## ПРОБЛЕМА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ПОДХОДЫ К ЕЕ РЕШЕНИЮ

## П.Н. Лобачевский

Государственный университет «Дубна» Объединенный институт ядерных исследований

E-mail: lobachevsky@jinr.ru

У небольшой части пациентов, проходящих радиотерапию злокачественных опухолей, развиваются тяжелые побочные эффекты как следствие присущей им радиочувствительности. Прогнозирование таких эффектов до начала лучевой терапии позволило бы их избежать и повысить эффективность лечения. Поэтому разработка подходов для предсказания индивидуальной радиочувствительности является важной задачей как экспериментальной, так и клинической радиобиологии. В настоящей работе изложены результаты экспериментального исследования, посвященного разработке критериев радиочувствительности на основе измерения кинетики маркера үH2AX, отражающего возникновение и репарацию радиационно-индуцированных повреждений ДНК.

Ключевые слова: радиотерапия, индивидуальная радиочувствительность, побочные эффекты, функциональный тест, повреждения ДНК, репарация, уH2AX-фокусы

Несмотря на постоянное совершенствование методов лучевой терапии рака, ее успешный исход в значительной мере ограничен невозможностью точно идентифицировать до начала лечения тех пациентов, у которых возможно возникновение тяжелых побочных эффектов лучевой терапии вследствие присущей им повышенной радиочувствительности. В современной практике лучевой терапии рака выбор дозы облучения в основном базируется на клинически определенной переносимости нормальных тканей в поле облучения. Эти дозы эмпирически подобраны таким образом, чтобы ограничить долю пациентов, у которых возникнут серьезные побочные реакции, примерно 1-5 % случаев. Таким образом, эта небольшая подгруппа диктует дозу лучевой терапии для всех пациентов. Выявление лиц с повышенной радиочувствительностью до начала лучевой терапии позволило бы применить индивидуальный подход лечения в радиационной онкологии.

Для разработки предикторов радиочувствительности использовались разнообразные подходы. Одним из таких подходов является определение индивидуальной радиочувствительности, основанное на измерении эффективности репарации повреждений ДНК. В радиобиологии общепринятым считается положение о том, что ДНК является главной мишенью в клетке при облучении, и повреждения ДНК ответственны за большинство радиационно-индуцированных клеточных эффектов. Принимая во внимание, что репарация повреждений ДНК представляет собой один из важнейших процессов, определяющих выход повреждений ДНК, эффективность этого процесса в значительной мере определяет радиочувствительность клеток и тканей. Современные методы иммунофлуоресценции и флуоресцентной микроскопии позволяют регистрировать в клетке структуры, ассоциированные с одним из наиболее критических повреждений ДНК — двунитевыми разрывами (ДР). Таковым

является так называемый  $\gamma$ H2AX-метод, заключающийся в идентификации и подсчете в клеточном ядре флуоресцентных фокусов. Такие фокусы образуются при связывании меченых флуоресцентным красителем антител с фосфорилированным гистоном H2AX ( $\gamma$ H2AX), который образуется вследствие и в местах образования ДР ДНК [1,2]. Данный метод получил широкое распространение в радиобиологии благодаря способности быстро регистрировать радиационно-индуцированные ДР ДНК на уровне отдельных клеток, определять их количество и дозовую зависимость, а также исследовать кинетику и эффективность репарации этих повреждений [3].

Учитывая достоинства этого подхода, многочисленные исследования были посвящены разработке функционального теста на основе уН2АХ-метода для определения и предсказания индивидуальной радиочувствительности у онкологических пациентов, проходящих курс лучевой терапии [4-8]. Эти исследования не позволили сделать однозначного вывода о прогностической эффективности уН2АХ-метода, однако они представляют ценную информацию в плане выбора пациентов, экспериментальных условий, количественных критериев радиочувствительности и аналитических методов для дальнейшего совершенствования этого подхода. Опираясь на эту информацию, было проведено клиническое и экспериментальное исследование, имеющее целью разработку подхода для определения индивидуальной радиочувствительности, участником которого являлся и автор настоящей работы [9]. Этот подход основан на измерении эффективности репарации повреждений ДНК и включающего аналитический метод и формулировку количественных показателей для прогнозирования повышенной радиочувствительности.

В качестве функционального теста использовали подход, основанный на подсчете количества γH2AX-фокусов в ех vivo облученных лимфоцитах крови пациентов. Образцы облучали в дозах 0.5, 1.0 и 2.0 Гр и для подсчета γH2AX-фокусов использовали образцы, зафиксированные в разные интервалы времени после облучения (от 1 до 24 часов), предполагая, что кинетика элиминации γH2AX-фокусов со временем отражает кинетику репарации ДР ДНК. Анализ изображений флуоресцентной микроскопии, включая идентификацию клеточных ядер и фокусов, проводили с использованием программного обеспечения JQuantPro, специально разработанного для этих целей [10]. Для выработки количественных показателей эффективности репарации кинетику γH2AX-фокусов аппроксимировали с помощью следующей формулы:

$$N(t) = N_m ((1 - Q)e^{-Rt} + Q), \qquad 1$$

где N(t) — среднее количество фокусов на клетку в момент времени t;  $N_m$  максимальное количество фокусов; Q — доля необратимого компонента (нерепарабельных повреждений); R — скорость репарации. Данная формула неявно предполагает, что репарация ДР ДНК происходит по экспоненциальному закону со скоростью R, при этом присутствуют нерепарабельные повреждения, доля которых составляет Q. При этом предполагается, что показателями высокой радиочувствительности являются высокие значения параметра Q (необратимый компонент) и низкие значения R (скорость репарации).

Для экспериментального исследования кинетики γH2AXфокусов в лимфоцитах крови была ретроспективно выбрана группа из 15 пациентов, у которых возникли тяжелые острые осложнения вследствие лучевой терапии (радиочувствительная группа — РГ), и для каждого из этих пациентов был выбран соответствующий по полу, возрасту, локализации опухоли и режиму лучевой терапии пациент без пост-лучевых осложнений (контрольная группа — КГ).

На рис. 1 представлена усредненная по каждой группе пациентов кинетика уН2АХ-фокусов в лимфоцитах крови, облученных ex vivo и зафиксированных в разное время после облучения. Экспериментальные точки представляют собой среднее значение и стандартную ошибку для каждой группы пациентов (РГ — открытые символы, пунктирная линия, КГ — закрытые символы, сплошная линия). Кривые представляют результат нелинейной регрессии по формуле 1, предполагая общие значения параметров Q и R для всех доз облучения. Получены следующие значения параметра Q: 0.228±0.013 и 0.134±0.007 для РГ и КГ групп соответственно, p=0.00002; параметра R: 0.192±0.016 and 0.226±0.011 для РГ и КГ групп соответственно, p=0.06. Визуальный анализ результатов и сравнение значений параметров указывает на различие средне-групповых показателей, причем, как и ожидалось, необратимый компонент кинетики в группе РГ статистически значимо превышает таковой в группе КГ. Кроме того, наблюдается тенденция к меньшей скорости репарации в группе РГ, хотя различия не являются статистически значимыми.



Рис.1. Кинетика үH2AX-фокусов в лимфоцитах крови, облученных в дозах 0.5 (A), 1.0 (Б) и 2.0 (В) Гр

Для дальнейшего анализа с целью выбора показателя для дискриминации пациентов двух групп величины параметров Q и R были рассчитаны для каждого пациента индивидуально. На рис. 2 (А и Б) приведены графики рассеяния индивидуальных для каждого пациента величин параметров Q и R в группах КГ (n = 10) and РГ (n = 15). Средние значения и их стандартное отклонения равны: для Q 0.081±0.009 и 0.177±0.027 для КГ и РГ групп соответственно, p=0.0093; для R 0.247±0.017 and 0.232±0.029 для КГ и РГ групп соответственно, p=0.70.

Первоначальный анализ этих величин параметров Q и R включал их попарное сравнение для каждой пары пациентов – пациент из РГ и соответствующий ему контрольный пациент из КГ. Из 14 пар в 12 случаях (86%) величины Q были выше в РГ, причем в 10 случаях из них превышение было статистически значимым (р < 0.05). В 2 случаях величины Q были выше в КГ, но превышение не было статистически значимым (р > 0.14). Попарное сравнение величин параметра R показало более низкую его величину в группе РГ в 9 случаях из 14 (64%). Важно также отметить, что в тех 2 случаях, когда величина параметра Q была выше в КГ, величина параметра R тоже была выше в КГ; иными славами, при попарном сравнении в 100% случаях в РГ был выше необратимый компонент Q или ниже скорость репарации R. Это наблюдение свидетельствует об определенной неза-

висимости этих параметров и возможности их комплементарного использования в качестве показателя радиочувствительности.



Рис. 2. Параметры Q и R как показатели радиочувствительности

Сравнение средних по группе величин Q и R (рис. 2) указывает на статистически значимое увеличение Q (p=0,0093) и тенденцию к снижению *R* в группе РГ по сравнению с КГ, однако это снижение не является статистически значимым (p=0,70). На рис. 2В представлены также результаты так называемого ROC-анализа, который применяется для характеристики прогностической способности классификаторов [11]. ROC-кривые показаны закрытыми символами для Q и открытыми символами для R, величины площади под кривой AUC равны 0.81±0.09 для *Q* и 0.61±0.11 для *R*. В контексте этого анализа ROC-кривая отражает взаимосвязь доли истинно-положительных (чувствительность) и ложно-отрицательных (100%специфичность) предсказаний классификатора при изменении порога отсечения. Площадь под ROC-кривой (AUC) является мерой эффективности классификации. Результаты анализа, приведенные на рис. 2В, указывают на хорошую прогностическую способность параметра Q (AUC=0,81), но плохую для параметра *R* (AUC=0,61).

Учитывая то, что приведенное выше попарное сравнение параметров величин Q и R указывает на определенную степень их независимости, имеет смысл рассмотреть комбинированный классификатор, который предполагает установление порогов отсечения для каждого из параметров Q и R ( $Q_c$  и  $R_c$  соответственно). При таком подходе радиочувствительным можно считать случай, для которого необратимый компонент выше порогового  $Q > Q_c$  или скорость репарации ниже пороговой  $R < R_c$ . Такой подход наглядно иллюстрируется двухмерным представлением значений этих параметров для каждого пациента, так называемой «карты радиочувствительности», представленной на рис. 3А.

Положение каждого символа (отдельного пациента) определяется значениями параметров Q и R; открытые символы – группа РГ, закрытые символы – группа КГ. Карта разделена на зону повышенной радиочувствительности (серая зона) и зону нормальной радиочувствительности (белая зона), иллюстрируя пример выбора пары пороговых значений Q<sub>c</sub> и R<sub>c</sub> и предположения, что  $Q > Q_c$  или  $R < R_c$  определяет повышенную радиочувствительность. Серая зона содержит все точки РГ (чувствительность = 100%) и исключает все, кроме двух из 10 точек КГ (специфичность = 80%). На рис. 3Б представлены результаты ROC-анализа с использованием комбинированного классификатора. Для построения ROC-кривой использовали пары пороговых значений Q<sub>c</sub> и R<sub>c</sub>, взаимосвязь между которыми отражена сплошной линией на панели А.



Рис. 3. Карта радиочувствительности

Чтобы оценить прогностическую эффективность комбинированного классификатора, был проведен ROC-анализ данных, приведенных на рис 3А. Для этого использовали серию комбинаций пороговых значений  $Q_c$  и  $R_c$ , обеспечивающую максимальное значение площади под кривой AUC, которая равна в данном случае 0.97, таким образом демонстрируя потенциал комбинированного классификатора. Комбинация Qи R демонстрирует отличную прогностическую эффективность (AUC=0.97). В зависимости от цели классификации, можно получить 100 % специфичности (нулевой шанс ложноположительного предсказания) при уровне чувствительности до 87 % (т.е. 87 % потенциальных пациентов с осложнениями будут классифицированы как радиочувствительные). Более высокий уровень чувствительности (100 %) может быть достигнут ценой снижения специфичности (80 %).

Таким образом, функциональный тест, основанный на измерении кинетики γH2AX-фокусов в ех vivo облученных лимфоцитах крови пациентов, с применением соответствующего анализа, имеет хороший потенциал для разработки подхода, позволяющего предсказать радиочувствительность онкологических пациентов до начала применения лучевой терапии.

## Список литературы

- 1. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem. 1998; 273:5858–68.
- 2. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. Histone H2AX in DNA damage and repair. Cancer Biol Ther. 2003; 2:233–5.
- 3. Goodarzi AA, Jeggo PA. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. Mutat Res. 2012; 736:39–47.
- 4. Vasireddy RS, Sprung CN, Cempaka NL, Chao M, McKay MJ. H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype. Br J Cancer. 2010; 102:1511–8.
- 5. Van Oorschot B, Hovingh, S E, Moerland, P D, Medema, J P, Stalpers, L J, Vrieling H, et al. Reduced activity of double-strand break repair genes in prostate cancer patients with late normal tissue radiation toxicity. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014; 88:664–70.
- Chua ML, Horn S, Somaiah N, Davies S, Gothard L, A'Hern R, et al. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. Radiat Environ Biophys. 2014; 53:355–64.
- Mumbrekar KD, Fernandes DJ, Goutham H V, Sharan K, Vadhiraja BM, Satyamoorthy K, et al. Influence of double-strand break repair on radiation therapy-induced acute skin reactions in breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014; 88:671–6.
- Martin NT, Nahas SA, Tunuguntla R, Fike F, Gatti RA. Assessing "radiosensitivity" with kinetic profiles of gamma-H2AX, 53BP1 and BRCA1 foci. Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol. 2011; 101:35–8.

- 9. Lobachevsky P, Leong T, Daly P, Smith J, Best N, Tomaszewski J, et al. Compromized DNA repair as a basis for identification of cancer radiotherapy patients with extreme radiosensitivity. Cancer Lett. 2016; 383:212–9.
- 10. Ivashkevich AN, Martin OA, Smith AJ, Redon CE, Bonner WM, Martin RF, et al. γH2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis. Mutat Res. 2011; 711:49–60.
- 11. Zweig MH, G C. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem. 1993; 39:561–77.