Вопросы онкологии, 2026. Том 72, № 5
УДК 617.51-006.6
DOI 10.37469/0507-3758-2026-72-5-2710

© К.Б. Гордон[1,2], А.Г. Соболева[2,3], П.А. Вишнякова[2,4], И.В. Арутюнян[2,3], Е.А. Ганцова[2,3], В.В. Киселева[2,4], А.В. Макаров[2,5], А.А. Мельникова[1], Э.Д. Джуманиязова[2], А.В. Ельчанинов[2,3,4], И.А. Гулидов[1], А.Д. Каприн[1,2], Т.Х. Фатхудинов[2,3]

Разработка мультиплексного ПЦР-теста для определения экспрессии генов кератинов-предикторов ответа на лучевую терапию при плоскоклеточном раке головы и шеи

[1]Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
[2]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Российская Федерация
[3]Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Российская Федерация
[4]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация
[5]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

© Konstantin B. Gordon[1,2], Anna G. Soboleva[2,3], Polina A. Vishnyakova[2,4], Irina V. Arutyunyan[2,3], Elena A. Gantsova[2,3], Victoriia V. Kiseleva[2,4], Andrey V. Makarov[2,5], Anzhelika A. Melnikova[1], Enar D. Jumaniyazova[2], Andrey V. Elchaninov[2,3,4], Igor A. Gulidov[1], Andrey D. Kaprin[1,2], Timur Kh. Fatkhudinov[2,3]

Development of a Multiplex PCR Assay for Measuring Keratin Gene Expression to Predict Response to Radiation Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

[1]A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (A. Tsyb MRRC) — the branch of the FSBI National Medical Research Radiological Centre (NMRRC) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, the Russian Federation
[2]Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, the Russian Federation
[3]Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, the Russian Federation
[4]National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, the Russian Federation
[5]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, the Russian Federation

Введение. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) характеризуется высокой частотой рецидивов. Определение чувствительности ПРГШ к лучевой терапии является важной клинической задачей, позволяющей снизить риски недостаточной эффективности лечения. Предикторами ответа опухоли на облучение могут стать гены кератинов 1, 6B и 16.

Цель. Разработка тест-системы для определения экспрессии генов кератинов 1, 6B и 16 с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (мПЦР-РВ) для определения радиочувствительности опухолей головы, шеи.

Материалы и методы. Подбор последовательностей праймеров для ПЦР-РВ выполняли с помощью онлайн-инструмента Primer-BLAST. Дизайн зондов проводили с помощью онлайн-инструмента PrimerQuest™. Вероятность синтеза неспецифичных ампликонов исключали с помо-

Introduction. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is characterized by a high recurrence rate. Determining the sensitivity of HNSCC to radiation therapy is an important clinical objective that may help reduce the risk of inadequate treatment efficacy. Keratin 1, 6B, and 16 genes may serve as predictors of tumor response to irradiation.

Aim. To develop a test system for assessing the expression of keratin 1, 6B, and 16 genes using multiplex real-time polymerase chain reaction (mRT-PCR) for radiosensitivity assessment of head and neck tumors.

Materials and Methods. Primer sequences for real-time PCR were selected using the Primer-BLAST online tool. Probe design was performed using the PrimerQuest™ online tool. The possibility of non-specific amplicon synthesis was excluded using UGENE in silico PCR simulation software. Unified

щью программного обеспечения для ПЦР-симуляции in silico UGENE. Для моно- и мультиплексной ПЦР-РВ были подобраны унифицированные условия.

Результаты. За время исследования было протестировано четыре пары праймеров для гена *KRT1*, девять пар праймеров для гена *KRT6B* и шесть пар праймеров для гена *KRT16*. Были отобраны праймеры, не дающие продукта с контрольной геномной ДНК, с оптимальными значениями пороговых циклов. Для всех подобранных последовательностей была показана высокая эффективность (не менее 88 %) реакции независимо от содержания в реакционной смеси одной пары праймеров или всех подобранных последовательностей одновременно. Неспецифические ампликоны отсутствовали, что говорит об адекватности и релевантности разработанной системы.

Заключение. Разработана мультиплексная ПЦР-РВ тест-система для одновременного определения уровня экспрессии генов кератинов 1, 6B и 16, имеющих потенциальное прогностическое значение для оценки эффективности лучевой терапии пациентов с ПРГШ. Система успешно работает как с модельными объектами (клеточными линиями, 3D тканевыми моделями), так и с клиническим биоматериалом малого объема.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи; лучевая терапия; кератины; полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ); мультиплексная система

Для цитирования: Гордон К.Б., Соболева А.Г., Вишнякова П.А., Арутюнян И.В., Ганцова Е.А., Киселева В.В., Макаров А.В., Мельникова А.А., Джуманиязова Э.Д., Ельчанинов А.В., Гулидов И.А., Каприн А.Д., Фатхудинов Т.Х. Разработка мультиплексного ПЦР-теста для определения экспрессии генов кератинов-предикторов ответа на лучевую терапию при плоскоклеточном раке головы и шеи. *Вопросы онкологии*. 2026; 72(5): 1173-1181.-DOI: https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-5-2710

conditions were established for both mono- and multiplex real-time PCR.

Results. During the study, four primer pairs for the *KRT1* gene, nine primer pairs for the *KRT6B* gene, and six primer pairs for the *KRT16* gene were tested. Primers that produced no product with control genomic DNA and demonstrated optimal threshold cycle values were selected. All sequences demonstrated high reaction efficiency (at least 88 %), regardless of whether the reaction mixture contained one primer pair or all selected sequences simultaneously. No non-specific amplicons were detected, confirming the adequacy and relevance of the developed system.

Conclusion. A multiplex real-time PCR test system has been developed for the simultaneous measurement of keratin 1, 6B, and 16 gene expression levels, which hold potential prognostic value for assessing the efficacy of radiation therapy in patients with HNSCC. The system performs reliably with both model objects (cell lines, 3D tissue models) and small-volume clinical biomaterial.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma; radiation therapy; keratins; real-time polymerase chain reaction (RT-PCR); multiplex system

For Citation: Konstantin B. Gordon, Anna G. Soboleva, Polina A. Vishnyakova, Irina V. Arutyunyan, Elena A. Gantsova, Victoriia V. Kiseleva, Andrey V. Makarov, Anzhelika A. Melnikova, Enar D. Jumaniyazova, Andrey V. Elchaninov, Igor A. Gulidov, Andrey D. Kaprin, Timur Kh. Fatkhudinov. Development of a multiplex PCR assay for measuring keratin gene expression to predict response to radiation therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2026; 72(5): 1173-1181.-DOI: https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-5-2710

✉ Контакты: Гордон Константин Борисович, gordonkb@nmicr.ru

Введение

Доля плоскоклеточного рака органов головы и шеи (ПРГШ) составляет около 3–4 % от всех злокачественных новообразований: в 2020 г. такой диагноз был поставлен 890 тыс. пациентов [1]. Показатели общей выживаемости больных ПРГШ постепенно улучшаются (с 6,7 мес. в 1998–2007 гг. до 11,8 мес. в 2008–2019 гг. [2]), однако связано это, в первую очередь, с технологическим совершенствованием диагностики, позволяющей выявлять заболевание на более ранних стадиях [3].

В рамках борьбы с этим видом рака чаще всего применяется хирургическое лечение (зачастую затрудненное в силу локализации новообразований), иммунотерапию и химиотерапию, в половине случаев сочетая их с облучением опухоли [4]. Но даже синергетический эффект комбинированной терапии не позволяет существенно снизить частоту рецидивов рака головы и шеи, которая вот уже много лет составляет в среднем 50 % [5]. Поиск предикторов ответа пациента на терапию считается ключевым вопросом современной онкологии: в случае ПРГШ для этого пытаются использовать количественную оценку различных биомаркеров как в самой опухоли, так и в ее микроокружении или системном кровотоке, а также анализ клинических данных с помощью машинного обучения [5–8]. Разделение пациентов с ПРГШ на когорты по степени их чувствительности к лучевой терапии является важной клинической задачей: разработка способов персонализированного прогнозирования ответа на лечение поможет снизить риски недостаточной эффективности облучения, в т. ч. частоты рецидивов.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) крайне широко используется для диагностики в медицине, в т. ч. у пациентов с ПРГШ. Исследователи применяют высокоточный метод ПЦР с обратной транскрипцией для выявления корреляции между чувствительностью плоскоклеточного рака к лучевой терапии и уровнем относительной экспрессии генов хемокинов [9], генов, ассоциированных с гипоксией [10], циркулирующей микроРНК [11] и др. маркеров. Более современная методика количественной ПЦР с флюоресцентными репортерными зондами (Multiplex TaqMan qPCR) позволяет объединить

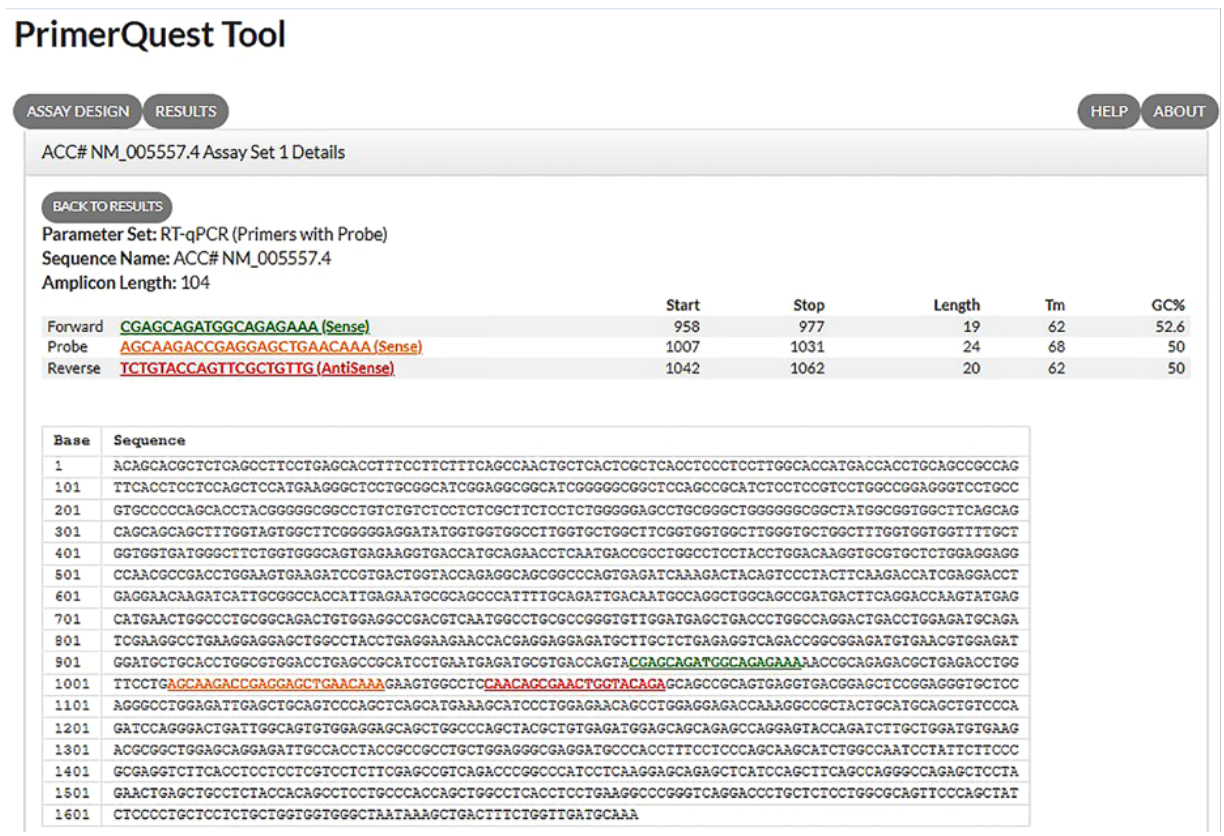
абсолютную и относительную количественную оценку целевых молекул ДНК/мРНК, точно определить уровень экспрессии генов, тестируя одновременно несколько специфичных мишеней в один шаг без снижения чувствительности. Такие мультиплексные системы активно применяются в экспериментальной и клинической онкологии, позволяя существенно снизить затраты материальных, трудовых и технических ресурсов [12, 13].

Проведенное нами ранее исследование транскриптома биоптатов ПРГШ позволило выявить новые предикторные маркеры: сопоставление транскриптомных профилей пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом после протонной терапии показало дифференциальную экспрессию генов кератинов 1, 6B и 16 [14]. Масштабирование исследования за счет увеличения когорт пациентов с ПРГШ определило необходимость разработки более эффективного подхода к оценке динамики экспрессии выбранных генов. Целью исследования стала разработка тест-системы для определения экспрессии генов кератинов 1, 6B и 16 с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (мПЦР-РВ).

Материалы и методы

Анализ in silico. Поиск нуклеотидных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Подбор последовательностей праймеров для ПЦР-РВ выполняли с помощью онлайн-инструмента Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). При подборе праймеров руководствовались условием, что последовательность синтезируемого продукта должна перекрывать последовательность двух экзонов гена для исключения потенциального синтеза ПЦР продуктов с геномной ДНК. Все пары подобранных праймеров тестировали с использованием контрольной пробы, геномной ДНК человека, для исключения вероятности получения ложноположительного результата тестовой системы. В работу брали последовательности, с которых амплифицировался один продукт расчётной длины.

Дизайн зондов (олигонуклеотидов, связанных с молекулами флуорофора и гасителя флуоресценции), расчет их температур плавления, определение длины ампликонов, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов проводили


PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

ACC# NM_005557.4 Assay Set 1 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)
Sequence Name: ACC# NM_005557.4
Amplicon Length: 104

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	CGAGCAGATGGCAGAGAAA (Sense)	958	977	19	62	52.6
Probe	AGCAAGACCGAGGAGCTGAACAAA (Sense)	1007	1031	24	68	50
Reverse	TCTGTACCAGTTCGCTGTTG (AntiSense)	1042	1062	20	62	50

Base	Sequence
1	ACAGCACGCTCTCAGCCTTCCTGAGCACCTTTCCTTCTTTCAGCCAACTGCTCACTCGCTCACCTCCCTCCTTGGCACCATGACCACCTGCAGCCGCCAG
101	TTCACCTCCTCCAGCTCCATGAAGGGCTCCTGCGGCATCGGAGGCGGCATCGGGGGCGGCTCCAGCCGCATCTCCTCCGTCCTGGCCGGAGGGTCCTGCC
201	GTGCCCCCAGCACCTACGGGGGCGGCCTGTCTGTCTCCCTCTCGCTTCTCCTCTGGGGGAGCCTGCGGGCTGGGGGGCGGCTATGGCGGTGGCTTCAGCAG
301	CAGCAGCAGCTTTGGTAGTGGCTTCGGGGGAGGATATGGTGGTGGCCTTGGTGCTGGCTTCGGTGGTGGCTTGGGTGCTGGCTTTGGTGGTGGTTTTGCT
401	GGTGGTGATGGGCTTCTGGTGGGCAGTGAGAAGGTGACCATGCAGAACCTCAATGACCGCCTGGCCTCCTACCTGGACAAGGTGCGTGCTCTGGAGGAGG
501	CCAACGCCGACCTGGAAGTGAAGATCCGTGACTGGTACCAGAGGCAGCGGCCCAGTGAGATCAAAGACTACAGTCCCTACTTCAAGACCATCGAGGACCT
601	GAGGAACAAGATCATTGCGGCCACCATTGAGAATGCGCAGCCCATTTTGCAGATTGACAATGCCAGGCTGGCAGCCGATGACTTCAGGACCAAGTATGAG
701	CATGAACTGGCCCTGCGGCAGACTGTGGAGGCCGACGTCAATGGCCTGCGCCGGGGTGTTGGATGAGCTGACCCTGGCCAGGACTGACCTGGAGATGCAGA
801	TCGAAGGCCTGAAGGAGGAGCTGGCCTACCTGAGGAAGAACCACGAGGAGGAGATGCTTGCTCTGAGAGGTCAGACCGGCGGAGATGTGAACGTGGAGAT
901	GGATGCTGCACCTGGCGTGGACCTGAGCCGCATCCTGAATGAGATGCGTGACCAGTACGAGCAGATGGCAGAGAAAAACCGCAGAGACGCTGAGACCTGG
1001	TTCCTGAGCAAGACCGAGGAGCTGAACAAAGAAGTGGCCTCCAACAGCGAACTGGTACAGAGCAGCCGCAGTGAGGTGACGGAGCTCCGGAGGGTGCTCC
1101	AGGGCCTGGAGATTGAGCTGCAGTCCCAGCTCAGCATGAAAGCATCCCTGGAGAACAGCCTGGAGGAGACCAAAGGCCGCTACTGCATGCAGCTGTCCCA
1201	GATCCAGGGACTGATTGGCAGTGTGGAGGAGCAGCTGGCCCAGCTACGCTGTGAGATGGAGCAGCAGAGCCAGGAGTACCAGATCTTGCTGGATGTGAAG
1301	ACGCGGCTGGAGCAGGAGATTGCCACCTACCGCCGCCTGCTGGAGGGCGAGGATGCCCACCTTTCCTCCCAGCAAGCATCTGGCCAATCCTATTCTTCCC
1401	GCGAGGTCTTCACCTCCTCCTCGTCCTCTTCGAGCCGTCAGACCCGGCCCATCCTCAAGGAGCAGAGCTCATCCAGCTTCAGCCAGGGCCAGAGCTCCTA
1501	GAACTGAGCTGCCTCTACCACAGCCTCCTGCCCACCAGCTGGCCTCACCTCCTGAAGGCCCGGGTCAGGACCCTGCTCTCCTGGCGCAGTTCCCAGCTAT
1601	CTCCCCTGCTCCTCTGCTGGTGGTGGGCTAATAAAGCTGACTTTCTGGTTGATGCAAA

Рис. 1. Подбор позиции для TaqMan-зонда в программе PrimerQuest™ с указанием идентификатора гена ACC# NM_005557.4 (номер доступа в базе данных NCBI (RefSeq) для транскрипта гена *KRT16* человека). Последовательности праймеров выделены зеленым и красным цветом, последовательность зонда выделена оранжевым цветом, указаны расположение последовательностей, температура плавления, доля GC-оснований

Fig. 1. Selection of the TaqMan probe position in PrimerQuest™ software, showing the gene identifier ACC# NM_005557.4 (NCBI RefSeq accession number for the human KRT16 gene transcript). Primer sequences are highlighted in green and red; the probe sequence is highlighted in orange. Sequence positions, melting temperature, and GC content are indicated

с помощью онлайн-инструмента PrimerQuest™ (www.idtdna.com/pages/tools/primerquest). Структуру TaqMan-зонда подбирали таким образом, чтобы он отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами, как показано на рис. 1 (зонд отмечен оранжевым цветом).

Вероятность синтеза неспецифичных ампликонов исключали с помощью программного обеспечения для ПЦР-симуляции in silico UGENE (ugene.net/pcr-in-silico), которое позволяет сопоставлять нуклеотидные последовательности зрелых РНК для проверки комплиментарности праймеров и зондов целевому гену, не перекрываясь с другими генами тест-системы.

Работа с нуклеиновыми кислотами. Тотальную РНК из клеток и тканей выделяли с помощью однофазного реагента MagZol (Magen, Китай). Синтез первой цепи кДНК с РНК-матрицы проводили с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с помощью амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad, США), с использованием реакционной смеси БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2 ×), (RM03-400, Биолабмикс, Россия). Условия для проведения моно- и мультиплексной ПЦР были унифицированными (представлены в табл. 1).

Таблица 1. Условия мультиплексной ПЦР-РВ

Реакционная смесь	ОТ-ПЦР-РВ
Концентрация праймеров	0,3 мкМ на реакцию
Концентрация зондов	0,150 мкМ на реакцию
Концентрация кДНК	300 нг на реакцию
Условия реакции	
Обратная транскрипция	45 °С — 10 мин
Предварительная денатурация	95 °С — 5 мин
Циклы ПЦР (40 циклов)	95 °С — 10 сек 60 °С — 30 сек

Table 1. Conditions for multiplex real-time PCR

Reaction mixture	RT-qPCR
Primer concentration	0.3 μM per reaction
Probe concentration	0.150 μM per reaction
cDNA concentration	300 ng per reaction
Reaction conditions	
Reverse transcription	45 °C — 10 min
Initial denaturation	95 °C — 5 min
PCR cycling (40 cycles)	95 °C — 10 sec 60 °C — 30 sec

Детекцию продуктов амплификации проводили в каналах FAM, HEX, ROX, Cy5 (для мультиплексной ПЦР). Положительным результатом анализа считали пробы, которые детектировались до 35-го цикла. Для оценки уровня относительной экспрессии гена использовали метод $2^{-\Delta\Delta ct}$, в качестве референсного использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*, при этом учитывали значения Ct, отличающиеся не более чем на один цикл.

Проверку наработки специфичных фрагментов амплификации тестировали при помощи электрофорезного разделения продуктов в 1,5 % агарозном геле (Lonza Rockland, США) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0) с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) и детекцией с использованием трансиллюминатора TCP-20.MC (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 312 нм.

Олигонуклеотидные праймеры и зонды были синтезированы ЗАО «Евроген» и АО «ГенТерра» (Москва, Россия).

Экспериментальные образцы. В качестве положительного контроля для каждого гена тест-системы использовали РНК, выделенную из иммортализованных клеточных линий человека, поскольку условия *in vitro* позволяют получать стандартизованный биоматериал высокого качества. Клеточные линии подбирали с помощью онлайн-ресурса The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org), оценивая показатель nTPM (число транскриптов целевого гена, нормализованных на миллион транскриптов всех белок-кодирующих генов), данные представлены в табл. 2.

При постановке мультиплексной ПЦР в качестве положительно контроля использовали смесь РНК трех линий клеток.

Результаты

Оптимизация тест-системы. Всего за время исследования было протестировано четыре пары праймеров для гена *KRT1*, девять пар праймеров для гена *KRT6B* и шесть пар праймеров для гена *KRT16*. Результаты эксперимента позволили отобрать праймеры, не дающие продукта с контрольной геномной ДНК, с оптимальными значениями пороговых циклов: в среднем 22,9 — для *KRT1*, 18,6 — для *KRT6B,* и 22,8 — для *KRT16.* Выбранные по результатам исследования праймеры и TaqMan-зонды представлены в табл. 3.

Пилотное использование тест-системы с клиническим материалом. Пилотное тестирование мультиплексной ПЦР-РВ системы провели на биоматериале пациента мужского пола 26 лет с диагностированным плоскоклеточным раком боковой поверхности языка. Пациент получал комплексное лечение в ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России и подписал информированное добровольное согласие. Из щипкового

Таблица 2. Клеточные линии, использованные в качестве положительного контроля тест-системы

Ген	Линия клеток	nTPM
KRT1	HaCaT, линия нормальных кератиноцитов	89.9
KRT6b	A431, линия эпидермоидной карциномы	131.2
KRT16	CAL27, линия плоскоклеточного рака языка	147.8
GAPDH	HaCaT, линия нормальных кератиноцитов	3179

Table 2. Cell lines used as positive controls for the test system

Gene	Cell line	nTPM
KRT1	HaCaT, normal human keratinocyte cell line	89.9
KRT6b	A431, epidermoid carcinoma cell line	131.2
KRT16	CAL27, tongue squamous cell carcinoma cell line	147.8
GAPDH	HaCaT, normal human keratinocyte cell line	3179

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности праймеров и TaqMan-зондов разработанной тест-системы

Ген	Праймеры (прямой/обратный)	TaqMan-зонды	Длина ампликона, п.о.
GAPDH	5’-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3’/5’-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3’/	5’-ROX-ACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCT-BHQ2	138
KRT1	5’-AAAGCTGAGGCCGAGTCCTT-3’/5’-CTGATGGACTGCTGCAAGTTGG-3’/	5’-FAM-AGCTGCAGATCACTGCTGGCAGAC-BHQ1	185
KRT6b	5’-TGTGACTCTGAAGAAGGATGTG-3’/5’-CAAGGCTCTCAGGAAGTTGAT-3’/	5’-Cy5-TGCAAGCCAAGGCAGACACTCTTA–BHQ2	103
KRT16	5’-GGAGATTGCCACCTACCGC-3’/5’-AGGTGAAGACCTCGCGGGA-3’/	5’-HEX-TTGCTGGGAGGAAAGGTGGGCAT–BHQ1	101

Table 3. Oligonucleotide sequences of the primers and TaqMan probes of the developed test system

Gene	Primers (forward/reverse)	TaqMan probes	Amplicon length, bp
GAPDH	5’-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3’/5’-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3’/	5’-ROX-ACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCT-BHQ2	138
KRT1	5’-AAAGCTGAGGCCGAGTCCTT-3’/5’-CTGATGGACTGCTGCAAGTTGG-3’/	5’-FAM-AGCTGCAGATCACTGCTGGCAGAC-BHQ1	185
KRT6b	5’-TGTGACTCTGAAGAAGGATGTG-3’/5’-CAAGGCTCTCAGGAAGTTGAT-3’/	5’-Cy5-TGCAAGCCAAGGCAGACACTCTTA–BHQ2	103
KRT16	5’-GGAGATTGCCACCTACCGC-3’/5’-AGGTGAAGACCTCGCGGGA-3’/	5’-HEX-TTGCTGGGAGGAAAGGTGGGCAT–BHQ1	101

Таблица 4. Сопоставление эффективности разработанной тест-системы при использовании моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ

Название гена	Моноплекс	Мультиплекс
KRT1	89,1 %	91,3 %
KRT6B	90,6 %	95,9 %
KRT16	101,2 %	88,4 %
GAPDH	96,3 %	92,6 %

Table 4. Comparison of the efficiency of the developed test system using monoplex and multiplex real-time PCR

Gene	Monoplex	Multiplex
KRT1	89.1 %	91.3 %
KRT6B	90.6 %	95.9 %
KRT16	101.2 %	88.4 %
GAPDH	96.3 %	92.6 %

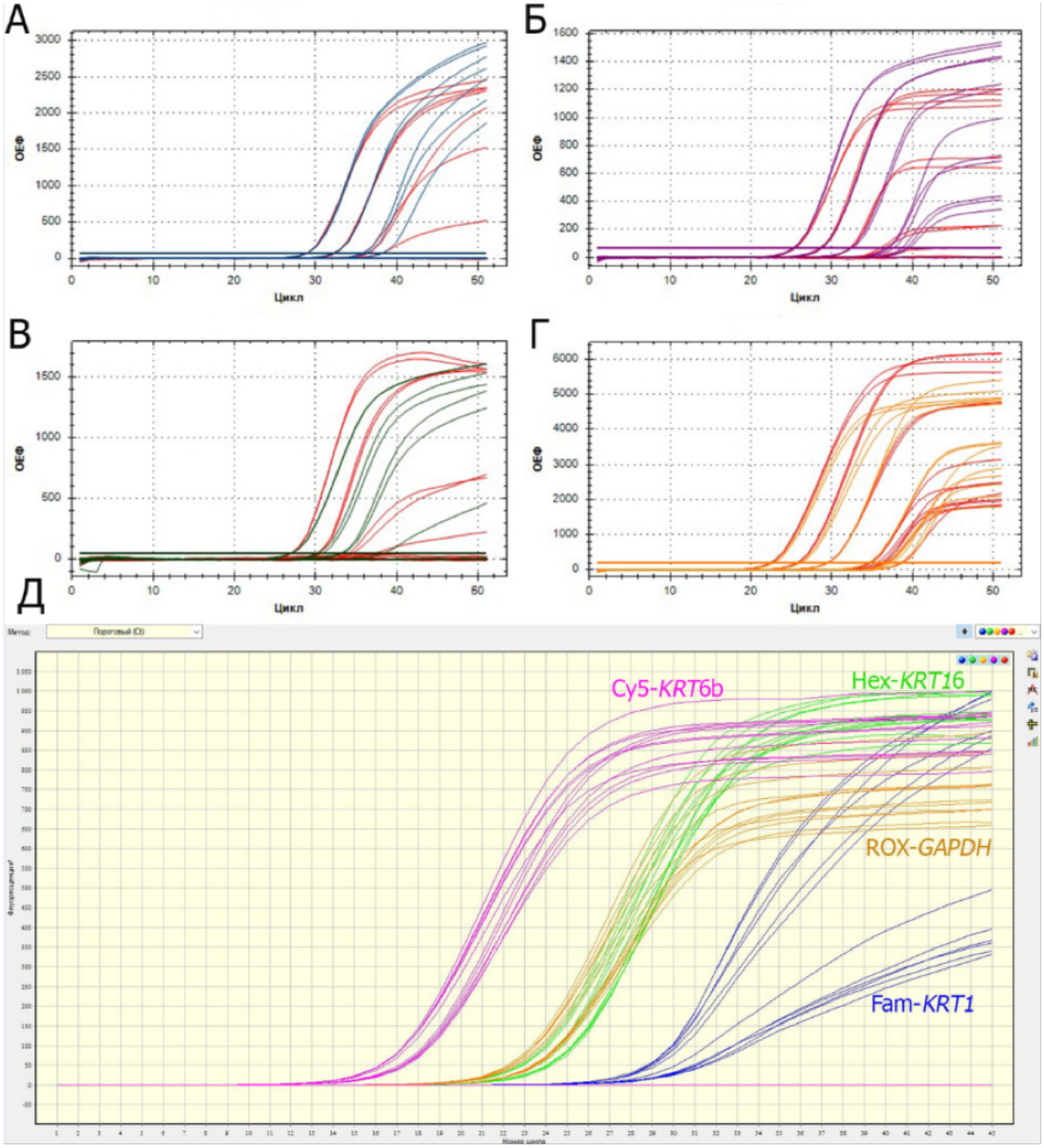


Рис. 2. Графики накопления флуоресценции при выполнении ПЦР-РВ в моноплексе и мультиплексе при использовании различных концентраций кДНК. А — графики накопления флуоресценции продуктов с праймеров для *KRT1*, красным цветом показаны кривые мультиплексной ПЦР, синим обозначены кривые моноплексной ПЦР; Б — графики для *KRT6b*, красные кривые — мультиплексная ПЦР, сиреневые кривые — моноплексная ПЦР; В — графики для *KRT16*, красные кривые — мультиплексная ПЦР, зеленые кривые — моноплексная ПЦР; Г — графики для *GAPDH*, красные кривые — мультиплексная ПЦР, оранжевые кривые — моноплексная ПЦР. На всех графиках показано синхронное накопление сигнала при снижении концентрации кДНК. Д — сводный график накопления сигналов в каналах FAM, HEX, ROX, Cy5 для мультиплексной ПЦР, проведенной на тканевой 3D-модели, облученной в разных режимах

Fig. 2. Fluorescence accumulation curves obtained during real-time PCR in monoplex and multiplex formats using different cDNA concentrations. А — fluorescence accumulation curves for products amplified with KRT1 primers: red curves indicate multiplex PCR, and blue curves indicate monoplex PCR. Б — curves for KRT16: red curves indicate multiplex PCR, and green curves indicate monoplex PCR. В — curves for KRT16; red curves indicate multiplex PCR, and green curves indicate monoplex PCR. Г — curves for GAPDH: red curves indicate multiplex PCR, and orange curves indicate monoplex PCR. All graphs demonstrate synchronous signal accumulation with decreasing cDNA concentration. Д — summary plot of signal accumulation in the FAM, HEX, ROX, and Cy5 channels for multiplex PCR performed on a tissue 3D model irradiated under different regimens

биоптата выделили по стандартной методике РНК, которую после пробоподготовки использовали для апробации тест-системы. Для каждой пары праймеров выполнили ПЦР-РВ с кДНК в разведениях от 10 фг до 1 нг на реакцию. Затем с помощью построения калибровочных кривых сравнили эффективности реакции в моно- и мультиплексах. Графики накопления флуоресценции приведены на рис. 2, А–Г.

Далее мы использовали разработанную мультиплексную тест-систему для оценки ответа 3D тканевой модели, полученную по технологии, защищенной патентом на изобретение № 2851825 [15]. Модель облучали фотонами, протонами и

быстрыми нейтронами в дозе 10 Грей, после чего оценивали уровень экспрессии целевых генов кератинов, которые предположительно могут служить предикторами эффективности ответа пациента на лучевую терапию. Результаты работы тест-системы представлены на рис. 2, Д.

Для всех подобранных последовательностей была показана высокая эффективность реакции независимо от содержания в реакционной смеси одной пары праймеров или всех подобранных последовательностей одновременно (табл. 4). При разделении продуктов реакции в агарозном геле также не было показано накопления неспецифических ампликонов, что говорит об адекватности и релевантности разработанной системы.

Обсуждение

Полученные результаты демонстрируют возможность создания мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для одновременной оценки экспрессии генов, ассоциированных с радиочувствительностью опухолевых клеток. В работе показано, что эффективность амплификации и значения пороговых циклов в мультиплексном формате сопоставимы с моноплексным вариантом системы, что свидетельствует об отсутствии значимого взаимного влияния компонентов реакционной смеси. Особое значение имеет показанное отсутствие амплификации геномной ДНК при исключении стадии обратной транскрипции, что подтверждает высокую специфичность разработанной тест-системы и исключает риск получения ложноположительных результатов.

Выбор генов *KRT1, KRT6B* и *KRT16* был определен нашими более ранними исследованиями транскриптома больных ПРГШ, получавших лучевую терапию [14]. Совсем недавно были опубликованы несколько работ, подтвердивших наши выводы. Так, в 2025 г. было обнаружено, что кератин 1 связан с инвазией, миграцией и эпителио-мезенхимальным переходом различных клеточных линий ПРГШ, пациенты с высокой продукцией кератина 1 имеют худшие показатели общей и безрецидивной выживаемости, а нокдаун экспрессии *KRT1* усиливает апоптоз опухолевых клеток, проявляя синергический эффект с традиционными методами лучевой и химиотерапии [16]. Роль изоформы кератина 6B до сих пор точно не определена, однако исследования показывают, что его уровень выше на периферии опухоли, чем в ее центре, что может указывать на связь этого белка с иммунным ответом микроокружения опухоли и вероятностью рецидива [17]. В 2026 г. было предположено, что перестройка цитоскелета опухолевых клеток при ПРГШ с образованием гетеродимера кератинов 6 и 15 способствует усилению их инвазивного потенциала [18]. Кератин 6 также может образовывать гетеродимеры и с кератином 16, который предположительно является маркером циркулирующих опухолевых клеток. Кроме того, повышенный уровень кератина 16 у пациентов с ПРГШ ассоциирован с худшей выживаемостью и большей частотой метастазирования в регионарные лимфатические узлы [19]. Перечисленные выше наблюдения различных научных групп подтверждают актуальность исследования перестройки цитоскелета опухолевых клеток в связи с возможностью использования генов отдельных кератинов в качестве предикторов ответа опухоли на лучевую терапию.

Важно заметить, что все три исследуемых нами кератина относятся к группе минорных. Для сравнения, показатели nTPM генов *KRT1, KRT6b, KRT16*, указанные в базе The Human Protein Atlas для модельной линии рака языка CAL27, невысоки и не превышают 150, в то время как для генов мажорных кератинов 5 и 17, характерных для плоскоклеточного рака, nTPM равны 6441,7 и 1921,4 соответственно. Более того, гены всех кератинов у человека сгруппированы в два кластера на хромосомах 12 и 17, а аминокислотные последовательности этих структурных белков промежуточных филаментов характеризуются высокой степенью гомологии, особенно в центральном стержневом домене. При таких исходных условиях разработка мультиплексной ПЦР-РВ системы, позволяющей точно уловить изменения уровней экспрессии минорных кератинов, оказалась нетривиальной задачей, которая была успешно нами решена. Мы предполагаем, что полученную тест-систему можно будет использовать для оценки реакции тканевых 3D моделей, полученных из биоптатов пациентов с ПРГШ, на лучевое воздействие, а после требуемой валидации — для составления прогноза эффективности терапии для конкретного пациента. Наибольший потенциал, по нашему мнению, данная тест-система будет иметь для маршрутизации пациентов на дорогостоящие методы лучевого лечения, а именно для адронной терапии.

Заключение

Таким образом, нами была разработана мультиплексная ПЦР-РВ тест-система для одновременного определения уровня экспрессии генов кератинов 1, 6B и 16, имеющих потенциальное прогностическое значение для оценки эффективности лучевой терапии пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи. Система успешно работает как с модельными объектами (клеточными линиями, 3D тканевыми моделями), так и с клиническим биоматериалом малого объема.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

Финансирование
Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-45-00031.
Funding
This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-45-00031).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Все пациенты, включенные в исследование, получали лечение в рамках рутинной практики после подписания информированного согласия на лечение. Персональные данные пациентов не использовались при проведении исследования.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
All patients included in this study received treatment as part of routine clinical practice after providing written informed consent. No personally identifiable patient data were used in the study.

Участие авторов
Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработке концепции статьи, получении и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.
Authors' contributions
All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published. All authors have approved the final version of the article before publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3): 209-249.-DOI: https://doi.org/10.3322/caac.21660.
2. Haring C.T., Kana L.A., Dermody S.M., et al. Patterns of recurrence in head and neck squamous cell carcinoma to inform personalized surveillance protocols. *Cancer*. 2023; 129(18): 2817-2827.-DOI: https://doi.org/10.1002/cncr.34823.
3. Barsouk A., Aluru J.S., Rawla P., Saginala K., Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)*. 2023; 11(2): 42.-DOI: https://doi.org/10.3390/medsci11020042.
4. Fabbrizi M.R., Parsons J.L. Radiotherapy and the cellular DNA damage response: current and future perspectives on head and neck cancer treatment. *Cancer Drug Resist*. 2020; 3(4): 775-790.-DOI: https://doi.org/10.20517/cdr.2020.49.
5. Tam S.Y., Tang F.H., Chan M.Y., et al. Prognosis prediction in head and neck squamous cell carcinoma by radiomics and clinical information. *Biomedicines*. 2024; 12(8): 1646.-DOI: https://doi.org/10.3390/biomedicines12081646.
6. Johnson D.E., Burtness B., Leemans C.R., et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6(1): 92.-DOI: https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3.
7. Meliante P.G., Zoccali F., de Vincentiis M., et al. Diagnostic predictors of immunotherapy response in head and neck squamous cell carcinoma. *Diagnostics (Basel)*. 2023; 13(5): 862.-DOI: https://doi.org/10.3390/diagnostics13050862.
8. Flach S., Pipinikas C., Huberty T., et al. Personalized ctDNA analysis for detection of residual disease and recurrence in surgically treated HNSCC patients. *NPJ Precis Oncol*. 2026; 10(1): 103.-DOI: https://doi.org/10.1038/s41698-026-01309-0.
9. Lai J., Huang R., Huang J. Predicting head and neck cancer response to radiotherapy with a chemokine-based model. *Sci Rep*. 2025; 15(1): 28450.-DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-025-13346-z.
10. Schanne D.H., Koch A., Elicin O., et al. Prognostic and predictive biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma treated with radiotherapy-a systematic review. *Biomedicines*. 2022; 10(12): 3288.-DOI: https://doi.org/10.3390/biomedicines10123288.
11. Summerer I., Unger K., Braselmann H., et al. Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2015; 113(1): 76-82.-DOI: https://doi.org/10.1038/bjc.2015.111.
12. Awrahman H.A., Mohamad D. Advanced breast cancer diagnosis: Multiplex RT-qPCR for precise typing and angiogenesis profiling. *Biochem Biophys Rep*. 2023; 37: 101615.-DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101615.
13. Vargas D.Y., Tyagi S., Marras S.A.E., et al. Multiplex superselective PCR assays for the detection and quantitation of rare somatic mutations in liquid biopsies. *J Mol Diagn*. 2022; 24(3): 189-204.-DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.11.006.
14. Джуманиязова Э.Д., Вишнякова П.А., Чиркова М.В., et al. Исследование транскриптома плоскоклеточного рака головы и шеи после протонного облучения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024; 23(1): 37-47.-DOI: https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47. [Jumaniyazova E.D., Vishnyakova P.A., Chirkova M.V., et al. Study of head and neck squamous cell carcinoma transcriptome after proton therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024; 23(1): 37-47.-DOI: https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47 (In Rus)].
15. Патент RU 2851825 C1 Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Макаров А.В. и др. Способ получения гистологической in vitro модели перитуморальной ткани больных с плоскоклеточным раком органов головы и шеи; Российская Федерация, МПК C12N 5/09: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы». заявл. 20.12.2024: опубл. 01.12.2025.-URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=87707308. [Patent RU 2851825 C1. Fatkhudinov T.Kh., Arutyunyan I.V., Makarov A.V., et al. Method for obtaining a histological in vitro model of peritumoral tissue from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Russian Federation, IPC C12N 5/09. Applicant: Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba. Filed December 20, 2024; published December 1, 2025.-URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=87707308 (In Rus)].
16. Jung E.K., Salam S.M.A., Jang H.B., et al. Expression of keratin-1 predicts recurrence and treatment response in advanced laryngeal cancer: A potential therapeutic target. *Curr*

Oncol. 2025; 32(9): 520.-DOI: https://doi.org/10.3390/curroncol32090520.

17. Nałęcz D., Świętek A., Hudy D., et al. Assessment of concentration KRT6 proteins in tumor and matching surgical margin from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(13): 7356.-DOI: https://doi.org/10.3390/ijms25137356.
18. Chen I.H., Ravichandran S., Lai M.T., et al. Cytoskeleton reorganization induced by a novel K6-K14 keratin fusion promotes cancer stemness and cellular plasticity via cGAS-STING selection. *Oncogenesis*. 2026; 15(1): 5.-DOI: https://doi.org/10.1038/s41389-026-00598-1.
19. Romashin D.D., Tolstova T.V., Varshaver A.M., et al. Keratins 6, 16, and 17 in Health and disease: A summary of recent findings. *Curr Issues Mol Biol*. 2024; 46(8): 8627-8641.-DOI: https://doi.org/10.3390/cimb46080508.

Поступила в редакцию / Received / 24.05.2026
Прошла рецензирование / Reviewed / 20.08.2026
Принята к печати / Accepted for publication / 17.09.2026

Сведения об авторах / Author Information / ORCID

Константин Борисович Гордон / Konstantin B. Gordon / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3146-5615; eLibrary SPIN: 2045-4565; Researcher ID (WOS) O-1778-2015; Author ID (Scopus) 53986437300.

Анна Геннадьевна Соболева / Anna G. Soboleva / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9158-1933; eLibrary SPIN: 2582-5511; Researcher ID (WOS) ABH-1033-2020; Author ID (Scopus) 35739240800.

Полина Александровна Вишнякова / Polina A. Vishnyakova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8650-8240; eLibrary SPIN: 3406-3866; Researcher ID (WOS) M-7730-2014; Author ID (Scopus) 57190971385.

Ирина Владимировна Арутюнян / Irina V. Arutyunyan / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4344-8943; eLibrary SPIN: 5220-1893; Researcher ID (WOS) A-5939-2014; Author ID (Scopus) 16444089400.

Елена Александровна Ганцова / Elena A. Gantsova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4925-8005; eLibrary SPIN: 6486-5795; Researcher ID (WOS) ABB-5881-2020; Author ID (Scopus) 56550044300.

Виктория Викторовна Киселева / Victoriia V. Kiseleva / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3001-4820; eLibrary SPIN: 2698-1448; Researcher ID (WOS) AAD-4216-2022; Author ID (Scopus) 57204832829.

Андрей Витальевич Макаров / Andrey V. Makarov / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2133-2293; eLibrary SPIN: 3534-3764; Researcher ID (WOS) A-4130-2014; Author ID (Scopus) 15030445400.

Анжелика Александровна Мельникова / Anzhelika A. Melnikova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7229-2813; eLibrary SPIN: 4197-1929; Researcher ID (WOS) GRF-3673-2022; Author ID (Scopus) 57739514200.

Энар Денисовна Джуманиязова / Enar D. Jumaniyazova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8226-0433; eLibrary SPIN: 1780-5326; Researcher ID (WOS) OGP-8209-2025; Author ID (Scopus) 57902215200.

Андрей Владимирович Ельчанинов / Andrey V. Elchaninov / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2392-4439; eLibrary SPIN: 5160-9029; Researcher ID (WOS) B-5320-2013; Author ID (Scopus) 36835289800.

Игорь Александрович Гулидов / Igor A. Gulidov / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2759-297X; eLibrary SPIN: 2492-5581; Researcher ID (WOS) P-6870-2018; Author ID (Scopus) 6603150052.

Андрей Дмитриевич Каприн / Andrey D. Kaprin / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8784-8415; eLibrary SPIN: 1759-8101; Researcher ID (WOS) K-1445-2014; Author ID (Scopus) 6602709853.

Тимур Хайсамудинович Фатхудинов / Timur Kh. Fatkhudinov/ ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6498-5764; eLibrary SPIN: 7919-8430; Researcher ID (WOS) A-5871-2014; Author ID (Scopus) 9036135400.

CC BY NC ND