressed genes. The 10 most and least expressed genes and their associated signaling pathways were identified. A number of signaling pathways associated with the underexpressed genes were detected in HNSCC after proton therapy, such as: STAT5; PD-1 signaling pathway; marked MET-mediated activation of PTK2 signaling pathway, PDGF signaling; CD22-mediated regulation of BCR; and FCERI-mediated MAPK activation. In addition to the above signaling pathways, activation of collagen degradation, FCGR3A-mediated phagocytosis, and FCGR3A-mediated interleukin (IL)-10 synthesis are of interest. In the enrichment analysis among highly expressed genes, keratinization and biological oxidation processes were activated in HNSCC tissues after proton therapy.

Conclusion. Proton therapy in HNSCC leads to overexpression of genes involved in the regulation of keratinization and biological oxidation processes as well as to underexpression of genes associated with suppression of signaling pathways: STAT5, PD-1, MET-mediated activation of PTK2 signaling pathway, PDGF signaling; CD22-mediated regulation of BCR; FCERI-mediated MAPK activation, collagen degradation, FCGR3A-mediated phagocytosis activation, and FCGR3A-mediated IL-10 synthesis. All signaling pathways of underexpressed genes function in HNSCC cells if there is no negative influence on the tumor from outside (irradiation or delivery of antitumor drugs). The predominance of suppressed signaling pathways over activated ones most likely indicates a decrease in the functional potential of cells after proton therapy. The dose-dependence of PT effects necessitates further study of changes in cellular and molecular-genetic signatures of HNSCC after proton irradiation with different doses.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, transcriptome, proton therapy, signaling pathways

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2022-294 dated April 15, 2022) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2021-1356 dated October 7, 2021 (identifier RF 0951.61321X0012, No. 15.SIN.21.0011).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. Before enrollment in the study, the study protocol and patient information and informed consent forms were approved by an independent Ethics Committee (Protocol No. 634 of 17.11.2021, Protocol No. 684 of 02.03.2022).

For citation: Jumaniyazova E.D., Vishnyakova P.A., Chirkova M.V., Karpulevich E.A., Eremina I.Z., Gordon K.B., Kaprin A.D., Fatkhudinov T.H. Study of head and neck squamous cell carcinoma transcriptome after proton therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(1):37–47. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47>.

ВВЕДЕНИЕ

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает 7-е место в структуре общей заболеваемости злокачественными новообразованиями, частота встречаемости которого составляет 0,7 млн новых случаев в год [1, 2]. Характерными чертами ПРГШ являются частые рецидивы и низкая 5-летняя выживаемость как при локализованной, так и при распространенной стадии заболевания (69 и 34% соответственно) [1]. Низкая выживаемость пациентов связана с поздней диагностикой, плохим ответом на различные виды лечения и высокой частотой рецидивов [2–4]. В большинстве случаев ПРГШ диагностируется на местнораспространенной стадии, для которой лучевая терапия (ЛТ) с сопутствующей радиосенсибилизирующей химиотерапией или без нее является одним из основных подходов лечения, используемым в 80% случаев [5].

Протонная терапия (ПТ) представляет собой один из наиболее перспективных видов корпускулярного облучения, внедрение которого в практику позволяет минимизировать возникновение нежелательных явлений, ассоциированных с облучением. Терапевтический эффект ПТ состоит в стойком повреждении генетического материала опухолевых клеток, ведущем к их гибели [6]. При этом цитотоксический эффект протонов обусловлен как прямым повреждением цепи ДНК опухолевых клеток, так и косвенным путем – за счет индукции образования активных форм кислорода [7] и стимуляции апоптоза (за счет активации каспазы-3 протонами) [8].

В нашем прошлом обзоре [9] мы описали биологические эффекты ПТ. Считается, что плоскоклеточный рак носоглотки является одним из основных показаний для ПТ ввиду сложной анатомии и близости расположения критических анатомических структур и органов, таких как перекрест зрительных нервов, височные доли и ствол головного мозга, мышцы-констрикторы глотки, слюнные железы [10]. В нескольких исследованиях продемонстрировали значимое снижение частоты возникновения острых постлучевых осложнений у пациентов с плоскоклеточным раком носоглотки, получающих ПТ, по сравнению с пациентами, получающих классическую ЛТ [11].

Накапливающийся клинический опыт применения протонного облучения значительно опережает фундаментальные радиобиологические исследования и способствует увеличению числа протонных центров в разных странах мира [12]. Однако ограниченные знания о молекулярно-генетических изменениях, индуцированных ПТ в опухолевых клетках,

препятствуют разработке новых терапевтических и комбинированных стратегий. Данное исследование посвящено описанию транскрипционных изменений в клетках ПРГШ после облучения протонами.

Целью нашего исследования являлась оценка изменений транскриптома клеток ткани плоскоклеточного рака головы и шеи у пациентов после протонного облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биопсийный материал опухолевой ткани был получен от трех пациентов с ПРГШ до и после протонного облучения СОД 10 изоГр (коэффициент относительной биологической эффективности – 1,1). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено независимым комитетом по этике (протокол № 634 от 17.11.2021, протокол № 684 от 02.03.2022). Исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией 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 № 266. Участников идентифицировали только по номеру пациента.

Облучение пациентов протонами проведено с использованием горизонтально фиксированного активного сканирующего пучка протонов в положении сидя на комплексе ПТ «Прометеус» (ЗАО «Протом», Россия). 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.

Обработка биоматериала выполнялась в асептических условиях с использованием стерильных инструментов. Тотальную РНК выделяли из ткани после гомогенизации с тefлоновыми бусинами в QIAzol (Qiagen) с последующей очисткой и концентрацией набором RNA Clean & Concentrator (Zymo Research), количество оценивали с помощью прибора Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies). После выделения тотальной РНК из 1 мкг для секвенирования на платформе Illumina были приготовлены библиотеки с использованием набора TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 с этапом обогащения в 10 циклов в соответствии с рекомендациями производителя.

Качество РНК и полученных библиотек проверялось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc.,

США). Параметр RIN для РНК составлял не менее 7. Концентрацию библиотек оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Окончательные библиотеки объединяли в эквимольных пропорциях перед секвенированием на платформе Illumina HiSeq 2500 с использованием парно-концевых прочтений по 50 оснований. Параметр Q20 для всех образцов составил > 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).

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 опухолевыми образцами до и после облучения. Анализ дифференциальной экспрессии 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 [13].

Hobotnica – инструмент для оценки качества инструментов вычисления дифференциальной экспрессии. Инструмент создан при использовании количественной оценки качества на концепции способности к разделению данных разных экспериментов, которые построены 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. Для множественного сравнения для расчета p использовалась поправка Бонферрони совместно с максиминным критерием Вальда (критерий крайнего пессимизма).

По итогам сравнения DESeq2 показал лучшие результаты при сравнении опухолевых образцов до и после облучения. Анализ обогащения был выполнен с помощью программного обеспечения PANTHER 17.0. Порогом статистической значимости для включения сигнального пути в список обогащенных являлось значение $p < 0,05$ (табл. 1).

Таблица 1

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе транскриптомного анализа опухолевой ткани ПРГШ после пятикратного облучения пациентов протонами (2 изоГр) в суммарной дозе 10 изоГр было обнаружено 1 414 значимо дифференциально экспрессированных генов. Нами было выделено 10 генов на основании минимальных (с наиболее пониженной экспрессией) и максимальных (с наиболее повышенной экспрессией) значений LOG2FC. Наименьшая экспрессия после протонного облучения была отмечена в следующих генах: *CLEC4E*, *IGHV2-70*, *P2RX1*, *SLC5A3*, *MYBPC1*, *RP11-551L14.1*, *FCRLA*, *FAM30A*, *IGHV2-26*, *IGHV2-5* (табл. 2).

Таблица 2

Наиболее низкоэкспрессируемые гены в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения				
Ген	p	LOG2FC	Расшифровка названия	Функция
<i>CLEC4E</i>	1,89E-06	-5,0	C-Type Lectin Domain Family 4 Member E – член E семейства 4 доменов лектинов C-типа	Кодирует члена суперсемейства лектинов C-типа/лектиноподобных доменов C-типа (CTL/CTLD), участвующего в клеточной адгезии, передаче сигналов между клетками, обмене гликопротеинов, в воспалении и иммунном ответе
<i>IGHV2-70</i>	8,57E-06	-5,1	Immunoglobulin Heavy Variable 2-70 – тяжелая переменная иммуноглобулина 2-70	Обеспечивает антигенсвязывающую активность и активность связывания рецепторов иммуноглобулинов; участвует в активации иммунного ответа, защитной реакции на другой организм и фагоцитоз

Ген	<i>p</i>	LOG2FC	Расшифровка названия	Функция
<i>P2RX1</i>	3,99E-05	-5,2	Purinergic Receptor P2X 1 – пуринергический рецептор P2X 1	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	-5,2	Solute Carrier Family 5 Member 3 – семейство переносчиков растворителей 5 член 3	Участвует в метаболическом процессе инозитола; трансмембранном транспорте моносахаридов; импорте миоинозитола через плазматическую мембрану
<i>MYBPC1</i>	0,000185	-5,2	Myosin Binding Protein C1 – миозинсвязывающий белок C1	Участие в сокращении поперечно-полосатой мускулатуры
<i>RP11-551L14,1</i>	0,011218	-5,3	Нет данных	Нет данных
<i>FCRLA</i>	0,000857	-5,3	Fc Receptor Like A – рецептор Fc, подобный A	Участвует в гуморальном иммунитете: разрушение покрытых IgG антигенов и клеток, индуцированное антителами
<i>FAM30A</i>	0,000853	-5,3	Family With Sequence Similarity 30 Member A – семейство со сходством последовательностей, член A из 30	Точная функция неясна, однако его активацию связывают с раковыми заболеваниями
<i>IGHV2-26</i>	0,002372	-5,4	Immunoglobulin Heavy Variable 2-26 – тяжелая переменная иммуноглобулина 2-26	Принимает участие в активации иммунного ответа; защитной реакции на другой организм; фагоцитоза
<i>IGHV2-5</i>	0,018504	-5,4	Immunoglobulin Heavy Variable 2-5 – тяжелая переменная иммуноглобулина 2-5	Обеспечивает антигенсвязывающую активность и активность связывания рецепторов иммуноглобулинов. Активирует иммунного ответа; защитная реакция на другой организм; фагоцитоз

Наибольшая экспрессия в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения была отмечена в генах *PIK3R2*; *CTD-3074O7,11*; *GOLGA6L9*; *GP1BB*; *NPIPA2*; *RP11-96O20,4*; *AC008132,13*; *SNX31*; *RP1-127D3,4*; *RPL21P119* (табл. 3).

Для определения принадлежности значимо высоко- и низкоэкспрессированных генов к тем или иным сигнальным путям был проведен анализ обогащения для каждой из этих групп генов по отдельности. В образцах опухолевой ткани после протонного облучения по сравнению с опухолевой тканью до протонного облучения среди низкоэкспрессируемых генов изменения были отмечены в сигнальных путях, представленных в табл. 4. В ПРГШ после облучения

протонами был обнаружен ряд сигнальных путей, связанных с низкоэкспрессированными генами, таких как STAT5; сигнальный путь PD-1; отмечена MET-опосредованная активация сигнального пути PTK2, передача сигналов PDGF; CD22-опосредованная регуляция BCR; активация MAPK, опосредованная FCER1. Кроме вышеназванных сигнальных путей обращает на себя внимание процесс распада коллагена, активация FCGR3A-опосредованного фагоцитоза и FCGR3A-опосредованного синтеза IL10 (табл. 4).

При анализе обогащения среди высокоэкспрессируемых генов в ткани ПРГШ после протонного облучения были активированы процессы ороговения и биологического окисления (табл. 5).

Таблица 3

Наиболее высокоэкспрессируемые гены в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения				
Ген	<i>p</i>	LOG2FC	Расшифровка названия	Функция
<i>PIK3R2</i>	0,001165114	4,9	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2 – регуляторная субъединица 2 фосфоинозитид-3-киназы	Фосфорилирует фосфатидилинозитол и подобные соединения, создавая вторичные мессенджеры, важные в сигнальных путях роста
<i>CTD-3074O7,11</i>	2,72E-06	4,6	Нет данных	Принимает участие в развитии глаз, конечностей, сердца и репродуктивной системы
<i>GOLGA6L9</i>	1,59E-07	4,5	Gene – Golgin A6 Family Like 9 – семейство голгина A6 подобное 9	Нет данных
<i>GP1BB</i>	4,01E-10	4,3	Glycoprotein Ib Platelet Subunit Beta – гликопротеин Ib тромбоцитарная субъединица бета	Опосредует адгезию тромбоцитов
<i>NPIPA2</i>	8,65E-10	4,0	Nuclear Pore Complex Interacting Protein Family Member A2 – ядерный комплекс пор, член семейства взаимодействующих белков A2	Участвует в транспорте мРНК и транспорте белков

Ген	<i>p</i>	LOG2FC	Расшифровка названия	Функция
<i>RP11-96O20,4</i>	3,93E-11	3,8	Нет данных	Нет данных
<i>AC008132,13</i>	1,07E-11	3,6	Нет данных	Нет данных
<i>SNX31</i>	7,48E-13	3,4	Sorting Nexin 31 – сортировка Нексина 31	Участвует во внутриклеточном транспорте белков
<i>RP1-127D3,4</i>	7,48E-13	3,4	Нет данных	Нет данных
<i>RPL21P119</i>	4,15E-12	3,4	Ribosomal Protein L21 Pseudogene 119 – рибосомальный белок L21, псевдоген 119	Псевдоген

Таблица 4

Сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения

Reactome pathways	Кол-во генов из референс-списка базы данных	Количество генов, связанных с данным сигнальным путем в представленных образцах	Обогащение кратности	<i>p</i>	Вероятность ложноположительных результатов
Активация STAT5 R-HSA-9702518.2	10	4	15,63	3.15E-04	1.60E-02
Сигнальный путь PD-1 R-HSA-389948.3	29	7	9,43	2.58E-05	2.22E-03
Распад коллагена R-HSA-1442490.4	64	14	8,55	7.25E-09	6.03E-06
МЕТ-опосредованная активация сигнального пути PTK2 R-HSA-8874081.2	30	6	7,81	2.42E-04	1.31E-02
Передача сигналов PDGF R-HSA-186797.5	54	8	5,79	1.48E-04	9.44E-03
Сигнальный путь АКТ1 E17K при раке R-HSA-5674400.2	26	5	7,51	9.44E-04	4.13E-02
CD22-опосредованная регуляция BCR R-HSA-5690714.3	67	9	5,25	1.13E-04	7.43E-03
Сигналинг интерферона гамма R-HSA-877300.6	91	12	5.15	1.00E-05	1.09E-03
Активация MAPK, опосредованная FCER1 R-HSA-2871796.3	89	11	4,83	4.03E-05	3.14E-03
FCGR3A-опосредованный синтез IL10 R-HSA-9664323.2	100	12	4,69	2.37E-05	2.11E-03

Примечание. Обогащение кратности определяется как процент генов в представленных образцах, принадлежащих к указанному пути, по сравнению с фоновой популяцией генов (здесь и в табл. 5).

Таблица 5

Активированные сигнальные пути ПРГШ, связанные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения

Reactome pathways	Кол-во генов из референс-списка базы данных	Количество генов, связанных с данным сигнальным путем в представленных образцах	Обогащение кратности	<i>p</i>	Вероятность ложноположительных результатов
Формирование ороговевающей оболочки R-HSA-6809371.5	129	14	6,96	4.57E-08	1.14E-04
Биологическое окисление R-HSA-211859.3	220	15	4,37	3.83E-06	4.77E-03

Полученные данные в ходе данной 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 центрах имеется необходимое дорогостоящее оборудование для проведения ПТ, зачастую клиницисты ограничиваются назначением классической фотонной ЛТ. В-третьих, сам транскрипционный анализ и биоинформатическая обработка данных довольно сложны, требуют высокой квалификации специалистов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Транскриптом – динамически изменяющаяся под действием различных факторов система. В качестве прецизионного онкологического исследования транскрипционный анализ начал применяться сравнительно недавно [14, 15]. В литературных источниках отсутствуют данные, описывающие изменения на уровне транскриптома ПРГШ, вызванные протонным облучением. На наш взгляд, понимание транскрипционной гетерогенности ПРГШ способствует разработке 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.

Ключевая роль активации преобразователей сигналов и активаторов транскрипции 5 (STAT5) обнаружена при многих злокачественных образованиях. В большинстве случаев STAT5 усиливает рост клеток плоского эпителия, увеличивает миграцию и инвазию клеток плоскоклеточного рака, вызывает фенотипические и молекулярные изменения, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом [16]. При ПРГШ активация STAT5 коррелирует с усилением роста опухоли, инвазией и эпителиально-мезенхимальным переходом [17]. После протонного облучения ПРГШ отмечено подавление STAT5.

Нерецепторная протеинтирозинкиназа 2 (PTK2), также известная как киназа фокальной адгезии (ФАК), является многофункциональным регулятором клеточного сигнала между опухолевыми клетками и микроокружением опухоли. Активированная PTK2 участвует в регуляции ряда клеточных функций: адгезии, пролиферации и миграции [18, 19]. Протеомный анализ показал, что гиперэкспрессия PTK2/ФАК является биомаркером радиорезистент-

ности ПРГШ. Комбинации ингибирования PTK2/ФАК с ЛТ в настоящее время изучаются в качестве терапевтической стратегии для улучшения местного контроля при ВПЧ-негативном ПРГШ [20].

Активация сигнального пути PD-1/PD-L1 ассоциирована с индукцией и поддержанием иммунной толерантности в опухолевой ткани, путем подавления эффекторных функций Т-клеток [21]. Уровни экспрессии PD-L1 при ПРГШ в значительной степени коррелируют с выраженным клиническим прогрессированием и плохой выживаемостью пациентов [22]. Активность PD-1 и его лигандов PD-L1 или PD-L2 отвечает за активацию, пролиферацию и цитотоксическую секрецию Т-лимфоцитов [23]. В ходе нашего 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 антиангиогенную роль [24]. Важно отметить, что он участвует в контроле пролиферации и инвазии опухолевых клеток через сигнальный путь JAK/STAT [25, 26].

Сигнальный путь PDGF/PDGFR играет одну из ключевых ролей в прогрессировании опухолей [27]. Гиперэкспрессия PDGF способствует росту опухолевых клеток [28] и индуцирует ангиогенез [29], воздействуя на клетки микроокружения опухоли, тем самым провоцируя прогрессирование опухоли. 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 [30]. В данном исследовании облучение протонами вызвало подавление сигнального пути PDGF в ПРГШ.

Сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) является ключевым посредником, объединяющим внеклеточные сигналы для контроля клеточной пролиферации, выживания, дифференцировки, старения, а также лекарственной устойчивости [31]. Для пациентов ПРГШ с высокой внутриопухолевой экспрессией p-MAPK1/3 (p-ERK1/2) характерна худшая выживаемость [32]. Считают, что измененная киназная сигнальная сеть, включающая EGFR, PDGFR, PAK1, PTK2 (ФАК) и MAP2K2, по-видимому, регулирует aberrантные изменения в опухолевой ткани, сопровождающие рецидив [33].

Выявление изменений ПРГШ после ПТ на транскриптомном уровне позволит разделить пациентов

на группы с разным прогнозом заболевания и ответом на лечение. Так, например, общая выживаемость пациентов с ПРГШ зависит от активности процесса кератинизации, особенно у пациентов с ПРГШ неассоциированного с вирусом папилломы человека. Активация процесса кератинизации в ПРГШ связана с неблагоприятным прогнозом и меньшей общей выживаемостью пациентов [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, облучение протонами при ПРГШ приводит к гиперэкспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов ороговения и биологического окисления; гипоекспрессии генов, связанных с подавлением сигнальных путей: STAT5, PD-1, MET-опосредованной активации сигнального пути РТК2, передачи сигналов PDGF; CD22-опосредованной регуляции BCR; активации MAPK, опосредованной FCER1, процесса распада коллагена, активации FCGR3A-опосредованного фагоцитоза и FCGR3A-опосредованного синтеза IL10.

Обобщая полученные результаты в ходе транскриптомного исследования ПРГШ после протонного облучения в суммарной дозе 10 изоГр, обращает на себя внимание преобладающее количество подавленных сигнальных путей над активированными. При этом часть из обнаруженных сигнальных путей соответствует данным, описанным в литературных источниках, а часть путей, изменившихся в ходе исследования, отличается от имеющихся данных. Все сигнальные пути гипоекспрессированных генов функционируют в клетках ПРГШ, если негативного влияния на опухоль не оказывается извне (облучение или поступление противоопухолевых препаратов). Преобладание подавленных сигнальных путей над активированными, вероятнее всего, свидетельствует о снижении функционального потенциала клеток после облучения протонами. Дозозависимость эффектов ПТ обуславливает необходимость дальнейшего изучения изменений клеточных и молекулярно-генетических сигнатур ПРГШ после протонного облучения разными дозами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Bhat G.R., Hyole R.G., Li J. Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives. *In Advances in Cancer Research*. 2021;152(1):67–102. DOI: 10.1016/bs.acr.2021.05.002.
- Johnson D.E., Burtneis B., Leemans C.R., Lui W.Y., Bauman J.E., Grandis J.R. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):92–112. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–2128. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
- Borras J.M., Barton M., Grau C., Corral J., Verhoeven R., Lemmens V. et al. The impact of cancer incidence and stage on optimal utilization of radiotherapy: Methodology of a population based analysis by the ESTRO-HERO project. *Radiotherapy and Oncology*. 2015;116(1):45–50. DOI: 10.1016/j.radonc.2015.04.021.
- Vitti E.T., Parsons J.L. The radiobiological effects of proton beam therapy: Impact on DNA damage and repair. *Cancers*. 2019;11(7):1–15. DOI: 10.3390/cancers11070946.
- Răileanu M., Straticiu M., Iancu D.A., Andrei R.F. Proton irradiation induced reactive oxygen species promote morphological and functional changes in HepG2 cells. *Journal of Structural Biology*. 2022;214(4):1–11. DOI: 10.1016/j.jsb.2022.107919.
- Alan Mitteer R., Wang Y., Shah J., Gordon S., Fager M., Butter P.P. et al. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. *Scientific Reports*. 2015;5(1):1–12. DOI: 10.1038/srep13961.
- Jumaniyazova E.D., Smyk D.I., Vishnyakova P.A., Fatkhudinov T.Kh., Gordon K.B. Photon- and proton-mediated biological effects: what has been learned? *Life*. 2022;3(1):30–46. DOI: 10.3390/life13010030.
- Nuyts S., Bollen H., Ng S.P., Corry J., Eisbruch A., Mendenhall W.M. et al. Proton therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: early clinical experience and current challenges. *Cancers*. 2022;14(11):1–18. DOI: 10.3390/cancers14112587.
- Holliday E.B., Garden A.S., Rosenthal D.I., Fuller C.D., Morrison W.H., Gunn G.B. et al. Proton therapy reduces treatment-related toxicities for patients with nasopharyngeal cancer: a case-match control study of intensity-modulated proton therapy and intensity-modulated photon therapy. *International Journal of Particle Therapy*. 2015;2(1):19–28. DOI: 10.14338/IJPT-15-00011.1.
- Tian X., Liu K., Hou Y., Cheng J., Zhang J. The evolution of proton beam therapy: Current and future status. *Molecular and Clinical Oncology*. 2018;8(1):15–21. DOI: 10.3892/mco.2017.1499.
- Stupnikov A., Szykh A., Budkina A., Szykh A., Budkina A., Favorov A. et al. Hobotnica: exploring molecular signature quality [version 2; peer review: 2 approved]. *F1000Research*. 2022;10:1260. DOI: 10.12688/f1000research.74846.2.
- Rodon J., Soria J.C., Berger R., Miller W.H., Rubin E., Kugel A. et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nature Medicine*. 2019;25(5):751–758. DOI: 10.1038/s41591-019-0424-4.
- Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A. et al. S. Next-generation person-

- alised medicine for high-risk paediatric cancer patients—The INFORM pilot study. *European Journal of Cancer*. 2016;65(1):91–101. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.06.009.
16. Choi S., Myers J.N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of Dental Research*. 2008;87(1):14–32. DOI: 10.1177/154405910808700104.
17. Koppikar P., Lui V.W.Y., Man D., Xi S., Chai R.L., Nelson E. et al. Constitutive activation of STAT5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to EGFR targeting. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(23):7682–7690. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1328.
18. Zhou J., Yi Q., Tang, L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):1–11. DOI: 10.1186/s13046-019-1265-1.
19. Zhang Z., Li J., Jiao S., Han G., Zhu J., Liu T. Functional and clinical characteristics of focal adhesion kinases in cancer progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10(1):1040311–1040335. DOI: 10.3389/fcell.2022.1040311.
20. Skinner H.D., Giri U., Yang L., Woo S.H., Story M.D., Pickering C.R. et al. Proteomic profiling identifies PTK2/FAK as a driver of radioresistance in HPV-negative head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(18):4643–4650. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2785.
21. Chen L., Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3384–3391. DOI: 10.1172/JCI80011.
22. Cui P., Jing P., Liu X., Xu W. Prognostic significance of PD-L1 expression and its tumor-intrinsic functions in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Management and Research*. 2020;1:5893–5902. DOI: 10.2147/CMAR.S257299.
23. Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2020;10(3):727–742.
24. Howell W.M., Rose-Zerilli M.J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(1):194S–199S. DOI: 10.1093/jn/137.1.194S.
25. Jiang Y. IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia*. 2015;29(8):1684–1694. DOI: 10.1038/leu.2015.57.
26. Han Y., Ding Z., Chen B., Liu Y., Liu Y. A novel inflammatory response-related gene signature improves high-risk survival prediction in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*. 2022;13(1):1–15. DOI: 10.3389/fgene.2022.767166.
27. Heldin C.H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Communication and Signaling*. 2013;11:1–18. DOI: 10.1186/1478-811X-11-97.
28. Pietras K., Sjöblom T., Rubin K., Heldin C.H., Östman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*. 2003;3(5):439–443. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00089-8.
29. Lindahl P., Johansson B.R., Leveen P., Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242–245. DOI: 10.1126/science.277.5323.242.
30. Heldin C.H., Rubin K., Pietras K., Östman A. High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(10):806–813. DOI: 10.1038/nrc1456.
31. Braicu C., Buse M., Busuioc C., Drula R., Gulei D., Raduly L. et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers*. 2019;11(10):1–25. DOI: 10.3390/cancers11101618.
32. Theocharis S., Kotta-Loizou I., Klijanienko J., Giaginis C., Alexandrou P., Rodriguez J. et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) expression and activation in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *Tumor Biology*. 2014;35:6455–6465. DOI: 10.1007/s13277-014-1853-9.
33. Kaneko T., Zeng P.Y., Liu X., Abdo R., Barrett J.W., Zhang Q. et al. Proteome and phosphoproteome signatures of recurrence for HPV+ head and neck squamous cell carcinoma. *Communications Medicine*. 2022;2(1):95–110. DOI: 10.1038/s43856-022-00159-8.
34. Cooper T., Biron V.L., Adam B., Klimowicz A.C., Puttagunta L., Seikaly H. Association of keratinization with 5-year disease-specific survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;141(3):250–256. DOI: 10.1001/jamaoto.2014.3335.

Вклад авторов

Джуманиязова Э.Д. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи. Вишнякова П.А. – разработка концепции и дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи. Чиркова М.В., Карпулевич Е.А. – биоинформатический анализ полученных результатов. Еремина И.З., Каприн А.Д. – окончательное утверждение для публикации рукописи. Гордон К.Б. – поставка биологического материала, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи. Фатхудинов Т.Х. – разработка концепции и дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Джуманиязова Энар Денисовна – ассистент, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Медицинский институт, стажер-исследователь, лаборатория молекулярной патофизиологии клетки, НИИ МКМ РУДН, г. Москва, enar2017@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8226-0433>

Вишнякова Полина Александровна – канд. биол. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Медицинский институт, РУДН; зав. лабораторией регенеративной медицины, НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова; зав. лабораторией молекулярной патофизиологии клетки, НИИ МКМ РУДН, г. Москва, Россия, p_vishnyakova@oparina4.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8650-8240>

Чиркова Мирослава Васильевна – лаборант, ИСП РАН, г. Москва, mirachirkova@ispras.ru, <http://orcid.org/0009-0008-3659-0360>

Карпулевич Евгений Андреевич – науч. сотрудник, ИСП РАН, г. Москва, karpulevich@ispras.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6771-2163>

Еремина Ирина Здиславовна – канд. биол. наук, доцент, зав. учебной частью, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Медицинский институт, РУДН, г. Москва, eremina_iz@rudn.university, <http://orcid.org/0000-0002-5093-6232>

Гордон Константин Борисович – канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Медицинский институт, РУДН, врач-радиотерапевт, науч. сотрудник, отделение протонной и фотонной терапии, МРНЦ им. А. Цыба, г. Москва, Россия, drgordonkb@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2759-297X>

Каприн Андрей Дмитриевич – д-р мед. наук, академик РАН, зав. кафедрой онкологии и рентгенорадиологии им. акад. РАН В.П. Харченко, Медицинский институт, РУДН; генеральный директор «НМИЦ радиологии», г. Москва, karpin-ad@rudn.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, зам. директора по научной работе, Медицинский институт РУДН; зам. директора НИИМЧ им. академика А.П. Авцына; директор НИИ МКМ РУДН, г. Москва, tfat@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6498-5764>

(✉) **Джуманиязова Энар Денисовна**, enar2017@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.09.2023;
одобрена после рецензирования 27.10.2023;
принята к публикации 16.11.2023