

Е.В. Голуб, В.В. Полькин, Г.Ф. Михайлова,  
Т.Г. Шкаврова, В.В. Цепенко, Ф.Е. Севрюков, В.С. Медведев

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПО ЧАСТОТЕ КЛЕТОК С ПОЛИСОМИЕЙ ХРОМОСОМ 7 И 11 ПРИ ФРАКЦИОНИРОВАННОЙ ГАММА-ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба Минздрава России, Обнинск

Контактное лицо: Елена Викторовна Голуб, e-mail: mgp@mrrc.obninsk.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Исследовать динамику частоты клеток опухоли с полисомией хромосом 7 и 11 в процессе фракционированной гамма-лучевой терапии больных раком слизистой оболочки полости рта (СОПР).

**Материал и методы:** Исследование проведено методом флуоресцентной *in situ* гибридизации на мазках, взятых у 19 пациентов со злокачественной опухоли СОПР до лечения и в процессе гамма-лучевой терапии: после первой суммарной очаговой дозы (СОД) до 18,0 Гр и после второй СОД – до 32,0 Гр. В качестве контроля брали мазки СОПР у 12 клинически здоровых людей.

**Результаты:** В контрольной группе среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосом 7 и 11 составляла  $0,7 \pm 0,2$  % и  $0,3 \pm 0,1$  % соответственно. В группе пациентов с раком СОПР до начала лечения среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосомы 7 составила  $32,3 \pm 4,5$  %, а после 1 СОД и 2 СОД –  $15,7 \pm 2,9$  % и  $8,0 \pm 2,3$  % соответственно. Анализ динамики среднегрупповых показателей выявил статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение частоты клеток с полисомией хромосомы 7 в процессе лучевой терапии. Среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосомы 11 также статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижалась в процессе терапии: до лечения –  $25,8 \pm 5,6$  %, после 1 СОД и 2 СОД –  $12,2 \pm 2,4$  % и  $5,4 \pm 0,9$  % соответственно. Сравнение полученных значений с соответствующими среднегрупповыми показателями контрольной группы выявило статистически значимое ( $p < 0,01$ ) превышение по всем показателям. После проведенной фракционированной гамма-лучевой терапии частота клеток с полисомией исследованных хромосом 7 и/или 11 у 16 (84 %) пациентов была статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ) уровней до лечения, из них у 6 (32 %) пациентов данные показатели снизились до уровней контроля. У 4 пациентов (21 %) наблюдалось сначала повышение, а затем снижение частоты таких клеток. У 5 (26 %) пациентов на протяжении всего курса гамма-лучевой терапии наблюдалось увеличение частоты клеток с полисомией хромосом 7 и/или 11, либо частота этих клеток сохранялась на уровне, выявленном до лечения.

**Заключение:** Исследование молекулярно-цитогенетических нарушений в клетках опухоли СОПР пациентов до лечения и после фракционированной гамма-лучевой терапии показало, что полисомия хромосом, являющаяся показателем нестабильности генома, может быть индикатором отклика опухоли на проводимую терапию.

**Ключевые слова:** рак полости рта, полисомия хромосом, FISH анализ, радиочувствительность, фракционированная гамма-лучевая терапия

**Для цитирования:** Голуб Е.В., Полькин В.В., Михайлова Г.Ф., Шкаврова Т.Г., Цепенко В.В., Севрюков Ф.Е., Медведев В.С. Определение радиочувствительности пациентов с раком слизистой оболочки полости рта по частоте клеток с полисомией хромосом 7 и 11 при фракционированной гамма-лучевой терапии // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Т. 67. № 3. С. 47–52. DOI:10.33266/1024-6177-2022-67-3-47-52

Е.В. Golub, V.V. Polkin, G.F. Mikhailova,  
T.G. Shkavrova, V.V. Tsepenko, F.E. Sevrukov, V.S. Medvedev

## Detection of Radiosensitivity of Patients with Oral Cancer Using the Frequency of Cells with Polysomy 7 and 11 Chromosomes in Process of Fractionated Gamma-Radiotherapy

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

Contact person: E.V. Golub, e-mail: mgp@mrrc.obninsk.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** To study the dynamics of frequency of tumor cells with polysomy 7 and 11 chromosomes in patients with oral cancer during fractionated gamma-radiotherapy.

**Material and methods:** The study was carried out using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on smears of 19 patients with oral cancer before treatment, after first total focal dose of gamma-radiotherapy (up to 18 Gy) and after second total focal dose (up to 32 Gy). As for control oral smears of 12 healthy donors were taken. Molecular cytogenetic abnormalities were examined in taken samples.

**Results:** The average group frequency of cell with polysomy 7 and 11 chromosomes in controls was  $0.7 \pm 0.2$  % and  $0.3 \pm 0.1$  % respectively. The average frequency of cells with chromosome 7 polysomy in group oral cancer patients before treatment was  $32.3 \pm 4.5$  %, after first focal dose was  $15.7 \pm 2.9$  % and after second focal dose was  $8.0 \pm 2.3$  %. Dynamics analysis of these values revealed the significant decreasing ( $p < 0.05$ ) in cells with chromosome 7 polysomy during radiotherapy. The average group frequency of cells with polysomy 11 in cancer patients before treatment was  $25.8 \pm 5.6$  %,  $12.2 \pm 2.4$  % and  $5.4 \pm 0.9$  % after first and second focal dose respectively. These values was significantly ( $p < 0.01$ ) higher compare with the one in the control group. After radiotherapy the 16 (84 %) patients with polysomy chromosomes 7 and/or 11 had significant decreasing ( $p < 0.05$ ) in aberrant levels. Some of them (6 persons – 32 %) had decreasing frequency up to the control levels. 4 persons (21 %) observed firstly the increasing of cells with polysomy but after there was the reduction.

5 patients (26 %) over full course of gamma-radiotherapy demonstrated the gain in frequency of cells with polysomy or the same value as it was before treatment.

**Conclusion:** Thus, the study of molecular cytogenetic abnormalities in cells of oral cancer patients before and after radiotherapy was shown the polysomy of chromosomes being the marker of genome instability could indicate the tumor response ongoing therapy.

**Keywords:** oral cancer, polysomy chromosomes, FISH, radiosensitivity, fractionated radiotherapy

**For citation:** Golub EV, Polkin VV, Mikhailova GF, Shkavrova TG, Tsepenko VV, Sevrukov FE, Medvedev VS. Detection of Radiosensitivity of Patients with Oral Cancer Using the Frequency of Cells with Polysomy 7 and 11 Chromosomes in Process of Fractionated Gamma-Radiotherapy. Medical Radiology and Radiation Safety. 2022;67(3):47–52. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2022-67-3-47-52

## Введение

Заболееваемость раком слизистой оболочки полости рта в России остается достаточно высокой и, согласно результатам анализа онкозаболеваемости в 2019 г. составляла 9510 случаев [1]. Во многих научных исследованиях показано, что прогрессирующая трансформация нормального плоскоклеточного эпителия в злокачественное новообразование обусловлена как хромосомными aberrациями (структурные перестройки, численные нарушения – полисомия, анеуплоидия), так и специфическими генными aberrациями (амплификации, делеции, точечные мутации) сочетающиеся или не сочетающиеся с эпигенетическими изменениями (метилирование промотора и дерегуляция мРНК). Одним из способов лечения пациентов с раком слизистой оболочки полости рта (СОПР) является фракционированная лучевая терапия. Но в настоящее время терапевтический эффект от различных схем фракционирования лучевой терапии близок к пределу, что требует новых подходов в лечении, возможно с учетом индивидуальной радиочувствительности опухоли.

Перспективным подходом к ее оценке в процессе лучевой терапии может быть анализ генной экспрессии, молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических нарушений в клетках опухоли. Было показано, что обнаруживаемая с помощью метода флуоресценции *in situ* гибридизации (FISH) полисомия хромосом 3, 4, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 20 (обычно 3–6 копий хромосом на ядро) и моносомия (потеря одной хромосомы), характерна для рака слизистой оболочки полости рта и часто приводит к агрессивному фенотипу опухоли [2], а также к уменьшению периода ремиссии и общей выживаемости после хирургического лечения и радиотерапии пациентов [3, 4]. Работы по исследованию влияния лучевой терапии на клетки опухоли с полисомией хромосом у пациентов с онкологическими заболеваниями не проводились.

Целью настоящей работы было исследовать динамику частоты клеток опухоли с полисомией хромосом 7 и 11 в процессе фракционированной гамма-лучевой терапии пациентов с раком слизистой оболочки полости рта.

## Материал и методы

Исследование проведено на мазках, взятых у 19 пациентов со злокачественной опухолью слизистой оболочки полости рта (СОПР) степени распространенности T<sub>2</sub>–T<sub>4</sub>. Больные проходили обследование и лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба в 2015–2018 гг. Исследования проводились в рамках, принятых в центре клинических протоколов, получивших соответствующие одобрения в этическом комитете МРНЦ им. А.Ф. Цыба. В обследованную группу включены пациенты с опухолью следующих локализаций: рак боковой поверхности или корня языка (11 чел.), рак слизистой щеки (2 чел.), рак слизистой альвеолярного отростка челюсти (3 чел.), рак дна полости рта (3 чел.). Облучение проводилось на установке «Терабалт» с источником гамма-излучения <sup>60</sup>Co. Доза на фракцию составляла 2,0 Гр. Взятие образцов опухолевой

ткани для цитогенетического анализа осуществлялось неинвазивным методом цитологических мазков щеточкой в три приема – до лечения, после первой суммарной очаговой дозы (СОД) гамма-лучевой терапии до 18,0 Гр и после второй СОД – до 32,0 Гр. Интервал времени взятия образца после облучения составлял в среднем 3 ч.

Щеточку с мазком СОПР с места локализации опухоли помещали в раствор PBS. Далее суспензию клеток проводили через фиксатор (метанол+ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Осадок наносили на предметное стекло. Пред- и постгибризационные отмывки, а также нанесение ДНК-зондов выполняли в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Денатурация ДНК осуществлялась в автоматической камере Hybrite при 74 °С в течение 7 мин. Гибридизация проходила при 37 °С в термостате в течение 18 ч. После постгибризационных отмывок для визуализации препаратов наносили DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол). Для контроля брали мазки слизистой оболочки полости рта у 12 клинически здоровых людей. Исследование выполнено методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием коммерческих ДНК-зондов (Kreatech, Нидерланды) на центромеры (СЕР) хромосом 7 и 11. Анализ молекулярно-цитогенетических нарушений проводился на флуоресцентном микроскопе Axiomager (Zeiss). В каждом случае анализировали по 100–300 ядер клеток опухоли. Ядра клеток оценивали по категориям: нормальные (2 центромеры) и с полисомией хромосом (рис. 1).

Обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием компьютерной программы Microsoft Excel (2007). Для представления полученных данных использованы следующие показатели описательной статистики, характеризующие вариационный ряд: среднее выборки, стандартная ошибка среднего, нижний квартиль, верхний квартиль. Оценку достоверности различий проводили с использованием параметрических и непараметрических

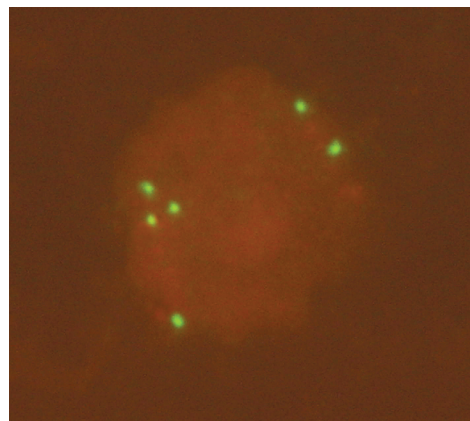


Рис. 1. Клетка опухоли слизистой оболочки полости рта с полисомией хромосомы 7 (зеленый сигнал – 6 копий СЕР 7)

Fig. 1. Cell of oral cancer with chromosome 7 polysomy (green signal – 6 copy of CEP 7)

критериев (t-критерий ( $t \geq 1,96$ ), U-критерий Манна-Уитни).

**Результаты и обсуждение**

Нормальная клетка в своем ядре содержит диплоидный набор хромосом. Одним из цитогенетических нарушений является полисомия хромосом, т.е. увеличение их числа в клетке. В исследованных 12 образцах контрольной группы выявлены клетки с полисомией хромосом 7 и 11, при этом в aberrантных клетках число хромосом 7 или 11 не превышало 4. В целом по группе частота клеток с полисомией варьировала в небольших диапазонах: 0–2,0 % для хромосомы 7 и 0–1,0 % для хромосомы 11. Среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосомы 7 составила  $0,7 \pm 0,2$  %, а с полисомией хромосомы 11 –  $0,3 \pm 0,1$  %.

Результаты исследования 19 образцов рака СОПР, взятых у пациентов с различной стадией заболевания до лечения, показали, что опухолевые клетки могут содержать от 3 до 10 хромосом 7 и/или 11. У обследованных пациентов выявлен широкий диапазон колебания частоты клеток с полисомией исследованных хромосом: 2,5–70,5 % с хромосомой 7 и 1,0–70,0 % с хромосомой 11 (рис. 2). Показатели вариации частоты клеток с полисомией хромосомы 7 были следующие: нижний квартиль – от 2,5 до 12,3 %, а верхний квартиль – от 44,2 до 70,5 %. Для частоты клеток с полисомией хромосомы 11 эти показатели были следующие: нижний квартиль от 0,5 до 4,4 %, а верхний квартиль – от 46,7 до 70,0 %.

После проведения 1 СОД гамма-лучевой терапии у большинства пациентов наблюдалось снижение частоты клеток с полисомией обеих исследованных хромосом (рис. 2). Частота клеток с полисомией хромосомы 7 изменялась в интервале от 2,0 до 46,0 %. Показатели вариации были следующие: нижний квартиль от 2,0 до 5,3 %, верхний квартиль от 21,0 до 46,0 %. Диапазон варибельности частоты клеток с полисомией хромосомы 11 составлял 2,5–39,5 %. Показатели вариации были следующие: нижний квартиль от 2,5 до 5,4 %, а верхний квартиль от 17,3 до 39,5 %.

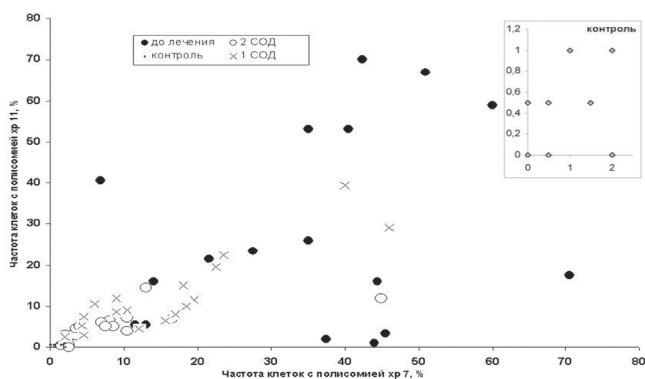


Рис. 2. Динамика индивидуальной частоты клеток с полисомией хромосом 7 и 11 в клетках рака СОПР до лечения, после 1 СОД и после 2 СОД. Вставка в правом верхнем углу рисунка показывает индивидуальную частоту клеток с полисомией хромосом 7 и 11 в контрольной группе

Fig. 2. Dynamics of individual frequency of cells with chromosome 7 and 11 polysomy in oral cancer cells before treatment, after 1st and 2nd total focal doses. Insertion on the figure (upper right corner) shows individual frequency of cells with chromosome 7 and 11 polysomy in control group

После 2 СОД гамма-лучевой терапии диапазон варибельности частоты клеток с полисомией хромосомы 7 наблюдался в интервале 1,5–45,0 %. Показатели вариации были следующие: нижний квартиль от 1,5 до 2,3 %,

верхний квартиль от 8,3 до 45,0 %. Диапазон варибельности частоты клеток с полисомией хромосомы 11 составлял 0–14,5 %. Показатели вариации были следующие: нижний квартиль от 0 до 3,0 %, верхний квартиль от 6,8 до 14,5 %.

Статистический анализ показал, что до начала лечения среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосомы 7 составила  $32,3 \pm 4,5$  %, а после 1 СОД и 2 СОД –  $15,7 \pm 2,9$  % и  $8,0 \pm 2,3$  % соответственно. Анализ динамики среднегрупповых показателей выявил статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение частоты клеток с полисомией хромосомы 7 в процессе лучевой терапии. Среднегрупповая частота клеток с полисомией хромосомы 11 также статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижалась в процессе терапии: до лечения –  $25,8 \pm 5,6$  %, после 1 СОД и 2 СОД –  $12,2 \pm 2,4$  % и  $5,4 \pm 0,9$  % соответственно. Сравнение полученных значений с соответствующими среднегрупповыми показателями контрольной группы выявило статистически значимое ( $p < 0,01$ ) превышение по всем показателям.

Анализ индивидуальных показателей (рис. 3) показал, что до начала лечения у 18 (95 %) пациентов частота клеток с полисомией хромосомы 7 была статистически значимо выше контроля ( $p < 0,05$ ), и только у пациента № 15 не отличалась от контроля. После проведения 1 СОД гамма-лучевой терапии в группе обследованных лиц обнаружена индивидуальная варибельность частоты клеток с повышенным числом СЕР 7.

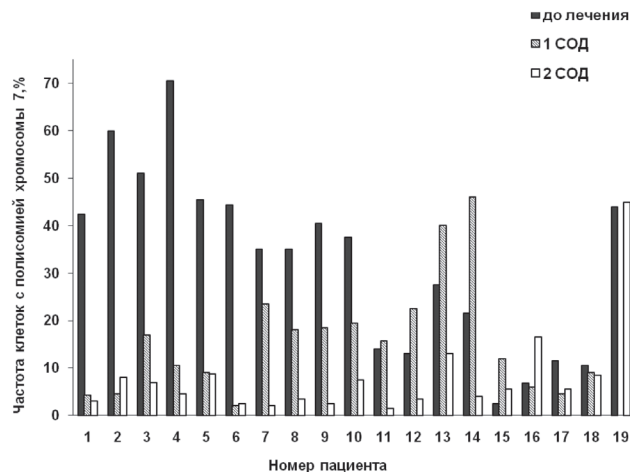


Рис. 3. Индивидуальная динамика частоты клеток с полисомией хромосомы 7 у больных до лечения, после 1-ой и 2-ой СОД гамма-лучевой терапии

Fig. 3. Individual dynamics of the frequency of cells with chromosome 7 polysomy in patients before treatment, after 1st and 2nd total focal doses of gamma-radiotherapy

По сравнению с показателями до лечения, после 1 СОД у 11 (58 %) пациентов (№№ 1–10, 17) частота этих клеток статистически значимо снизилась ( $p < 0,05$ ). При этом у 2 пациентов (№№ 1, 6) этот показатель снизился до контрольного уровня. У 4 пациентов (№№ 12–15), наоборот, наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,01$ ) повышение частоты клеток с этим нарушением. В образцах пациентов №№ 11, 16 и 18 частота клеток с повышенным числом СЕР 7 не изменилась в ответ на проводимую гамма-лучевую терапию. Данные пациента №19 отсутствуют из-за недостаточного числа клеток в образце. После проведения 2 СОД гамма-лучевой терапии динамика частоты клеток с повышенным числом СЕР 7 оставалась разнонаправленной. У 6 пациентов (№№ 1, 2, 5, 6, 17, 18) частота этих клеток статистически значи-

мо не отличалась от уровня, выявленного после 1 СОД. У 11 пациентов (№№ 3, 4, 7–15) статистически значимо снизилась ( $p < 0,05$ ) по сравнению с уровнем после 1 СОД, а у пациента № 16 – повысилась ( $p < 0,01$ ). Дальнейший анализ показал, что в целом после проведенного курса лечения у 16 (84 %) пациентов (№№ 1–14, 16, 17) частота клеток с полисомией хромосомы 7 наблюдалась статистически значимо ниже уровня, выявленного до лечения ( $p < 0,05$ ), а у 3 (№№ 15, 18, 19) не отличалась от него. Однако только у 5 пациентов (№№ 1, 6, 7, 9, 11) изучаемый показатель снизился до контрольного уровня, в то время как у 14 пациентов он остался статистически значимо выше контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

Анализ индивидуальных показателей частоты клеток с полисомией хромосомы 11 (рис. 4) показал, что до начала лечения у 16 (84 %) пациентов она была статистически значимо выше контроля ( $p < 0,05$ ) и у 3 пациентов (№№ 10, 15, 19) не отличалась от контроля. После проведения 1 СОД гамма-лучевой терапии в группе обследованных лиц так же как и для хромосомы 7 обнаружена индивидуальная вариабельность частоты клеток с полисомией хромосомы 11. По сравнению с показателями до лечения, после 1 СОД у 10 (56 %) пациентов (№№ 1–9, 11) частота этих клеток статистически значимо снизилась ( $p < 0,05$ ). При этом у пациента № 2 этот показатель снизился до контрольного уровня. У 5 пациентов (№№ 10, 12, 13, 15, 16), наоборот, наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение частоты клеток с этим нарушением. В образцах пациентов №№ 14, 17 и 18 частота клеток с повышенным числом СЕР 11 не изменилась в ответ на проводимую гамма-лучевую терапию. Данные пациента №19 отсутствуют из-за недостаточного числа клеток в образце. После проведения 2 СОД гамма-лучевой терапии динамика частоты клеток с повышенным числом СЕР 11 тоже оставалась разнонаправленной. У 8 пациентов (№№ 1–3, 5, 6, 15–17) частота этих клеток статистически значимо не отличалась от уровня, выявленного после 1 СОД. У 10 пациентов (№№ 4, 7–14, 18) статистически значимо снизилась ( $p < 0,05$ ) по сравнению с уровнем после 1 СОД.

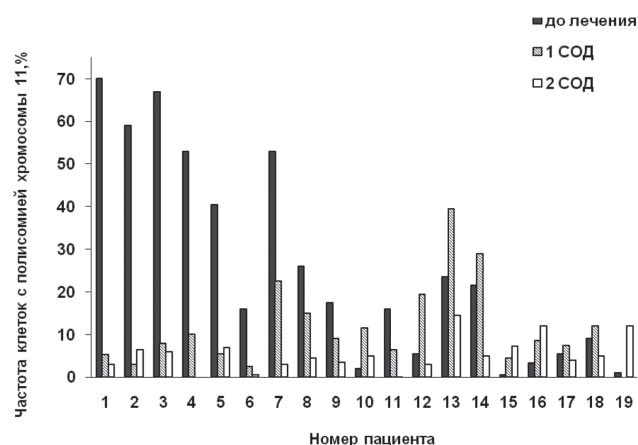


Рис. 4. Индивидуальная динамика частоты клеток с полисомией хромосомы 11 у больных до лечения, после 1-ой и 2-ой СОД гамма-лучевой терапии

Fig. 4. Individual dynamics of the frequency of cells with chromosome 11 polysomy in patients before treatment, after 1st and 2nd total focal dose of gamma-radiotherapy

В целом после проведенного курса лечения у 12 (63 %) пациентов (№№ 1–9, 11, 13, 14) частота клеток с полисомией хромосомы 11 была статистически значимо ниже уровня, выявленного до лечения ( $p < 0,05$ ), у 4

(№№ 10, 12, 17, 18) не отличалась от него, а у 3 (№№ 15, 16, 19) – статистически значимо увеличилась ( $p < 0,05$ ). Однако только у 3 пациентов (№№ 4, 6, 11) изучаемый показатель снизился до контрольного уровня, в то время как у 16 пациентов он остался статистически значимо выше контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, анализ полученных в работе данных показал, что после проведенной фракционированной гамма-лучевой терапии частота клеток с полисомией исследованных хромосом 7 и/или 11 у 16 (84 %) пациентов была статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ) уровней до лечения, из них у 6 (32 %) пациентов данные показатели снизились до уровней контроля. У 4 пациентов (21 %) наблюдалась одинаковая реакция клеток с этим нарушением генома в ответ на воздействие гамма-излучения – сначала повышение, а затем снижение их частоты. У 5 (26 %) пациентов на протяжении всего курса гамма-лучевой терапии наблюдалось увеличение частоты клеток с полисомией хромосом 7 и/или 11, либо частота этих клеток статистически значимо не отличалась от уровня, выявленного до лечения.

Развитие карциномы слизистой оболочки полости рта является многошаговым генетическим процессом, включающим различную степень нестабильности генома и deregulation внутриклеточных сигнальных путей [5]. В исследованных нами образцах опухоли СОПР наблюдались клетки с нестабильным геномом, показателем которого является полисомия хромосом 7 и 11. Наше исследование показало, что в результате фракционированной гамма-лучевой терапии в дозе до 32,0 Гр среднегрупповая частота клеток с этим нарушением генома последовательно снижалась, но оставалась статистически значимо выше контрольного уровня ( $p < 0,05$ ). Однако поскольку ответ опухоли на проводимую лучевую терапию отличается у разных пациентов, то по среднегрупповым показателям невозможно судить об эффективности проводимого курса лечения.

Выполненный анализ полученных индивидуальных данных показал, что в процессе фракционированной гамма-лучевой терапии можно было выделить 3 подгруппы пациентов с различной динамикой частоты этих клеток, что может свидетельствовать об индивидуальной радиочувствительности клеток опухоли: 1 – пациенты, у которых наблюдалось последовательное снижение частоты клеток с полисомией исследованных хромосом; 2 – пациенты, у которых выявлено повышение, а затем снижение частоты клеток с этим нарушением генома и 3 – пациенты, у которых частота клеток с полисомией обеих хромосом незначительно изменялась на протяжении всего курса терапии, в итоге оставаясь на уровне, выявленном до лечения, или повышалась.

Известно, что пролиферирующие клетки наиболее чувствительны к воздействию ионизирующего излучения (ИИ). Опухолевые клетки характеризуются активным делением и в стадии митоза ИИ вызывает двунитевые разрывы ДНК, что приводит к нарушению репарации и апоптозу основной массы клеток [6]. Уязвимость опухолевых клеток к излучению повышается также в присутствии кислорода, а по мере их апоптоза выжившие клетки проходят реоксигенацию за счет контакта с капиллярами, становясь также более чувствительными к облучению [7]. Вероятно, этот ответ на гамма-лучевую терапию характерен для пациентов 1-ой подгруппы, у которых мы наблюдали снижение частоты клеток с полисомией хромосом уже после первой суммарной очаговой дозы и последующее снижение после второй СОД.

Что касается 2-ой и 3-ей подгрупп, то в основе такой реакции клеток опухоли на фракционированное облуче-

ние могут лежать различные механизмы. Считается, что фракционированная гамма-лучевая терапия включает защитные реакции клеток, которые позволяют им выживать на ранних этапах курса лучевой терапии. Большинство опухолей имеет особый клон раковых стволовых клеток, которые ответственны за рост, метастазирование, инвазию и рецидивы. Они обычно характеризуются самообновлением, обеспечивающим непрерывную пролиферацию опухоли, а также потенциалом дифференцировки, который приводит к образованию основной массы опухоли.

В работе [8], проведенный авторами анализ результатов исследований стволовых клеток опухолей различных локализаций (рак легкого, простаты, гортани, печени, глиомы) показал, что эти клетки обладают высокой радиорезистентностью благодаря повышению активности процессов репарации и активации различных сигнальных путей. Было также показано, что воздействие ионизирующего излучения повышает экспрессию белков, связанных с клеточным циклом, что может стимулировать пролиферацию стволовых клеток опухоли. В клетках HeLa Her2 при наибольшей поглощенной дозе 10,0 Гр наблюдалась задержка деления в точке G<sub>2</sub>-M, которая была неустойчива и клетки повторно входили в клеточный цикл с оставшимися нерепарированными повреждениями [9]. Этот преждевременный вход был причиной увеличения анафазных мостов и мультиполярных митотических веретен, что приводило к дозо-зависимому увеличению числа полиплоидных клеток. Такие нарушения приводили клетки к так называемой митотической катастрофе, и фракция погибающих клеток показывала признаки апоптоза только через 5–7 дней после облучения. Другие авторы [10] отмечают активацию дедифференциации нестволовых опухолевых клеток в пул стволовых клеток в ответ на радиотерапию. Этот результат также показан в работе [11] при фракционированном облучении *in vitro* клеток линий A431 и 183A ежедневно получавших по 0,5–0,75 Гр.

В последнее время многие процессы, происходящие в опухолевых клетках, рассматриваются с точки зрения молекулярно-генетических аспектов. Авторами [4, 12] показано, что одним из наиболее важных биомаркеров при плоскоклеточной карциноме является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который находится на хромосоме 7. Связывание факторов роста со специфическими мембранными рецепторами, обладающими тирозинкиназной активностью, вызывает активацию Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt/mTOR сигнальных путей, что приводит к активному клеточному росту, увеличению ангиогенеза, пролиферации опухолевых клеток, инвазии и метастазированию [8]. Кроме того, исследование показали, что ИИ может активировать рецептор

EGFR, и эта активация вызывает ряд защитных реакций опухолевых клеток, включая усиление репарации ДНК и снижение апоптоза, что увеличивает клеточную устойчивость к ИИ, а также повышает репопуляцию опухолевых клеток, что позволяет опухоли уклониться от цитотоксического эффекта ИИ [4, 13]. Полиплоидные клетки могут образовываться с помощью трех различных механизмов: abortивного клеточного цикла, слияния клеток и эндоредупликации [14]. Эндоредупликация, которая происходит когда модифицируются определенные механизмы, управляющие последовательным прохождением G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и митотической фазы (M) клеточного цикла, также лежит в основе полисомии хромосом, наблюдаемой в опухолевых клетках. В нормальном клеточном цикле развитие S-фазы требует полной M-фазы, но в процессе эндоредупликации эта зависимость отклоняется, и хроматин повторно конденсируется, даже если митоз не завершается. Эти механизмы регулируются концентрацией циклинзависимых киназ, которые в том числе активируются геном *CCND1*, находящимся на хромосоме 11, и ингибиторы этих белков вызывают полиплоидию [12, 14]. Вероятно, все рассмотренные выше механизмы могут быть причиной повышения частоты клеток с полисомией хромосом 7 и 11 у пациентов 2-ой и 3-ей подгрупп в ответ на фракционированную лучевую терапию, в то время как до лечения этот показатель нестабильности генома у некоторых пациентов даже не превышал контрольного уровня.

### Заключение

Таким образом, исследование клеток опухоли слизистой оболочки полости рта до и после фракционированной гамма-лучевой терапии пациентов показало, что среднегрупповая частота клеток опухоли с полисомией исследованных хромосом последовательно уменьшается, но у большинства пациентов остается выше контрольного уровня. Наибольший интерес представляют пациенты, у которых после проведенного курса фракционированной гамма-лучевой терапии частота изучаемых клеток не изменилась или увеличилась.

Механизмы радиорезистентности злокачественных опухолей до сих пор полностью не раскрыты. Исследования, направленные на изучение этих механизмов очень важны, поскольку это позволит проводить персонализированную терапию. Полученные нами результаты свидетельствуют, что клетки опухоли больших поразному реагируют на проведении фракционированной лучевой терапии. Исследования клеток опухоли в процессе ЛТ методом флуоресцентной *in situ* гибридизации может быть полезным для выявления больных с радиорезистентными опухолями.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. The State of Cancer Care to the Population in Russia in 2019 (Morbidity and Mortality). Ed. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shakhzadova A.O. Moscow Publ., 2020 (In Russ.). [Состояние онкологической помощи населению в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М: МНИОИ им. П.А.Герцена, 2020].
2. Papanikolaou V.S., Kyrodimos E., Tsiambas E., Giotakis E., Psyri A., Ragos V., Chrysovergis A. Chromosomal Instability in Oral Squamous Cell Carcinoma. J. BUON. 2018;23;6:1580-1582.
3. Sato H., Uzawa N., Takahashi K.I., Myo K., Ohya Y., Amagasa T. Prognostic Utility of Chromosomal Instability Detected by Fluorescence in Situ Hybridization in Fine-Needle Aspirates from Oral Squamous Cell Carcinomas. BMC Cancer. 2010;10:182. DOI: 10.1186/1471-2407-10-182.
4. Alterio D., Marvaso G., Maffini F., Gandini S., Choocca S., Ferrari A. Role of EGFR as Prognostic Factor in Head and Neck Cancer Patients Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy: Proposal of a New Approach Behind the EGFR Overexpression. Med. Oncol. 2017;34;6:107. doi: 10.1007/s12032-017-0965-7.
5. Nikitakis N.G., Pentenero M., Georgaki M., et al. Molecular Markers Associated with Development and Progression of Potentially Premalignant Oral Epithelial Lesions: Current Knowledge and Future Implications. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol Oral Radiol. 2018;125;6:650-669. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.03.012.

6. Sia J., Szmyd R., Hau E., Gee H.E. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: a Primer. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020;8;41. DOI: 10.3389/fcell.2020.00041.
7. Dando I., Cordani M., Pozza D.E., Biondani G., Donadelli M., Palmieri M. Antioxidant Mechanisms and ROS-Related Micro-RNAs in Cancer Stem Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015;2015:425708. DOI: 10.1155/2015/425708.
8. Chang L., Graham P., Hao J., Ni J., Deng J., Bucci J., et al. Cancer Stem Cells and Signaling Pathways in Radioresistance. *Oncotarget.* 2016;7;10:11002-11017. DOI: 10.18632/oncotarget.6760.
9. Eriksson D., Löfroth P.O., Johansson L., Riklund K.A., Stigbrand T. Cell Cycle Disturbances and Mitotic Catastrophes in HeLa Hep2 Cells Following 2.5 to 10 Gy of Ionizing Radiation. *Clin. Cancer. Res.* 2007;13;18 Pt 2:5501s-5508s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0980.
10. Lee S.Y., Jeong E.K., Ju M.K., Jeon H.M., Kim M.Y., Kim C.H., et al. Induction of Metastasis, Cancer Stem Cell Phenotype and Oncogenic Metabolism in Cancer Cells by Ionizing Radiation. *Mol. Cancer.* 2017;16;1:10. DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4.
11. Kavanagh B.D., Lin P.S., Chen P., Schmidt-Ullrich R.K. Radiation-Induced Enhanced Proliferation of Human Squamous Cancer Cells in Vitro: a Release from Inhibition by Epidermal Growth Factor. *Clin. Cancer Res.* 1995;1;12:1557-1562.
12. Chien H.T., Cheng S.D., Liao C.T., Wang H.M., Huang S.F. Amplification of the EGFR and CCND1 Are Coordinated and Play Important Roles in the Progression of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel).* 2019;11;6:760. DOI: 10.3390/cancers11060760.
13. Fujimichi Y., Hamada N. Ionizing Irradiation Not Only Inactivates Clonogenic Potential in Primary Normal Human Diploid Lens Epithelial Cells But Also Stimulates Cell Proliferation in a Subset of this Population. *PLoS ONE.* 2014;9;5:e98154. DOI: 10.1371/journal.pone.0098154.
14. Oliveira-Junior R.J., Goulart L.R., Bastos L.M., Alves D.D., dos Santos e Silva S.V., Morelli S. Contributions of Cytogenetics to Cancer Research. *Biosci. J.* 2014;30;1:245-260.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.  
**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.  
**Поступила:** 17.01.2022. **Принята к публикации:** 15.03.2022.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.  
**Financing.** The study had no sponsorship.  
**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.  
**Article received:** 17.01.2022. **Accepted for publication:** 15.03.2022.