

# МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЛИНИЙ РАКОВЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ КЛОНОГЕННОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК

М. Ваннус<sup>1</sup>, В.Д. Шемель<sup>2</sup>, Г.Г. Гольшев<sup>2</sup>, А.Н. Гольцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

## METHOD FOR DETERMINING RADIORESISTANCE OF CANCER CELL LINES BASED ON CLUSTER ANALYSIS OF CLONOGENIC CELL SURVIVAL DATA

M. Wannouss<sup>1</sup>, V.D. Semel<sup>2</sup>, G.G. Golyshchev<sup>2</sup>, A.N. Goltsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research ITMO University, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> MIREA - Russian Technological University, Moscow, Russia

### Реферат

**Цель:** Результаты лучевой терапии, продолжительность и качество жизни онкологических пациентов существенно зависят от радиочувствительности (РЧ) раковой опухоли, и длительность безрецидивного периода у пациентов во многом определяется степенью ее радиорезистентности (РР). Результаты исследований молекулярных механизмов радиорезистентности злокачественных образований и классификация раковых клеток по их радиофенотипу сегодня во многом способствуют совершенствованию методов прогнозирования результатов лечения и повышению эффективности лучевой терапии. В настоящей работе разработан метод классификации раковых клеток по их радиочувствительности с применением машинного обучения на основе анализа данных клоногенной выживаемости клеток при действии ионизирующего излучения.

**Материал и методы:** Метод заключается в кластеризации параметров уравнения линейно-квадратичной (ЛК) модели, которая была использована для аппроксимации экспериментальных зависимостей доза–эффект. В процесс обучения статистической модели были включены опубликованные экспериментальные данные 96 линий раковых клеток, для которых определены наборы параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и их отношение  $\alpha/\beta$ , используемое в радиобиологии для оценки РЧ клеток. Классификация раковых клеток по их радиочувствительности проведена на основе анализа главных компонент в пространстве параметров ( $\alpha$ ,  $\alpha/\beta$ ) и методов кластеризации k-средних и иерархической кластеризации.

**Результаты:** Применение разработанной статистической модели к большому набору раковых клеток позволило с высокой надежностью разделить радиочувствительные и радиорезистентные клетки на два кластера по параметрам  $\alpha$  и  $\alpha/\beta$  ЛК модели. Применение модели к раковым клеткам с приобретенной РР, у которых РЧ была подавлена в результате действия ИИ или гипоксии, позволило проследить сдвиг параметров дочерних клеток из кластера РЧ в кластер РР клеток. С целью исследования генетических механизмов радиочувствительности в работе выполнен биоинформационный анализ распределения мутаций генов, кодирующих белки в сигнальных путях пролиферации, апоптоза, репарации ДНК и антиоксидантной системы защиты клетки.

**Заключение:** Развита в настоящей работе статистическая модель радиофенотипической классификации раковых клеток на основе их радиочувствительности может быть использована в математических подходах к разработке оптимальных стратегий лучевой терапии, а также в совместном анализе фенотипических и генотипических особенностей раковых клеток с целью выяснения генетических механизмов радиочувствительности и определения биомаркеров радиорезистентности.

**Ключевые слова:** лучевая терапия, радиорезистентность, ионизирующее излучение, клонногенный анализ выживаемости, кластеризация, машинное обучение

#### Abstract

**Background:** The outcome of radiation therapy, the duration and quality of life of cancer patients significantly depend on the radiosensitivity (RS) of a cancerous tumor, and the duration of the patient's relapse-free period is largely determined by the degree of its radioresistance (RR). Today the results of molecular mechanism investigation of cancer radioresistance and the classification of cancer cells according to their radiophenotypes mostly contribute to improving prognosis methods of treatment outcomes and increasing effectiveness of radiation therapy. In this work, we developed a classification method of cancer cells according to their radiosensitivity using machine learning based on the data analysis of clonogenic cell survival under ionizing radiation.

**Material and methods:** The method consists of clustering parameters of experimental dose-effect relationships, which were approximated using the equation of a linear-quadratic (LQ) model, which is used to evaluate RS of cancer cells in radiobiology. The training of the statistical model included published experimental dataset of 96 cancer cell lines, for which parameters  $\alpha$ ,  $\beta$  and their ratio  $\alpha/\beta$  of the LQ model were determined. Classification of cancer cells according to their radiosensitivity was carried out based on principal component analysis (PCA) in the parameter space ( $\alpha$ ,  $\alpha/\beta$ ), k-means clustering and hierarchical clustering methods.

**Results:** Application of the developed statistical model to a large dataset of cancer cells made it possible to reliably separate radiosensitive and radioresistant (RR) cells into two clusters according to the parameters  $\alpha$  and  $\alpha/\beta$ . Application of the model to cancer cells with acquired RR, in which RS was suppressed as a result of exposure to irradiation or hypoxia, allowed tracing the shift of parent cells' parameters from the RS cluster to the RR cell cluster. To study the genetic mechanisms of radiosensitivity, we performed bioinformatic analysis of the mutation distribution in genes encoding proteins in the cellular signalling pathways of cancer cells, i.e. proliferation, apoptosis, repair of damaged DNA molecules and antioxidant defence cellular system.

**Conclusion:** The developed statistical model of radiophenotypic classification of cancer cells based on their radiosensitivity can be used in the development of radiation therapy treatment plans taking into account radiosensitivity of patient's tumour. The model may be also helpful in a joint analysis of the phenotypic and genotypic characteristics of cancer cells, aiming at the elucidation of the molecular and genetic mechanisms of radiosensitivity and development of biomarkers of radioresistance.

**Key words:** radiotherapy, radioresistance, ionizing radiation, clonogenic survival analysis, clustering, machine learning

E-mail: alexey.goltsov@gmail.com

<https://doi.org/10.52775/1810-200X-2024-101-1-18-35>

## Введение

В последние десятилетия повышение эффективности радиотерапии (РТ) ведется путем внедрения в клиническую практику новых прецизионных установок РТ с улучшенным качеством ионизирующих пучков и оптимизацией лечебных планов, а также путем разработки новых методов подавления радиорезистентности (РР) раковых опухолей пациентов за счет комбинации РТ с химио-, иммуно- и таргетной терапиями с использованием данных молеку-

лярной диагностики [1, 2]. Одно из направлений молекулярной диагностики связано с разработкой биомаркеров радиочувствительности раковых опухолей на основе интегрального ответа раковых клеток на ионизирующее излучение (ИИ) и потерей пролиферативной активности в *in vitro* экспериментах по клоногенной выживаемости клеток [3].

В этом подходе для определения параметров выживаемости клеток экспериментальные данные доза-эффект аппроксимируются уравнением линейно-квадратичной (ЛК) модели,

которая широко применяется в радиобиологии и радиотерапии [4]. ЛК модель описывает зависимость фракции выживших клеток от поглощенной дозы  $D$  (Гр) ионизирующего излучения следующей формулой

$$S(D) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (1)$$

где  $\alpha$  и  $\beta$  – параметры, характеризующие вероятности разрывов и репарации молекул ДНК при облучении. Экспоненциальный член с линейным показателем  $\alpha D$  отражает вероятность невосстанавливаемых (летальных) двухцепочечных разрывов молекул ДНК, а член с квадратичным показателем  $\beta D^2$  описывает вероятность образования кластеров сублетальных одноцепочечных разрывов ДНК, которые могут быть репарированы в клетке. Отношение параметров  $\alpha/\beta$  используется в радиобиологии для оценки радиочувствительности клеток и сравнения ответов раковых и здоровых клеток на действие ИИ. Высокое значение  $\alpha/\beta$  характерно для РЧ клеток, которые обладают невысокой способностью к репарации после облучения (лимфомы, лейкозы, недифференцированный мелкоклеточный рак легкого и др.). Низкое значение  $\alpha/\beta$  характерно для РР клеток и отражает высокую способность клеток к репарации (плоскоклеточный рак шейки матки, фибросаркома, рак почки, меланома, нейрогенные опухоли и др.).

Параметры ЛК модели используются в клинической практике для расчета изоэффективных доз и терапевтического интервала при оптимизации планов лучевой терапии с целью определения суммарной очаговой дозы (СОД)  $D$ , числа фракций и разовых очаговых доз (РОД)  $d$  для различных типов злокачественных опухолей [1]. Для этого были введены следующие величины, являющиеся производными от параметров ЛК модели: биологическая эффективная доза (biologically effective dose, BED)  $BED = D[1 + d/(\alpha/\beta)]$ , эквивалентная доза для расчета изоэффективных доз при оптимизации планов РТ:  $EQD_2 = D(d + \alpha/\beta)/(2 + \alpha/\beta)$  [5], вероятность контроля над опухолью (tumor control probability, TCP) и вероятность осложнений в нормальных тканях (normal tissue complication probability, NTCP) [6]. Хотя ЛК модель является феноменологической и обладает рядом недостатков, она оказалась весьма полезной в радиобиологических исследованиях молекулярных механизмов радиочувствительности раковых клеток, а также она находит широкое при-

менение при оптимизации планов РТ [7]. В работе [8] проведено дальнейшее развитие ЛК модели и ее применение к выбору оптимальных планов лучевой терапии ранних стадий рака молочной железы.

В настоящее время для определения РЧ раковых опухолей и прогнозирования результатов РТ развиваются методы машинного обучения (МО) и искусственного интеллекта с привлечением большого объема экспериментальных и клинических данных [9]. Целями данных разработок являются создание статистических моделей для прогнозирования терапевтического ответа онкопациентов на РТ и оптимизация планов лечения. В настоящей работе метод МО применяется для определения радиочувствительности раковых клеток на основе анализа экспериментальных данных клоногенной выживаемости клеток при действии ИИ. Метод заключается в кластеризации характеристик раковых клеток с целью выделения кластеров радиочувствительных и радиорезистентных раковых клеток. Ранее метод классификации раковых клеток по их радиочувствительности на основе данных клоногенной выживаемости был развит с использованием метода анализа главных компонент и апробирован на малом наборе раковых клеток [10, 11]. В настоящей работе дано дальнейшее развитие этого подхода и разработана статистическая модель, которая обучена на большом наборе экспериментальных данных. В обучающий набор модели были включены также данные по раковым клеткам с приобретенной РР, что позволило исследовать изменение РЧ в результате пролонгированного действия ИИ и влияния гипоксии. Для РЧ и РР раковых клеток, учтенных в модели, выполнен биоинформационный анализ распределения основных мутаций генов с целью исследования генетических механизмов радиочувствительности и определения главных сигнальных путей, дающих вклад в фенотип радиорезистентных раковых клеток.

## Материал и методы

Для исследования радиочувствительности раковых клеток были собраны экспериментальные данные из литературы по дозовым зависимостям клоногенной выживаемости 140 линий раковых клеток, относящихся к различным типам рака. В регрессионном анализе экспериментальных данных использовались урав-

нение ЛК модели (1) в его логарифмическом представлении:  $\ln(S) = -\alpha D - \beta D^2$ , где параметры  $\alpha$  и  $\beta$  определялись методом подгонки к экспериментальным дозовым зависимостям.

Для классификации РЧ и РР клеточных линий был использован кластерный анализ полученных параметров  $\alpha$  и  $\beta$  с применением методов агломеративной иерархической кластеризации и кластеризации k-средних значений (k-mean clustering analysis) [12, 13].

Учитывая высокую вариабельность значений  $\alpha$  и  $\beta$  для раковых клеток, методы кластеризации были применены совместно с методом главных компонент (МГК) [12] который заключается в уменьшении размерности данных путем построения ортогональной системы главных компонент (ГК). При этом первая ось ГК выбирается так, чтобы дисперсия данных вдоль нее была бы максимальной. Остальные оси ГК также выбираются так, чтобы максимизировать дисперсии данных вдоль этих осей ГК. Построение системы ГК сводится к задаче диагонализации ковариационной матрицы  $C_{ij} = \text{cov}(X_i, X_j)$ , где  $X_i (i=1, 2, 3, \dots, n)$  – вектор значений  $n$  параметров из анализируемого набора. Трансформация векторов  $X_i$  к главным компонентам  $Z_i$  состоит в нахождении проекции век-

тора  $X_i$  на оси ГК:  $Z = AX^T$ , где матрица трансформации  $A$  содержит в столбцах собственные векторы матрицы  $C_{ij}$ .

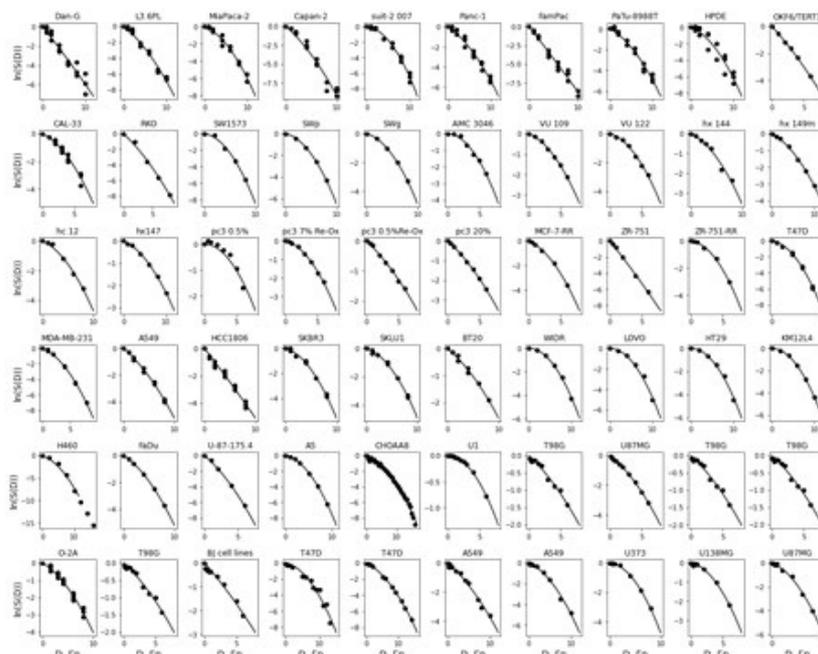
В данной работе МГК применен к набору параметров ЛК модели  $X_1 = \alpha/\beta$  и  $X_2 = \alpha$ . Перед применением МГК набор параметров был преобразован к нормировано-центрированным значениям с нулевыми средними и выравниванием путем деления на их дисперсию.

Статистическая модель была разработана на языке Питон с применением библиотеки машинного обучения sklearn (scikit-learn.org).

## Результаты

### Результаты регрессионного анализа экспериментальных данных доза-эффект. Оценка параметров ЛК модели

На рис. 1 представлены результаты аппроксимации экспериментальных дозовых зависимостей выживаемости клеток  $S(D)$  уравнением ЛК модели (1) в полулогарифмическом масштабе. Полученные значения параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha/\beta$  для 96 линии раковых клеток, которые вошли в данное исследование, приведены в табл. 1. Там же даны коэффициенты детерми-



**Рис. 1.** Результаты аппроксимации экспериментальных дозовых зависимостей выживаемости раковых клеток  $S(D)$  уравнением ЛК модели. Точки – экспериментальные данные, линии – расчетные кривые. Данные приведены в полулогарифмическом масштабе

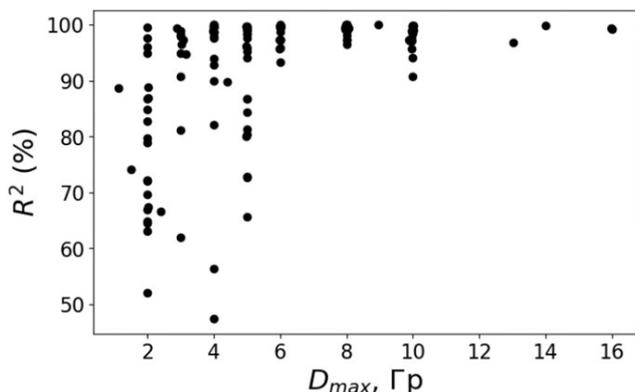
Таблица 1

Значения параметров  $\alpha$  (Гр<sup>-1</sup>),  $\beta$  (Гр<sup>-2</sup>),  $\alpha/\beta$  (Гр) и коэффициента детерминации  $R^2$  (%), полученных при анализе экспериментальных данных по дозовым зависимостям клоногенной выживаемости раковых клеток

Клетки	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$	$R^2$	Клетки	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$	$R^2$
Dan-G <sup>1</sup>	0,54±0,08	0,005±0,01	115,88	94,1	T98G <sup>9</sup>	0,17±0,06	0,05±0,02	3,14	96,2
L3.6PL <sup>1</sup>	0,42±0,07	0,026±0,009	16,31	97,7	T98G <sup>9</sup>	0,16±0,03	0,011±0,006	15,41	97,4
MiaPaca-2 <sup>1</sup>	0,21±0,06	0,040±0,008	5,26	97,4	T98G <sup>9</sup>	0,19±0,05	0,04±0,01	5,1	97,6
Capan-2 <sup>1</sup>	0,6±0,1	0,03±0,01	18,56	95,8	T98G <sup>9</sup>	0,16±0,03	0,011±0,006	14,96	97,4
suit-2 007 <sup>1</sup>	0,05±0,07	0,060±0,008	0,89	98,5	T98G <sup>9</sup>	0,16±0,03	0,011±0,006	15,67	97,4
Panc-1 <sup>1</sup>	0,28±0,05	0,025±0,006	11,47	97,2	T98G <sup>9</sup>	0,16±0,03	0,011±0,006	15,21	97,4
FamPac <sup>1</sup>	0,83±0,08	0,003±0,01	259,37	97,2	<b>U138MG<sup>9</sup></b>	0,06±0,02	0,049±0,004	1,39	99,4
PaTu-8988T <sup>1</sup>	0,22±0,06	0,027±0,007	8,3	97,2	U87MG <sup>9</sup>	0,16±0,03	0,042±0,005	3,94	99,4
HPDE <sup>1</sup>	0,2±0,1	0,04±0,01	4,88	90,8	<b>U87MG<sup>9</sup></b>	0,32±0,02	0,033±0,003	9,81	99,8
pc3 0,5% <sup>2</sup>	0,0±0,07	0,04±0,01	<10 <sup>-3</sup>	93,3	HGL21 <sup>9</sup>	0,20±0,03	0,030±0,006	6,82	99,1
pc3 7% Re-Ox <sup>2</sup>	0,08±0,02	0,048±0,004	1,81	99,7	<b>MO59J/Fus1<sup>9</sup></b>	0,41±0,08	0,03±0,02	14,82	95,9
pc3 0,5%Re-Ox <sup>2</sup>	0,20±0,02	0,011±0,004	18,25	99,6	<b>MO59K<sup>9</sup></b>	0,32±0,07	0,03±0,03	9,97	94,9
<b>pc3 20%<sup>2</sup></b>	0,29±0,01	0,020±0,002	14,81	99,9	O-2A <sup>9</sup>	0,18±0,03	0,022±0,005	7,98	97,3
LNCaP <sup>2</sup>	0,2±0,1	0,07±0,03	2,51	90	U373 <sup>10</sup>	0,03±0,01	0,044±0,002	0,86	99,9
<b>OKF6/TERT1<sup>3</sup></b>	0,51±0,02	0,017±0,005	30,82	99,9	U373-G1 <sup>10</sup>	0,00±0,03	0,13±0,01	<10 <sup>-3</sup>	97,9
CAL-33 <sup>3</sup>	0,22±0,05	0,05±0,01	4,35	95,9	U373-G2 <sup>10</sup>	0,12±0,04	0,11±0,01	1,16	98,6
FaDu <sup>3</sup>	0,24±0,01	0,028±0,001	8,71	100	<b>U-87-175.4<sup>10</sup></b>	0,73±0,05	0,058±0,009	12,6	99,9
<b>RKO<sup>4</sup></b>	0,7±0,1	0,040±0,02	18,68	99,1	<b>AT221JE-TJ</b>	0,39±0,05	0,13±0,02	3,07	98,3
KM12L4 <sup>4</sup>	0,00±0,01	0,044±0,002	<10 <sup>-3</sup>	99,9	<b>EBS7YZ5<sup>11</sup></b>	0,24±0,1	0,10±0,04	2,49	90,8
HT29 <sup>5</sup>	0,06±0,02	0,051±0,005	1,28	98,5	MR4 <sup>11</sup>	0,30±0,07	0,01±0,01	40,11	95,8
HT29 <sup>5</sup>	0,00±0,05	0,043±0,006	<10 <sup>-3</sup>	99	BJ <sup>11</sup>	0,24±0,05	0,14±0,03	1,69	97,6
HT29 <sup>5</sup>	0,02±0,02	0,059±0,005	0,37	99,7	GM0639 <sup>11</sup>	0,24±0,05	0,14±0,03	1,69	97,6
HT29 <sup>5</sup>	0,05±0,01	0,040±0,002	1,29	99,6	<b>HFIB 2<sup>11</sup></b>	0,8±0,1	0,01±0,03	92,53	97,9
HT29 <sup>5</sup>	0,05±0,02	0,053±0,005	1,01	98,3	<b>HFIB 41<sup>11</sup></b>	0,6±0,1	0,02±0,03	42,86	97,6
SW480 <sup>5</sup>	0,14±0,02	0,040±0,005	3,6	99,7	<b>MCF-7<sup>12</sup></b>	0,50±0,06	0,38±0,02	1,36	100
SW707 <sup>5</sup>	0,21±0,04	0,04±0,01	5,59	99,3	MCF-7-RR <sup>12</sup>	0,23±0,03	0,061±0,005	3,78	99,9
<b>SW48<sup>5</sup></b>	0,4±0,1	0,30±0,05	1,34	99	<b>ZR-751<sup>12</sup></b>	0,98±0,07	0,01±0,01	80,25	99,7
WIDR <sup>5</sup>	0,00±0,03	0,042±0,003	0	99,7	ZR-751-RR <sup>12</sup>	0,05±0,04	0,074±0,007	0,68	99,7
SW1573 <sup>6</sup>	0,09±0,08	0,08±0,01	1,22	99,3	MDA-MB-231-RR <sup>12</sup>	0,09±0,06	0,14±0,02	0,65	99,7
SWp <sup>6</sup>	0,103±0,001	0,0545±0,0002	1,89	100	<b>MDA-MB-231<sup>12</sup></b>	0,29±0,03	0,073±0,004	3,98	99,9
SWg <sup>6</sup>	0,1±0,002	0,0389±0,0003	2,56	100	T-47D <sup>12</sup>	0,08±0,04	0,080±0,006	1,08	99,6
<b>H460<sup>6</sup></b>	0,26±0,08	0,046±0,006	5,66	99,4	T-47D <sup>12</sup>	0,08±0,07	0,033±0,006	2,65	96,8
A5 <sup>6</sup>	0,12±0,01	0,064±0,002	2,04	100	<b>T-47D<sup>12</sup></b>	0,20±0,01	0,021±0,001	9,99	99,9
hx 144 <sup>7</sup>	0,12±0,04	0,0234±0,006	5,19	98,2	<b>HCC1806<sup>12</sup></b>	0,47±0,05	0,003±0,007	160,21	97,4
hx 149m <sup>7</sup>	0,13±0,02	0,018±0,002	7,78	99,8	SKBR3 <sup>12</sup>	0,12±0,04	0,044±0,006	2,75	99,3
hc 12 <sup>7</sup>	0,15±0,05	0,032±0,007	4,86	99,1	BT20 <sup>12</sup>	0,15±0,02	0,010±0,003	15,11	98,8
hx147 <sup>7</sup>	0,08±0,01	0,015±0,001	5,49	99,9	LOVO <sup>13</sup>	0,00±0,07	0,048±0,008	<10 <sup>-3</sup>	98,7
SKLU1 <sup>7</sup>	0,12±0,03	0,037±0,004	3,27	99,4	CHOAAS <sup>14</sup>	0,15±0,02	0,022±0,001	6,87	99,2
<b>A549<sup>7</sup></b>	0,25±0,03	0,0127±0,004	19,82	98,6	<b>CHO wild-type</b>	0,12±0,02	0,078±0,009	1,54	99,5
<b>A549<sup>7</sup></b>	0,17±0,04	0,032±0,005	5,59	99,1	<b>AA-8<sup>14</sup></b>	0,25±0,07	0,12±0,04	2,07	95
<b>A549<sup>7</sup></b>	0,32±0,03	0,020±0,004	16,03	99,6	CHO mutant EM-9 <sup>14</sup>	0,35±0,06	0,36±0,02	1	99,4
<b>A549-P<sup>7</sup></b>	0,50±0,002	0,0108±0,0003	46,57	100	<b>V79-379A<sup>15</sup></b>	0,16±0,01	0,023±0,003	6,95	99,6
A549-RR <sup>7</sup>	0,09±0,03	0,057±0,006	1,6	99,8	V79-379A <sup>15</sup>	0,21±0,06	0,09±0,04	2,37	96
<b>H1299-P<sup>7</sup></b>	0,41±0,03	0,004±0,006	108,22	99,8	V79 <sup>15</sup>	0,12±0,1	0,14±0,03	0,9	98,9
H1299-RR <sup>7</sup>	0,24±0,04	0,028±0,008	8,77	99,7	WTK1 <sup>16</sup>	1,10±0,1	0,03±0,03	34,24	99,7
AMC 3046 <sup>8</sup>	0,02±0,05	0,06±0,01	0,32	98,7	<b>TK6E6<sup>17</sup></b>	0,18±0,04	0,008±0,009	22,79	94,1
VU 109 <sup>8</sup>	0,12±0,01	0,038±0,003	3,3	99,8	Be11 <sup>18</sup>	0,00±0,003	0,0211±0,0007	<10 <sup>-3</sup>	99,7
VU 122 <sup>8</sup>	0,12±0,04	0,060±0,008	2,05	99,4	U1 <sup>18</sup>	0,21±0,02	0,022±0,005	9,88	99
					RT112 <sup>19</sup>	0,05±0,09	0,09±0,03	0,61	93,9

Примечание: <sup>1</sup>раковые и нераковые (HPDE) клетки поджелудочной железы человека [10]; <sup>2</sup>рак предстательной железы [14, 15]; <sup>3</sup>плоскоклеточный рак [16, 17]; <sup>4</sup>рак толстой кишки [18, 19]; <sup>5</sup>аденокарцинома толстой кишки человека [15, 19, 20]; <sup>6</sup>рак легких (эпителиальные клетки) [18, 21, 22]; <sup>7</sup>рак легких (клетки аденокарциномы) [12, 13, 32, 40]; <sup>8</sup>глиобластома [18]; <sup>9</sup>мультиформная опухоль глиобластомы [15, 25, 26]; <sup>10</sup>глиобластома астроцитома опухоль [22, 25]; <sup>11</sup>фибробластома [15]; <sup>12</sup>рака молочной железы [15, 23, 27]; <sup>13</sup>колоректальная карцинома человека [19]; <sup>14</sup>линия эпителиальных клеток, полученная из яичника китайского хомячка [15, 19]; <sup>15</sup>фибробласт легочной ткани китайского хомячка [15]; <sup>16</sup>рак яичников [28]; <sup>17</sup>лимфобластоидный рак [28]; <sup>18</sup>меланома [15]; <sup>19</sup>рак мочевого пузыря [15]; <sup>20</sup>гепатома [15].

Названия радиочувствительных клеток выделены жирным шрифтом. Верхние индексы у названий клеток указывают типы рака, которые приведены внизу таблицы



**Рис. 2.** Распределение значений коэффициента детерминации  $R^2$  для результатов аппроксимации экспериментальных данных доза-эффект в зависимости от максимальной дозы  $D_{max}$ , до которой проводились измерения

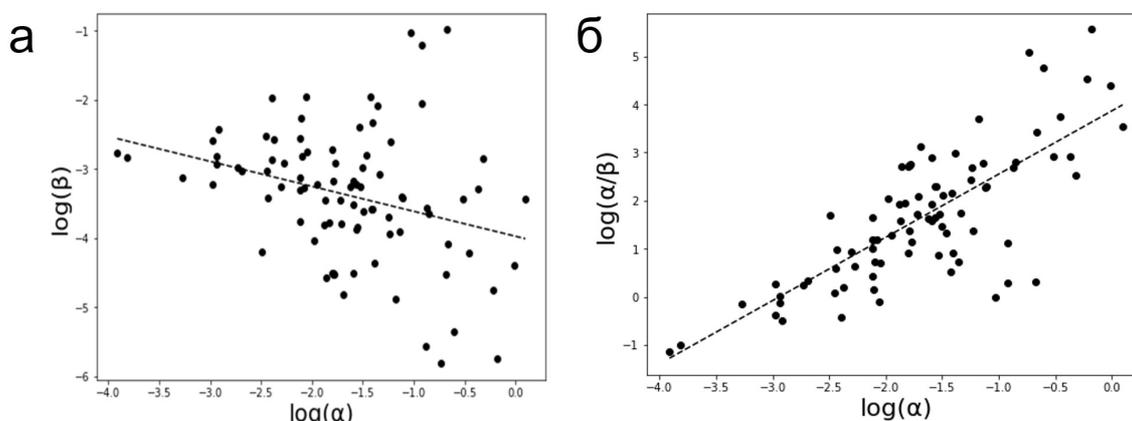
нации  $R^2$ , показывающие точность подгонки к экспериментальным данным уравнением ЛК модели.

Проблема использования параметров ЛК модели в планах лучевой терапии при выборе полных и подведенных доз связана с получением надежных значений этих параметров, в частности, отношения  $\alpha/\beta$ . На рис. 2 показаны значения коэффициента детерминации  $R^2$  для аппроксимации экспериментальных данных доза-эффект уравнением ЛК модели для 140 линий раковых клеток в зависимости от максимальной дозы облучения  $D_{max}$ , выбранной в различных экспериментах. Как видно, аппроксимация экспериментальных данных, полученных с максимальной дозой  $D_{max}$  ниже 6 Гр, имела значения  $R^2$  в области 50–90 %, что пока-

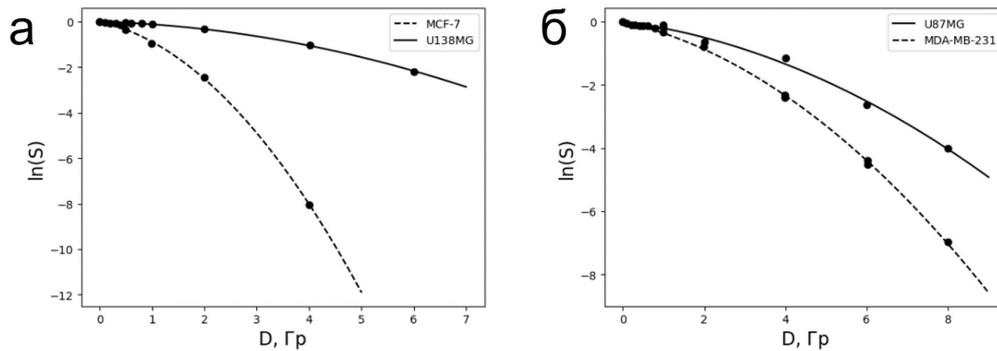
зывает низкую точность аппроксимации, в то время как аппроксимация данных, полученных с максимальной дозой  $D_{max}$  выше 6 Гр, имела значения  $R^2$  выше 90 % со средним значением 98,5 %. В связи с этими результатами для дальнейшего анализа были использованы экспериментальные данные, полученные с максимальной дозой выше 6 Гр, и из экспериментальных данных 140 линий клеток были отобраны данные линий 96 раковых клеток, для которых получена высокая точность аппроксимации дозовых зависимостей ЛК моделью с  $R^2 > 90\%$  (табл. 1).

Взаимное попарное распределение параметров  $\alpha$  и  $\beta$ , а также  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  приведено на рис. 3а и 3б соответственно. Как видно, значения, полученных параметров находятся в широких пределах:  $\alpha$  лежит в пределах 0,0 Гр – 2,2 Гр<sup>-1</sup> со средним значением 0,4 Гр<sup>-1</sup>;  $\beta$  – в пределах 0,0–2 Гр<sup>-2</sup> – 0,5 Гр<sup>-2</sup> со средним значением 0,1 Гр<sup>-2</sup> и  $\alpha/\beta$  – в пределах 0,0 Гр – 260 Гр со средним значением 19,2 Гр. Приведенные данные показывают положительную корреляцию между  $\alpha$  и  $\beta$  (коэффициент корреляции Спирмана 0,3). Также видна высокая корреляция между  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$ , которая в данном случае определяется спецификой выбранных параметров, включающих  $\alpha$  в оба параметра (коэффициент Спирмана 0,8). Широкий диапазон значений коэффициентов  $\alpha$  и  $\beta$  проявляется в различной форме дозовых кривых (рис. 1), которая изменяется в полулогарифмических координатах от линейной зависимости с высоким значением  $\alpha$  и низким  $\beta < 10^{-2}$  Гр<sup>-2</sup> до параболической функции с низким значением  $\alpha < 10^{-3}$  Гр<sup>-1</sup>.

Для кластеризации клеток по их радиочувствительности в качестве величин  $X_1$  и  $X_2$



**Рис. 3.** Взаимное распределение параметров  $\alpha$  и  $\beta$  (а) и  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  (б) ЛК модели (точки) в логарифмическом масштабе. Прямая – линейная регрессия



**Рис. 4.** Зависимость фракции выживших клеток от дозы  $D$  для раковых клеток с близкими значениями параметра  $\alpha/\beta$  и разными значениями  $\alpha$ . а: клетки MCF-7 (пунктир) с  $\alpha/\beta=1,4$  Гр и  $\alpha=0,51$  Гр<sup>-1</sup> и U138MG (сплошная линия) с  $\alpha/\beta=1,4$  Гр и  $\alpha=0,07$  Гр<sup>-1</sup>. б: клетки U87MG (сплошная линия) с  $\alpha/\beta=3,94$  Гр и  $\alpha=0,17$  Гр<sup>-1</sup> и MDA-MB-231 (пунктир) с  $\alpha/\beta=3,98$  Гр и  $\alpha=0,29$  Гр<sup>-1</sup>

(см. Методы) были выбраны параметры  $X_1=\alpha/\beta$  и  $X_2=\alpha$ . Отношение  $\alpha/\beta$  выбрано исходя из того, что этот параметр обычно используется для характеристики радиочувствительности раковых клеток к действию ИИ. Второй параметр  $\alpha$  добавлен, чтобы более точно и однозначно характеризовать поведение кривой выживаемости. Как видно из распределения параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  (рис. 3б), клетки с разными значениями  $\alpha$  могут иметь одинаковое отношение  $\alpha/\beta$  и, следовательно, различное поведение кривой выживаемости. В частности, в наших расчетах были получены близкие значения  $\alpha/\beta$  для различных клеточных линий, характеризующихся различным поведением кривых выживаемости и различной радиочувствительностью. На основе поведения кривых выживаемости и ЛК модели, чувствительность можно определить через производную функции  $S(D)$ :

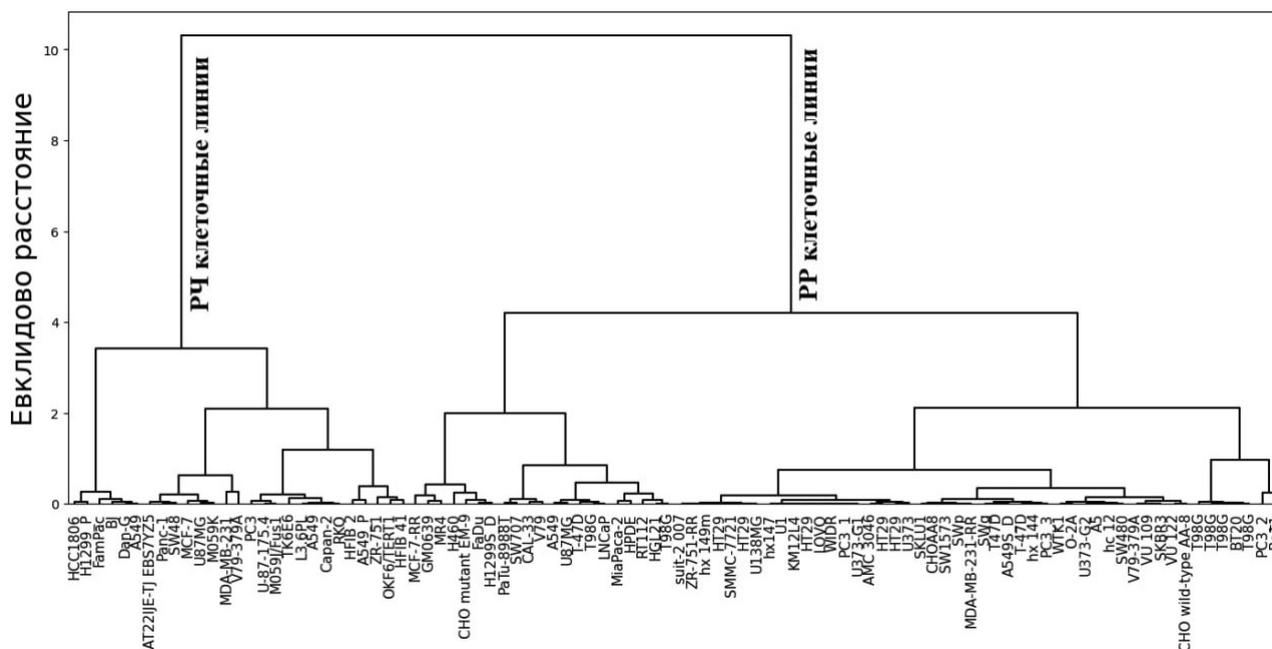
$$\sigma(D) = \frac{d \ln(S)}{dD} = \alpha + 2\beta D = \alpha \left(1 + \frac{2D}{\alpha/\beta}\right). \quad (2)$$

При этом чувствительность  $\sigma$  определяет наклон касательной к кривой выживаемости или, другими словами, ее крутизну при определенной дозе  $D$ . Из уравнения (2) следует известное соотношение между наклоном кривой выживаемости и параметром  $\alpha$ : в области малых доз ( $D \approx 0$ ) чувствительность  $\sigma \approx \alpha$ , а при  $D = \alpha/\beta$  чувствительность  $\sigma = 3\alpha$  [7]. Таким образом, параметр  $\alpha$  определяет радиочувствительность в области малых доз и при  $D = \alpha/\beta$ , когда вклады линейного и квадратичного членов равны. Исходя из этого, параметр  $\alpha$  был добавлен к параметру  $\alpha/\beta$  для проведения кластерного анализа.

В развиваемом методе кластеризации по двум параметрам  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  учтено, что один параметр  $\alpha/\beta$  неоднозначно определяет характер дозовой зависимости, и, следовательно, степень радиочувствительности раковых клеток. На рис. 4а и 4б приведены дозовые зависимости выживаемости для клеток с одинаковыми параметрами  $\alpha/\beta$  Гр, но с разными значениями параметра  $\alpha$ . При этом ЛК модель хорошо описывает экспериментальные данные в обоих случаях. Как видно из рис. 4а, параметр  $\alpha$  определяет различную радиочувствительность (наклон кривой) в области  $D \approx 0$  Гр для клеток линий MCF-7 и U138MG ( $\alpha=0,51$  Гр<sup>-1</sup> и  $0,07$  Гр<sup>-1</sup>, соответственно). Как показал кластерный анализ, результаты которого приведены в табл. 1 и рис. 5, клетки MCF-7 и U138MG обладают различной радиочувствительностью: MCF-7 принадлежит к кластеру РЧ клеток, а U138MG – к кластеру РР клеток несмотря на одинаковое значение параметра  $\alpha/\beta=1,4$  Гр.

#### Кластеризация радиочувствительных и радиорезистентных линий раковых клеток

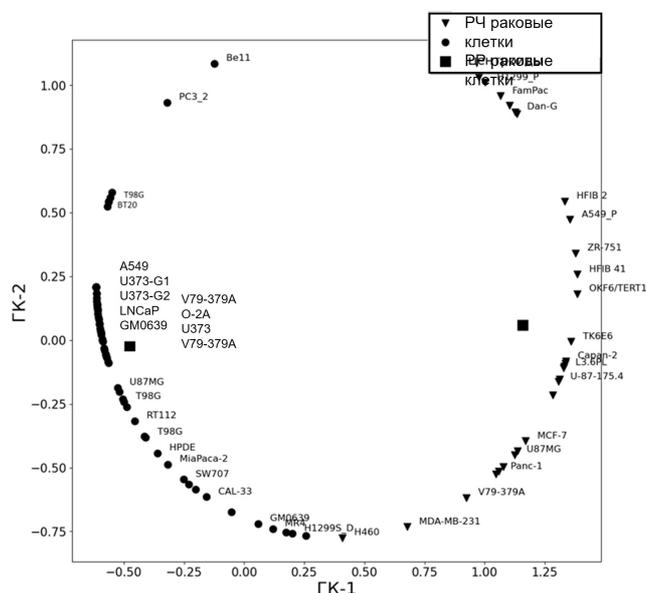
Параметры  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  отобранных клеток были использованы для классификации клеток по их радиочувствительности. На рис. 5 представлена дендрограмма с результатами применения метода иерархической кластеризации, где показаны два основных выделенных кластера, которые содержат РЧ и РР клетки, соответственно. В кластер РЧ клеток вошли клетки рака поджелудочной железы Dan-G, FamPac и клетки рака молочной железы ZR-751 и MCF-7, которые в литературе отнесены к радиочув-



**Рис. 5.** Дендрограмма иерархической кластеризации раковых клеток по их радиочувствительности, построенная на основе анализа данных клоногенной выживаемости клеток при действии ИИ. Выделены два основных кластера, содержащие радиочувствительные (левый кластер) и радиорезистентные (правый кластер) клетки

ствительным клеткам [7, 10, 11]. В кластер радиорезистентных клеточных линий вошли, например, клетки рака поджелудочной железы suit-2 007 и клетки рака молочной железы BT20, отмеченные в литературе как радиорезистентные [7, 11, 12].

В результате применения МГК к набору параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  были выделены кластеры РЧ и РР клеток в пространстве главных компонент ГК-1 и ГК-2 (рис. 6). Полученные главные компоненты для наборов  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  были расположены на единичной окружности путем нормировки. После применения МГК был использован метод кластеризации k-средних значений, в результате чего определены центроиды двух кластеров клеток, которые рассчитаны как средние значения координат ГК-1 и ГК-2 для параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$ , входящих в кластеры. Как видно из рис. 6, расположение центроидов кластеров различаются по координате ГК-1 и равны  $-0,5$  и  $1,15$  для РР и РЧ клеток соответственно, а координаты центроидов по оси ГК-2 почти совпадают ( $0,02$  и  $0,0$ ). Следовательно, разделение кластеров происходит по координате ГК-1 без заметного отличия по координате ГК-2. Таким образом, критерием

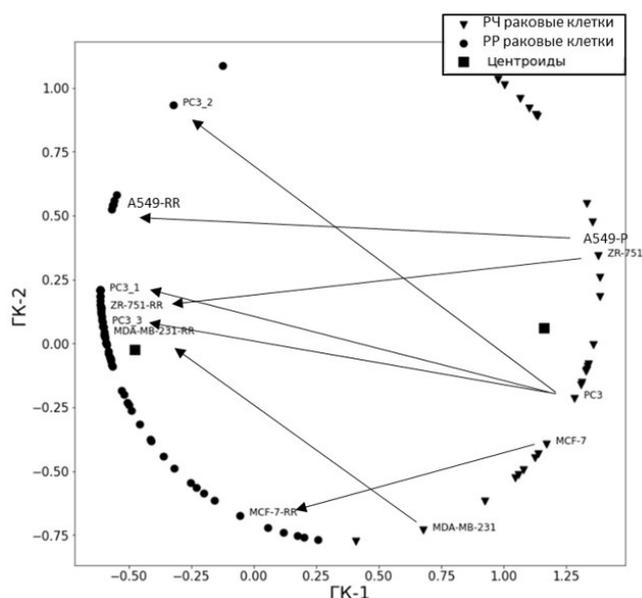


**Рис. 6.** Результаты кластеризации клеточных линий по их радиочувствительности, полученные с применением метода главных компонент и метода кластеризации k-средних. Треугольные и круглые точки соответствуют РЧ и РР клеточным линиям, соответственно. Квадратные точки обозначают центроиды двух кластеров

радиорезистентности клеток, полученным в данном методе, является значение ГК-1, лежащее в области  $-0,5$ , а критерием радиочувствительности – значение ГК-1 в области  $1,15$ . Границу между РЧ и РР кластерами можно определить на уровне ГК-1, равном  $0,3$ .

В исследуемый набор раковых клеток были добавлены клетки с приобретенной радиорезистентностью, индуцированной рентгеновским облучением клеток рака молочной железы MDA-MB-231, MCF-7 и ZR-751 общей дозой  $57$  Гр в течении 12 недель [27] и клеток немелкоклеточного рака легких A549 и H1299, облученных общей дозой  $60$  Гр [30]. В нашем исследовании клетки с приобретенной радиорезистентностью обозначены, соответственно, как MDA-MB-231-RR, MCF-7-RR, ZR-751-RR, A549-RR и H1299-RR. В модель также были включены клетки рака предстательной железы PC3 с радиорезистентностью, приобретенной в результате их выращивания в условиях гипоксии [14]. Радиочувствительные клетки PC3 были выращены при нормоксии ( $20\% \text{ O}_2$ ), при  $7\% \text{ O}_2$  (PC3  $7\% \text{ O}_2$ ) и гипоксии  $0,5\% \text{ O}_2$  (обозначены как PC3-1). Клетки PC3-1 и PC3 ( $7\% \text{ O}_2$ ) были помещены в условия нормоксии для реоксигенации после облучения (обозначены как PC3-2 и PC3-3, соответственно). Результаты применения разработанной модели к классификации клеток с приобретенной резистентностью приведены на рис. 7, где стрелками соединены родительские РЧ клетки и соответствующих им дочерние клетки с приобретенной радиорезистентностью из кластера РР клеток.

В табл. 1 для некоторых клеток приведены несколько наборов  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha/\beta$ , определенных для экспериментальных данных, которые были опубликованы разными группами исследователей. Разброс значений параметров для различных наборов данных, в большинстве случаев, не приводит к неопределенности при классификации этих клеточных линии (HT29, T98G, V79-379A, U87MG и A549). Однако для клеточной линии рака молочной железы T-47D расхождение в определении параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha/\beta$  привело к тому, что разные наборы параметров были отнесены к различным кластерам. Разброс значений параметров, полученных для одной и той же линии клеток в разных экспериментах, может быть связан, например, с различием в источниках ИИ и режимов облучения, использованных в экспериментах ( $^{60}\text{Co}$  или рентгеновские трубки). Различие в экспери-



**Рис. 7.** Результаты кластеризации линий раковых клеток с приобретенной радиорезистентностью в координатах главных компонент ГК-1 и ГК-2. Стрелками соединены родительские РЧ клетки и соответствующие им клетки с приобретенной радиорезистентностью

ментальных данных также может быть обусловлено различной плотностью клеток при проведении клоногенного анализа, что возможно приводит к уменьшению радиочувствительности при высокой плотности клеток [31]. В результате анализа 6 экспериментальных наборов данных клеточная линия глиобластомы T98G была классифицирована как радиорезистентная, хотя экспериментальные данные показали высокое значение  $\alpha/\beta$  со средним значением  $11,6$  Гр.

Валидация разработанной модели была проведена на наборе 12 линий раковых клеток [32, 33], которые не были использованы при обучении модели. В тестовый набор вошли 5 радиорезистентных и 6 радиочувствительных клеточных линий, а также одна клеточная линия (G60) со средней радиочувствительностью. В табл. 2 приведены параметры  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$ , рассчитанные для выбранных клеток. Классификация клеток по их радиочувствительности была выполнена путем преобразования параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  с помощью матрицы **A** МГК, полученной в процессе обучения модели. Применение преобразования **A** параметров выбранных клеток привело к их распределению по кластерам РЧ и РР клеток, которые были найдены при

Таблица 2

Параметры  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  и радиочувствительность, РЧ (1 – РЧ и 0 – РР) клеточных линий, отобранных для валидации модели

Клетки	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$	РЧ
G28 <sup>s</sup>	-0,15	-0,02	7,5	0
G112 <sup>s</sup>	-0,21	-0,01	21	0
G44 <sup>s</sup>	-0,17	-0,03	5,7	0
G62 <sup>s</sup>	-0,2	-0,3	0,7	0
G120 <sup>s</sup>	-0,18	-0,04	4,5	0
G60 <sup>s</sup>	-0,37	-0,02	18,5	0/1
PBH-1 <sup>21</sup>	-0,27	-0,02	13,5	1
1532T <sup>2</sup>	-0,29	-0,02	14,5	1
1535T <sup>2</sup>	-0,29	-0,02	14,5	1
4451 <sup>2</sup>	-0,52	-0,01	52	1
1542N <sup>2</sup>	-0,49	-0,01	49	1
1542T <sup>2</sup>	-0,61	-0,01	61	1

Примечание: Верхними индексами отмечены типы раковых опухолей, которые приведены в табл. 1.

обучении модели (рис. 6). Это позволило правильно классифицировать новый набор клеток по их радиочувствительности.

Общая схема разработанной модели классификации показана на рис. 8, где на верхней панели рисунка представлена схема обучения модели на большом наборе экспериментальных данных по дозовым зависимостям клоногенной выживаемости. На этой стадии определяется расположение кластеров РЧ и РР клеток в пространстве ГК параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$ . В результате обучения модели формируется матрица **A** преобразования набора параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  к их главным компонентам, которая в дальнейшем используется при классификации но-

вых клеточных линий. На нижней панели рис. 8 приведена схема применения разработанной модели к классификации раковых клеток, не вошедших в обучающий набор данных. На этом этапе по экспериментальной дозовой зависимости исследуемой клетки определяются параметры  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$ , после чего производится их преобразование к главным компонентам с помощью матрицы трансформации **A**, полученной на этапе обучения модели. Преобразование **A** переводит параметры исследуемой клетки либо в область кластера РЧ клеток, либо РР клеток, на основе чего делается вывод о ее радиочувствительности. Результаты кластеризации раковых клеток по их радиочувствительности и разработанная статистическая модель могут быть использованы в математических подходах, применяемых в расчетах оптимальных планов лучевой терапии [3–8, 43].

**Распределение мутаций генов в раковых клетках, обладающих различной радиочувствительностью**

С целью исследования генетических механизмов резистентности раковых клеток был выполнен биоинформационный анализ распределения мутаций генов в РЧ и РР раковых клетках, исследованных в работе. Исходные данные по соматическим мутациям были извлечены из баз данных COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk>),

Harmonizome (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome>), DepMap (<https://depmap.org>), GeneCards (<https://www.genecards.org>) и KEGG (<https://www.genome.jp/kegg>). Для анализа бы-

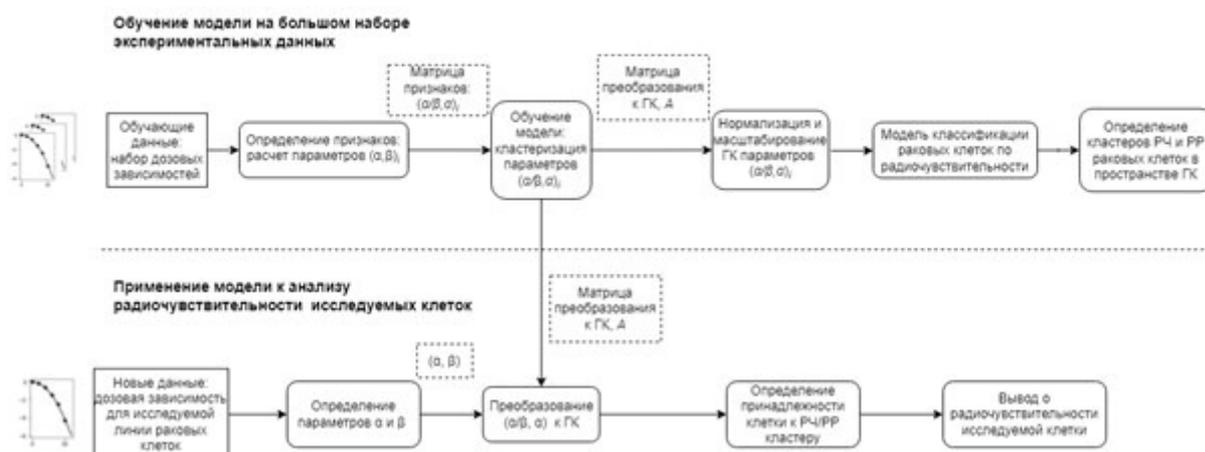
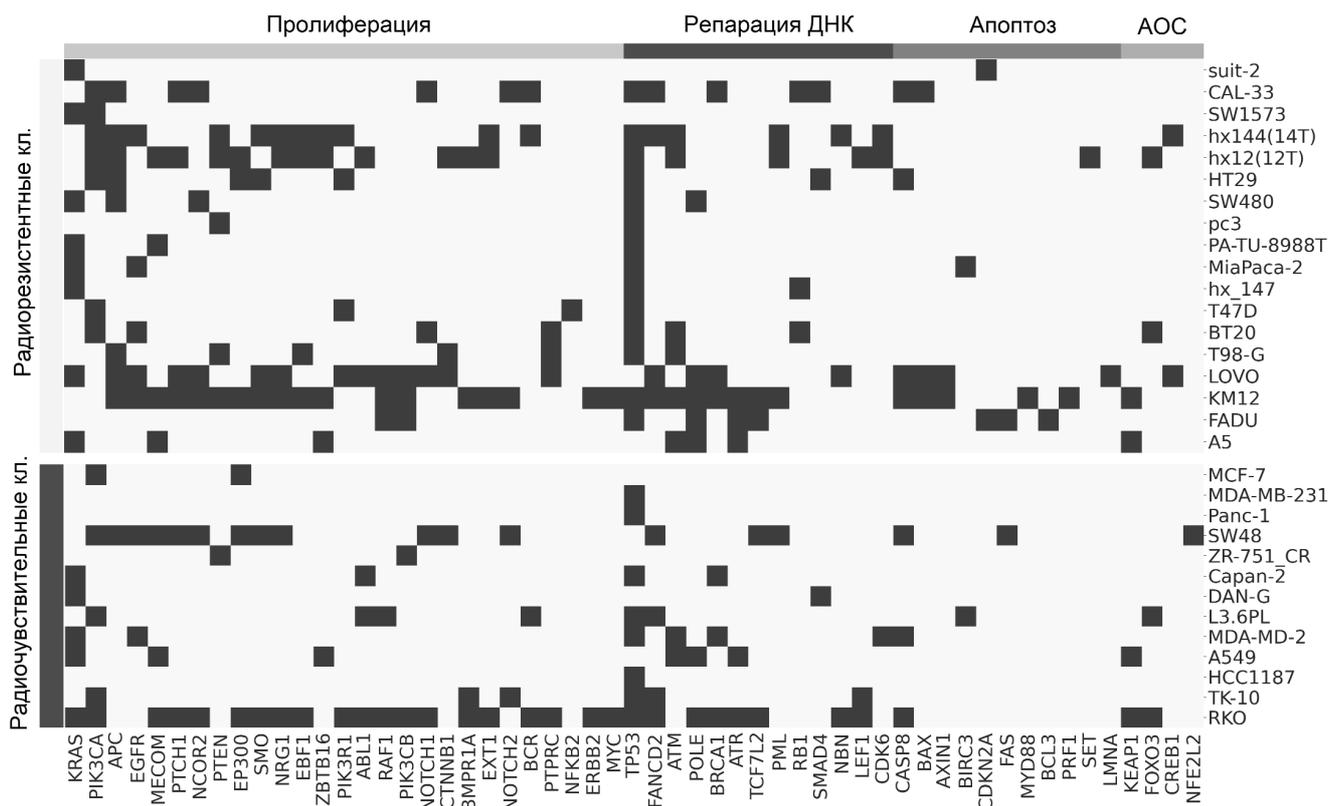


Рис. 8. Схема разработанной модели классификации раковых клеток по их радиочувствительности (верхняя панель) и применения модели к идентификации радиочувствительности раковых клеток, не вошедших в обучающий набор (нижняя панель)



**Рис. 9.** Распределение мутантных генов в линиях раковых клеток, исследованных в данной работе. Выделены группы радиочувствительных и радиорезистентных клеток, определенные в работе. Гены разделены по сигнальным путям, являющимися основными драйверами канцерогенеза: сигнальные пути пролиферации, репарации ДНК, апоптоза и антиоксидантной системы (АОС) защиты клетки

ли отображены гены с повреждающими мутациями (damaging mutations) из раздела DepMap и подтвержденными патогенными мутациями (Census Tier 1) в базе COSMIC. Генетические данные в этих базах данных были найдены для ряда клеток, включенных в настоящее исследование. Полученное распределение мутированных генов для найденного набора клеток представлено на рис. 9. Мутантные гены были разделены на группы, соответствующие основным сигнальным путям, в которых присутствуют гены-драйверы канцерогенеза [2]: сигнальные пути апоптоза, репарации ДНК и пролиферации, а также гены, регулирующие систему антиоксидантной защиты клетки [34]. Отметим, что многие рассмотренные гены участвуют в нескольких сигнальных путях, как, например, ген-онкосупрессор TP53, кодирующий транскрипционный фактор p53, который запускает апоптотическую программу клетки при повреждении ДНК в результате воздей-

ствия радиации, а также регулирует клеточный цикл деления клеток.

В проведенном анализе были выявлены основные драйверные мутации канцерогенеза в онкогенах, генах-онкосупрессорах и протоонкогенах в сигнальном пути пролиферации PI3K/ERK (PIK3CA, KRAS, PTEN, ERBB2 (HER2), RAF и др.), в сигнальном пути репарации ДНК (TP53, ATM, ATR, BRCA1, RB1 и др.) и в системе апоптоза клетки (BCL, BAX, CASP и др.). Также мы выделили группу генов, которые ответственны за активацию антиоксидантной системы клетки, находящейся под управлением транскрипционного фактора NRF2 [35]. Как установлено в экспериментальных и клинических исследованиях, при лучевой терапии происходит активация NRF2 антиоксидантной системы раковых клеток, сопровождающаяся экспрессией большого числа антиоксидантных ферментов [36]. В данном наборе клеток были обнаружены мутации как в самом гене транс-

крипционного фактора NRF2 (NFE2L2), так и в генах, кодирующих белки, которые участвуют в его активации (KEAP1, FOXO3 и CREB1).

Как видно из диаграммы, приведенной на рис. 9, большинство из указанных мутаций встречаются как РЧ, так и в РР клетках. Например, мутация в гене-онкосупрессоре TP53 представлена почти во всех клетках данного набора. Мутация в гене-онкосупрессоре BRCA1, который играет важную роль в контроле гомологической рекомбинации при ДНК репарации, обнаружена как РЧ, так и в РР клетках. Можно также отметить, что мутации генов-онкосупрессоров PTEN, APC, RB1 и рецептора EGFR встречаются чаще в РР клетках.

Обращают на себя внимание клетки рака толстой кишки RKO и KM12, которые имеют большое количество общих мутаций (>60 %) во всех перечисленных сигнальных путях, но которые, в то же время, существенно отличаются по радиочувствительности (см. табл. 1): RKO относится к РЧ клеткам ( $\alpha/\beta=18,7$  Гр), а KM12 – радиорезистентная линия ( $\alpha/\beta<0,1$  Гр). В РР клетках KM12 в дополнение к общим мутациям присутствует мутация гена-супрессора APC, кодирующего белок APC, принадлежащий к WNT/ $\beta$ -катениновому сигнальному пути. Мутация гена APC характерна не только для клеток рака толстой кишки: она была обнаружена у 44 % РР клеток и у 1 % РЧ клеток, вошедших в наше исследование. Также мутация гена AXIN1, который кодирует белок, входящий комплекс деструкции  $\beta$ -катенина в том же сигнальном пути, является отличием RKO и KM12 клеток рака толстой кишки. Анализ частоты мутаций также показал, что мутации в генах PTEN и ATM встречаются в 3 раза чаще в РР, чем в РЧ клетках.

С целью разделения мутантных генов в РР и РЧ клетках была построена диаграмма Венна (рис. 10), где выделены мутации общие и специфические для обеих групп. Видно, что в исследованном наборе раковых клеток мутаций в группе РР клеток гораздо больше, чем РЧ клетках. Среди них присутствуют такие гены как BAX, BCL3, CREB1, NFKB2, PDGFRB, PPP2R1A, REL, SRC, IDH1, FGFR4 и другие, многие из которых являются онкогенами или генами-онкосупрессорами.



**Рис. 10.** Диаграмма Венна, показывающая общие и специфические мутантные гены в радиочувствительных (слева) и радиорезистентных (справа) раковых клетках, включенных в данное исследование

## Обсуждение

В настоящей работе разработан статистический метод определения радиочувствительности раковых клеток с применением машинного обучения. Метод заключается в кластеризации параметров зависимости выживаемости раковых клеток от дозы ИИ и выделения кластеров РЧ и РР раковых клеток. Для определения параметров выживаемости клеток экспериментальные данные доза–эффект были аппроксимированы с помощью уравнения ЛК модели, применяющейся в радиобиологии для описания поражающего действия ИИ. В процесс обучения статистической модели были включены опубликованные экспериментальные данные для 96 клеточных линий рака.

Для классификации раковых клеток по их радиочувствительности использованы два параметра ЛК модели: отношение  $\alpha/\beta$ , которое обычно используется для разделения клеток по их радиочувствительности, и параметр  $\alpha$ , который определяет радиочувствительность в области низких доз. Результаты анализа показали, что выбор двух характеристик РЧ позволяет более надежно разделить РЧ и РР клетки по сравнению с использованием одного параметра  $\alpha/\beta$ .

В результате применения модели к обучающему набору данных достигнуто надежное разделение РЧ и РР клеток по двум кластерам. Валидация разработанной статистической модели и тестирование ее предсказательной способности показало высокий уровень дискриминации РЧ и РР клеток. Определение кластеров РЧ и РР раковых клеток на основе обученной статистической модели позволяет надежно определять радиочувствительность линий ра-

ковых клеток, не вошедших в обучающий набор и подлежащих исследованию.

Большие вариации параметров  $\alpha$  и  $\beta$ , полученные в расчетах для различных клеточных линий, говорит о том, что оба параметра определяют не только вероятность начального поражения молекул ДНК при действии ИИ, слабо зависящей от типа клеток, но и отражают многие молекулярные процессы, индуцируемые в клетке под действием ИИ, которые существенно зависят от типа клеток. К таким процессам относятся клеточная гибель (апоптоз и некроз), репарация ДНК и активация антиоксидантной системы защиты клетки при возрастании уровня активных форм кислорода при действии ИИ. Все эти процессы определяют выживаемость клеток и существенно зависят от генотипа и фенотипа раковых клеток.

Как видно из полученных данных (табл. 1 и рис. 3) вариации параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha/\beta$  наблюдаются в различных клетках раковых опухолей определенных органов, что ведет к гетерогенности опухолей по их радиочувствительности. Это существенным образом влияет на результаты РТ и ведет к необходимости разработки и применения нетрадиционных режимов лучевой терапии, в частности, гипофракционирования.

Проведенный анализ точности аппроксимации кривых выживаемости и ошибок в определении коэффициентов ЛК модели (табл. 1) показал, что параметр  $\alpha/\beta$  может быть определен с большой погрешностью (до 20 %), что может привести к ошибкам при его дальнейшем использовании, например, при вычислении изоэффективной и биологической эффективной доз с использованием отношения  $\alpha/\beta$  [37]. По нашим данным, для достижения максимальной точности в определении параметров  $\alpha$  и  $\beta$ , а также отношения  $\alpha/\beta$  следует измерять дозовую зависимость выживаемости  $S(D)$  до максимальной дозы  $D_{\max} = 10 \text{ Гр} - 16 \text{ Гр}$ . Уменьшение точности в определении параметров  $\alpha$  и  $\beta$  в зависимости от интервала дозы было также отмечено при фитировании кривых выживаемости ряда раковых клеток [38]. Было показано, что включение в фитинг данных при низких дозах до 2 Гр существенно уменьшает точность аппроксимации по критерию  $\chi^2$  по сравнению с высокой точностью в области доз 4–16 Гр, что согласуется с нашими данными по анализу 140 линий раковых клеток (см. рис. 2). Как предполагается, ошибка при описания экспериментальных данных ЛК моделью связана с

аномальным поведением дозовой зависимости в области низких доз ( $< 0,3 \text{ Гр}$ ), где наблюдается гиперчувствительность многих раковых клеток, которая не описывается ЛК моделью.

При валидации разработанной статистической модели были выбраны раковые клетки, которые не входили в набор данных, использованный при обучении модели. Классификация клеток по их радиочувствительности была выполнена путем преобразования параметров  $\alpha/\beta$  и  $\alpha$  к их главным компонентам с помощью матрицы преобразования МГК **A**, которая переводит параметры исследованных клеток в области, соответствующие кластерам РЧ и РР клеток в пространстве ГК1 и ГК2. Этот подход позволил правильно классифицировать новый набор клеток по их радиочувствительности (табл. 2). Схема возможного применения разработанной модели приведена на нижней панели на рис. 8.

Трансляция полученных результатов на *in vivo* данные по действию ИИ на раковые опухоли и применение ее к прогнозированию результатов лучевой терапии требует дальнейшего развития модели. Во-первых, значения параметров  $\alpha$  и  $\beta$  существенно зависят не только от типа раковых клеток, но и от условий, в которых раковая опухоль растет, в частности, они зависят от уровня снабжения опухоли кислородом, иммунного ответа, и других факторов. Обычно *in vitro* эксперименты по клоногенной выживаемости раковых клеток проводятся при 20 % кислорода, в то время как концентрация кислорода в опухоли значительно ниже и лежит в области 8 % при нормоксии и может опускаться до 5–0 % при гипоксии и аноксии [39]. Как было показано в наших расчетах, у клеток, выращенных в условиях гипоксии (5 %  $O_2$ ), существенно уменьшаются значения параметров  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha/\beta$  по сравнению с клетками, выращенными при нормоксии (см. табл. 1 и рис. 7), что подтверждает хорошо известный факт уменьшения радиочувствительности клеток при гипоксии [39, 40]. Один из методов учета клеточного уровня кислорода в рамках ЛК модели состоит в перенормировке параметров  $\alpha$  и  $\beta$  путем введения коэффициентов, учитывающих уровень кислорода в клеточной среде [41]. В общем случае описание влияния гипоксии на радиочувствительность клеток выходит за рамки ЛК модели, и зависимость параметров  $\alpha$  и  $\beta$  от концентрации кислорода в клеточной среде свидетельствует о связи фенотипа раковой клетки (отклика клетки действие ИИ) и

ее генотипа, который определяется уровнем экспрессии генов при гипоксии в области раковой опухоли [42].

Изменение параметров  $\alpha$  и  $\beta$  в ЛК модели было также обнаружено у клеток рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и ZR-751 после их длительного облучения, которое привело к приобретенной радиорезистентности у изначально радиочувствительных дочерних клеток [27]. Применение разработанной модели к классификации этих клеток показало, что положения параметров дочерних клеток сдвигаются из кластера РЧ клеток в кластер РР клеток (рис. 7).

На основании проведенного анализа линий раковых клеток с приобретенной радиорезистентностью можно предположить, что многие клетки, принадлежащие кластеру РЧ клеток, сместились бы в область кластера РР клеток при изменении инкубационных условий и действий внешних факторов. Изменение параметров  $\alpha$  и  $\beta$  при различных условиях внеклеточной среды является общей проблемой применения ЛК модели и трансляции *in vitro* данных по клоногонной выживаемости клеток к предсказанию радиочувствительности опухоли *in vivo*, которая определяется многими процессами в микроокружении опухоли, включающими васкуляризацию опухоли, степень иммунного ответа, эпителиально-мезенхимальный переход и др., что не учитывается в ЛК модели [40]. Более того, параметры  $\alpha$  и  $\beta$  ЛК модели не только характеризуют определенную раковую клетку и ее микроокружение, но и существенно зависят от типа ионизирующего излучения, воздействующего на клетку. Результаты экспериментов с ионными пучками показали, что радиочувствительность клеток возрастает по сравнению с использованием гамма-излучения. Это отражается в существенном увеличении параметров  $\alpha$ ,  $\alpha/\beta$  и относительной биологической эффективности (RBE), а также в появлении их зависимости от ЛПЭ [43].

Несмотря на указанные проблемы, ЛК модель успешно применяется для выбора изоэффективных доз, разовых очаговых доз и разработки нетрадиционных режимов фракционирования в лечебных планах. В частности, данные ЛК модели используются при выборе режимов гипофракционирования, которые показали терапевтическое преимущество по сравнению с конвенциональным фракционированием. Например, применение гипофракционирования с подведением к опухоли высо-

ких разовых очаговых доз для пациентов с раком предстательной железы, обладающим низким значением  $\alpha/\beta$  (1 Гр – 1,7 Гр), показало более высокую терапевтическую эффективность РТ в режиме дозой нагрузки 33,5 Гр, подведенных за 5 фракций, что является биологическим эквивалентом 78 Гр в режиме конвенционального фракционирования [44]. Также параметр  $\alpha/\beta$  был использован для определения оптимального уровня изоэффективных доз и разовой очаговой дозы в планах лечения пациентов с глиобластомой [7].

С целью исследования генетических механизмов резистентности раковых клеток в данной работе был выполнен биоинформационный анализ распределения мутаций генов в РЧ и РР раковых клетках, включенных в данную работу. Хотя в настоящее время результаты подобных исследований не привели к определению надежных маркеров для прогнозирования радиорезистентных фенотипов раковых опухолей, тем не менее, они позволили выяснить основные механизмы радиорезистентности. На основе полученных результатов ведутся разработки генетических биомаркеров РР с целью создания персонализированных планов лечения пациентов с учетом данных генетической диагностики [1, 15, 33].

В генетический анализ нами были включены основные драйверные мутации канцерогенеза в онкогенах, генах-онкосупрессорах и протоонкогенах в сигнальных путях клеточной пролиферации, репарации поврежденных молекул ДНК, а также в системе апоптоза и антиоксидантной системы защиты клетки [2]. Как предполагается, многие выделенные мутации отвечают за возникновение РР в различных типах раковых опухолей. Построенные диаграммы распределения мутаций в РЧ и РР клетках (рис. 9 и 10) показали, что большинство из указанных мутаций встречается как РЧ, так и в РР клетках. Например, мутации гена-онкосупрессора TP53, кодирующего белок p53, который является одним из основных драйверов онкогенеза, представлен почти во всех клетках данного набора независимо от их радиочувствительности. Таким образом, онкомутации могут приводить как к высокой РЧ, так и к РР. Это подтверждают также эксперименты по длительному облучению ИИ раковых клеток, в результате которого были получены клоны с различной радиочувствительностью [45].

Сравнение двух клеточных линий рака толстой кишки RKO и KM12, несущих большое

количество общих мутаций (>60 %), но принадлежащих различным кластерам, показало, что мутация гена APC встречается намного чаще в РР, чем в РЧ клетках, вошедших в наше исследование. Ген-онкосупрессор APC кодирует белок APC из WNT/ $\beta$ -катенинового сигнального пути, дерегуляция которого ведет к канцерогенезу, активируя пролиферацию клеток и эпителиально-мезенхимальный переход. Проведенные экспериментальные исследования показали существенную роль WNT/ $\beta$ -катенинового сигнального пути в приобретении радиорезистентности раковыми клетками с мутациями генов белков в этом сигнальном пути [46]. Предполагается, что ингибирование этого пути может привести к радиосенсибилизации раковой опухоли и подавлению радиорезистентности [47]. В биоинформационном анализе нами также были выделены большое количество мутаций, специфических для РР клеток, которые могут быть ответственны за появление клеточных линий, устойчивых к действию ИИ.

Проведенная в данной работе радиофенотипическая классификация раковых клеток на основе их радиочувствительности может быть использована в совместном анализе фенотипических и генотипических особенностей раковых клеток с целью выяснения молекулярных и генетических механизмов радиочувствительности и определения биомаркеров радиорезистентности с целью поиска методов подавления РР и разработки персонализированных планов лечения онкопациентов на основе данных молекулярной диагностики.

## Заключение

Дальнейшее развитие данной статистической модели будет сфокусировано на исследовании кластера радиорезистентных раковых клеток и учете в модели факторов, приводящих к увеличению радиочувствительности раковых клеток. Как отмечалось выше, параметры  $\alpha$  и  $\beta$  ЛК модели существенно зависят от многих факторов, включая тип подведенного ионизирующего излучения (фотонные или ионные пучки), уровень кислорода в инкубационной среде, развитие радиорезистентности при длительном действии ИИ и др. Учет этих факторов в модели будет заметно изменять области кластеров РЧ и РР клеток, а также приводить к уменьшению размеров кластера РР клеток при радиосенсибилизации раковых клеток и подав-

лению РР. Предполагается включить в модель данные современных радиобиологических и клинических исследований по радиосенсибилизации раковых опухолей, которые сегодня ведутся по многим направлениям, включая разработку нетрадиционных планов лучевой терапии с учетом радиочувствительности раковых опухолей, широкого внедрения ионных пучков с различными значениями ЛПЭ, комбинации РТ с химио-, иммуно- и таргетными терапиями, а также разработку и внедрение методов сенсибилизации раковых опухолей за счет модуляции микроокружения опухоли, например, путем ее реоксигенации. Систематизация результатов этих исследований в единой статистической модели может быть использована при разработке эффективных комбинационных стратегий в радиотерапии, ведущих к усилению радиочувствительности и подавлению радиорезистентности злокачественных новообразований у онкопациентов.

## Список литературы

- Каприн А.Д., Костин А. А., Хмелевский Е.В. Стандарты лучевой терапии. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2023. <https://www.labirint.ru/books/688754/?ysclid=lt8h3a36j1222611829>.  
Kaprin A.D., Kostin A.A., Khmelevsky E.V. Standards of radiation therapy. Moscow: GEOTAR-Media; 2023 (In Russ.).
- Meehan J, Gray M, Martınez-Pırez C, Kay C, Pang LY, Fraser JA, и др. Precision Medicine and the Role of Biomarkers of Radiotherapy Response in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020; 10: 628.
- Беляшова А.С., Галкин М.В., Антипина Н.А., Павлова Г.В., Голанов А.В. Использование клеточных культур для оценки радиорезистентности глиобластом. *Вопросы нейрохирургии.* 2022; 86 (5): 126-32.  
Belyashova AS, Galkin MV, Antipina NA, Pavlova GV, Golanov AV. Cell cultures in assessing radioresistance of glioblastomas. 2022; 86 (5): 126-32 (In Russ.).
- McMahon SJ. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Phys Med Biol.* 2018;64(1):01TR01.
- Столбовой А.В., Залялов И.Ф. Радиобиологические модели и клиническая радиационная онкология. *Онкология Журнал им ПА Герцена.* 2016; 5 (6): 88. [2024, № 1](http://www.medias-</a></li>
</ol>
</div>
<div data-bbox=)

- phera.ru/issues/onkologiya-zhurnal-im-p-agertsena/2016/6/downloads/ru/12305218X2016061088.
- Stolbovoy AV, Zalyalov IF. Radiobiological models and clinical radiation oncology. *Onkol Z im PA Gercena*. 2016; 5 (6): 88 (In Russ.).
6. Warkentin B, Stavrev P, Stavreva N, Field C, Fallone BG. A TCP-NTCP estimation module using DVHs and known radiobiological models and parameter sets. *J Appl Clin Med Phys*. 2004; 5 (1): 50-63.
  7. Даценко П., Чуругев А, Герасимов В., Беликова А., Каприн А. Оптимальные уровни изоэффективных доз для двух режимов фракционирования при глиобластоме. *Медицинская физика*. 2023; (3): 5-13.  
Datsenko P, Chuguev A, Gerasimov V, Belikova A, Kaprin A. Optimal Levels of Isoeffective Doses for Two Fractionation Modes in Glioblastoma. *Medical Physics*. 2023; (3): 5-13 (In Russ.).
  8. Клеппер ЛЯ, Гладиллина ИА, Ушкова ВЛ, Козлов ОВ, Высоцкая ИВ. Применение синтезированной математической модели для описания вероятности излечения ранних стадий рака молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2015; 11 (2): 59-67.  
Klepper LYa, Gladilina IA, Ushkova VL, Kozlov OV, Vysotskaya IV. The use of a synthesized mathematical model to describe the probability successful therapy of early breast cancer stages. *Tumors of the Female Reproductive System*. 2015; 11 (2): 59-67 (In Russ.).
  9. Huynh E, Hosny A, Guthier C, Bitterman DS, Petit SF, Haas-Kogan DA, et al. Artificial intelligence in radiation oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020; 17 (12): 771-81.
  10. Unkel S, Belka C, Lauber K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiat Oncol*. 2016; 11 (1): 11.
  11. Majd Wannouss, Gleb G. Golyshev, Alexey N. Goltsov. Classification of cancer cell lines on their radiosensitivity by machine learning. *Annals of Biostatistics & Biometric Applications*. 2023; 5(2): 2023.
  12. Айвазян СА, Бухштабер ВМ, Енюков ИС, Мешалкин ЛД. Прикладная статистика: классификация и снижение размерности. *Финансы и статистика Москва*; 1989. 608 с. <https://istina.msu.ru/publications/book/5671301/>.
  - Ayvazyan SA, Buchstaber VM, Enyukov IS, Meshalkin L. D. *Applied Statistics: Classification and Dimensionality Reduction*. 1989 (In Russ.).
  13. Анфёров МА. Генетический алгоритм кластеризации. *Российский технологический журнал*. 2020; 7 (6): 134-50.  
Anferov MA. A genetic clustering algorithm. *Russian Technological Journal*. 2020 January 10; 7 (6): 134-50 (In Russ.).
  14. McMullan T, Meehan J, Langdon S, McLaren DB, McLaughlin S, Nailon WH. EP-2162 Applying the Linear Quadratic Model to PC-3 cells irradiated under different O<sub>2</sub> conditions. *Radiotherapy and Oncology*. 2019; 133: S1195.
  15. Polgar S, Schofield PN, Madas BG. Datasets of *in vitro* clonogenic assays showing low dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance. *Scientific Data*. 2022; 9 (1): 555.
  16. Braselmann H, Michna A, Heß J, Unger K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol*. 2015; 10 (1): 223.
  17. Menegakis A, Yaromina A, Eichele W, Doerfler A, Beuthien-Baumann B, Thames HD, et al. Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by  $\gamma$ H2AX staining. *Int J Radiat Biol*. 2009; 85 (11): 1032-41.
  18. Franken NAP, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, et al. Cell survival and radiosensitisation: Modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model. *International Journal of Oncology*. 2013; 42 (5): 1501-15.
  19. Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: Implications for a role of NF- $\kappa$ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 50 (1): 183-93.
  20. Dunne AL, Price ME, Mothersill C, McKeown SR, Robson T, Hirst DG. Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2003; 89 (12): 2277-83.
  21. Park C, Papiez L, Zhang S, Story M, Timmerman RD. Universal Survival Curve and Single Fraction Equivalent Dose: Useful Tools in Understanding Potency of Ablative Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 70 (3): 847-52.
  22. Gupta N, Lamborn K, Deen DF. A Statistical Approach for Analyzing Clonogenic Survival Data. *Radiat Research*. 1996; 145 (5): 636.

23. Brix N, Samaga D, Hennel R, Gehr K, Zitzelsberger H, Lauber K. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiat Oncol.* 2020; 15 (1): 248.
24. Li S, Miyamoto C, Wang B, Giaddui T, Micaily B, Hollander A, и др. A unified multi-activation (UMA) model of cell survival curves over the entire dose range for calculating equivalent doses in stereotactic body radiation therapy (SBRT), high dose rate brachytherapy (HDRB), and stereotactic radiosurgery (SRS). *Med Phys.* 2021; 48 (4): 2038-49.
25. Short SC, Woodcock M, Marples B, Joiner MC. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 2003; 79 (2): 99-105.
26. Van Der Maazen RWM, Kleiboer BJ, Verhagen I, Van Der Kogel AJ. Repair Capacity of Adult Rat Glial Progenitor Cells Determined by an in Vitro Clonogenic Assay after in Vitro or in Vivo Fractionated Irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1993; 63 (5): 661-6.
27. Gray M, Turnbull AK, Ward C, Meehan J, Martinez-Perez C, Bonello M, et al. Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. *Radiat Oncol.* 2019; 14 (1): 64.
28. Schaefer J, Bachtler J, Engling A, Little JB, Weber KJ, Wenz F. Suppression of Apoptosis and Clonogenic Survival in Irradiated Human Lymphoblasts with Different TP53 Status. *Radiation Research.* 2002; 158 (6): 699-706.
29. Speers C, Zhao S, Liu M, Bartelink H, Pierce LJ, Feng FY. Development and Validation of a Novel Radiosensitivity Signature in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21 (16): 3667-77.
30. Pustovalova M, Alhaddad L, Smetanina N, Chigasova A, Blokhina T, Chuprov-Netochin R, et al. The p53-53BP1-Related Survival of A549 and H1299 Human Lung Cancer Cells after Multifractionated Radiotherapy Demonstrated Different Response to Additional Acute X-ray Exposure. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (9): 3342.
31. Chignola R, Sega M, Molesini B, Baruzzi A, Stella S, Milotti E. Collective radioresistance of T47D breast carcinoma cells is mediated by a Syncytin-1 homologous protein. *PLoS One.* 2019; 14 (1): e0206713.
32. Brenner DJ, Sachs RK, Peters LJ, Withers HR, Hall EJ. We Forget at Our Peril the Lessons Built into the  $\alpha/\beta$  Model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012; 82 (4): 1312-4.
33. Akudugu JM, Theron T, Serafin AM, Vчm L. Influence of DNA double-strand break rejoining on clonogenic survival and micronucleus yield in human cell lines. *Int J Radiat Biol.* 2004; 80 (2): 93-104.
34. Омельчук ЕП, Кутилин ДС, Димитриади СН, Гусарева МА, Тимошкина НН. Молекулярно-генетические аспекты радиорезистентности рака предстательной железы. *Бюллетень сибирской медицины.* 2021; 20 (3): 182-92.  
Omelchuk EP, Kutilin DS, Dimitriadi SN, Gusareva MA, Timoshkina NN. Molecular genetic aspects of radioresistance of prostate cancer. *Bulletin of Siberian Medicine,* 2021; 20 (3) (In Russ.).
35. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Frontiers in Oncol.* 2017;7. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2017.00085>.
36. McDonald JT, Kim K, Norris AJ, Vlashi E, Phillips TM, Lagadec C, et al. Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Res.* 2010; 70 (21): 8886-95.
37. Wang CKC. The progress of radiobiological models in modern radiotherapy with emphasis on the uncertainty issue. *Mutation Research/Rev Mutation Res.* 2010; 704 (1): 175-81.
38. Garcia LM, Leblanc J, Wilkins D, Raaphorst GP. Fitting the linear-quadratic model to detailed data sets for different dose ranges. *Phys Med Biol.* 2006; 51 (11): 2813-23.
39. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15 (7): 409-25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26105538/>.
40. Jeong J, Oh JH, Sonke JJ, et al. Modeling the Cellular Response of Lung Cancer to Radiation Therapy for a Broad Range of Fractionation Schedules. *Clin Cancer Res.* 2017; 23 (18): 5469-79.
41. Yang L, West CM. Hypoxia gene expression signatures as predictive biomarkers for personalising radiotherapy. *Br J Radiol.* 2019; 92 (1093): 20180036.
42. Solovov A, Troshina M, Pikalov V, Saburov V, Chernukha A, Moiseev A, et al. *In vitro* modified microdosimetric kinetic model-based predictions for B14-150 cells survival in 450 MeV/u carbon ion beam with aluminum ridge filter for biologically optimized spread-out

- Bragg peak. Biomed Phys Eng Express. 2022; 8 (3).
43. Зинькович МС, Максимов АЮ, Розенко ЛЯ, и др. Радиорезистентность как фактор эволюции лучевой терапии рака предстательной железы. Современные проблемы науки и образования. 2019; (2). <https://istina.msu.ru/publications/article/584667201/?ysclid=lqf5suyonn316723887>. Zinkovich MS, Maksimov AY, Rozenko LY, et al. Radioresistance as a factor in the evolution of radiation therapy for prostate cancer. Modern Problems of Science and Education, 2019, 2 (In Russ.).
44. Wang J, Hu L, Gupta N, Shamseldin T, Ozawa T, Klem J, et al. Induction and Characterization of Human Glioma Clones With Different Radiosensitivities. Neoplasia. 1999; 1 (2):138-44.
45. Zhao Y, Tao L, Yi J, Song H, Chen L. The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance. Cell Physiol Biochem. 2018; 48 (2): 419-32.
46. Alberti C. Prostate cancer: radioresistance molecular target-related markers and foreseeable modalities of radiosensitization. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014; 18 (16): 2275-82.