

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ им. Д.Г. КНОРРЕ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот

На правах рукописи

ТАЛЫШЕВ ВАДИМ АЛЕКСЕЕВИЧ

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах
выполненной научно-
квалификационной работы

Молекулярные механизмы, опосредующие возникновение и развитие
радиорезистентности опухолевых клеток при злокачественных заболеваниях шейки матки

Направление подготовки

1.5 Биологические науки

Специальность

1.5.3 Молекулярная биология

Аспирант _____ Талышев В. А.

Научный руководитель _____ к.б.н. Логашенко Е. Б.

Новосибирск, 2026

Введение

Рак шейки матки (РШМ) остаётся одной из значимых проблем современной онкологии. В 2022 г. в мире было зарегистрировано около 662 тыс. новых случаев заболевания и 349 тыс. смертей [1]. Несмотря на развитие профилактики, скрининга и методов лечения, РШМ сохраняет высокую клиническую значимость, особенно в развивающихся странах. В России в 2024 г. РШМ составлял 4,3% в структуре онкологической заболеваемости женского населения и занимал шестое место среди злокачественных новообразований у женщин [91].

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения РШМ и применяется как самостоятельно, так и совместно с другими методами лечения. Однако в ряде случаев лучевая терапия может оказаться недостаточно эффективной, и одной из основных причин снижения её эффективности является радиорезистентность опухолевых клеток.

Радиорезистентность может быть связана как с исходными свойствами опухолевых клеток, так и с изменениями, возникающими в процессе лечения. В её формировании могут участвовать повышение эффективности репарации повреждений ДНК, изменения регуляции клеточного цикла и клеточной гибели, гипоксия опухолевого микроокружения, а также изменения сигнальных путей. Однако механизмы радиорезистентности РШМ остаются изучены недостаточно [17, 24]. Одним из подходов к изучению этих механизмов является использование клеточных моделей.

В данной работе мы проводим сравнительную оценку радиационного ответа нескольких клеточных линий РШМ, включая линии, полученные из опухолевого материала одной пациентки до и после химиолучевой терапии. Для изучения приобретённой радиорезистентности используется модель фракционированного облучения, воспроизводящая принцип распределения дозы, применяемый при проведении лучевой терапии, с последующей оценкой изменений клеточного ответа на радиацию. Дополнительно проводится биоинформатический анализ транскриптомных данных для поиска генов, потенциально связанных с ответом РШМ на радиацию.

Цели и задачи:

Цель работы: охарактеризовать особенности ответа на облучение на модели различных клеточных линий рака шейки матки человека, и влияние на характер этого ответа фракционированного облучения, а также провести биоинформатический поиск ключевых генов, связанных с опухолевой радиорезистентностью.

Задачи для достижения цели:

1. Оценить исходную радиочувствительность трёх линий РШМ человека SiHa, HeLa и CaSki, а также линий AdMer-35 и AdMer-43, полученных из опухолевого материала пациента.
2. Провести фракционированное облучение клеточных линий SiHa, HeLa и CaSki, охарактеризовать изменения их ответа на повторное облучение и сделать вывод о степени приобретённой радиорезистентности.
3. Провести биоинформатический анализ данных транскриптомных исследований из открытых источников, выявить панель генов, связанных с опухолевым ответом на радиацию и валидировать полученную панель на используемых клеточных моделях.

1. Литературный обзор

1.1. Рак шейки матки и радиотерапия

1.1.1. Рак шейки матки: эпидемиология и клиническая значимость

Рак шейки матки (РШМ) остаётся одной из значимых проблем мирового здравоохранения. В 2022 г. в мире было зарегистрировано около 662 000 новых случаев заболевания и 349 000 смертей, при этом бремя РШМ существенно различается между регионами [1]. Заболеваемость и смертность во многом определяются доступностью вакцинации против вируса папилломы человека (ВПЧ), скрининга и своевременного лечения, поэтому наиболее высокие показатели сохраняются в странах с ограниченным доступом к профилактическим программам и медицинской помощи [2, 3].

Основным этиологическим фактором РШМ является персистирующая инфекция онкогенными типами ВПЧ, прежде всего за счёт действия вирусных онкобелков Е6 и Е7 [2]. Наиболее распространённым гистологическим типом является плоскоклеточная карцинома, тогда как аденокарцинома встречается реже и в ряде исследований ассоциировалась с менее благоприятными результатами радиотерапии [2, 4]. Несмотря на развитие профилактики и лечения, сохраняющиеся случаи неэффективности терапии и рецидивирования определяют необходимость изучения биологических факторов, влияющих на радиочувствительность опухоли.

1.1.2. Современные подходы к лечению и роль радиотерапии

Выбор тактики лечения РШМ зависит от стадии заболевания и клинических характеристик опухоли. На ранних стадиях может применяться хирургическое лечение, тогда как при местнораспространённом РШМ основным методом является радикальная одновременная химиолучевая терапия (ХЛТ), как правило, с использованием препаратов платины [3, 5]. Добавление химиотерапии к лучевой терапии (ЛТ) улучшает контроль заболевания и выживаемость по сравнению с применением только ЛТ; по данным метаанализа, абсолютное увеличение пятилетней выживаемости составляет около 6% [5]. Одновременно развиваются системные подходы, в том числе добавление иммунотерапии в схемы ХЛТ для отдельных групп пациенток высокого риска [3].

Однако даже при использовании современных методов ответ на лечение остаётся неоднородным: у части пациенток сохраняется опухоль либо развивается рецидивирующее или метастатическое заболевание [3, 5]. Эти различия определяются не только

характеристиками лечения, но и биологическими свойствами опухоли, включая её способность сохранять жизнеспособность и репродуктивный потенциал после облучения.

1.1.3. Неэффективность лечения, рецидивирование и клиническая проблема радиорезистентности

При местнораспространённом РШМ пятилетняя общая выживаемость после одновременной ХЛТ составляет около 70%, поэтому, несмотря на эффективность лечения у большинства пациенток, сохраняется клинически значимая группа с персистирующим заболеванием, рецидивами или отдалёнными метастазами [2]. Совершенствование ДЛТ и брахитерапии повысило локальный контроль, однако полностью проблему неэффективности лечения не устранило [5].

При этом клиническую неэффективность терапии нельзя отождествлять с радиорезистентностью. Рецидив может быть связан со стадией и объёмом опухоли, поражением лимфатических узлов, метастатическим распространением, особенностями проведения лечения и другими факторами [2]. Радиорезистентность характеризует непосредственно способность опухолевых клеток переживать воздействие ионизирующего излучения и сохранять репродуктивный потенциал. Поэтому сам факт рецидива после радиотерапии не является доказательством радиорезистентного клеточного фенотипа.

Вместе с тем различия биологических свойств опухолей способны влиять на результаты ЛТ. В частности, для аденокарциномы шейки матки описан более высокий риск локального рецидива и менее благоприятный ответ на облучение по сравнению с плоскоклеточной карциномой [4]. Кроме того, фракционированная радиотерапия создаёт селективное давление, при котором выжившие клетки могут участвовать в формировании остаточной опухоли или рецидива. Их устойчивость может быть обусловлена как исходными свойствами, существовавшими до лечения, так и изменениями, формирующимися в процессе многократного облучения. Разграничить эти варианты только по клиническим исходам невозможно, что определяет необходимость экспериментального изучения исходной и приобретённой радиорезистентности.

1.2. Биологические основы ответа на ионизирующее излучение

1.2.1. Молекулярные механизмы радиационно-индуцированных повреждений

Основной внутриклеточной мишенью, определяющей цитотоксический эффект ионизирующего излучения, считается ДНК. Её повреждение возникает непосредственно

при поглощении энергии молекулой ДНК либо опосредованно через образование реакционноспособных соединений [6, 7]. В результате формируются модификации оснований, однонитевые разрывы ДНК (single-strand breaks, SSB), двунитевые разрывы ДНК (double-strand breaks, DSB), сшивки и кластерные повреждения. Наибольшее значение имеют DSB и сложные повреждения, поскольку при неполной или ошибочной репарации они могут приводить к хромосомным перестройкам, геномной нестабильности и утрате репродуктивной способности клетки [6, 7].

Значительная часть повреждений при фотонном облучении связана с радиолизом воды и образованием активных форм кислорода (АФК), воздействующих на ДНК, белки и клеточные мембраны. АФК одновременно участвуют в регуляции апоптоза, сенесценции и сигнальных путей клеточной выживаемости [7, 8]. Тип и сложность повреждений зависят и от характеристик излучения: при высокой линейной передаче энергии возрастает доля плотных и трудно репарируемых повреждений [8].

Биологический результат облучения определяется не только количеством первичных повреждений, но и последующей реакцией клетки. Их распознавание, активация контрольных точек и репарация объединяются в систему ответа на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR), эффективность которой является одним из основных факторов клеточной радиочувствительности.

1.2.2. Ответ на повреждение ДНК и механизмы репарации

DDR представляет собой координированную систему распознавания повреждений, их репарации и регуляции клеточного цикла. При DSB одним из ключевых ранних событий является активация ATM, которая через комплекс MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) и нижестоящие мишени, включая γ H2AX, CHK2 и p53, связывает распознавание повреждений с репарацией, остановкой клеточного цикла и при выраженном повреждении - клеточной гибелью. ATR преимущественно активируется при репликативном стрессе и через CHK1 регулирует прохождение S- и G2-фаз [9].

Различные повреждения устраняются специализированными механизмами. Однонитевые разрывы преимущественно восстанавливаются посредством эксцизионной репарации оснований с участием поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP) и других белков, тогда как основными путями репарации DSB являются нехомологичное соединение концов (non-homologous end joining, NHEJ) и гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR) [7, 9]. NHEJ может функционировать на протяжении большей части

клеточного цикла и не требует гомологичной матрицы, тогда как HR использует сестринскую хроматиду и поэтому преимущественно активна в S- и G2-фазах [7].

Эффективность и точность репарации непосредственно влияют на выживание после облучения. Корректное восстановление ДНК позволяет клетке продолжить пролиферацию, тогда как сохраняющиеся либо ошибочно репарированные повреждения приводят к хромосомным нарушениям, геномной нестабильности и потере репродуктивного потенциала [7, 9]. Поэтому различия в работе DDR могут формировать различия радиочувствительности между опухолевыми клетками.

1.2.3. Клеточный цикл и судьба клеток после облучения

Повреждение ДНК активирует контрольные точки клеточного цикла, временно задерживающие его прохождение и предоставляющие клетке время для репарации. АТМ-CHK2 участвует преимущественно в регуляции G1-контрольной точки через p53 и p21, тогда как ATR-CHK1 регулирует прохождение S- и G2-фаз [9].

Радиочувствительность зависит и от положения клетки в клеточном цикле: G2 и митоз относятся к наиболее радиочувствительным фазам. Поэтому радиационно-индуцированное накопление клеток в G2/M отражает активацию ответа на повреждение, но его нельзя однозначно интерпретировать как показатель радиорезистентности или радиочувствительности. Облучение изменяет распределение клеток по фазам, а фаза клетки в момент воздействия, в свою очередь, влияет на вероятность её выживания [10].

После облучения возможны различные исходы. При успешной репарации клетка возобновляет пролиферацию, тогда как сохраняющиеся повреждения могут приводить к апоптозу, сенесценции или митотической катастрофе [6, 7]. Апоптоз является лишь одним из вариантов ответа: его слабая выраженность не означает автоматического сохранения долговременной репродуктивной способности. Клетки могут оставаться метаболически активными, но утрачивать способность к делению вследствие сенесценции или повреждений, проявляющихся при последующих митозах [6-9].

Для оценки эффекта радиации принципиально важно различать непосредственную клеточную гибель и долговременную способность облучённых клеток сохранять пролиферативный потенциал.

1.2.4. Биологические факторы, определяющие радиочувствительность

Радиочувствительность формируется под действием комплекса внутриклеточных и микроокруженческих факторов. К ним относятся эффективность DDR и репарации ДНК,

состояние клеточного цикла, пролиферативная активность, оксигенация, сигнальные пути выживания и наличие устойчивых клеточных субпопуляций [7].

Клетки с высокой способностью к репарации радиационно-индуцированных повреждений имеют больше возможностей сохранить жизнеспособность и репродуктивный потенциал. Пролиферативное состояние также имеет двойственное значение: фаза клеточного цикла влияет на чувствительность к отдельной фракции, тогда как размножение выживших клеток во время длительного курса лечения способствует репопуляции опухоли [7].

Сильным модификатором радиационного ответа является гипоксия. Кислород способствует фиксации радикальных повреждений, поэтому гипоксические клетки менее чувствительны к фотонному излучению. Кроме того, гипоксия активирует адаптивные сигнальные механизмы и может поддерживать устойчивые клеточные фенотипы [7]. Дополнительный вклад в гетерогенность ответа могут вносить клетки со свойствами опухолевых стволовых клеток, отличающиеся усиленной DDR, антиапоптотической сигнализацией и антиоксидантной защитой [7].

Следовательно, радиочувствительность представляет собой интегральное свойство клеточной популяции и не определяется одним молекулярным механизмом.

1.2.5. Экспериментальная оценка клеточной радиочувствительности

Единого экспериментального показателя, полностью характеризующего ответ клетки на облучение, не существует. Радиотерапия может вызывать потерю репродуктивного потенциала, временное подавление роста, изменения клеточного цикла, повреждение ДНК и различные варианты клеточной гибели. Поэтому наиболее информативным является сочетание нескольких взаимодополняющих методов [11-13].

Классическим методом оценки радиочувствительности остаётся клоногенный анализ, определяющий способность отдельных облучённых клеток сохранять длительный пролиферативный потенциал и формировать колонии. По кривым «доза-выживаемость» могут рассчитываться доля клеток, выживших после облучения дозой 2 Гр (surviving fraction at 2 Gy, SF2), D10 - доза, снижающая выживаемость до 10%, и другие параметры радиочувствительности [7, 11]. Именно долговременная репродуктивная выживаемость наиболее непосредственно характеризует способность клетки пережить радиационное воздействие.

Краткосрочные метаболические тесты, включая МТТ-тест, характеризуют другой компонент ответа. Сохранение метаболической активности после облучения не означает

сохранения способности клетки в дальнейшем сформировать колонию, поэтому результаты таких тестов не должны рассматриваться как прямой эквивалент клоногенной выживаемости [13].

Анализ клеточного цикла позволяет оценить активацию контрольных точек и радиационно-индуцированное накопление клеток в отдельных фазах. В работе Liu и соавт. доля клеток в G2/M после облучения коррелировала с параметрами клоногенной радиочувствительности, однако выявленная связь не была универсальной. Поэтому G2/M-ответ следует рассматривать как дополнительную характеристику радиационного фенотипа, а не самостоятельный показатель радиорезистентности [11].

Аналогично, определение апоптоза помогает установить механизмы клеточного ответа, но не заменяет оценку репродуктивной выживаемости. Различия радиационно-индуцированного апоптоза действительно наблюдались между клеточными линиями с различной радиочувствительностью [12], однако клетки могут терять клоногенный потенциал вследствие сенесценции, митотической катастрофы и других процессов даже при относительно слабом апоптотическом ответе [6].

Несовпадение результатов различных методов при сравнении клеточных линий не следует рассматривать как методическое противоречие, поскольку каждый показатель характеризует отдельный уровень радиационного ответа. Метаболические тесты отражают краткосрочное состояние клеточной популяции, апоптоз - один из вариантов радиационно-индуцированной гибели, а распределение по фазам клеточного цикла - активацию контрольных точек и задержку пролиферации. При этом клетки, остающиеся метаболически активными и не вступающие в апоптоз непосредственно после облучения, могут впоследствии утратить способность к неограниченному делению. Аналогично, выраженное накопление в G2/M может сопровождать как эффективную остановку для репарации, так и повреждение, приводящее к последующей потере репродуктивного потенциала. Поэтому расхождения между отдельными тестами могут отражать многокомпонентность радиационного ответа, а не недостаточность одного из методов [6, 11-13].

Дополнительные методы позволяют оценивать повреждение ДНК, пролиферацию, миграцию и инвазивную активность. Например, γ H2AX используется как показатель ответа на DSB, тогда как функциональные тесты миграции и пролиферации характеризуют свойства сохранившейся клеточной популяции [12, 13]. В результате наиболее полное представление о радиационном ответе даёт сопоставление клоногенной выживаемости с метаболическими, клеточно-цикловыми и функциональными показателями.

1.2.6. Фракционирование и радиобиологические основы повторного облучения

В клинической радиотерапии суммарную дозу обычно разделяют на отдельные фракции. При стандартном фракционировании доза одной фракции составляет около 1,8-2,0 Гр; при РШМ ДЛТ на область малого таза обычно проводится до суммарной дозы порядка 40-50 Гр с последующей или сочетанной брахитерапией [4, 10].

Биологическое действие фракционирования традиционно описывают принципом 5 R: репарация, перераспределение, реоксигенация, репопуляция и радиочувствительность [10]. Между последовательными фракциями клетки могут репарировать сублетальные повреждения; выжившие клетки перераспределяются по фазам клеточного цикла, в том числе переходя в более радиочувствительные фазы; изменение перфузии способствует реоксигенации ранее гипоксических участков. Одновременно длительное лечение создаёт возможность для репопуляции выживших опухолевых клеток. Исходная радиочувствительность определяет вероятность выживания после каждого последующего воздействия [7, 10].

Зависимость биологического эффекта от дозы и размера фракции описывается линейно-квадратичной моделью, включающей α - и β -компоненты повреждения. Отношение α/β характеризует чувствительность ткани к изменению дозы за фракцию и используется, в частности, при расчёте эквивалентной дозы при фракционировании по 2 Гр (EQD2) [10].

С биологической точки зрения фракционированное облучение представляет собой последовательность циклов повреждения и восстановления, а не эквивалент однократного воздействия той же суммарной дозы. Поэтому длительное повторное облучение создаёт условия как для отбора клеток с исходно более устойчивым фенотипом, так и для формирования изменений в выжившей популяции [7, 10]. Этот принцип лежит в основе экспериментальных моделей приобретённой радиорезистентности.

1.3. Исходная радиорезистентность рака шейки матки

1.3.1. Понятие исходной радиорезистентности и её отличие от приобретённой

Ответ опухолевых клеток на одинаковую дозу ионизирующего излучения может существенно различаться. Исходная радиорезистентность представляет собой относительно устойчивый фенотип, существующий до терапевтического воздействия, тогда как приобретённая радиорезистентность формируется в процессе или после

повторного облучения вследствие селекции и/или адаптивных изменений выживших клеток [7, 14].

Экспериментальное изучение этих состояний требует разных подходов. Исходные различия можно оценивать при сравнении необлучённых клеточных линий, первичного опухолевого материала или существующих клеточных субпопуляций, тогда как приобретённую резистентность необходимо исследовать в динамике, сопоставляя исходные клетки с популяциями после многократного облучения [14].

Исходная радиорезистентность не определяется одним молекулярным механизмом. Она формируется совокупностью свойств, включающих особенности DDR, регуляции клеточного цикла и клеточной гибели, окислительного стресса и клеточной пластичности. Поэтому её целесообразно рассматривать как компонент биологической гетерогенности опухоли, существующий уже до начала лечения и способный впоследствии подвергаться селекции при фракционированном облучении.

1.3.2. Доказательства исходной гетерогенности радиочувствительности РШМ

Сравнение необлучённых клеточных линий РШМ показывает значительные различия исходной клоногенной радиочувствительности. В исследованиях Tam и соавт., Eastham и соавт. и Hall и соавт. значения SF2 существенно различались между моделями РШМ, подтверждая наличие широкого спектра радиационного ответа [15-17]. Например, Tam и соавт. получили SF2 0,67 для SiHa, 0,66 для CaSki и 0,70 для HeLa, тогда как в другом исследовании наибольшая выживаемость была характерна для CaSki, а значения для SiHa и HeLa составляли 0,73 и 0,71 соответственно [15, 16].

Другие работы подтвердили общую гетерогенность, хотя конкретное распределение линий по радиочувствительности различалось. C33A неоднократно относилась к более чувствительным моделям, тогда как SiHa часто характеризовалась относительно высокой выживаемостью после облучения [15-19]. При этом абсолютные значения SF2 одной и той же линии могли заметно различаться между исследованиями: например, для CaSki они варьировали от 0,59 до 0,92 [15, 16, 20].

Такая вариабельность может отражать не только происхождение клеточной линии, но и различия условий культивирования, параметров облучения и особенностей экспериментального анализа. Поэтому установленные линии РШМ целесообразно использовать как сравнительные модели, однако выводы об их относительной радиочувствительности предпочтительно основывать на прямом сопоставлении в рамках одной экспериментальной системы [15-20].

1.3.3. Исходные биологические характеристики и устойчивые клеточные субпопуляции

Различия исходной радиочувствительности нельзя объяснить только количеством первичных повреждений ДНК. Eastham и соавт. не выявили связи между SF2 и уровнем первоначальных радиационно-индуцированных повреждений, тогда как Banáth и соавт. показали, что с клоногенной радиочувствительностью лучше соотносилась динамика сохранения сигнала γ H2AX после облучения [16, 20]. Это указывает на значение последующей обработки повреждений и DDR, а не только на количество повреждений, возникающих непосредственно после воздействия.

Попытки связать исходную радиочувствительность с профилем экспрессии генов также не выявили универсального молекулярного показателя. Hall и соавт. обнаружили множество генов, связанных с SF2, однако согласованность результатов между различными наборами клеточных линий оказалась низкой [17]. Другие исследования также выявляли отдельные потенциальные факторы, включая сурвивин и ВПЧ-ассоциированные характеристики, но ограниченное число моделей не позволяло установить их универсальное значение [18].

Дополнительным источником различий является гетерогенность внутри одной клеточной культуры. В линиях HeLa, SiHa, CaSki и C4-I были получены субпопуляции с признаками стволовости, повышенной туморогенностью и большей устойчивостью к облучению; их молекулярные характеристики включали усиление процессов, связанных с репарацией DSB и метаболизмом АФК [21]. Kumazawa и соавт. показали, что исходно присутствующая в культуре HeLa боковая популяция (SP) также обладала более выраженными признаками стволовости, большей клоногенной выживаемостью после облучения и меньшей склонностью к апоптозу по сравнению с основной популяцией клеток [22].

Следовательно, интегральный показатель радиочувствительности клеточной линии представляет собой усреднённую характеристику и может не отражать свойства отдельных устойчивых субпопуляций. Их существование до начала облучения создаёт предпосылки для последующей селекции при длительном фракционированном воздействии.

1.3.4. Клиническая значимость и ограничения экспериментальных моделей

Связь исходной радиочувствительности с клиническим ответом была показана и при исследовании опухолевого материала. Tam и соавт. определяли SF2 в свежих образцах

РШМ, полученных до начала радиотерапии: более высокие значения SF2 были связаны с отсутствием локорегионарного контроля и менее благоприятной выживаемостью [15]. Несмотря на небольшую выборку и особенности применявшейся схемы лечения, эти результаты показывают, что исходные различия радиочувствительности могут иметь клиническое значение.

Современные данные также подтверждают значимость характеристик опухоли, существующих до лечения. В исследовании BIOEMBRACE исходные молекулярные и визуализационные параметры, включая p16, PD-L1, L1CAM и наличие некроза, были связаны с ответом и контролем заболевания после ХЛТ и брахитерапии [23]. Однако подобные ассоциации нельзя автоматически трактовать как специфические показатели радиорезистентности, поскольку на клинический исход одновременно влияют химиотерапия, опухолевая нагрузка и другие факторы.

Систематические данные также указывают, что радиочувствительность РШМ определяется взаимодействием процессов DDR, клеточного цикла, гипоксии, стволовости, эпигенетической регуляции и сигнальных путей, а отдельные маркеры редко воспроизводятся независимо [24].

Установленные клеточные линии остаются удобным инструментом контролируемого изучения радиационного ответа, но имеют ограничения. Значения SF2 зависят от экспериментальных условий, внутри одной культуры могут существовать фенотипически различные субпопуляции, а двумерные культуры не воспроизводят сложность опухоли и её микроокружения. Кроме того, методы искусственного обогащения клеток с признаками стволовости сами создают селективные условия [15, 16, 21]. Поэтому результаты, полученные на клеточных линиях, желательно дополнять исследованиями первичного опухолевого материала и клинически охарактеризованных моделей.

Исходную радиорезистентность следует рассматривать как гетерогенный фенотип, существующий до облучения, а не как фиксированное свойство конкретной клеточной линии или отдельного молекулярного фактора. Такая исходная неоднородность создаёт биологическую основу для последующего отбора и изменения клеточных популяций при длительном фракционированном воздействии.

1.4. Приобретённая радиорезистентность РШМ: селекция, адаптация и экспериментальные модели

1.4.1. Определение и формирование приобретённой радиорезистентности при фракционированном облучении

В отличие от исходной радиорезистентности, существующей до начала лечения, приобретённая радиорезистентность формируется в процессе или после повторного терапевтического воздействия. В экспериментальных системах о её формировании можно говорить, если популяция, прошедшая многократное облучение, при последующем контрольном воздействии демонстрирует более высокую выживаемость по сравнению с исходной необлучённой популяцией [14]. Сам факт того, что клетки перенесли высокую суммарную дозу, этого не доказывает.

При фракционированном облучении клетки проходят повторяющиеся циклы повреждения, восстановления и репопуляции. В результате состав выжившей популяции может изменяться как вследствие преимущественного отбора исходно устойчивых клеток, так и за счёт адаптивных изменений, возникающих непосредственно под действием радиации. Разграничить эти процессы сложно, поскольку большинство экспериментальных моделей сравнивает только исходную и конечную производную популяции.

Поэтому однократное и длительное повторное облучение отражают разные аспекты радиационного ответа: первое преимущественно характеризует исходную радиочувствительность, тогда как второе дополнительно создаёт условия для селекции и перестройки клеточной популяции.

1.4.2. Клональная селекция и адаптивное репрограммирование

Прямое подтверждение селекции исходно устойчивых клеток получено с помощью клеточного баркодирования. Wursthorn и соавт. при фракционированном облучении моделей плоскоклеточной карциномы головы и шеи наблюдали выраженное сокращение клонального разнообразия и повторное выживание небольшой группы устойчивых клонов, исходно составлявших около 0,6-3,3% популяции [25]. Хотя эта работа выполнена не на РШМ, она непосредственно демонстрирует способность радиации изменять структуру гетерогенной клеточной популяции.

Сходные данные получены и для РШМ. Yang и соавт. показали, что после пяти фракций по 2 Гр доминировавшая до лечения опухолевая субпопуляция практически исчезла, тогда как небольшая исходная субпопуляция стала преобладающей [26]. Несмотря

на ограниченность исследования одной пациенткой, эти результаты подтверждают возможность клональной селекции непосредственно в опухоли.

Одновременно повторное облучение может сопровождаться изменением состояния самих выживших клеток. При продольном анализе модели A549 Shi и соавт. выявили последовательное появление клеточных состояний со свойствами стволовости и последующую метаболическую и фенотипическую перестройку в процессе накопления дозы [27]. В моделях РШМ после длительного облучения также описаны стойкие изменения экспрессии генов DDR и сигнального пути SOX2/Hedgehog [28, 29].

Таким образом, селекция и адаптивное репрограммирование могут протекать одновременно. Сравнение только исходной и конечной популяций не позволяет установить относительный вклад каждого из этих процессов.

1.4.3. Фенотипические изменения, связанные с приобретённой радиорезистентностью

Наиболее прямым функциональным критерием приобретённой радиорезистентности является повышение репродуктивной выживаемости после последующего контрольного облучения. Для производных HeLa-RR, SiHa-RR, HeLaXR и HeLaNR было показано увеличение клоногенной выживаемости по сравнению с соответствующими исходными линиями [28, 29].

Дополнительными признаками могут быть снижение радиационно-индуцированного апоптоза, изменение клеточного цикла и пролиферации [28, 29]. Однако эти характеристики не являются универсальными. В отдельных радиорезистентных моделях наблюдалось даже увеличение времени удвоения популяции, поэтому приобретённую радиорезистентность нельзя отождествлять с высокой пролиферативной активностью. Аналогично, не существует единого профиля клеточного цикла, характерного для всех устойчивых линий.

Особенно важны результаты Werts и соавт. Клетки плоскоклеточной карциномы шейки матки многократно облучали ежедневными фракциями по 2 Гр до суммарных доз 30-60 Гр. Несмотря на выживание при длительном фракционированном воздействии, в большинстве полученных популяций не наблюдалось стабильного повышения радиорезистентности при последующем тестировании; только один из семи выделенных клонов демонстрировал выраженное увеличение SF2 [30].

Следовательно, накопление высокой суммарной дозы не приводит автоматически к приобретённой радиорезистентности. Клоногенная выживаемость является основным

критерием её подтверждения, тогда как изменения апоптоза, клеточного цикла или пролиферации характеризуют отдельные компоненты сформировавшегося фенотипа.

1.4.4. Стабильность и обратимость приобретённого фенотипа

Один из ключевых вопросов заключается в том, представляет ли приобретённая радиорезистентность временный стрессовый ответ или относительно стабильное состояние клетки. Чтобы разграничить эти варианты, после завершения селекции клетки необходимо выдержать определённый период без облучения и лишь затем повторно оценить радиорезистентный фенотип.

Особенно убедительные данные о стабильности фенотипа получили Qing и соавт. Клетки HeLa подвергали фракционированному рентгеновскому или нейтронному облучению ^{252}Cf до суммарной дозы 75 Гр в течение восьми месяцев, в результате чего были получены производные линии HeLaXR и HeLaNR. После последнего облучения радиорезистентные линии более двух месяцев культивировали без дополнительного воздействия излучения, чтобы минимизировать вклад острых радиационных эффектов перед последующей характеристикой клеток [29]. Несмотря на этот период восстановления, их выживаемость после облучения оставалась выше, чем у исходных клеток HeLa. Это показывает, что приобретённая радиорезистентность может сохраняться и без постоянного радиационного воздействия.

Исследования других опухолевых моделей показывают, что отдельные компоненты приобретённого фенотипа могут различаться по степени обратимости. Shi и соавт. культивировали клетки A549-RR более 30 дней после прекращения облучения. Некоторые морфологические изменения, возникшие в ходе радиационного воздействия, постепенно уменьшались, и клетки становились более похожими на исходную популяцию. В то же время повышенная клоногенная выживаемость при повторном контрольном облучении сохранялась [27].

Сохранение радиорезистентности не означает необратимости всех фенотипических изменений, возникших в процессе создания модели. Функциональная устойчивость к последующему облучению может сохраняться, тогда как некоторые признаки стрессового состояния постепенно регрессируют. Однако для РШМ пока немного систематических исследований, специально оценивающих долговременную стабильность и обратимость приобретённого радиорезистентного фенотипа.

1.4.5. Экспериментальное получение моделей приобретённой радиорезистентности РШМ

Единого протокола получения таких моделей не существует. Используемые схемы значительно различаются по дозе за фракцию, суммарной дозе, интервалам между воздействиями и продолжительности селекции.

Huang и соавт. получили HeLa-RR и SiHa-RR после последовательного увеличения дозы от 2 до 10 Гр и накопления 72 Гр [28]. Qing и соавт. подвергали клетки HeLa длительному воздействию рентгеновского излучения или нейтронов ^{252}Cf до суммарной дозы 75 Гр в течение восьми месяцев [29]. Werts и соавт., напротив, использовали ежедневные фракции по 2 Гр и получали производные после накопления 30, 40 и 60 Гр, причём большинство этих популяций не становилось более радиорезистентным [30]. Hu и соавт. также применяли фракции по 2 Гр до суммарной дозы 60 Гр, однако облучение проводили примерно раз в пять дней, а весь процесс занял почти год [31].

Эти работы показывают, что одинаковая суммарная доза может достигаться принципиально разными путями, создающими различное селективное давление. Поэтому результаты отдельных моделей необходимо интерпретировать с учётом конкретного режима их получения.

1.4.6. Клиническая релевантность и ограничения моделей приобретённой радиорезистентности

Использование фракций по 2 Гр, как в работах Werts и Hu, приближает эксперимент к стандартной дозе за одну фракцию при ДЛТ [30, 31]. Однако совпадение отдельной дозы ещё не означает воспроизведение клинического курса: интервалы между фракциями, продолжительность культивирования и условия восстановления клеток могут существенно отличаться. Схемы с повышением отдельных доз до 8-10 Гр ещё сильнее расходятся со стандартным клиническим фракционированием [28]. Кроме того, местнораспространённый РШМ обычно лечат одновременной ХЛТ, тогда как экспериментальные модели чаще используют только ионизирующее излучение. Такие системы позволяют изолированно изучать радиационно-индуцированную селекцию и адаптацию, но не воспроизводят всего комплекса воздействий клинического лечения. Следовательно, модели длительного фракционированного облучения следует рассматривать как упрощённые экспериментальные системы, моделирующие отдельные компоненты терапевтического давления. При этом основным ограничением существующих исследований остаётся отсутствие единых протоколов получения и критериев подтверждения

радиорезистентности. Схемы облучения значительно различаются, а для характеристики производных линий используются клоногенная выживаемость, метаболические тесты, апоптоз, клеточный цикл и молекулярные показатели [28-31]. Способность популяции пережить высокую суммарную дозу сама по себе недостаточна: повышение устойчивости должно быть подтверждено при последующем сравнительном облучении исходных и производных клеток.

Дополнительной проблемой является недостаточное описание периода восстановления после последней фракции, из-за чего стабильные изменения трудно отделить от временного стрессового ответа [28, 29]. Большинство исследований также основано на двумерных культурах HeLa и SiHa, которые не воспроизводят микроокружение опухоли и сами обладают исходной внутрипопуляционной гетерогенностью [21, 22].

Наконец, сравнение только исходной и конечной популяций не позволяет определить, возникли ли изменения вследствие отбора уже существовавших устойчивых клеток или адаптивного репрограммирования. Для разграничения этих процессов необходимы методы отслеживания отдельных клонов и продольный анализ клеточных состояний [25, 27].

Приобретённую радиорезистентность РШМ следует рассматривать как динамичный и неоднородный результат повторного радиационного воздействия, а не как неизбежное следствие накопления определённой суммарной дозы. Характер конечной производной популяции зависит как от исходной гетерогенности культуры, так и от конкретной схемы облучения и последующего отбора.

1.5. Молекулярные и клеточные механизмы радиорезистентности РШМ

1.5.1. Ответ на повреждение ДНК и репарация ДНК

Способность опухолевой клетки распознавать и репарировать радиационно-индуцированные повреждения ДНК является одним из основных факторов радиочувствительности. При РШМ различия ответа определяются не только количеством первоначально возникших повреждений, но и особенностями их последующей обработки. Так, остаточный сигнал γ H2AX через 24 ч был связан с клоногенной радиочувствительностью клеточных линий, хотя его сохранение не всегда непосредственно отражало количество нерепарированных DSB [20]. Эти наблюдения согласуются с представлением о DDR как о комплексном процессе, включающем распознавание повреждений, контроль клеточного цикла и работу нескольких путей репарации [24, 32].

Функциональное значение отдельных компонентов DDR подтверждено экспериментально. Ингибирование ATM повышало радиочувствительность клеток РШМ в клоногенном анализе, тогда как воздействие на отдельный субстрат ATM - 53BP1 - изменяло радиационно-индуцированный ответ клеточного цикла, но не вызывало сопоставимой радиосенсибилизации [33]. На возможную роль NHEJ указывают и клинические данные: в остаточных опухолях после ЛТ увеличивалась представленность клеток, экспрессирующих DNA-PKcs, Ku70 и Ku86 [34]. Однако наблюдательный характер этого исследования не позволяет установить, является ли усиление NHEJ причиной устойчивости или результатом отбора соответствующей клеточной популяции.

Регуляция репарации может происходить и через более широкие сигнальные сети. Ингибирование оси RhoC-ROCK2 повышало радиочувствительность клеток РШМ и сопровождалось изменением компонентов репарации DSB [35]. Для HR показано участие оси HNF1 α -YTHDF3-RAD51D: изменение экспрессии её компонентов влияло на клоногенную выживаемость и динамику γ H2AX, а функциональные эксперименты подтвердили роль RAD51D как нижележащего медиатора [36].

Стойкая перестройка DDR наблюдается и при приобретённой радиорезистентности. В производных HeLaNR и HeLaXR после длительного облучения сохранялись изменения экспрессии десятков DDR-ассоциированных генов даже после более чем двух месяцев культивирования без дополнительного воздействия [29]. В целом эти данные показывают, что радиорезистентность РШМ связана не с универсальным усилением одного пути репарации, а с различными вариантами перестройки взаимосвязанных механизмов DDR.

1.5.2. Регуляция клеточного цикла и уход от радиационно-индуцированной клеточной гибели

Контрольные точки клеточного цикла предоставляют повреждённым клеткам дополнительное время для репарации, однако их активацию нельзя однозначно связывать с радиорезистентностью. В зависимости от контекста временная остановка может способствовать восстановлению, тогда как длительная задержка сопровождается утратой пролиферативной способности или клеточной гибелью [24, 32].

Это подтверждается моделями приобретённой радиорезистентности. В HeLa-RR и SiHa-RR наблюдались снижение апоптоза и менее выраженная остановка в G1, тогда как в HeLaXR и HeLaNR уменьшалось накопление клеток в G2 после облучения [28, 29]. Следовательно, для устойчивых клеток не существует универсального профиля распределения по фазам клеточного цикла. Аналогично, ингибирование ATM

одновременно нарушало работу контрольных точек и снижало клоногенную выживаемость, тогда как воздействие на 53BP1 изменяло клеточный цикл без сопоставимой радиосенсибилизации [33].

Более непосредственная функциональная связь была показана для оси Sp1-CDK1. Нокдаун Sp1 снижал клоногенную выживаемость HeLa и SiHa после облучения и увеличивал накопление клеток в G2/M; влияние Sp1 реализовывалось через регуляцию CDK1, а подавление CDK1 устраняло радиорезистентный эффект сверхэкспрессии Sp1 [37].

Уход от апоптоза также может способствовать выживанию после облучения. Снижение экспрессии сурвивина в клетках C33A уменьшало клоногенную выживаемость и усиливало радиационно-индуцированный апоптоз и G2/M-арест. Этот эффект зависел от проапоптотического белка PUMA и воспроизводился в ксенографтной модели [38].

Следовательно, изменения клеточного цикла и апоптоза являются важными компонентами радиационного ответа, но ни один из них отдельно не определяет радиорезистентность. Для её функционального подтверждения необходимо учитывать долгосрочную репродуктивную выживаемость клеток.

1.5.3. Окислительный стресс и метаболическая адаптация

Значительная часть повреждений при фотонном облучении опосредована АФК, поэтому способность клеток поддерживать восстановительное внутриклеточное состояние может способствовать радиорезистентности. При РШМ в этом процессе участвуют несколько взаимосвязанных метаболических систем [24, 32].

Одним из наиболее подробно исследованных примеров является глутаминовый обмен. В радиорезистентных опухолях и производной линии HeLaR была повышена экспрессия GLS2. Нокдаун GLS2 снижал клоногенную выживаемость, уменьшал содержание глутатиона и восстановительных эквивалентов, усиливал накопление АФК и апоптоз после облучения; радиосенсибилизирующий эффект был подтверждён и *in vivo* [39]. Связь радиорезистентности с редокс-метаболизмом подтверждается и тем, что одновременное нарушение гликолиза, глутатионовой и тиоредоксиновой систем преимущественно повышало чувствительность устойчивых клеток к облучению [40].

Митохондриальный регулятор UCP2 также ограничивал радиационно-индуцированный окислительный стресс: его подавление в HeLa сопровождалось повышением уровня АФК и γ H2AX, усилением апоптоза, накоплением клеток в G2/M и снижением клоногенной выживаемости [41]. При этом исследование выполнено на одной

клеточной линии и не позволяет считать UCP2 клинически подтверждённым фактором радиорезистентности.

Метаболические изменения могут быть связаны с онкогенной сигнализацией. Мутация PIK3CA-E545K поддерживала глутамин-зависимое состояние через снижение SIRT4 и регуляцию GPT1; воздействие на эту ось нарушало восстановление после повреждения ДНК и усиливало апоптоз [42]. Повышенный антиоксидантный потенциал также выявлялся в популяциях клеток РШМ со свойствами стволовости [21].

Таким образом, метаболическая радиорезистентность не определяется одним универсальным путём. Различные клетки могут использовать глутаминовый и глюкозный обмен, антиоксидантные системы и митохондриальные регуляторы для ограничения окислительных повреждений и поддержания репарации ДНК.

1.5.4. Сигнальные пути, поддерживающие клеточную выживаемость

Механизмы радиорезистентности включают более широкие сигнальные сети, регулирующие одновременно пролиферацию, апоптоз, метаболизм и DDR. Наиболее часто при РШМ описывается участие PI3K/AKT/mTOR и MAPK/ERK, однако их активация может происходить через различные вышележащие регуляторы [24, 32].

Например, транскрипционный корегулятор TRIP4 активировал PI3K/AKT- и MAPK-сигналинг, тогда как его нокдаун повышал радиочувствительность HeLa и SiHa, усиливал повреждение ДНК и изменял экспрессию RAD51. Дополнительное участие hTERT связывало этот механизм с регуляцией теломеразы [43]. Клиническая связь TRIP4 и hTERT с выживаемостью носила прогностический характер и не доказывала специфической связи с эффективностью радиотерапии.

Для MICAL2 получены более прямые данные: его подавление снижало активность PI3K/AKT- и MAPK-сигналинга, усиливало апоптоз и повреждение ДНК и повышало чувствительность исходных и приобретённо устойчивых клеток к облучению [44]. В клинической когорте высокая экспрессия MICAL2 была связана с худшим ответом на ХЛТ и более короткой выживаемостью без прогрессирования (ВБП), поэтому этот фактор можно рассматривать как маркер, ассоциированный с ответом на лечение, но не как формально доказанный предиктивный биомаркер.

Другой механизм выявлен в производных CaSki-RR и SiHa-RR после суммарного облучения 60 Гр. HSP90 поддерживал устойчивость клеток за счёт стабилизации CD147 и ограничения его FBXO6-зависимой деградации; ингибирование HSP90 или повышение

активности FBXO6 усиливало радиочувствительность в клоногенных и ксенографтных моделях [45].

Различные сигнальные регуляторы могут сходиться на общих функциональных процессах - репарации ДНК, клеточной гибели и метаболизме. Универсального сигнального пути радиорезистентности РШМ при этом не выявлено. Отдельным примером такой взаимосвязи является SOX2/Hedgehog-сигналинг, объединяющий приобретённую радиорезистентность со свойствами стволовости [28].

1.5.5. Опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход и клеточная пластичность

Популяции со свойствами опухолевых стволовых клеток (ОСК) представляют один из возможных источников внутриопухолевой гетерогенности радиационного ответа. В линии HeLa исходно выделенная боковая популяция обладала более выраженной способностью к самообновлению и опухолеобразованию, большей клоногенной выживаемостью и меньшим уровнем апоптоза после облучения, чем основная клеточная популяция [22]. Сходные свойства наблюдались в сфероидных культурах HeLa, SiHa, CaSki и C4-I, где повышение радиорезистентности сочеталось с признаками усиления репарации DSB, редокс-метаболизма и ЭМП [21].

Программы стволовости могут участвовать и в приобретённой резистентности. В HeLa-RR и SiHa-RR была активирована ось SOX2/Hedgehog; сверхэкспрессия SOX2 повышала клоногенную выживаемость и уменьшала апоптоз после облучения, тогда как его подавление восстанавливало радиочувствительность [28].

С радиационным ответом также связан эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). В клетках SiHa и CaSki нокдаун DLL4 одновременно повышал радиочувствительность, усиливал апоптоз и остаточный сигнал γ H2AX и смещал клетки к более эпителиальному фенотипу с уменьшением миграционной и инвазивной активности [46]. В небольшой клинической серии экспрессия DLL4 была выше в опухолях без ответа на ХЛТ. Однако эти данные не доказывают, что именно ЭМП являлся единственной причиной изменения радиочувствительности.

Таким образом, ОСК-подобные состояния могут участвовать как в исходной, так и в приобретённой радиорезистентности. При этом существующие исследования не всегда позволяют разграничить селекцию уже присутствовавших устойчивых клеток и истинное радиационно-индуцированное изменение клеточного состояния, поэтому термин «пластичность» требует осторожной интерпретации.

1.5.6. Гипоксия и опухолевое микроокружение

На радиационный ответ влияют не только свойства опухолевых клеток, но и их микроокружение. Наиболее обоснованным радиобиологическим фактором является гипоксия: снижение концентрации кислорода уменьшает фиксацию радиационно-индуцированных повреждений и одновременно активирует адаптивные программы клеточной выживаемости [24, 32].

Клиническое значение физиологического состояния опухоли подтверждается проспективным исследованием, в котором неблагоприятный исход РШМ был связан как с гипоксией, так и с повышенным интерстициальным давлением [47]. При этом оксигенация пространственно и временно неоднородна и изменяется в ходе фракционированного лечения, что ограничивает информативность единичного измерения.

Внеклеточные сигналы также могут участвовать в формировании устойчивости. В приобретённо радиорезистентных HeLa-RR и SiHa-RR была повышена экспрессия CXCL8; её нокдаун снижал клоногенную выживаемость после облучения и усиливал апоптоз, тогда как добавление экзогенного CXCL8 оказывало противоположный эффект [31]. Эти результаты подтверждают причинный вклад CXCL8 в клеточный радиационный ответ, однако пока не устанавливают его роль как клинического фактора микроокружения или биомаркера ответа на ЛТ.

Следовательно, микроокружение может модифицировать радиочувствительность через оксигенацию, сосудистые характеристики и внеклеточную сигнализацию, однако сила доказательств для отдельных компонентов существенно различается.

1.5.7. Эпигенетическая и посттранскрипционная регуляция

Ответ на облучение может изменяться без мутаций последовательности ДНК за счёт метилирования, состояния хроматина, эпитранскриптомной регуляции и некодирующих РНК [24].

Метилирование промотора ZNF582 было связано с ответом пациенток на лечение, тогда как в экспериментальных моделях изменение экспрессии ZNF582 влияло на клеточный цикл и чувствительность к облучению [48]. Другой механизм связан с организацией хроматина: GAGE12 способствовал поддержанию состояния хроматина, облегчавшего доступ системы репарации к повреждённой ДНК, а нарушение этого механизма повышало радиочувствительность [49].

На посттранскрипционном уровне ось HNF1 α -YTHDF3 усиливала m6A-зависимую трансляцию RAD51D и тем самым влияла на HR и выживание после облучения [36]. Некодирующие РНК также способны регулировать радиационный ответ: miR-181a повышала устойчивость через подавление проапоптотической PRKCD [50], а lncRNA-EME1 была связана с BRCA1-зависимой HR; её подавление усиливало накопление АФК, апоптоз и остаточный сигнал γ H2AX и снижало клоногенный рост [51].

Эти примеры показывают, что регуляторная пластичность может воздействовать на одни и те же конечные процессы - репарацию ДНК, клеточный цикл и апоптоз - через различные молекулярные уровни. При этом степень доказанности отдельных механизмов неодинакова: многие из них требуют независимой экспериментальной и клинической валидации.

1.5.8. ВПЧ-ассоциированные механизмы ответа на облучение

Вирусные онкобелки E6 и E7 воздействуют на p53, pRb, клеточный цикл, апоптоз и DDR, однако наличие ВПЧ само по себе не определяет единый радиочувствительный или радиорезистентный фенотип. Значение имеют генотип вируса, характер интеграции, транскрипционная активность и молекулярный контекст опухолевой клетки [52, 53].

Характер интеграции ВПЧ был связан с выживаемостью пациенток после ХЛТ, однако наблюдательные данные не позволяют считать его причинным фактором радиочувствительности [54]. Более прямые эксперименты показали, что различные транскрипты E6 могут по-разному воздействовать на p53/p21, динамику γ H2AX и сенесценцию [53]. Контекст-зависимость особенно хорошо иллюстрируется тем, что экспрессия ВПЧ16 E6 в ВПЧ-негативных клетках C33A с мутантным p53, напротив, повышала радиочувствительность [55].

ВПЧ-ассоциированная регуляция может также поддерживать устойчивые клеточные субпопуляции. E6 способствовал обогащению CD71-положительных клеток со свойствами ОСК, характеризовавшихся повышенным самообновлением и выживаемостью после облучения, тогда как подавление CD71 повышало радиочувствительность [56].

Изменения ВПЧ-ассоциированных характеристик наблюдаются и в процессе лечения. В парных биопсиях при неблагоприятном исходе сохранялись экспрессия E6/E7 и пролиферативные программы при менее благоприятном иммунном профиле [57], а анализ единичных клеток до и после облучения показал изменение клонального состава и характера интеграции ВПЧ [26].

Таким образом, ВПЧ следует рассматривать как контекст-зависимый модификатор радиационного ответа, а не как бинарный фактор радиочувствительности.

1.5.9. Взаимосвязанные регуляторные сети, лежащие в основе радиорезистентности

Рассмотренные механизмы тесно взаимодействуют друг с другом. Репарация ДНК связана с редокс-метаболизмом [39], доступностью хроматина [49] и посттранскрипционной регуляцией компонентов HR [36]. Сигнальные пути клеточной выживаемости одновременно воздействуют на DDR, апоптоз, метаболизм и свойства стволовости [28, 44], а ВПЧ-ассоциированные эффекты зависят от клеточного состояния и могут иметь противоположное влияние на радиочувствительность [53, 55, 56].

Микроокружение добавляет ещё один уровень регуляции: гипоксия и физиологические характеристики опухоли изменяют эффективность радиационного повреждения [47], а сама опухолевая популяция продолжает перестраиваться в процессе лечения, что проявляется изменением молекулярных и клональных характеристик остаточных клеток [26, 34, 57].

Радиорезистентность РШМ представляет собой гетерогенный сетевой фенотип, который может формироваться через различные сочетания DDR, клеточного цикла, апоптоза, метаболизма, сигнальных путей, стволовости и факторов микроокружения [24]. Это помогает объяснить ограниченную воспроизводимость отдельных молекулярных маркеров и обосновывает поиск интегральных биомаркерных подходов.

1.6. Молекулярные биомаркеры ответа РШМ на радиотерапию

1.6.1. Определение и классификация биомаркеров ответа на радиотерапию

Развитие технической персонализации радиотерапии пока значительно опережает использование биологических характеристик опухоли при выборе лечебной тактики. Для РШМ описано большое количество геномных, эпигенетических и белковых факторов, связанных с радиочувствительностью или исходами лечения, однако лишь небольшая их часть прошла независимую клиническую валидацию [7, 24].

При интерпретации таких исследований принципиально важно различать прогностические и предиктивные биомаркеры. Прогностический маркер характеризует вероятность клинического исхода независимо от конкретного лечения, тогда как предиктивный указывает на различия эффекта определённого терапевтического вмешательства. Поэтому формальное подтверждение предиктивного значения требует

сравнения различных вариантов лечения и оценки взаимодействия «биомаркер × лечение» [58].

Большинство исследований РШМ включает только пациенток, получающих ЛТ или ХЛТ. Выявленная внутри такой когорты связь маркера с ответом, рецидивом или выживаемостью не позволяет установить, отражает ли он специфическую пользу от радиотерапии или общую агрессивность опухоли. В таких случаях корректнее использовать определения «прогностический биомаркер» или «биомаркер, ассоциированный с ответом на лечение», а не считать его доказанным предиктивным маркером [58].

Дополнительное значение имеет время определения биомаркера. Исходные показатели характеризуют состояние опухоли до облучения, динамические - изменения непосредственно в ходе ХЛТ, а маркеры остаточной опухоли отражают свойства клеток, переживших лечение. Такое разграничение особенно важно при фракционированном воздействии, способном изменять состав и молекулярное состояние опухоли.

1.6.2. Молекулярные биомаркеры, определяемые до начала лечения

1.6.2.1. Маркеры ответа на повреждение ДНК и регуляции клеточного цикла

Компоненты DDR представляют биологически обоснованную группу кандидатных биомаркеров, поскольку эффективность распознавания и репарации повреждений непосредственно связана с радиационным ответом. Однако клинические данные показывают, что уровень отдельного белка не всегда отражает функциональное состояние соответствующего пути.

Так, высокая исходная экспрессия фосфорилированной ATM у пациенток, получавших ЛТ или ХЛТ, была связана с неблагоприятным ответом и более высоким риском неэффективности лечения [33]. В то же время в другой когорте низкое общее содержание ATM и PARP-1 было связано с худшей ВБП и общей выживаемостью (ОВ) [59]. Эти результаты не обязательно противоречат друг другу, поскольку в первом случае оценивалась активация ATM, а во втором - общее содержание белка. Это подчёркивает зависимость биологического смысла маркера от аналитического метода.

Связь DDR с исходом подтверждалась и для других факторов. Высокая экспрессия SKP2 была ассоциирована с локорегионарным рецидивом и одновременно влияла на клоногенную выживаемость и сохранение повреждений ДНК в функциональных экспериментах [60]. Для компонентов HR показаны ассоциации преламина A и RAD51 с ответом на ХЛТ и выживаемостью [61].

Несмотря на биологическую обоснованность, большинство подобных исследований проведено в отдельных центрах и не имеет независимой внешней валидации. Поэтому DDR-маркеры пока следует рассматривать преимущественно как прогностические или ассоциированные с ответом на лечение кандидаты, а не как доказанные предиктивные биомаркеры.

1.6.2.2. Маркеры гипоксии и опухолевого микроокружения

Гипоксия является одним из наиболее обоснованных факторов снижения радиочувствительности, однако её клиническая оценка осложняется пространственной неоднородностью опухоли и различиями используемых методов. Прямое измерение оксигенации и интерстициального давления показало связь неблагоприятного физиологического состояния опухоли с худшими исходами после ЛТ [47].

Более доступным молекулярным показателем является HIF-1 α : его повышенная экспрессия была связана с менее благоприятной выживаемостью [62]. Однако HIF-1 α регулирует не только ответ на недостаток кислорода, но и ангиогенез и метаболическую адаптацию, поэтому не является простым эквивалентом степени гипоксии.

Перспективным подходом стало объединение разных способов оценки одного фенотипа. Fjeldbo и соавт. сопоставили шестигенную сигнатуру гипоксии и динамическую МРТ с контрастным усилением (ДКУ-МРТ); два метода совпадали примерно в 75% случаев, а их совместное использование лучше разделяло пациенток по риску прогрессирования, чем каждый показатель отдельно [63]. Аналогично BIOEMBRACE показало клиническую значимость ряда показателей микроокружения, включая PD-L1 и L1CAM, в современной когорте пациенток, получавших ХЛТ и брахитерапию [23].

Таким образом, гипоксия и микроокружение содержат клинически значимую информацию, однако отдельные показатели отражают лишь разные компоненты сложного фенотипа. Это поддерживает использование комбинированных, а не одномолекулярных подходов.

1.6.2.3. Маркеры стволовости, метаболизма и сигнальных путей

Факторы стволовости, метаболической адаптации и клеточной выживаемости также исследуются как потенциальные биомаркеры. Для SOX2 и OCT4 высокая экспрессия до лечения была связана с неблагоприятным исходом радиотерапии [64], а проспективное исследование комбинированного ОСК-ассоциированного фенотипа подтвердило его связь с более низкой выживаемостью без локорегионарного рецидива [65]. Механистическая

роль SOX2 в радиорезистентности дополнительно подтверждена функциональными экспериментами [28].

Для других маркеров результаты менее устойчивы. Повышенная экспрессия ALDH1 была связана с остаточной опухолью или ранним рецидивом, тогда как для CD133 и Nanog значимой связи выявлено не было [66]. Метаболический фактор GLS2 [39] и сигнальные регуляторы TRIP4 [43] и MICAL2 [44] имеют экспериментальное обоснование, однако клинические данные основаны преимущественно на небольших или ретроспективных выборках.

Ограниченность одномаркерного подхода показывает пятибелковая панель BCL2, HER2, CD133, CAIX и ERCC1, которая дополняла клинические показатели при стратификации риска, но была проверена только внутри исходной когорты [67]. Такие результаты поддерживают идею, что интеграция нескольких биологических процессов может быть информативнее определения одного маркера.

1.6.3. Эпигенетические и ВПЧ-ассоциированные биомаркеры

Среди эпигенетических показателей наиболее значимые клинические данные получены для метилирования ДНК. Исходное гипометилирование PAX1 было связано с остаточной опухолью после ХЛТ, а объединение этого показателя с клиническими параметрами обеспечивало площадь под ROC-кривой (area under the curve, AUC) 0,823, хотя модель имела только внутреннюю валидацию [68]. Для ZNF582 связь уровня метилирования с ответом была воспроизведена в отдельной проспективной когорте [48].

Другие эпигенетические механизмы пока имеют преимущественно экспериментальное подтверждение. К ним относятся регуляция доступности хроматина с участием GAGE12 [49], m6A-зависимая ось HNF1 α /YTHDF3/RAD51D [36] и miR-181a [50].

Специфичную для РШМ группу составляют ВПЧ-ассоциированные показатели. Характер интеграции ВПЧ сохранял связь с выживаемостью без признаков заболевания (disease-free survival, DFS) в когорте разработки и независимой валидационной выборке [54], а высокая транскрипционная активность E6/E6* была ассоциирована с менее благоприятными исходами и поддержана функциональными данными [53]. Однако и эти характеристики остаются преимущественно прогностическими или ассоциированными с ответом на лечение, поскольку различия пользы от альтернативных лечебных стратегий не исследовались [58].

1.6.4. Динамические биомаркеры и биомаркеры, определяемые в ходе лечения

Изменение биомаркера в процессе ХЛТ потенциально может отражать ранний ответ точнее, чем единственное измерение до лечения. Для ZNF582 описаны изменения метилирования непосредственно в ходе курса ЛТ [48], а последовательное определение PAX1 показало, что различия между полным и частичным ответом становились наиболее выраженными в середине лечения; сочетание динамического показателя с размером опухоли достигало AUC 0,86 [69].

Молекулярное профилирование парных биопсий также показало, что при неблагоприятном исходе во время ХЛТ могут сохраняться пролиферативные и биосинтетические программы, транскрипция E6/E7 и менее выраженный иммунный ответ [57]. Вирусологические показатели также меняются во времени: сохранение ВПЧ после лечения было связано с рецидивированием [70], однако динамика вирусной нагрузки и элиминации ВПЧ не во всех исследованиях устойчиво различала группы ответа [71].

Преимущество динамических биомаркеров заключается в возможности оценить состояние опухоли уже под действием лечения. Однако для их практического применения необходимо заранее определить оптимальное время анализа и получить результат достаточно рано, чтобы он ещё мог повлиять на лечебную тактику.

1.6.5. Сигнатуры экспрессии генов и транскриптомные сигнатуры

Транскриптомный анализ позволяет одновременно оценивать множество процессов, участвующих в радиорезистентности. Одним из ранних примеров стал 62-генный классификатор, сформированный на основании различий экспрессии между опухолями с разной степенью регрессии после ЛТ, однако его разработка проводилась всего на 19 образцах и без внешней проверки [72].

Анализ изменений непосредственно в ходе лечения потенциально может быть более информативным. В исследовании RTOG 0128 семигенная сигнатура, построенная по 13 парным биопсиям до и во время терапии, разделяла случаи локального контроля и неэффективности лечения, однако крайне небольшой объём выборки создавал высокий риск переобучения [73].

Более трансляционный дизайн использовали Buttarelli и соавт.: комбинированный протеомный и транскриптомный поиск позволил выделить ANXA2, NDRG1 и STAT1, после чего различия были подтверждены методами цифровой ПЦР и количественной ПЦР с обратной транскрипцией (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) [74]. Анализ

отдельных ОСК-подобных клеточных популяций также позволял выявлять кандидатные транскрипты, которые могли теряться при исследовании опухоли в целом [75].

Сигнатуры могут формироваться и на основании конкретных биологических процессов. Гипоксическая сигнатура дополняла визуализационную оценку [63], тогда как показатель NDB, отражавший программы внеклеточного матрикса (ВКМ), ЭМП и TGF- β -сигналинга, демонстрировал связь с исходами в нескольких независимых наборах данных, несмотря на крайне малую исходную выборку разработки [76].

Основной проблемой остаётся воспроизводимость. При сравнении сигнатур радиочувствительности между независимыми панелями клеточных линий совпадение отдельных генов было низким [17]. Поэтому устойчивые биологические процессы и независимо подтверждённые комбинации признаков представляются более перспективными, чем единичные высокоранжированные гены.

1.6.6. Биоинформатический поиск и приоритизация кандидатных биомаркеров

Высокоразмерное профилирование позволяет выявлять сотни и тысячи молекулярных различий, большинство из которых невозможно непосредственно проверить экспериментально. Биоинформатический анализ используется для приоритизации ограниченного набора кандидатных генов с помощью анализа дифференциальной экспрессии, функционального обогащения, сетей взаимодействий и клинических данных [7, 24].

Принципиальное значение имеет происхождение исходных данных. Сравнение радиочувствительных и радиорезистентных опухолей либо исходных клеток и производных после длительного облучения непосредственно связано с радиационным фенотипом. Напротив, сравнение опухоли с нормальной тканью или поиск генов, связанных только с общей выживаемостью, прежде всего выявляет признаки опухолевого процесса или прогностические факторы. Даже ассоциация с исходом исключительно у пациенток, получавших ЛТ, не доказывает предиктивного значения без анализа взаимодействия «биомаркер $\times$ лечение» [58].

Выявление дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) с последующим анализом по онтологии генов (Gene Ontology, GO), Киотской энциклопедии генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) и другим методам функционального обогащения позволяет определить биологические процессы, в которых сосредоточены изменения. Анализ сетей белок-белковых взаимодействий (protein-protein interaction networks, PPI) дополнительно помогает выделить наиболее связанные узлы. Однако ни

обогащение определённого пути, ни высокая связность гена в PPI-сети сами по себе не доказывают его причинного участия в радиорезистентности.

Показательным примером является исследование Zhang и соавт., в котором объединение двух наборов из базы Gene Expression Omnibus (GEO) с последующей фильтрацией 298 ДЭГ позволило выделить ASPH и NKAPP1 [77]. Такой подход существенно уменьшает число кандидатов, но остаточные батч-эффекты и дополнительный отбор по общей выживаемости ограничивают специфичность результатов именно в отношении радиационного ответа.

Более сильный дизайн предполагает сочетание биоинформатического поиска с экспериментально подтверждённым фенотипом и функциональной проверкой. Ну и соавт. после получения HeLa-RR и SiHa-RR суммарной дозой 60 Гр выявили транскриптомные изменения, провели RT-qPCR-валидацию и приоритизацию CXCL8, после чего функционально показали его влияние на радиочувствительность [31]. Другие стратегии включали объединение протеомных и транскриптомных данных [74], анализ ОСК-подобных популяций [75] и проверку сигнатур в независимых наборах данных [76].

Секвенирование РНК единичных клеток (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) и пространственная транскриптомика позволяют учитывать клеточную гетерогенность. Так был приоритизирован PGM2, однако его нокдаун изменял пролиферацию, миграцию и инвазию без прямой проверки радиочувствительности, поэтому PGM2 остаётся кандидатом, ассоциированным с резистентностью, а не доказанным маркером радиационного ответа [78].

Следовательно, результат биоинформатической приоритизации следует рассматривать как набор кандидатных молекул для последующей экспериментальной проверки, а не как готовый диагностический тест. Условную последовательность можно представить следующим образом:

поиск кандидатов → техническая валидация → функциональная проверка радиационного ответа → независимая клиническая валидация → при необходимости подтверждение предиктивного значения.

Особенно важна независимая проверка, поскольку даже хорошо ранжированные отдельные гены нередко плохо воспроизводятся между наборами данных [17].

1.6.7. Мультимаркерные модели и ограничения клинического внедрения

После приоритизации отдельных кандидатов следующим направлением становится их объединение в мультимаркерные модели. Поскольку радиационный ответ формируется

взаимодействием нескольких биологических процессов, такие модели потенциально способны превосходить одиночные показатели [7, 24]. Пятибелковая панель Choi [67] и панель циркулирующих антигена плоскоклеточной карциномы (squamous cell carcinoma antigen, SCC-Ag), CA125, IL-6 и отношения нейтрофилов к лимфоцитам (neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR), достигавшая AUC 0,86 [79], демонстрируют такую возможность, однако обе требуют независимой внешней валидации.

Интеграция молекулярных данных с визуализацией также улучшала стратификацию: комбинировались генные и МРТ-признаки гипоксии [63], диффузионные МРТ-показатели с ВПЧ-статусом и клиническими параметрами [80], а также радиомические признаки позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и МРТ [81, 82]. Последний пример показал существенную зависимость результатов внешней валидации от гармонизации многоцентровых данных.

Модель CerviPro, включавшая более тысячи пациенток и сочетавшая клинические, радиомические и автоматически извлечённые признаки компьютерной томографии (КТ), также демонстрировала снижение эффективности во внешних когортах [83]. Это показывает, что увеличение сложности модели не решает автоматически проблему её переносимости.

Большинство подобных моделей остаются прогностическими либо ассоциированными с ответом на лечение, а не формально предиктивными [58]. Высокие AUC или индекс конкордантности (concordance index, C-index), характеризующий способность модели правильно ранжировать пациенток по риску, сами по себе недостаточны для клинического применения без внешней валидации, калибровки и доказательства того, что результат модели способен изменить лечебную тактику.

Однако увеличение числа признаков и сложности модели не устраняет основную проблему биомаркерных исследований РШМ - недостаточную трансляцию исследовательских ассоциаций в воспроизводимый клинический инструмент. Систематический анализ 77 прогностических моделей показал недостаточную внешнюю валидацию, оценку калибровки и воспроизводимость; ни одна модель не имела общего низкого риска систематической ошибки по инструменту оценки риска систематической ошибки в прогностических моделях (Prediction model Risk Of Bias ASsessment Tool, PROBAST) [84].

Особенно высок риск переобучения при небольших выборках и высокоразмерных молекулярных данных, что характерно для многих ранних транскриптомных исследований [72-76]. Дополнительным источником вариабельности являются технические различия. В радиомике рассчитанные признаки зависят от оборудования, протоколов, сегментации и

обработки изображений [85]; необходимость гармонизации многоцентровых данных была непосредственно продемонстрирована при внешней проверке ПЭТ/МРТ-моделей [82].

Необходимо учитывать и биологическую гетерогенность. Единственная биопсия отражает лишь часть пространственно неоднородной опухоли, а её состояние может меняться во время лечения, что показывают различия молекулярной и визуализационной оценки гипоксии [63] и динамика PAX1 [69].

Наконец, большинство исследований не позволяет доказать предиктивное значение, поскольку все пациентки получают сходное лечение [58]. Поэтому ограничениями остаются одновременно малые выборки, переобучение, техническая стандартизация, недостаточная внешняя валидация и пространственно-временная гетерогенность опухоли.

1.6.8. Требования к клинически применимым биомаркерам

Переход от кандидатного маркера к клиническому тесту требует нескольких последовательных уровней доказательности. Сначала должна быть подтверждена аналитическая валидность - воспроизводимость измерения при стандартизованных условиях получения и обработки материала [86]. Аналогичные требования относятся к визуализационным биомаркерам, для которых необходимо обеспечить устойчивость результатов между оборудованием, протоколами и центрами [87].

Следующим этапом является клиническая валидность, то есть воспроизводимая связь с клинически значимым исходом в независимых популяциях. Внутренняя кросс-валидация или разделение одной выборки на обучающую и тестовую не заменяют внешнюю валидацию [84]. Кроме того, новый маркер должен предоставлять дополнительную информацию по сравнению с уже известными клиническими факторами.

Для заявления предиктивного значения необходим ещё более высокий уровень доказательности: различия исходов внутри одной лечебной группы недостаточны; требуется показать, что эффект терапии зависит от статуса биомаркера, то есть подтвердить взаимодействие «биомаркер × лечение» [58, 88]. Наиболее убедительно это достигается в проспективных рандомизированных исследованиях либо при заранее спланированном анализе материала из рандомизированных исследований [89].

Даже доказанная предиктивность не равнозначна клинической полезности. Результат теста должен реально влиять на выбор лечения и быть доступным в сроки, позволяющие изменить лечебную тактику [88]. Для динамических маркеров это особенно важно: анализ должен быть выполнен достаточно рано в ходе ХЛТ.

Развитие клинически применимого биомаркера можно представить как последовательность:

биологически обоснованный кандидат → аналитическая валидация → независимая клиническая валидация → подтверждение дополнительной информативности → доказательство предиктивного значения при необходимости → подтверждение клинической полезности.

Большинство описанных для РШМ молекулярных показателей пока находится на первых этапах этой последовательности, что объясняет отсутствие рутинной биологической стратификации при проведении радиотерапии.

1.7. Перспективы дальнейших исследований

1.7.1. Нерешённые биологические вопросы и ограничения экспериментальных моделей

Радиорезистентность РШМ формируется в результате взаимодействия репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, клеточной гибели, метаболизма, гипоксии, стволовости и сигнальных механизмов микроокружения. Их относительный вклад может различаться между опухолями и изменяться в ходе лечения, поэтому поиск единственного универсального механизма радиорезистентности представляется маловероятным [7, 24].

Граница между исходной и приобретённой устойчивостью также не является абсолютной. Повторное облучение может одновременно отбирать уже существующие устойчивые субпопуляции и индуцировать изменения состояния выживших клеток. Именно поэтому сравнение только исходной и конечной популяций не позволяет однозначно разделить селекцию и адаптивное репрограммирование.

Дополнительным ограничением являются используемые экспериментальные модели. Установленные линии HeLa, SiHa и CaSki удобны для воспроизводимых функциональных исследований, но не отражают полностью гетерогенность опухоли пациента и её микроокружение [17]. Более клинически релевантный промежуточный уровень представляют культуры, полученные непосредственно из опухолевого материала. Xing и соавт. методом условного репрограммирования получили три радиорезистентные и две радиочувствительные первичные культуры РШМ, сохранявшие относительные различия радиочувствительности *in vitro* и в ксенографтах [90]. Такие модели дополняют стандартные клеточные линии, однако также подвержены селекции при культивировании и не воспроизводят интактное опухолевое микроокружение.

Модели, полученные из опухолевого материала пациенток, также не являются полным эквивалентом исходной опухоли. Успешное получение культуры может сопровождаться преимущественным сохранением отдельных клеточных популяций, а условия *in vitro* изменяют взаимодействия со стромой, иммунными клетками и внеклеточным матриксом. Кроме того, число доступных независимых пациент-ассоциированных моделей обычно невелико. Поэтому их целесообразно использовать не вместо стандартных клеточных линий, а как дополняющий уровень между воспроизводимыми клеточными системами и непосредственным исследованием опухолевой ткани [90].

Дополнительную сложность создаёт пространственная и временная гетерогенность. Отдельная биопсия характеризует лишь ограниченный участок опухоли, тогда как гипоксия, клеточный состав и состояние микроокружения могут существенно различаться между её зонами. Например, классификация гипоксии на основании визуализационных и генных показателей совпадала примерно в 75% случаев, что указывает на частично различающуюся информацию, получаемую разными методами [63]. Не менее важно, что фракционированная ХЛТ постоянно изменяет состав и состояние выжившей опухолевой популяции. Поэтому исходный образец может хорошо характеризовать состояние до лечения, но не отражать биологические свойства клеток, сохраняющихся после нескольких фракций. Для разграничения исходных признаков и изменений, возникающих под действием терапии, особенно информативны парные образцы и последовательный забор материала.

1.7.2. Интегративные и продольные подходы к изучению радиорезистентности

Динамический характер радиорезистентности определяет необходимость исследования клеток и опухолей в процессе формирования фенотипа, а не только в одной конечной временной точке. Продольные модели позволяют проследивать, какие изменения существовали изначально, какие клетки преимущественно переживают повторное облучение и какие молекулярные состояния возникают уже под действием лечения. Клеточное баркодирование, анализ единичных клеток и последовательное молекулярное профилирование подтверждают возможность как клональной селекции, так и адаптивной перестройки популяций [25-27].

Значение анализа в динамике хорошо иллюстрируют клинические биомаркеры. При последовательном определении метилирования PAX1 различия между группами с полным и частичным ответом становились наиболее выраженными в середине курса лечения, а не

до его начала [69]. Анализ парных транскриптомных и иммунных профилей также показал, что опухоли с последующим неблагоприятным исходом сохраняли во время ХЛТ отличающиеся пролиферативные, вирусные и иммунные характеристики [57]. Такие результаты показывают, что биологическая информация, полученная в процессе терапии, может дополнять исходную характеристику опухоли.

Продольный подход целесообразно сочетать с несколькими экспериментальными системами. Стандартные клеточные линии позволяют проводить контролируемое облучение и направленное воздействие на отдельные механизмы, производные после повторного облучения - изучать изменения, возникающие при накоплении дозы, а культуры из опухолевого материала пациенток - проверять наблюдения в более клинически релевантном и гетерогенном контексте [90]. Совпадение результатов в нескольких моделях повышает надёжность вывода и уменьшает вероятность того, что выявленный эффект специфичен только для одной клеточной линии.

Одноклеточные методы дополнительно позволяют различать два процесса, которые при анализе смешанной популяции могут выглядеть одинаково: изменение клеточного состава вследствие преимущественного выживания отдельных субпопуляций и перестройку состояния самих выживших клеток. Такое разграничение принципиально важно для интерпретации приобретённой радиорезистентности, поскольку селекция и адаптивное репрограммирование способны приводить к сходным изменениям средней экспрессии генов.

При этом молекулярные данные необходимо связывать с функциональным фенотипом. Изменение экспрессии гена само по себе не доказывает его участия в радиорезистентности, если оно не сопоставлено с клоногенной выживаемостью или другими специфическими показателями радиационного ответа. Аналогично, клиническая интеграция нескольких типов данных может повышать информативность, однако сложность модели не компенсирует отсутствие внешней валидации: это показывают исследования гипоксии и мультимодальные модели, включая CerviPro [63, 83].

Поэтому перспективный дизайн исследований должен сочетать фенотипическую характеристику, продольное молекулярное профилирование, взаимодополняющие экспериментальные модели и независимую проверку полученных результатов.

1.7.3. От молекулярных механизмов к клинически применимым биомаркерам и прецизионной радиотерапии

Связь молекулярного изменения с радиорезистентностью ещё не означает, что оно является клинически применимым биомаркером или терапевтической мишенью. Для биомаркера необходима воспроизводимая связь с биологическим состоянием или клиническим исходом, тогда как для терапевтической мишени требуется подтверждение причинной роли посредством функционального воздействия.

Такой подход хорошо иллюстрируют CXCL8 и RhoC-ROCK2, воздействие на которые непосредственно изменяло радиационный ответ клеток [31, 35]. Напротив, для PGM2 было показано влияние на пролиферацию, миграцию и инвазию, однако прямое изменение радиочувствительности после его подавления не исследовалось [78]. Поэтому подобные молекулы следует рассматривать как кандидатные факторы, пока их роль не подтверждена специфическими функциональными тестами.

Механистическая значимость также не равнозначна клинической предиктивности. Ассоциация биомаркера с исходом у пациенток, получавших одинаковое лечение, не доказывает различия пользы от этого лечения в зависимости от статуса маркера [58]. Наиболее убедительный путь трансляции включает связь клинически определённого ответа с молекулярным поиском и последующей функциональной проверкой, как это реализовано, например, в работе Buttarelli и соавт. [74].

Таким образом, наиболее перспективны кандидаты, для которых совпадают несколько уровней доказательности: связь с радиационным фенотипом, воспроизводимость в разных моделях, функциональное изменение ответа на облучение и подтверждение в клиническом материале.

Следующим этапом такой трансляции является переход от технической индивидуализации радиотерапии к учёту биологических характеристик опухоли при выборе лечебной тактики [7]. Один исходный маркер вряд ли способен полностью описать гетерогенную опухоль, поэтому наиболее реалистичным представляется объединение молекулярных, визуализационных и клинических данных. Возможность такого подхода показана при совместной оценке генных и визуализационных признаков гипоксии, в BIOEMBRACE и мультимодальных моделях типа CerviPro [23, 63, 83].

Вторым компонентом может стать оценка ответа в динамике. Например, различия метилирования PAX1 становились более выраженными непосредственно в ходе лечения, чем до его начала [69]. Концептуально такой подход можно представить как:

исходная стратификация → ранняя оценка ответа → адаптация лечения.

Однако изменение лечебной тактики на основании биомаркеров возможно только после доказательства их воспроизводимости и клинической полезности. Особенно важно отличать прогнозирование неблагоприятного исхода от формально предиктивного биомаркера, показывающего различия эффекта конкретного лечения [58].

1.7.4. Итоговое обобщение

В целом радиорезистентность РШМ представляет собой гетерогенный и динамический фенотип, формирующийся при взаимодействии DDR, клеточного цикла и клеточной гибели, гипоксии, редокс-метаболизма, стволовости, сигнальных процессов и опухолевого микроокружения [7, 24]. Его выраженность определяется как исходными особенностями опухолевой популяции, так и селекцией и адаптивными изменениями при повторном облучении.

Ни одна экспериментальная система не позволяет полностью охарактеризовать эту сложность. Установленные клеточные линии обеспечивают воспроизводимость механистических исследований, производные после длительного облучения позволяют изучать приобретённые изменения, а культуры из опухолевого материала пациенток повышают клиническую релевантность модели [90]. Наиболее убедительны результаты, воспроизводимые в нескольких системах и подтверждённые функциональной оценкой радиационного ответа.

Поэтому дальнейшее изучение радиорезистентности РШМ целесообразно строить на сочетании фенотипической характеристики, экспериментальных моделей повторного облучения, молекулярного профилирования, биоинформатической приоритизации кандидатов и последующей функциональной и клинической валидации. Именно такой подход создаёт основу для перехода от выявления молекулярных ассоциаций к клинически применимым биомаркерам и стратегиям персонализации радиотерапии.

2. Материалы и методы

2.1 Клеточные линии, получение пациент-ассоциированных культур и условия культивирования

В работе использовали клеточные линии рака шейки матки человека HeLa, SiHa и CaSki, а также клетки, полученные от пациента до- и после проведения химиолучевой терапии AdMer-35 и AdMer-43, соответственно. Клеточные линии HeLa, SiHa и CaSki были получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки HeLa и SiHa культивировали в среде DMEM, содержащей 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки CaSki культивировали в среде RPMI с добавлением 10% инактивированной FBS и той же смеси антибиотиков и антимикотика. Культуры поддерживали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и пассировали два раза в неделю.

Линии AdMer-35 и AdMer-43 были получены в нашей лаборатории Татарниковой И.С. Формирование устойчивой первичной культуры занимало около одного месяца. После достижения стабильного роста клетки AdMer-35 и AdMer-43 переводили на среду DMEM с 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл гентамицина.

Перед проведением экспериментов клетки открепляли от культуральной поверхности с использованием TrypLE Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и подсчитывали на автоматическом счётчике TC20 (Bio-Rad, США). Морфологию клеточных культур оценивали с использованием инвертированного фазово-контрастного микроскопа EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific, США) при увеличении $\times 4$. Исследование с использованием биопсийного материала было одобрено этическим комитетом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (протокол № 1 от 11 января 2022 г.). Биологический материал получали после подписания пациенткой информированного согласия.

2.2 Рентгеновское облучение клеток

Для проведения экспериментов клетки высевали в 6-луночные планшеты за сутки до облучения в количестве $2-5 \times 10^5$ клеток на лунку в 2 мл соответствующей культуральной среды. Рентгеновское облучение проводили на базе НИО онкологии и радиотерапии Института онкологии и нейрохирургии НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина на установке SmART+ (Precision X-Ray, США) при напряжении 225 кВ и силе тока 30 мА с использованием медного фильтра толщиной 0,3 мм и коллиматора 40 $\times$ 40 мм. При

указанных параметрах доза 5 Гр накапливалась в течение 1 мин, а доза 10 Гр — в течение 2 мин. Необлучённые клетки соответствующей линии использовали в качестве контроля.

2.3 Получение производных клеточных линий после фракционированного облучения до суммарной дозы 60 Гр

Для получения производных клеточных линий клетки HeLa, SiHa и CaSki подвергали последовательному фракционированному рентгеновскому облучению до достижения суммарной дозы 60 Гр. Облучение проводили в 6-луночных планшетах с использованием параметров рентгеновской установки, описанных выше.

На первом этапе проводили 10 последовательных облучений по 2 Гр с интервалами 2-3 сут, в результате чего суммарная накопленная доза составляла 20 Гр. Далее клетки облучали 4 раза по 5 Гр, увеличивая суммарную дозу до 40 Гр. Между воздействиями клетки культивировали до восстановления роста и достижения приблизительно 80% конфлюентности; продолжительность восстановительного периода зависела от клеточной линии и составляла около недели.

На заключительном этапе проводили 2 облучения по 10 Гр, после которых суммарная накопленная доза достигала 60 Гр. Между облучениями клетки также культивировали до восстановления роста; после воздействия дозой 5 и 10 Гр данный период составлял одну неделю и более в зависимости от клеточной линии.

После последнего облучения клетки культивировали до восстановления роста и достижения приблизительно 80% конфлюентности. Часть клеток замораживали и хранили в жидком азоте для сохранения полученных культур, оставшиеся использовали в последующих экспериментах.

2.4 Оценка метаболической активности митохондрий методом МТТ

Для оценки метаболической активности митохондрий после облучения клетки снимали с культуральной поверхности при помощи TrypLE Express Enzyme, подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл соответствующей культуральной среды. Для каждого образца использовали пять технических повторов. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 суток.

По окончании инкубации в каждую лунку добавляли 10 мкл водного раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч. Затем среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 570 нм с регистрацией фонового сигнала при 620 нм.

При оценке ответа исходных клеточных линий на однократное облучение полученные значения нормировали на соответствующий необлучённый контроль, принятый за 100%. При сравнении исходных и производных клеточных линий после накопления суммарной дозы 60 Гр значения для каждой линии нормировали на соответствующие исходные необлучённые клетки SiHa, HeLa или CaSki, принятые за 100%.

2.5 Оценка жизнеспособности клеток с помощью ЛДГ-теста

Для оценки цитотоксического действия ионизирующего излучения на клетки AdMer-35, AdMer-43 и SiHa определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой в культуральную среду при нарушении целостности плазматической мембраны. Анализ проводили с использованием набора CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения рабочего диапазона метода предварительно оценивали спонтанное и максимальное высвобождение ЛДГ при различной плотности клеток: 0, 1×10^3 , 3×10^3 , 5×10^3 и 10×10^3 клеток на лунку 96-луночного планшета в 100 мкл культуральной среды. Максимальное высвобождение ЛДГ определяли после добавления лизирующего буфера. Для дальнейших экспериментов использовали плотность 5×10^3 клеток на лунку.

После облучения дозой 5 Гр клетки подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл соответствующей культуральной среды. Необлучённые клетки использовали в качестве контроля. Активность ЛДГ в культуральной среде определяли через 4 и 6 суток после облучения согласно протоколу производителя. Оптическую плотность измеряли при 490 нм с коррекцией фонового сигнала при 680 нм. Цитотоксичность выражали в процентах и рассчитывали как отношение разности между активностью ЛДГ в исследуемом образце и уровнем спонтанного высвобождения ЛДГ к разности между максимальным и спонтанным высвобождением ЛДГ. Жизнеспособность клеток рассчитывали как разность между 100% и полученным значением цитотоксичности.

2.6 Анализ апоптоза методом проточной цитометрии

Для оценки апоптоза, индуцируемого облучением, клетки SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 высевали в 6-луночные планшеты по 1×10^5 клеток на лунку и подвергали однократному рентгеновскому облучению дозой 5 Гр. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 5 суток.

По окончании инкубации клетки снимали с культуральной поверхности, промывали 1 мл PBS и окрашивали с использованием набора Annexin V-FITC/PI Cell Apoptosis Detection Kit (Servicebio, Китай) согласно инструкции производителя. Флуоресценцию

регистрировали на проточном цитометре NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) в каналах FITC и PE-Texas Red. Для настройки гейтирования использовали образцы, окрашенные отдельно Annexin V-FITC или пропидия йодидом. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress.

По характеру окрашивания Annexin V-FITC и PI определяли распределение клеток по стадиям апоптоза. Основным показателем для сравнительного анализа служила доля клеток на стадии позднего апоптоза, одновременно положительных по Annexin V-FITC и PI. Для клеток SiHa, HeLa и CaSki анализ также проводили при сравнении исходных и производных после накопления суммарной дозы 60 Гр культур до и после дополнительного однократного облучения дозой 5 Гр.

2.7 Анализ клеточного цикла методом проточной цитометрии

Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 высевали в 6-луночные планшеты по 2×10^5 клеток на лунку. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. По окончании инкубации облучённые и контрольные клетки снимали с культуральной поверхности, промывали PBS и фиксировали охлаждённым 75% этанолом в течение ????. Фиксированные клетки окрашивали DAPI (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение 1 ч. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитометре NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) в канале Pacific Blue. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress.

Определяли долю клеток в фазах G0/G1, S и G2/M клеточного цикла. Основным показателем для сравнительной оценки радиационного ответа служила доля клеток в фазе G2/M через 24 ч после облучения. Данный показатель использовали как при сравнении исходных клеточных линий, так и при сопоставлении исходных и производных линий после накопления суммарной дозы 60 Гр и последующего однократного облучения дозой 5 Гр.

2.8 Клоногенный анализ

Клоногенную выживаемость клеток SiHa, HeLa и CaSki оценивали для исходных клеточных линий и соответствующих производных линий после накопления суммарной дозы 60 Гр. Для оценки выживаемости после облучения клетки подвергали однократному воздействию дозой 5 Гр, после чего снимали с культуральной поверхности, подсчитывали и высевали в 6-луночные планшеты в соответствующей культуральной среде.

Необлучённые клетки высевали по 150 клеток на лунку, клетки после облучения дозой 5 Гр — по 750 и 1500 клеток на лунку в 2 мл среды. После посева клетки

инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 12-14 суток в зависимости от скорости формирования колоний. По окончании инкубации культуральную среду удаляли, клетки промывали PBS и фиксировали 4% формальдегидом в течение 15 мин при комнатной температуре. После повторной промывки PBS колонии окрашивали 0.5% раствором генцианвиолета в этаноле в течение 1 мин при комнатной температуре. Затем краситель удаляли, планшеты промывали дистиллированной водой, высушивали и фотографировали с использованием системы ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США). Колонии подсчитывали вручную в приложении «Морфометрия»; колонией считали скопление, содержащее более 50 клеток.

Эффективность колониеобразования (plating efficiency, PE) рассчитывали как отношение числа сформировавшихся колоний в необлучённом контроле к числу посеянных клеток контрольного образца. Фракцию выживших клеток после облучения дозой 5 Гр (surviving fraction, SF5) рассчитывали как отношение числа колоний, сформировавшихся после облучения, к произведению числа посеянных облучённых клеток и PE соответствующего необлучённого контроля. Для исходных и производных после накопления суммарной дозы 60 Гр линий PE рассчитывали отдельно по соответствующему необлучённому контролю.

2.9 Оценка пролиферативной активности клеток в реальном времени

Пролиферативную активность клеток оценивали в реальном времени с использованием системы xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, США) и 16-луночных планшетов E-Plate 16. Перед внесением клеток в каждую лунку добавляли 100 мкл соответствующей культуральной среды, после чего регистрировали фоновое значение импеданса. Клетки высевали по 5×10^3 клеток на лунку в двух технических повторах. После посева планшеты инкубировали в течение 30 мин для прикрепления клеток, после чего помещали в прибор xCELLigence RTCA DP.

Измерения проводили в стандартных условиях культивирования в течение 120 ч с регистрацией клеточного индекса (Cell Index, CI) каждые 30 мин. CI использовали как инструментальный показатель динамики роста клеточной культуры, а не как прямую оценку числа клеток. Для количественного сравнения групп анализировали значение CI через 96 ч наблюдения, соответствующее участку выхода кривых на плато.

Метод применяли для оценки пролиферативной активности клеточных линий SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 и их ответа на однократное облучение дозой 5 Гр. Среди

производных линий после накопления суммарной дозы 60 Гр пролиферативную активность дополнительно оценивали только для клеток HeLa.

2.10 Оценка миграционной активности клеток в реальном времени

Миграционную активность клеток оценивали в реальном времени с использованием системы xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, США) и 16-луночных планшетоов CIM-16, состоящих из верхней и нижней камер, разделённых микропористой мембраной.

Перед внесением клеток в нижнюю и верхнюю камеры добавляли 160 и 30 мкл соответствующей культуральной среды соответственно. После регистрации фонового сигнала клетки суспендировали в соответствующей бессывороточной среде и вносили в верхнюю камеру в количестве 8×10^4 клеток на лунку. Для каждого образца использовали два технических повтора. После посева планшеты инкубировали в течение 30 мин и помещали в прибор xCELLigence RTCA DP.

Измерения проводили в стандартных условиях культивирования в течение 120 ч с регистрацией клеточного индекса каждые 30 мин. Изменение CI использовали как инструментальный показатель миграционной активности клеток. Базальную миграционную активность оценивали для клеточных линий SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43. Для количественного сравнения исходных клеточных линий использовали значение CI через 30 ч наблюдения. Среди производных линий после накопления суммарной дозы 60 Гр миграционную активность дополнительно исследовали только для клеток HeLa. Для количественного сравнения исходных и производных клеток HeLa использовали значение CI через 72 ч наблюдения.

2.11 Биоинформатический анализ и отбор кандидатных генов

Для поиска генов, потенциально связанных с особенностями радиационного ответа при раке шейки матки, использовали данные транскриптомного профилирования, представленные в базе Gene Expression Omnibus (GEO). В анализ были включены два комплементарных набора данных — GSE56363 и GSE7410. Набор GSE56363 включал образцы первичных опухолей 21 пациентки с местно-распространённым плоскоклеточным РШМ, полученные до начала химиолучевой терапии. В зависимости от ответа на лечение пациентки были разделены на группы полного ответа (CR, $n = 12$) и неполного ответа (NCR, $n = 9$); группу CR использовали в качестве референсной. В наборе GSE7410 сравнивали образцы нормальной ткани шейки матки ($n = 5$) и опухолевой ткани пациенток группы высокого риска с метастатическим поражением лимфатических узлов ($n = 16$); в качестве референсной использовали нормальную ткань. Таким образом, GSE56363 применяли для

выявления изменений экспрессии, связанных с различиями терапевтического ответа, а GSE7410 — как дополнительный набор для оценки изменений, характерных для опухолевого фенотипа РШМ высокого риска.

Анализ дифференциальной экспрессии для каждого набора данных проводили отдельно с использованием онлайн-инструмента GEO2R. Полученные таблицы экспортировали в Microsoft Excel, идентификаторы генов приводили к Gene Symbol, после чего удаляли повторяющиеся и неидентифицированные записи. Для дальнейшего анализа отбирали дифференциально экспрессированные гены при скорректированном значении $p < 0,05$ и абсолютном значении $\log_2FC \geq 0,58$, соответствующем изменению уровня экспрессии приблизительно в 1,5 раза. Направление изменения экспрессии определяли по знаку $\log_2FC$.

Для каждого набора дифференциально экспрессированных генов отдельно строили сеть функциональных белковых ассоциаций в программной среде Cytoscape v3.10.3 с использованием приложения stringApp v2.2.0. При построении сетей использовали стандартное значение порога достоверности взаимодействий (confidence score = 0,4). Топологический анализ полученных сетей проводили с использованием приложения cytoHubba v0.1. Для узлов сети рассчитывали показатели Degree и Maximal Clique Centrality (MCC); для дальнейшего ранжирования генов в качестве основного показателя сетевой значимости использовали MCC.

После сетевого анализа списки генов GSE7410 и GSE56363 сопоставляли по Gene Symbol. Для генов, представленных в обеих сетях, проводили интегральное ранжирование с учётом величины дифференциальной экспрессии и топологической значимости. В каждом наборе данных гены отдельно ранжировали по абсолютному значению $\log_2FC$ и MCC, при этом наиболее высоким значениям соответствовал наименьший номер ранга. Ранги, полученные для GSE7410 и GSE56363, суммировали отдельно для $|\log_2FC|$ и MCC, после чего для каждого из двух показателей выполняли повторное ранжирование. Полученные итоговые ранги по $|\log_2FC|$ и MCC суммировали и на их основе формировали интегральный рейтинг. Гены с наименьшими значениями суммарного ранга рассматривали как наиболее приоритетные. Для последующего анализа были отобраны 35 генов с наиболее высоким положением в интегральном рейтинге.

Дополнительную приоритизацию отобранных генов проводили с использованием клинических, литературных и функциональных критериев. Связь уровня экспрессии генов с общей выживаемостью (overall survival, OS) пациенток с РШМ оценивали с использованием Kaplan-Meier Plotter. Пациенток разделяли на группы высокой и низкой экспрессии по медианному уровню экспрессии соответствующего гена. Результаты

классифицировали как наличие статистически значимой ассоциации с OS, наличие тенденции без достижения статистической значимости либо отсутствие выявленной связи. Степень изученности каждого гена в контексте радиационного ответа РШМ оценивали посредством контекстного поиска публикаций в PubMed и Google Scholar. В поисковые запросы включали термины radioresistance или radiosensitivity, название или Gene Symbol соответствующего гена и cervical cancer. По количеству найденных релевантных публикаций гены условно разделяли на три категории: ≥ 11 публикаций, 2-10 публикаций и 0-1 публикация. Функциональную релевантность генов оценивали на основании сведений GeneCards с учётом возможной связи их продуктов с механизмами клеточного ответа на ионизирующее излучение, включая репарацию повреждений ДНК, регуляцию клеточного цикла, клеточную гибель и другие процессы, потенциально влияющие на радиочувствительность.

Итоговую панель кандидатных генов формировали на основании совокупности интегрального рейтинга, связи уровня экспрессии с общей выживаемостью, представленности в литературе и функциональной релевантности. Для отобранных генов были разработаны и синтезированы пары прямых и обратных праймеров и флуоресцентные зонды для последующей экспериментальной оценки экспрессии методом RT-qPCR в исследуемых клеточных моделях. Обращение к используемым базам данных и онлайн-ресурсам выполняли в сентябре 2025 г.

2.12 Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики. Количественные данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD). При попарном сравнении групп использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. Результаты

Основной целью данной работы является определение особенностей и механизмов ответа РШМ на облучение и механизмов возникновения опухолевой радиорезистентности на клеточных моделях. Она включала три основных этапа. На первом этапе проводили сравнительную характеристику ответа на облучение клеточных линий РШМ HeLa, SiHa и CaSki (Рис. 1 А-В), а также линий AdMer-35 и AdMer-43 (Рис 1 Г-Д), полученных из опухолевого материала одной пациентки до и после проведения химиолучевой терапии, соответственно. На втором этапе клетки HeLa, SiHa и CaSki подвергали последовательному фракционированному облучению до достижения суммарной дозы 60 Гр. Полученные производные линии сравнивали с соответствующими исходными культурами по базовым характеристикам и ответу на последующее однократное облучение дозой 5 Гр. На третьем этапе проводили биоинформатический анализ для выбора генов, потенциально связанных с ответом клеток облучение.

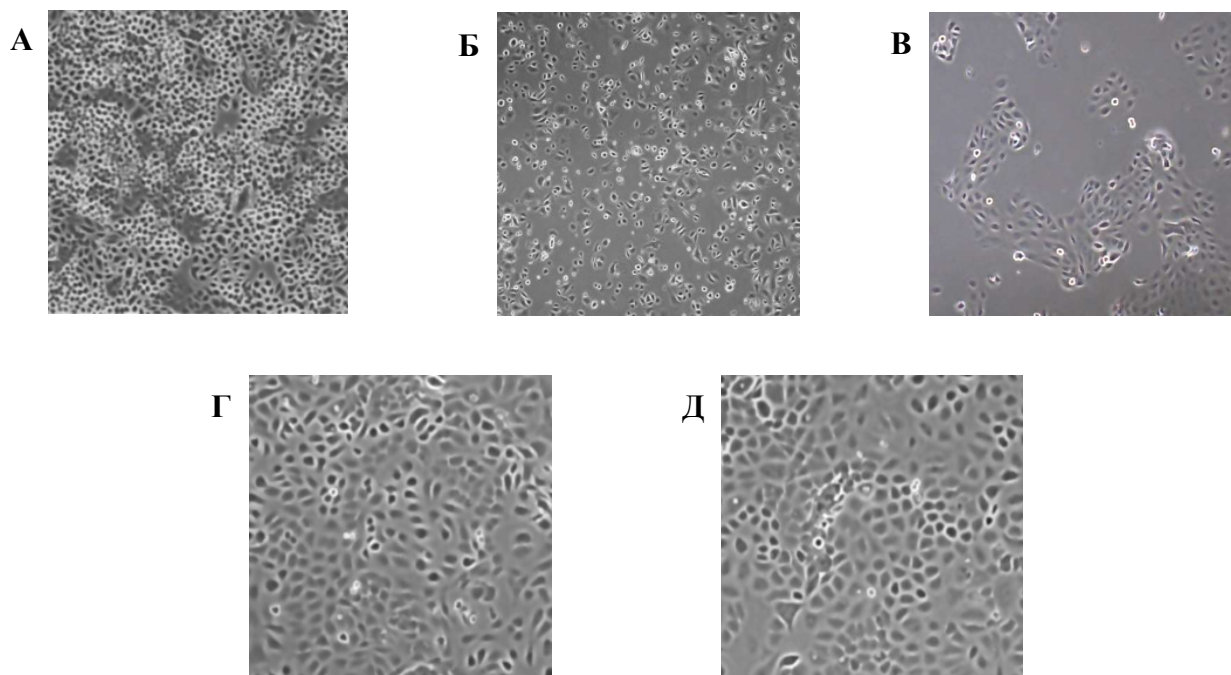


Рис. 1 Морфология клеток РШМ линий SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 (А-Д). Микрофотографии получены с использованием инвертированного фазово-контрастного микроскопа EVOS XL Core, $\times 4$.

3.1 Сравнительная характеристика ответа на облучение нативных клеточных линий РШМ

На первом этапе сравнивали характер ответа клеточных линий HeLa, SiHa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 на однократное воздействие ионизирующего излучения. В качестве

основной рабочей дозы использовали 5 Гр.. После облучения исследовали метаболическую активность и жизнеспособность клеток, выраженность апоптоза, изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла и пролиферативную активность. Миграционную активность оценивали для характеристики исходных функциональных свойств исследуемых линий.

3.1.1 Влияние облучения на метаболическую активность и жизнеспособность клеток

Для первоначальной оценки клеточного ответа на облучение исследовали метаболическую активность митохондрий с помощью МТТ-теста. Через 5 суток после облучения дозой 5 Гр метаболическая активность клеток SiHa, HeLa и CaSki снижалась примерно до 60% для всех клеточных линий от соответствующего необлучённого контроля соответственно (значения для каждой линии нормировались на необлучённые клетки этой же линии, рис. 2А). При увеличении дозы до 10 Гр снижение показателя становилось более выраженным для HeLa и CaSki, где метаболическая активность составляла 21 и 22% от контроля соответственно. Для SiHa после воздействия 10 Гр она сохранялась на уровне 51% (рис. 2Б).

Поскольку МТТ-тест позволяет лишь косвенно сделать выводы о жизнеспособности клеток, для клеток AdMer-35 и AdMer-43 использовали тест на высвобождение ЛДГ, в ходе которого измеряется высвобождение внутриклеточной лактатдегидрогеназы из мёртвых клеток; клетки SiHa использовали для сопоставления. Через 4 суток после облучения дозой 5 Гр жизнеспособность всех трёх культур составляла около 85–90%. К 6-м суткам у AdMer-43 показатель практически не изменялся, у AdMer-35 незначительно снижался, в то время как у SiHa жизнеспособность снижалась до 38% (рис. 2В).

3.1.2 Апоптоз

Одним из возможных исходов радиационно-индуцированного повреждения ДНК, в том случае когда системы репарации не могут в должной степени восстановить структуру, является активация программируемой клеточной гибели [7]. Поэтому следующим этапом оценивали выраженность апоптотического ответа клеточных линий HeLa, SiHa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 через 5 суток после облучения дозой 5 Гр. Апоптоз оценивали по проценту клеток Annexin V-FITC⁺/PI⁺, соответствующих поздним стадиям апоптоза.

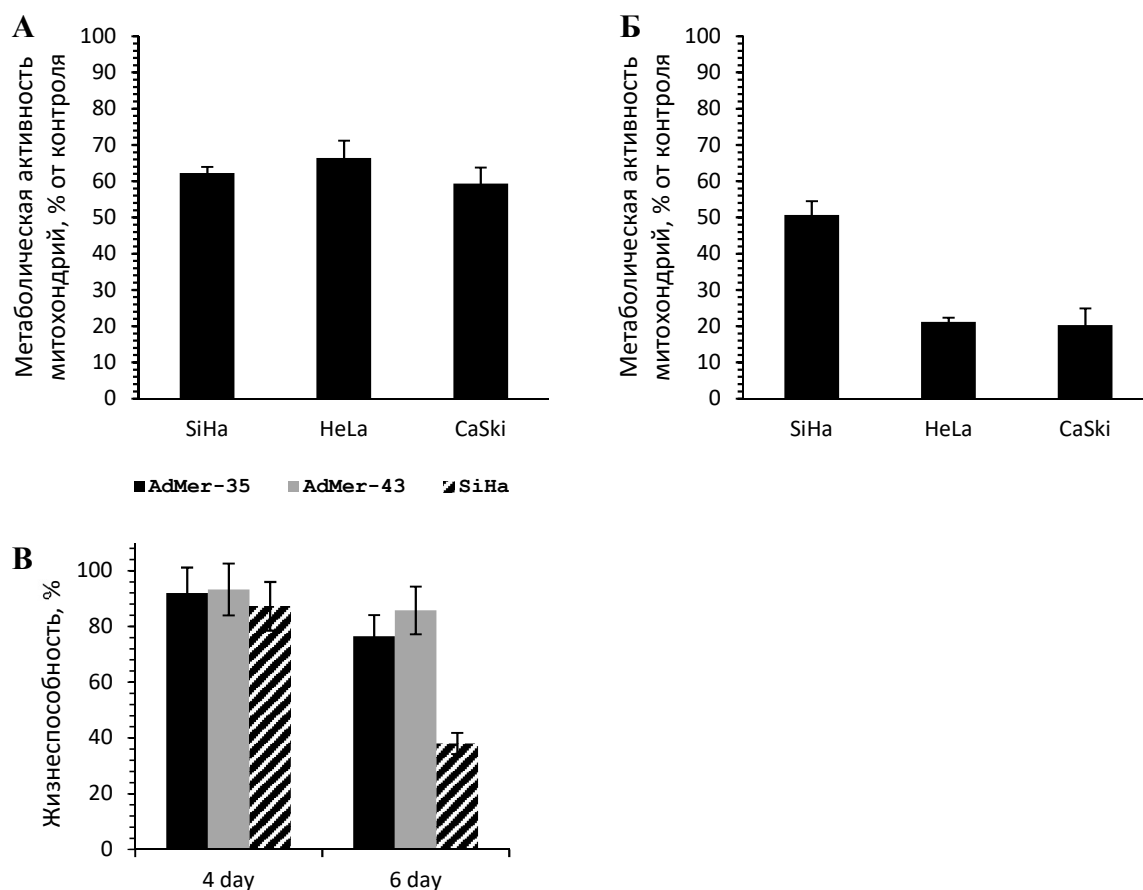


Рис. 2 Влияние ионизирующего излучения на метаболическую активность и жизнеспособность клеток РШМ. А, Б — метаболическая активность митохондрий клеток SiHa, HeLa и CaSki через 5 суток после облучения дозами 5 и 10 Гр соответственно, определённая с помощью МТТ-теста; значения нормированы на соответствующий необлучённый контроль. В — жизнеспособность клеток AdMer-35, AdMer-43 и SiHa через 4 и 6 суток после облучения дозой 5 Гр по данным ЛДГ-теста.

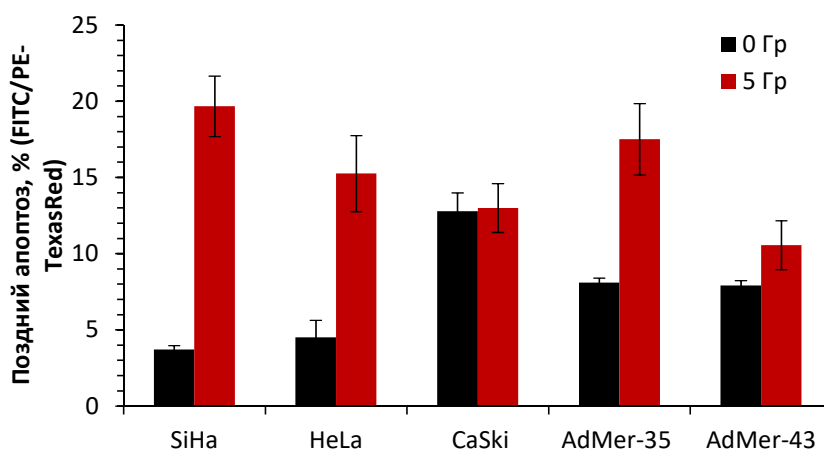


Рис. 3 Доля клеток SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 на поздних стадиях апоптоза через 5 суток после облучения дозой 5 Гр. Апоптоз оценивали методом проточной цитометрии после окрашивания Annexin V-FITC/PI.

Наиболее выраженное увеличение доли клеток на поздних стадиях апоптоза наблюдалось у SiHa и HeLa. У SiHa данный показатель возрастал приблизительно в 5 раз (с 4 до 20%), а у HeLa — в 3 раза (с 4,5 до 15%). Для CaSki выраженных изменений не наблюдалось: доля Annexin V-FITC⁺/PI⁺ клеток составляла около 13% как до, так и после облучения. У AdMer-35 доля клеток на поздних стадиях апоптоза увеличивалась приблизительно в 2 раза (с 8 до 17%), тогда как у AdMer-43 отмечалось лишь небольшое увеличение — с 8 до 10% (рис. 3). Таким образом, выраженность апоптотического ответа на воздействие 5 Гр существенно различалась между исследуемыми линиями и была минимальной у CaSki и AdMer-43.

3.1.3 Клеточный цикл

Воздействие ионизирующего излучения сопровождается активацией контрольных точек клеточного цикла и может приводить в том числе к накоплению клеток в фазе G2/M. Для сравнительной оценки данного ответа определяли долю клеток в G2/M через 24 ч после облучения дозой 5 Гр.

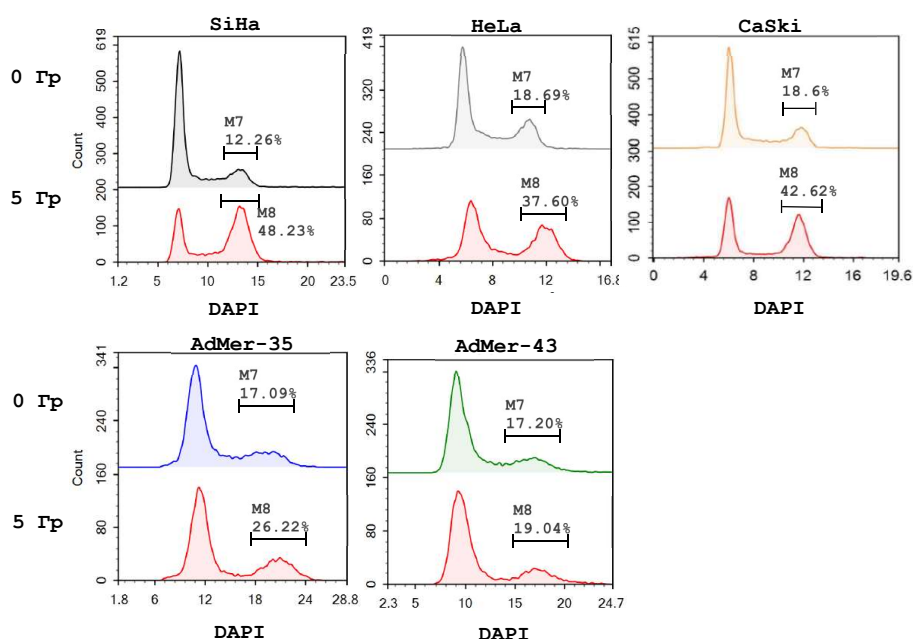


Рис. 4 Накопление клеток SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 в фазе G2/M через 24 ч после облучения дозой 5 Гр. Клеточный цикл анализировали методом проточной цитометрии после окрашивания DAPI; рамкой обозначена популяция клеток в фазе G2/M.

Увеличение доли клеток в фазе G2/M наблюдалось во всех исследованных линиях, однако выраженность ответа существенно различалась (рис. 4). Наиболее выраженное

накопление клеток в G2/M отмечалось у SiHa, где показатель увеличивался приблизительно в 4 раза (с 12 до 48%). У CaSki доля клеток в G2/M возрастала в 2,3 раза (с 19 до 43%), а у HeLa — в 2 раза (с 19 до 38%). Клетки AdMer демонстрировали менее выраженный ответ: у AdMer-35 доля клеток в G2/M увеличивалась в 1,5 раза (с 17 до 26%), тогда как у AdMer-43 — только с 17 до 19%.

Таким образом, наиболее выраженный G2/M-ответ на облучение наблюдался у SiHa, CaSki и HeLa. Для AdMer-35 накопление клеток в G2/M было менее выраженным, а у AdMer-43 изменение данного показателя было в пределах ошибки эксперимента.

3.1.4 Проллиферативная и миграционная активность

Изменения клеточного цикла и выраженность апоптоза характеризуют отдельные компоненты клеточного ответа на повреждения вызванные действием ионизирующего излучения, однако не позволяют полностью оценить функциональное состояние сохранившейся клеточной популяции. Поэтому дополнительно исследовали пролиферативную активность клеточных линий HeLa, SiHa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 после облучения. Миграционную активность оценивали отдельно как дополнительную характеристику исходных функциональных свойств исследуемых линий [13, 24].

Для оценки пролиферации в реальном времени использовали систему xCELLigence и планшеты E-Plate, позволяющие измерять кол-во клеток по мере их прикрепления к дну лунки планшета по связанному с этим изменению сопротивления на контактах. Регистрацию проводили в течение 120 ч, значения записывались раз в 30 мин; на рисунке 5 представлены графики пролиферации за первые 100 часов, до выхода всех линий на плато. Для количественного сравнения использовали значение клеточного индекса через 96 часов после начала эксперимента, поскольку к этому времени все клетки либо выходили на плато, либо уже находились там.

После облучения дозой 5 Гр снижение пролиферативной активности наблюдалось во всех исследованных линиях, однако его выраженность различалась. К 96 ч у SiHa, HeLa и AdMer-35 пролиферативная активность облучённых клеток была приблизительно в 2 раза ниже, чем в контроле. Наиболее выраженное подавление наблюдалось у CaSki — приблизительно в 5 раз. Для AdMer-43 снижение пролиферативной активности было менее выраженным (рис. 5).

Миграционную активность необлучённых клеток также оценивали с использованием системы xCELLigence и планшетов CIM-Plate. Регистрацию проводили в течение 120 ч; на рис. 6 представлен начальный 50-часовой участок кривых, а для количественного сопоставления использовали значения клеточного индекса через 30 ч.

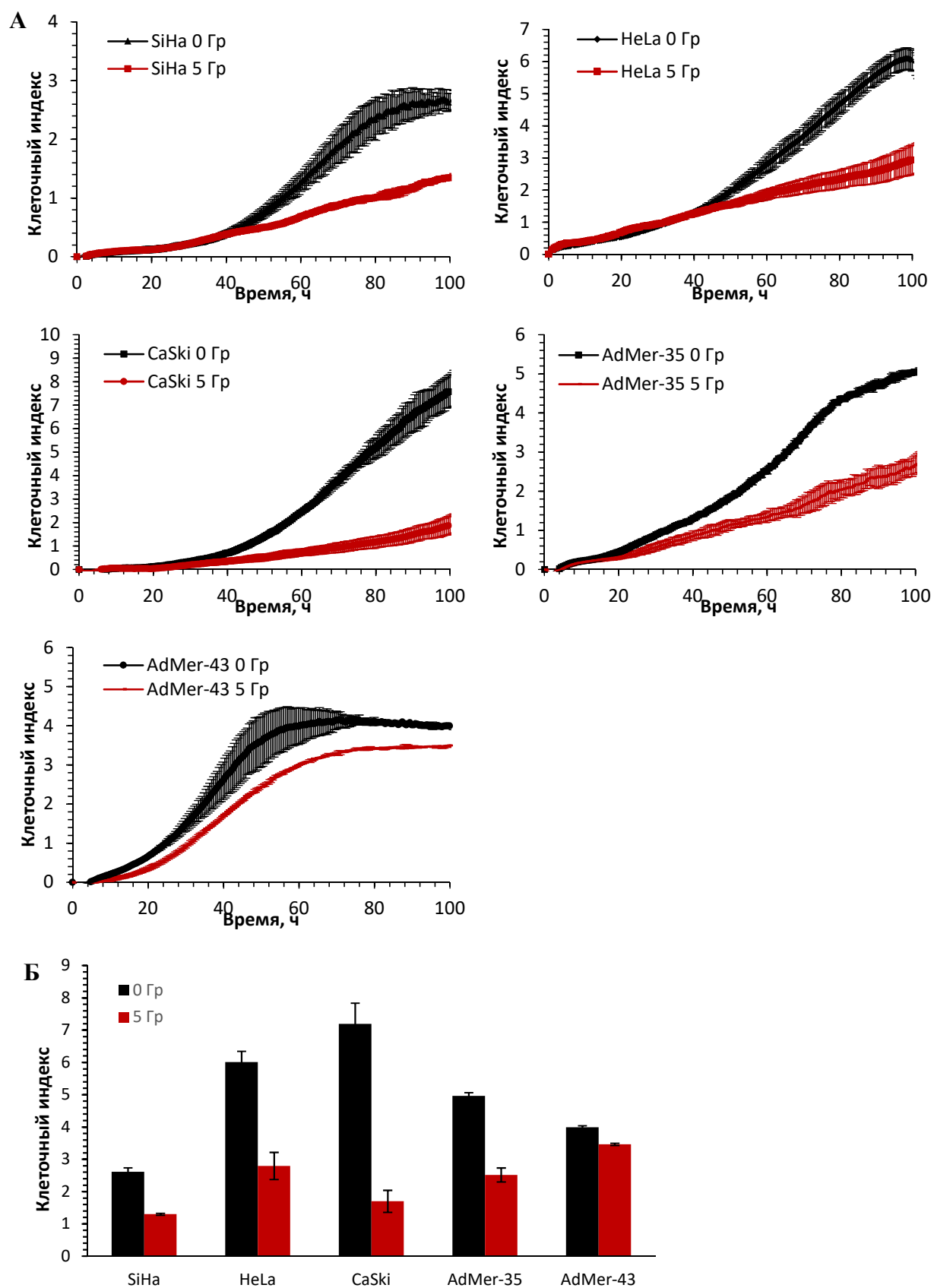


Рис. 5 Пролиферативная активность клеток SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 после облучения дозой 5 Гр по данным xCELLigence: представлены первые 100 ч из 120 ч наблюдения (А); значения клеточного индекса через 96 ч после облучения (Б).

Наиболее высокие значения данного показателя наблюдались у CaSki, тогда как для HeLa и SiHa они оставались низкими. Клетки AdMer-35 и AdMer-43 занимали промежуточное положение, при этом для AdMer-43 значения миграционно-ассоциированного Cell Index были выше, чем для AdMer-35.

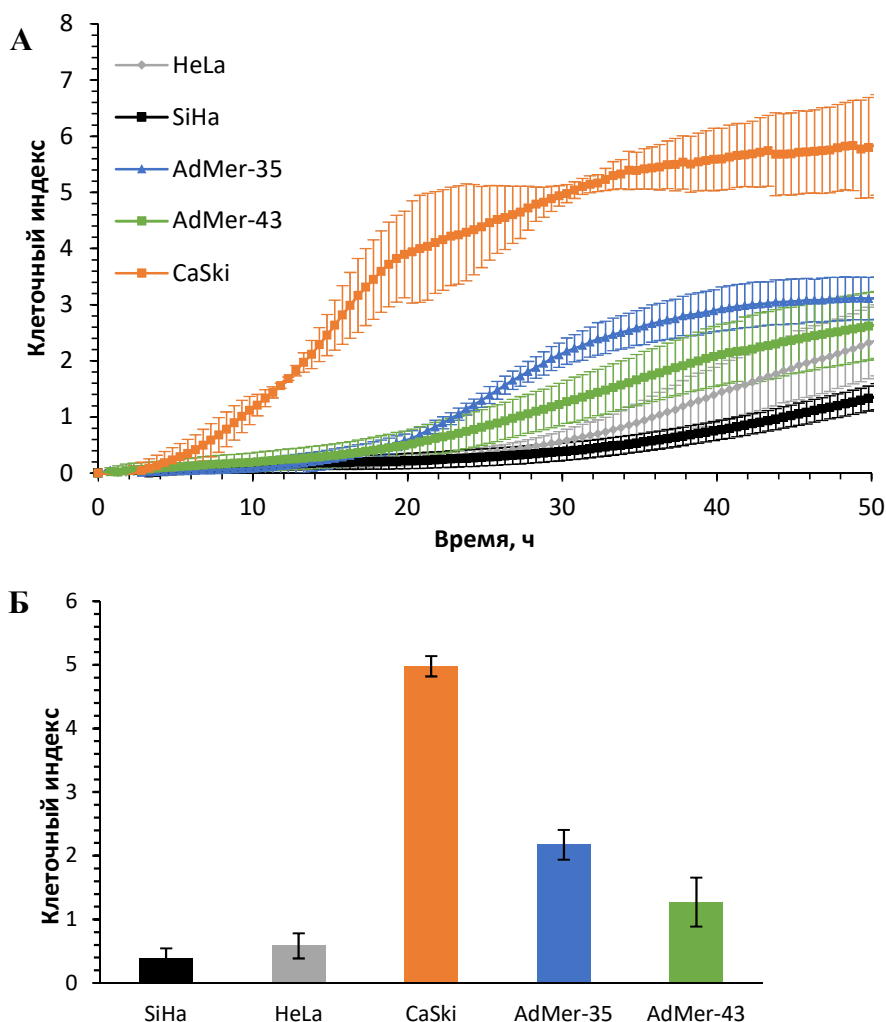


Рис. 6 Миграционная активность клеток SiHa, HeLa, CaSki, AdMer-35 и AdMer-43 по данным xCELLigence. Представлены первые 50 ч из 120 ч наблюдения и значения миграционно-ассоциированного Cell Index через 30 ч.

3.1.5 Сопоставление характера радиационного ответа исследуемых линий

Проведенный анализ показал, что исследуемые клеточные линии различались не только по выраженности, но и по характеру ответа на однократное облучение дозой 5 Гр. При этом изменения отдельных показателей не всегда были однонаправленными. По данным МТТ-теста метаболическая активность клеток SiHa, HeLa и CaSki через 5 суток после облучения снижалась примерно в равной степени и составляла около 59–66% от необлучённого контроля. Вместе с тем выраженность апоптотического ответа, накопления

клеток в фазе G2/M и подавления пролиферативной активности заметно различалась между линиями.

Для клеток SiHa и HeLa воздействие 5 Гр сопровождалось выраженным увеличением доли клеток на поздних стадиях апоптоза, накоплением клеток в фазе G2/M и приблизительно двукратным снижением пролиферативной активности после 96 ч инкубации. У CaSki, несмотря на практически неизменную долю клеток на поздних стадиях апоптоза, наблюдалось выраженное накопление в G2/M и наиболее сильное подавление пролиферативной активности – приблизительно в 5 раз к 96 ч. Таким образом, сходное снижение метаболической активности трёх стандартных клеточных линий сопровождалось различными сочетаниями клеточных ответов.

Клетки AdMer-35 и AdMer-43 демонстрировали менее выраженную реакцию на облучение, однако между ними также наблюдались различия. Для AdMer-35 воздействие 5 Гр сопровождалось увеличением доли клеток на поздних стадиях апоптоза, увеличенным накоплением в G2/M и снижением пролиферативной активности. Для AdMer-43 изменения этих показателей были слабее: увеличение доли клеток в позднем апоптозе было менее выраженным, чем AdMer-35, накопление в G2/M практически отсутствовало, а снижение пролиферативной активности было минимальным. По данным ЛДГ-теста жизнеспособность AdMer-43 также сохранялась на высоком уровне к 6-м суткам после облучения, тогда как у AdMer-35 наблюдалось её умеренное снижение. В совокупности полученные данные указывают на более слабый клеточный ответ AdMer-43 на воздействие 5 Гр по сравнению с AdMer-35.

Базальная миграционная активность также различалась между исследуемыми культурами: наиболее высокие значения наблюдались у CaSki, а среди парных линий AdMer более высокие значения были характерны для AdMer-43 по сравнению с AdMer-35. Эти различия рассматривали как дополнительную характеристику исходного функционального фенотипа клеток, а не как показатель радиационного ответа.

3.2 Характеристика изменений клеточного ответа после длительного фракционированного облучения

Для оценки изменений клеточного ответа, возникающих при длительном воздействии ионизирующего излучения, клеточные линии HeLa, SiHa и CaSki подвергали последовательному фракционированному облучению до достижения суммарной дозы 60 Гр, соответствующей дозе, которую получает опухоль в ходе курса радиотерапии. Подобные экспериментальные подходы применяются для изучения адаптации опухолевых клеток к повторному радиационному воздействию, однако накопление высокой суммарной дозы не обязательно сопровождается формированием одинакового радиорезистентного фенотипа в различных клеточных моделях [30, 31]. Поэтому производные линии после фракционированного облучения сравнивали с соответствующими исходными культурами по базовым характеристикам и по ответу на последующее однократное облучение дозой 5 Гр.

3.2.1 Получение производных клеточных линий после фракционированного облучения

Клетки HeLa, SiHa и CaSki подвергали последовательному фракционированному облучению с периодами восстановления между воздействиями до достижения суммарной дозы 60 Гр. Схема фракционирования включала 10 облучений дозой 2 Гр, 4 облучения дозой 5 Гр и 2 облучения дозой 10 Гр. После каждой дозы у клеток был период восстановления, который варьировался в зависимости от линии и дозы. Так, после дозы в 2 Гр следующее облучение можно было проводить уже через день, при дозе в 5 Гр восстановление занимало от недели для HeLa и SiHa, до 12-14 дней для CaSki, а после 10 Гр HeLa и SiHa восстанавливались 10-12 дней, а CaSki около 21 дня (Рис. 7). Полученные производные популяции далее обозначали как HeLa 60, SiHa 60 и CaSki 60, а соответствующие исходные клетки — как HeLa 0, SiHa 0 и CaSki 0. После завершения схемы фракционированного облучения производные культуры использовали для последующего сравнительного анализа ответа на облучение.

3.2.2 Изменение способности образовывать колонии после фракционированного облучения

Для оценки изменения способности клеток сохранять долгосрочную репродуктивную выживаемость после фракционированного облучения исходные и получившие суммарную дозу 60 Гр клетки подвергали однократному воздействию 5 Гр с последующим клоногенным анализом. В качестве показателя использовали фракцию

выживших клеток после облучения дозой 5 Гр (SF5), нормированную на эффективность колониеобразования (PE) соответствующего необлучённого контроля.

Исходные линии различались по уровню SF5: наименьшее значение наблюдалось у SiHa, а наиболее высокое — у CaSki. После накопления суммарной дозы 60 Гр характер изменений существенно различался между клеточными линиями. Для SiHa выраженного изменения SF5 не наблюдалось. У HeLa значение SF5 увеличивалось приблизительно в 2 раза по сравнению с исходными клетками, тогда как у CaSki, напротив, снижалось примерно в 2-3 раза (рис. 8).

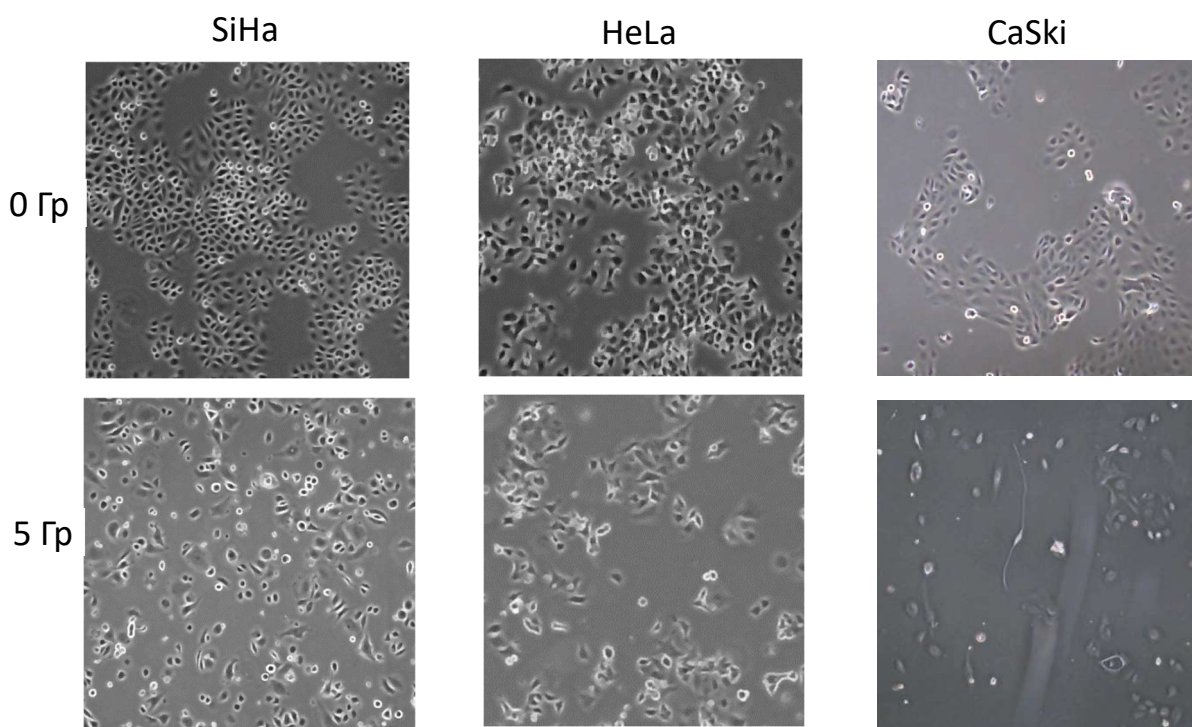


Рис. 7. Морфология клеток РШМ линий SiHa, HeLa и CaSki без облучения и через 5 суток после облучения дозой 5 Гр. Микрофотографии получены с использованием инвертированного фазово-контрастного микроскопа EVOS XL Core, $\times 4$.

3.2.3 Изменение метаболической активности митохондрий

Для дополнительной характеристики изменений, сформировавшихся после длительного фракционированного облучения, метаболическую активность митохондрий исходных и производных клеточных линий оценивали с помощью МТТ-теста через 5 суток после дополнительного облучения дозой 5 Гр. Для каждой клеточной линии значения нормировали на соответствующие исходные необлучённые клетки, значение которых принимали за 100% (рис. 9).

Накопление суммарной дозы 60 Гр сопровождалось снижением базовой метаболической активности во всех исследованных производных культурах, однако

выраженность изменений различалась между клеточными линиями. Наиболее выраженное снижение наблюдалось у CaSki 60 – до 30% от контроля, тогда как для HeLa 60 и SiHa 60 изменения были менее выраженными – до 75 и 89% соответственно. Дополнительное облучение дозой 5 Гр приводило к дальнейшему снижению метаболической активности исходных клеток всех трёх линий. У SiHa 60 и HeLa 60 после повторного облучения показатель также снижался на 23 и 12% соответственно, тогда как у CaSki 60 практически не изменялся относительно соответствующего необлучённого контроля.

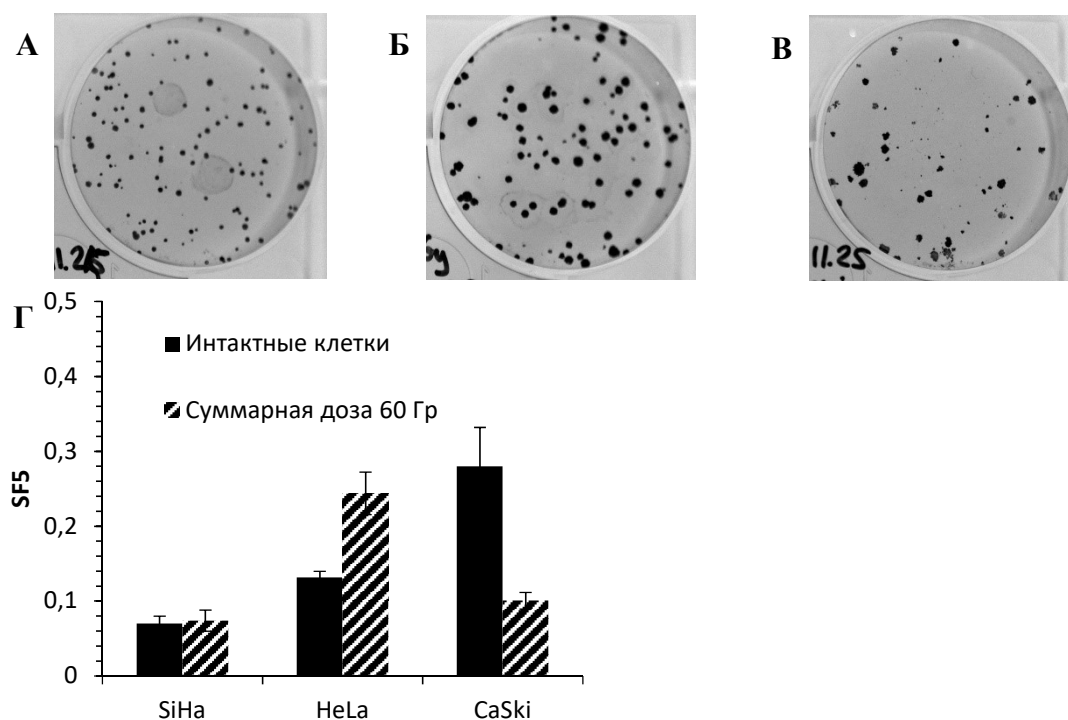


Рис. 8 Клоногенный анализ исходных и производных после накопления суммарной дозы 60 Гр клеток SiHa, HeLa и CaSki после дополнительного облучения дозой 5 Гр: колонии, окрашенные 0,5% раствором генцианвиолета (А–В); фракция выживших клеток после облучения дозой 5 Гр (SF5) (Г).

Таким образом, длительное фракционированное облучение сопровождалось изменением как базовой метаболической активности клеток, так и характера их последующего ответа на воздействие 5 Гр, причём выраженность этих изменений зависела от клеточной линии.

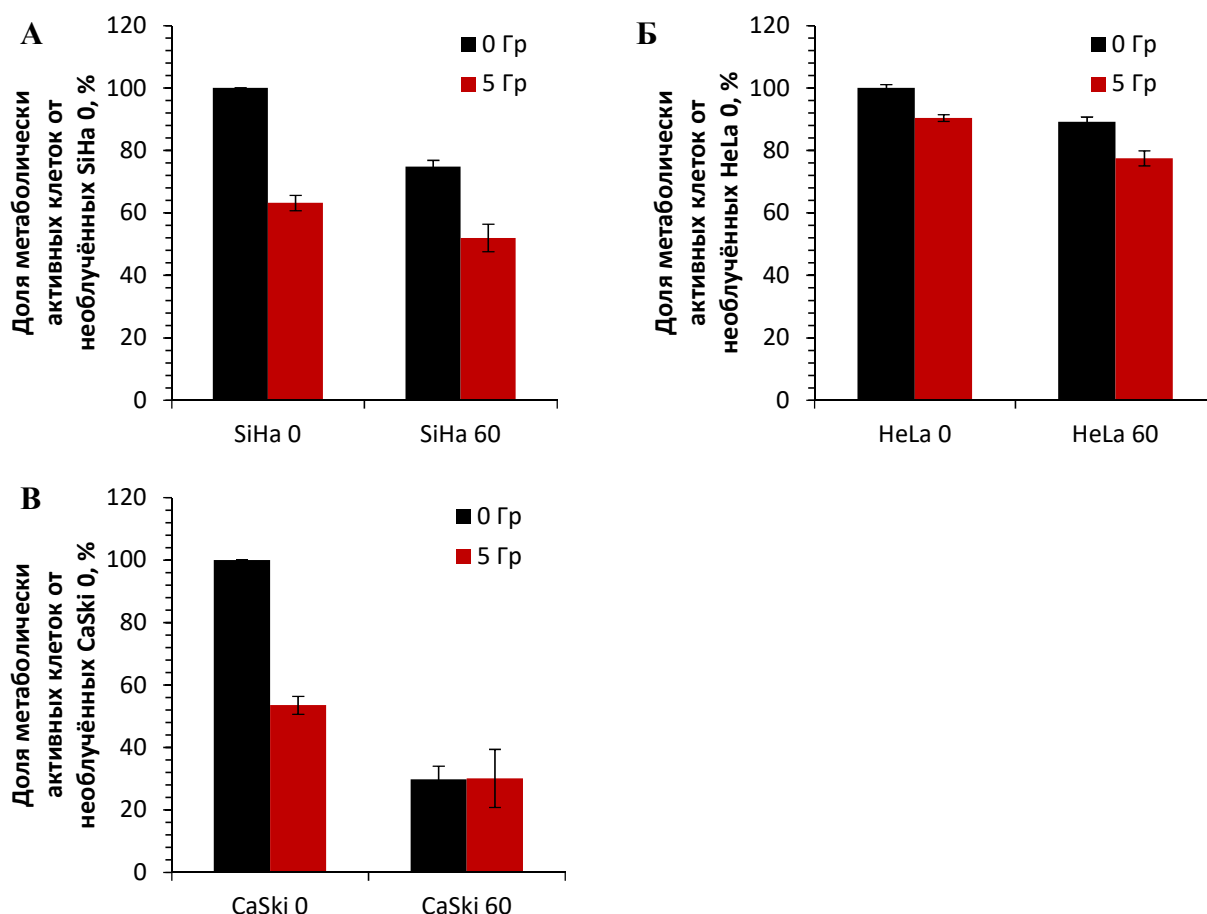


Рис. 9 Метаболическая активность митохондрий исходных и производных после накопления суммарной дозы 60 Гр клеток линий SiHa (А), HeLa (Б) и CaSki (В) до и после дополнительного облучения дозой 5 Гр. Метаболическую активность оценивали через 5 суток с помощью МТТ-теста. Для каждой клеточной линии значения нормировали на соответствующие исходные необлучённые клетки (0/0), принятые за 100%.

3.2.4 Изменение пролиферативной и миграционной активности клеток HeLa

Для оценки пролиферационной активности клеток HeLa 0 и HeLa 60 использовали систему xCelligence/. Количественное сравнение проводили по значению клеточного индекса через 96 ч наблюдения. В отсутствие дополнительного облучения пролиферативная активность HeLa 60 была ниже, чем у исходных клеток HeLa 0; значение Cell Index снижалось приблизительно в 1,5 раза. Последующее облучение дозой 5 Гр приводило к снижению пролиферативной активности обеих культур примерно в 2,5 раза (рис. 10А).

Аналогичным образом сравнивали миграционную активность клеток HeLa 0 и HeLa 60. Для количественной оценки использовали значение клеточного индекса через 72 ч наблюдения. В отсутствие дополнительного облучения данный показатель у HeLa 60 был ниже, чем у исходной культуры в 1,5 раза. После воздействия 5 Гр миграционная

активность снижалась в обеих культурах, однако у HeLa 60 выраженность снижения была меньше, чем у HeLa 0, в 1,2 и 1,7 раз соответственно (рис. 10Б).

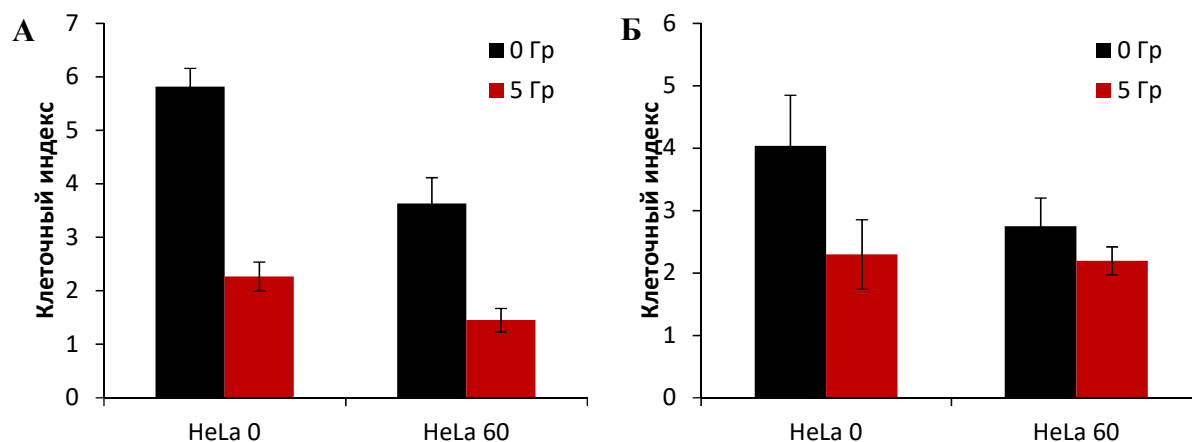


Рис. 10 Пролиферативная и миграционная активность исходных клеток HeLa 0 и производных HeLa 60 до и после дополнительного облучения дозой 5 Гр по данным xCELLigence. А — значения клеточного индекса через 96 ч при оценке пролиферации; Б — значения клеточного индекса через 72 ч при оценке миграции.

3.2.5 Изменение апоптотического ответа

Для оценки изменений радиационно-индуцированной клеточной гибели после длительного фракционированного облучения сравнивали долю клеток на поздних стадиях апоптоза в исходных и производных культурах до и после дополнительного облучения дозой 5 Гр. Апоптоз оценивали через 5 суток после воздействия методом проточной цитометрии после окрашивания Annexin V-FITC/PI.

В отсутствие дополнительного облучения доля клеток на поздних стадиях апоптоза у SiHa 0 и SiHa 60 составляла около 4%; сходные значения наблюдались для HeLa 0 и HeLa 60. У CaSki после накопления суммарной дозы 60 Гр данный показатель незначительно увеличивался с 13 до 18%. После дополнительного облучения дозой 5 Гр различия между исходными и производными культурами становились более выраженными. У SiHa доля клеток на поздних стадиях апоптоза снижалась приблизительно в два раза, с 20% у SiHa 0 до 11% у SiHa 60. Для HeLa также наблюдалось двукратное снижение показателя — примерно с 15 до 8%. Напротив, у CaSki после накопления 60 Гр доля клеток на поздних стадиях апоптоза после повторного облучения увеличивалась примерно с 13 до 34% (рис. 11).

Таким образом, длительное фракционированное облучение сопровождалось разнонаправленными изменениями апоптотического ответа: у SiHa 60 и HeLa 60 ответ на

последующее воздействие 5 Гр был менее выраженным, тогда как у CaSki 60 наблюдалось его усиление.

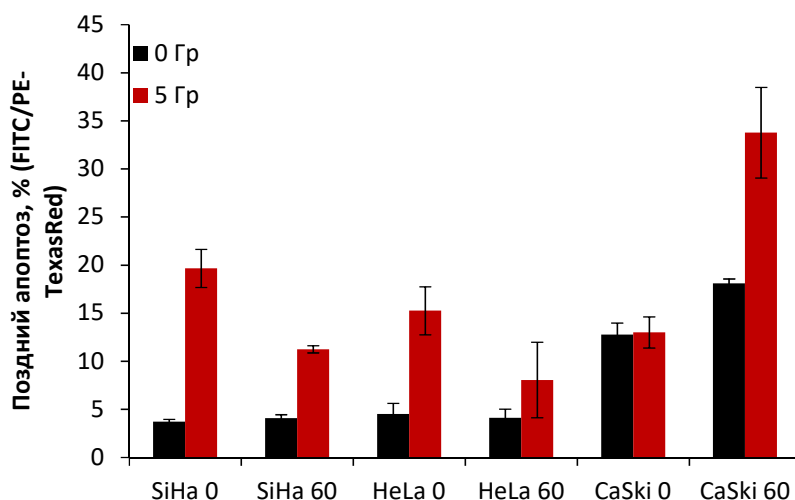


Рис. 11 Доля клеток SiHa, HeLa и CaSki на поздних стадиях апоптоза до и после накопления суммарной дозы 60 Гр и дополнительного облучения дозой 5 Гр. Апоптоз оценивали через 5 суток методом проточной цитометрии после окрашивания Annexin V-FITC/PI.

3.2.6 Изменение клеточного цикла

Для оценки влияния длительного фракционированного облучения на ответ клеточного цикла сравнивали долю клеток в фазе G2/M у исходных и производных культур через 24 ч после дополнительного облучения дозой 5 Гр.

Во всех исследованных линиях как исходных, так и получивших суммарную дозу 60 Гр наблюдалось увеличение доли клеток в фазе G2/M после облучения. Для SiHa характер ответа практически не изменялся: после воздействия 5 Гр доля клеток в G2/M составляла около 44% у SiHa 0 и 48% у SiHa 60. У HeLa после облучения данный показатель увеличивался приблизительно до 31% в исходной культуре и до 37% в HeLa 60. Для CaSki доля клеток в G2/M после воздействия 5 Гр составляла около 43% у CaSki 0 и 48% у CaSki 60. При этом в отсутствие дополнительного облучения доля клеток в G2/M у CaSki 60 была приблизительно на 3% ниже, чем у CaSki 0 (рис. 12).

3.2.7 Сопоставление изменений радиационного ответа после фракционированного облучения

Сопоставление результатов различных функциональных тестов показало, что длительное фракционированное облучение приводило к формированию различного

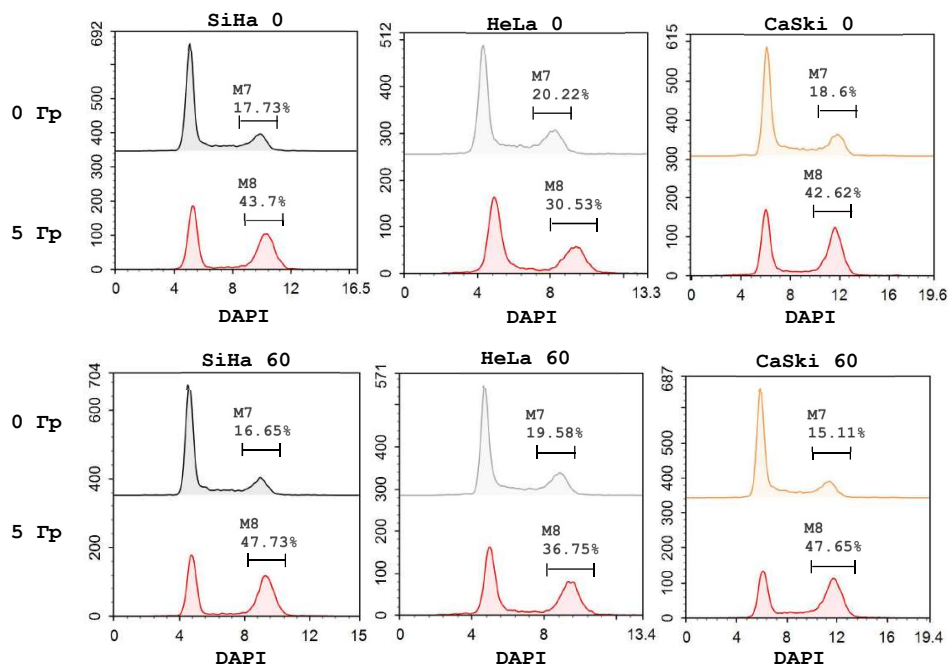


Рис. 12 Изменение доли клеток SiHa, HeLa и CaSki в фазе G2/M до и после накопления суммарной дозы 60 Гр и дополнительного облучения дозой 5 Гр. Анализ проводили через 24 ч после облучения методом проточной цитометрии после окрашивания DAPI; рамкой обозначена область клеток в фазе G2/M.

фенотипа у исследованных клеточных линий. Направление и выраженность изменений существенно зависели от исходной клеточной модели.

Наиболее отчётливые признаки повышения устойчивости к повторному облучению наблюдались в случае клеток HeLa. После накопления суммарной дозы 60 Гр значение SF5 увеличивалось приблизительно в 2 раза по сравнению с исходной культурой, при этом наблюдалось снижение доли клеток на поздних стадиях апоптоза после воздействия 5 Гр. Не наблюдалось снижения накопления клеток в фазе G2/M, а изменения метаболической и пролиферативной активности не демонстрировали столь же однозначного повышения устойчивости. Таким образом, основным признаком приобретённой радиорезистентности HeLa 60 являлось увеличение способности клеток образовывать колонии (SF5) после повторного облучения, сопровождавшееся снижением апоптотического ответа.

Для SiHa накопление суммарной дозы 60 Гр практически не изменяло SF5, поэтому выраженного повышения способности образовывать колонии выявлено не было. Вместе с тем у SiHa 60 после дополнительного воздействия 5 Гр наблюдалось снижение доли клеток на поздних стадиях апоптоза по сравнению с исходной культурой. Характер G2/M-ответа при этом практически сохранялся. Полученные результаты указывают на изменение отдельных компонентов радиационного ответа без выраженного повышения долгосрочной клоногенной выживаемости.

Наиболее отличающийся характер изменений наблюдался у CaSki. После накопления суммарной дозы 60 Гр значение SF5 снижалось приблизительно в 2-3 раза, а после повторного облучения доля клеток на поздних стадиях апоптоза увеличивалась примерно с 13 до 34%. Накопление клеток в фазе G2/M сохранялось и было несколько более выраженным, чем у исходной культуры. Одновременно CaSki 60 характеризовались выраженным снижением базовой метаболической активности, при этом дополнительное воздействие 5 Гр практически не приводило к её дальнейшему уменьшению. В совокупности эти данные не свидетельствуют о формировании у CaSki 60 приобретённой клоногенной радиорезистентности и, напротив, указывают на повышение чувствительности по ряду исследованных показателей.

Таким образом, одинаковая схема длительного фракционированного облучения приводила к различным вариантам изменения клеточного ответа: у HeLa формировалось повышение клоногенной устойчивости, у SiHa наблюдались изменения отдельных компонентов ответа без увеличения SF5, тогда как у CaSki клоногенная выживаемость после повторного облучения снижалась. Полученные результаты подчёркивают зависимость последствий длительного радиационного воздействия от биологических особенностей исходной клеточной линии.

3.3 Биоинформатический поиск и отбор генов, потенциально связанных с ответом клеток РШМ на облучение

Для поиска кандидатных генов были использованы два комплементарных транскриптомных набора данных GSE7410 и GSE56363 из базы Gene Expression Omnibus. GSE56363, которые позволили нам оценить различия экспрессии между опухолями пациенток с полным и неполным ответом на химиолучевую терапию. GSE7410 использовали как дополнительный набор для выявления изменений, характерных для опухолевой ткани РШМ высокого риска по сравнению с нормальной тканью шейки матки. Таким образом, два набора отражали разные, но взаимодополняющие аспекты опухолевого фенотипа и терапевтического ответа.

3.3.1 Выявление дифференциально экспрессированных генов и сетевой анализ

После анализа дифференциальной экспрессии и применения установленных критериев отбора в GSE7410 было выявлено 7439 дифференциально экспрессированных генов, а в GSE56363 - 3961. Для каждого набора отдельно проводили сетевой анализ. В сформированных сетях значения Maximal Clique Centrality (MCC) были получены для 3461 гена GSE7410 и 1828 генов GSE56363.

Сопоставление двух сетевых списков по Gene Symbol позволило выделить 446 генов, представленных в обеих сетях. Для каждого из них были доступны значения дифференциальной экспрессии и MCC в обеих исследованных выборках, что позволило перейти к их совместному ранжированию.

3.3.2 Интегральное ранжирование генов

Для 446 общих генов проводили интегральное ранжирование с учётом двух характеристик: величины изменения экспрессии, представленной абсолютным значением $\log_2FC$, и сетевой значимости, характеризуемой MCC. Рейтинги формировали отдельно для каждого набора данных, после чего объединяли показатели GSE7410 и GSE56363 и рассчитывали суммарный ранг. Наиболее высокий приоритет соответствовал генам с минимальным значением итогового ранга.

На основании интегрального рейтинга первоначальный список из 446 генов был сокращён до 35 наиболее приоритетных кандидатов, отобранных для последующей оценки их клинической и биологической значимости.

3.3.3 Функциональный анализ и дополнительный отбор генов

Для 35 отобранных генов проводили дополнительную оценку по трём направлениям. Связь уровня экспрессии с общей выживаемостью пациенток с РШМ оценивали по данным Kaplan–Meier Plotter. Дополнительно анализировали представленность каждого гена в публикациях, посвящённых радиочувствительности и радиорезистентности РШМ; по количеству релевантных работ гены относили к категориям ≥ 11 , 2-10 или 0-1 публикация. Функциональную релевантность оценивали по описанию GeneCards с учётом возможной связи гена с репарацией повреждений ДНК, регуляцией клеточного цикла, клеточной гибелью и другими процессами, способными участвовать в формировании радиационного ответа.

Совместная оценка интегрального рейтинга, связи экспрессии с общей выживаемостью, литературной представленности и функциональной релевантности позволила сформировать итоговую панель из 13 кандидатных генов: RAD51, CXCL12, NEK2, EXO1, BLM, DTL, CDC45, NUSAP1, TK1, TIMELESS, RPA3, FANCI и RAD54L. Для выбранных генов были разработаны и синтезированы пары прямых и обратных праймеров и флуоресцентные зонды для последующей оценки экспрессии методом RT-qPCR в исследуемых клеточных моделях РШМ. Экспериментальная проверка экспрессии отобранных генов на данном этапе работы ещё не проведена, поэтому сформированную

панель рассматривают как набор кандидатов для последующей экспериментальной валидации.

4. Обсуждение

4.1. Выбор рабочей дозы и экспериментального подхода

В качестве рабочей дозы для сравнительной оценки радиационного ответа клеток использовали 5 Гр. Доза 2 Гр, соответствующая стандартной клинической фракции [4, 10], в предварительных экспериментах не обеспечивала достаточно выраженного ответа клеток для последующего сравнения нескольких параметров. В то же время увеличение дозы до 10 Гр приводило к чрезмерному снижению метаболической активности: через 5 суток показатель МТТ у HeLa и CaSki составлял около 20% от необлучённого контроля (Рис. 2 Б). Поэтому 5 Гр использовали как промежуточную дозу, при которой радиационный эффект оставался достаточно выраженным, но не сопровождался столь сильным подавлением клеточной активности.

Доза 5 Гр использовалась как при сравнении исходных клеточных линий, так и при оценке ответа культур после длительного фракционированного облучения. Полученные результаты отражают особенности экспериментального ответа клеток на однократное воздействие 5 Гр и не должны рассматриваться как прямая модель отдельной фракции клинической ЛТ, поскольку биологический эффект облучения зависит не только от величины дозы, но и от интервалов между фракциями, возможности репарации повреждений, перераспределения клеток по фазам клеточного цикла и репопуляции [7, 10]. При оценке радиочувствительности необходимо учитывать, что используемые методы характеризуют разные стороны клеточного ответа на облучение. При этом клоногенный анализ имеет особое значение, поскольку позволяет определить, сохраняют ли клетки после облучения способность к длительному размножению и формированию колоний [7, 11]. Краткосрочное сохранение метаболической активности после облучения не обязательно означает сохранение репродуктивного потенциала, поскольку клетка может утратить способность к дальнейшему формированию колонии [13]. Поэтому способность образовывать колонии рассматривалась как один из главных функциональных показателей радиочувствительности, тогда как изменения метаболической активности, доли клеток в стадии позднего апоптоза, распределения клеток по фазам клеточного цикла и пролиферации использовались для более полной характеристики радиационного ответа.

4.2. Исходная гетерогенность радиационного ответа HeLa, SiHa и CaSki

При облучении дозой 5 Гр линии HeLa, SiHa и CaSki различались по характеру клеточного ответа. По данным МТТ-теста снижение метаболической активности было

сопоставимым и составляло около 60-65% от контроля (Рис. 2 А). Однако у CaSki облучение сопровождалось выраженным накоплением клеток в фазе G2/M и наиболее сильным подавлением пролиферации, при этом доля клеток в стадии позднего апоптоза практически не изменялась (Рис. 3; Рис. 4; Рис. 5). Это указывает на преобладание цитостатического ответа над клеточной гибелью. В сочетании с более высокой способностью образовывать колонии такой профиль характеризует CaSki как наименее чувствительную к облучению из трёх исследованных линий (Рис. 8).

Полученные для CaSki результаты согласуются с опубликованными данными. Eastham и соавт. получили для CaSki максимальное значение SF2 среди девяти исследованных линий РШМ [16], а в работе Tam и соавт. CaSki также характеризовалась сравнительно высокой способностью образовывать колонии после облучения [15]. Hall и соавт. подтвердили выраженную гетерогенность исходной радиочувствительности клеточных линий РШМ [17]. Хотя абсолютные значения SF2 и SF5 напрямую не сопоставимы, поскольку получены при разных дозах и условиях эксперимента, совокупность данных подтверждает относительно низкую радиочувствительность CaSki. У CaSki отсутствие выраженного увеличения доли клеток в стадии позднего апоптоза сочеталось с накоплением клеток в фазе G2/M и значительным снижением пролиферативной активности после облучения (Рис. 3; Рис. 4; Рис. 5). Такое сочетание не является противоречивым, поскольку радиационное повреждение может приводить не только к апоптозу, но и к временной остановке клеточного цикла, сенесценции, митотической катастрофе и другим вариантам утраты репродуктивного потенциала [6, 7]. Накопление клеток в фазе G2/M отражает ответ со стороны клеточного цикла на повреждение, однако само по себе не позволяет однозначно судить о радиочувствительности клеток [10]. Высокая способность клеток CaSki к образованию колоний после облучения в сочетании с выраженным подавлением пролиферации и накоплением клеток в фазе G2/M позволяет предположить эффективную работу систем репарации повреждений ДНК (Рис. 4; Рис. 5; Рис. 8). Однако параметры репарации в настоящей работе непосредственно не исследовались, поэтому данное объяснение остаётся предположительным. Eastham и соавт. также не выявили прямой корреляции между количеством радиационно-индуцированных повреждений ДНК и способностью клеток образовывать колонии после облучения [16].

Для SiHa выраженное увеличение доли клеток в стадии позднего апоптоза и накопление клеток в фазе G2/M сочетались с относительно низкой способностью образовывать колонии после облучения, а HeLa занимала промежуточное положение по большинству исследованных показателей (Рис. 3; Рис. 4; Рис. 8). При этом в ряде

опубликованных работ для SiHa была показана сравнительно высокая способность к образованию колоний после облучения [15-20]. Такое расхождение может быть связано с различиями экспериментальных условий и указывает на ограниченность однозначного отнесения отдельных клеточных линий к радиочувствительным или радиорезистентным.

В совокупности полученные результаты показывают, что радиационный ответ клеток РШМ определяется сочетанием нескольких параметров. Сходное снижение метаболической активности может сопровождаться различиями в доле клеток в стадии позднего апоптоза, распределении клеток по фазам клеточного цикла, пролиферативной активности и способности образовывать колонии после облучения. Поэтому оценивать радиочувствительность HeLa, SiHa и CaSki только по одному показателю некорректно. Более информативным является их комплексное сопоставление с учётом способности клеток сохранять репродуктивный потенциал. Эти исходные различия необходимо учитывать и при последующем анализе линий после длительного фракционированного облучения.

4.3. Сравнение радиационного ответа AdMer-35 и AdMer-43

Особый интерес представляет сравнение линий AdMer-35 и AdMer-43, полученных из опухолевого материала одной пациентки до и после проведения химиолучевой терапии соответственно. Такая парная модель позволяет оценивать изменения клеточного фенотипа, связанные с проведённым лечением, при меньшем влиянии межиндивидуальной вариабельности. Вместе с тем линии были получены из разных биопсий, а между моментами забора материала опухоль подвергалась комплексной терапии, поэтому выявленные различия нельзя связывать исключительно с воздействием ионизирующего излучения.

После облучения дозой 5 Гр ответ клеток AdMer-43 был слабее, чем AdMer-35. Доля клеток в стадии позднего апоптоза изменялась незначительно, выраженного накопления клеток в фазе G2/M не наблюдалось, пролиферативная активность снижалась в меньшей степени, а жизнеспособность к 6-м суткам оставалась высокой (Рис. 2 В; Рис. 3; Рис. 4; Рис. 5). Полученные данные согласуются с результатами Xing и соавт. [90], которые при сравнении культур, полученных из радиочувствительных и радиорезистентных опухолей, также выявили различия в распределении клеток по фазам клеточного цикла: в радиорезистентных культурах доля клеток в G2/M была ниже, чем в радиочувствительных. Совокупность полученных данных указывает на более высокую устойчивость AdMer-43 к облучению по сравнению с AdMer-35. Однако стандартный клоногенный анализ для этих линий провести не удалось, поскольку клетки не формировали устойчивых хорошо

различимых колоний. В связи с этим полученных данных недостаточно, чтобы с высокой уверенностью назвать AdMer-43 радиорезистентной линией. Данная парная модель требует более подробного изучения механизмов, определяющих различия в радиационном ответе.

4.4. Изменения после длительного фракционированного облучения

Одним из основных результатов работы стало отсутствие единого направления изменений после длительного фракционированного облучения HeLa, SiHa и CaSki до суммарной дозы 60 Гр. Несмотря на использование одной последовательности доз, получившиеся в итоге линии существенно различались по ответу на последующее облучение 5 Гр. Способность образовывать колонии повышалась у HeLa 60, практически не изменялась у SiHa 60 и снижалась у CaSki 60 (Рис. 8). Доля клеток в стадии позднего апоптоза также изменялась разнонаправленно: уменьшалась у HeLa 60 и SiHa 60 и значительно возрастала у CaSki 60 (Рис. 11).

Наиболее убедительные признаки приобретённой радиорезистентности были получены для HeLa 60. По сравнению с исходной культурой способность образовывать колонии после повторного облучения увеличивалась приблизительно в 2 раза, а доля клеток в стадии позднего апоптоза снижалась (Рис. 8; Рис. 11). Сходные изменения описаны и в других моделях приобретённой радиорезистентности РШМ. Huang и соавт. [28] после длительного облучения HeLa и SiHa до суммарной дозы 72 Гр получили культуры с повышенной способностью образовывать колонии и меньшей долей апоптотических клеток. Qing и соавт. [29] также показали формирование устойчивого фенотипа HeLa после накопления 75 Гр, причём повышенная способность образовывать колонии сохранялась после завершения длительного облучения.

В работах Huang и соавт. [28] и Qing и соавт. [29] сходный устойчивый фенотип сопровождался изменением экспрессии генов и активности сигнальных путей, участвующих в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза. Это позволяет предположить, что повышение устойчивости HeLa 60 после длительного облучения также может быть связано с изменением этих процессов, однако в настоящей работе их молекулярные механизмы непосредственно не исследовались.

Для SiHa 60 наблюдалась иная картина. После накопления 60 Гр доля клеток в стадии позднего апоптоза после дополнительного облучения снижалась, однако способность образовывать колонии практически не отличалась от исходной культуры (Рис. 8; Рис. 11). Это отличает полученную модель от SiHa-RR, описанных Huang и соавт. [28] и Hu и соавт. [31], где снижение доли апоптотических клеток сопровождалось повышением способности образовывать колонии. Поэтому для SiHa 60 корректнее говорить об

изменении отдельных компонентов ответа на облучение, а не о доказанном формировании приобретённой радиорезистентности.

Противоположное направление изменений наблюдалось у CaSki 60. После длительного облучения способность клеток образовывать колонии снижалась приблизительно в 2-3 раза, а доля клеток в стадии позднего апоптоза после дополнительных 5 Гр увеличивалась по сравнению с исходной культурой (Рис. 8; Рис. 11). В данной модели длительное радиационное воздействие не приводило к формированию более устойчивого фенотипа и, напротив, сопровождалось повышением чувствительности по ряду исследованных показателей. Это показывает, что выживание клеточной популяции в процессе накопления высокой суммарной дозы само по себе не свидетельствует о развитии приобретённой радиорезистентности.

Полученные результаты согласуются с данными Werts и соавт. [30], которые исследовали линии плоскоклеточного рака шейки матки HTB35 и RECA после длительного фракционированного облучения. Культуры, полученные после накопления суммарных доз 30-60 Гр, в целом не демонстрировали повышения способности образовывать колонии после последующего облучения по сравнению с исходными линиями. При анализе отдельных клонов устойчивый фенотип был выявлен только у одного из семи клонов, полученных из HTB35-60. Эти данные подтверждают, что длительное фракционированное облучение не обязательно приводит к формированию более устойчивой клеточной популяции.

Различия между HeLa 60, SiHa 60 и CaSki 60 могут быть связаны как с исходной гетерогенностью клеточных линий, так и с различным вкладом селекции и адаптивных изменений в процессе длительного воздействия. Работы с клональным баркодированием на моделях плоскоклеточного рака головы и шеи подтверждают, что фракционированное облучение способно существенно изменять клональный состав клеточной популяции [25]. В нашем исследовании отдельные клоны не выделялись, а динамика состава культур в процессе накопления дозы не отслеживалась, поэтому разграничить вклад отбора предсуществовавших субпопуляций и изменений, формировавшихся непосредственно в ходе облучения, невозможно.

Полученные данные показывают, что длительное фракционированное облучение не обязательно сопровождается формированием радиорезистентности, а направление изменений зависит от свойств конкретной клеточной линии.

4.5. Сравнение изменений в разных моделях

Сопоставление линий AdMer-35 и AdMer-43 с HeLa 60, SiHa 60 и CaSki 60 позволяет оценить изменения клеточного ответа и радиочувствительности после ХЛТ *in vivo* и длительного фракционированного облучения *in vitro*. Эти модели не являются прямыми аналогами, поэтому наиболее корректно сравнивать не абсолютные значения показателей, а направление изменений относительно соответствующей исходной культуры.

Наиболее заметным общим признаком было снижение доли клеток в стадии позднего апоптоза после облучения. Этот показатель был ниже у AdMer-43 по сравнению с AdMer-35 и снижался у HeLa 60 и SiHa 60 по сравнению с соответствующими исходными линиями, тогда как у CaSki 60 наблюдалось противоположное изменение (Рис. 3; Рис. 11). Однако только у HeLa 60 снижение доли клеток в стадии позднего апоптоза сопровождалось повышением способности образовывать колонии. У SiHa 60 способность образовывать колонии практически не менялась, а для AdMer-35 и AdMer-43 оценить этот показатель не удалось из-за особенностей роста клеток (Рис. 8). Поэтому снижение доли клеток в стадии позднего апоптоза можно рассматривать как один из признаков изменения радиационного ответа, но не как самостоятельный показатель приобретённой радиорезистентности.

С другой стороны, изменения со стороны клеточного цикла в разных моделях не совпадали. У AdMer-43 после облучения практически отсутствовало накопление клеток в фазе G2/M, тогда как у HeLa 60 такого изменения не наблюдалось, несмотря на то что именно для HeLa 60 были получены наиболее выраженные признаки приобретённой радиорезистентности среди трёх линий после фракционированного облучения (Рис. 4; Рис. 12). Это показывает, что снижение доли клеток в G2/M после облучения не является обязательным признаком устойчивого фенотипа. Сходная неоднородность наблюдалась и при оценке пролиферации: у AdMer-43 она снижалась слабее, чем у AdMer-35, тогда как у HeLa 60 повышение способности образовывать колонии не сопровождалось увеличением пролиферативной активности (Рис. 5; Рис. 10 А). Для SiHa 60 и CaSki 60 такое сравнение пока ограничено отсутствием соответствующих данных xCELLigence.

Такое сопоставление представляет интерес для дальнейшего молекулярного анализа. Если сходные изменения экспрессии отобранных генов будут выявлены, например, в AdMer-43 и HeLa 60, но отсутствовать в SiHa 60 и CaSki 60, это позволит выделить гены, потенциально связанные с формированием более устойчивого фенотипа. На данном этапе сравнение основано на функциональных характеристиках клеток и не позволяет установить общий механизм приобретённой радиорезистентности.

4.6. Значение различных показателей радиационного ответа

Полученные результаты показали, что изменения отдельных показателей радиационного ответа не всегда совпадают по направлению.

МТТ-тест отражает метаболическую активность клеточной популяции в определённый момент времени, но не позволяет непосредственно оценить её долгосрочный репродуктивный потенциал. Метаболически активная клетка может сохраняться в культуре после облучения, но впоследствии утратить способность к продолжительному делению. Поэтому изменение сигнала МТТ нельзя напрямую приравнять к изменению радиочувствительности по данным клоногенного анализа [13]. ЛДГ-тест, в свою очередь, характеризует нарушение целостности клеточной мембраны и позволяет оценивать цитотоксический эффект в выбранной временной точке, но также не отражает все варианты последующей судьбы клетки.

Оценка апоптоза характеризует один из возможных вариантов радиационно-индуцированной клеточной гибели. Отсутствие выраженного увеличения доли Annexin V/PI-положительных клеток не означает сохранения способности к дальнейшему размножению, поскольку после облучения возможны сенесценция, митотическая катастрофа и другие варианты утраты репродуктивного потенциала [6, 7]. В нашей работе у CaSki после 5 Гр доля клеток в стадии позднего апоптоза практически не изменялась, несмотря на выраженное подавление пролиферации, тогда как у SiHa 60 снижение доли клеток в стадии позднего апоптоза не сопровождалось повышением способности образовывать колонии (Рис. 3; Рис. 5; Рис. 8; Рис. 11).

Накопление клеток в фазе G2/M следует рассматривать как характеристику ответа со стороны клеточного цикла на повреждение, а не как самостоятельный признак радиочувствительности или радиорезистентности. Задержка клеточного цикла может создавать дополнительное время для репарации ДНК, однако её дальнейший исход зависит от характера повреждений и эффективности восстановления. Поэтому сходное накопление клеток в фазе G2/M может сопровождаться различной способностью образовывать колонии после облучения [10, 11]. В исследованных моделях выраженное накопление клеток в фазе G2/M наблюдалось при различных значениях способности к образованию колоний и сохранялось у HeLa 60, несмотря на повышение её устойчивости к облучению (Рис. 4; Рис. 8; Рис. 12). Поэтому для интерпретации изменений клеточного цикла необходимо дополнительно оценивать активность систем репарации ДНК.

4.7. Биоинформатический поиск генов, потенциально связанных с радиационным ответом

Наряду с оценкой радиационного ответа был проведён биоинформатический поиск ключевых генов, потенциально связанных с ответом на облучение. Для анализа использовали два набора транскриптомных данных из базы Gene Expression Omnibus (GEO). Набор GSE56363 включал данные экспрессии генов в опухолях пациенток с различным ответом на ХЛТ и поэтому был непосредственно связан с терапевтическим ответом. Набор GSE7410 содержал транскриптомные данные нормальной ткани шейки матки и опухолей группы высокого риска и использовался как дополнительный источник изменений экспрессии, характерных для РШМ.

После анализа дифференциальной экспрессии и сетей функциональных взаимодействий было выделено 446 генов, присутствовавших в обеих сетях. Последующее ранжирование по величине изменения экспрессии, сетевой значимости и дополнительным критериям позволило сократить список сначала до 35, а затем до 13 генов: RAD51, CXCL12, NEK2, EXO1, BLM, DTL, CDC45, NUSAP1, TK1, TIMELESS, RPA3, FANCI и RAD54L. Функциональный состав полученного набора согласуется с основными процессами, способными влиять на радиационный ответ. Значительная часть отобранных генов связана с репарацией повреждений и поддержанием геномной стабильности, репликацией ДНК и регуляцией клеточного цикла, то есть процессами, имеющими центральное значение для судьбы клетки после воздействия радиации [7, 24]. Наряду с ними в список вошёл CXCL12, что указывает на возможное участие более широких сигнальных механизмов. Такая функциональная неоднородность закономерна с учётом того, что радиочувствительность определяется взаимодействием нескольких клеточных процессов, а не одним молекулярным путём.

Для отдельных генов их включение в итоговый список дополнительно подтверждается данными литературы. В модели приобретённой радиорезистентности HeLa, описанной Qing и соавт. [29], после длительного рентгеновского облучения изменялась экспрессия генов репарации ДНК, включая RAD51 и RAD54L, которые также вошли в наш итоговый список. Для NEK2 в моделях РШМ описана связь с радиационным ответом, а его подавление сопровождалось повышением чувствительности клеток к облучению [24]. Для CXCL12 также имеются данные о возможном участии в регуляции ответа клеток РШМ на воздействие радиации [24].

При этом следует учитывать, что состав генных панелей, связанных с радиочувствительностью, может существенно различаться в зависимости от используемой модели и дизайна исследования. Hall и соавт. [17] при сравнении экспрессионных профилей

радиочувствительных и радиорезистентных клеточных линий также показали ограниченное совпадение отдельных генов между разными опухолевыми моделями. Это указывает на выраженную зависимость выявляемых транскриптомных изменений от особенностей конкретной экспериментальной системы.

В связи с этим итоговый список из 13 генов рассматривается как основа для дальнейшей экспериментальной проверки, а не как готовая молекулярная сигнатура радиочувствительности. Основная ценность биоинформатического этапа на текущей стадии заключается в существенном сокращении числа генов, требующих дальнейшей экспериментальной проверки. Следующим этапом должно стать определение их экспрессии и сопоставление с выявленными особенностями радиационного ответа.

4.8. Ограничения исследования и дальнейшие этапы

Исследование имеет ряд ограничений, связанных с используемыми экспериментальными моделями. Двумерные клеточные культуры не позволяют в полной мере воспроизвести условия опухоли *in vivo*, включая её сложную пространственную организацию, гипоксию и взаимодействие опухолевых клеток со стромой и иммунными клетками [15, 16, 21, 24]. Поэтому полученные результаты характеризуют преимущественно клеточный ответ на облучение в контролируемых условиях и не отражают всего комплекса факторов, определяющих радиочувствительность опухоли.

Для линий AdMer-35 и AdMer-43 необходимо учитывать, что в промежутке между получением биопсий пациентка проходила комплексную ХЛТ, поэтому выявленные различия нельзя однозначно связывать только с воздействием радиации. Дополнительным ограничением стало то, что для этих линий не удалось провести корректный клоногенный анализ, поскольку клетки не формировали устойчивых хорошо различимых колоний. В связи с этим их радиационный ответ оценивали по совокупности других показателей.

Не все методы были применены к исследуемым линиям в одинаковом объёме. После накопления 60 Гр анализ пролиферации и миграционной активности с использованием xCELLigence был проведён только для HeLa, что пока ограничивает прямое сравнение HeLa 60, SiHa 60 и CaSki 60 по этим показателям. В дальнейшем аналогичный анализ планируется провести для SiHa 60 и CaSki 60, дополнив прочие данные о радиационном ответе этих линий.

Проведённые функциональные исследования позволили охарактеризовать различия радиационного ответа, однако их молекулярные механизмы пока остаются неясными. Для HeLa 60 повышение способности образовывать колонии и снижение доли клеток в стадии позднего апоптоза могут быть связаны с изменениями репарации ДНК, регуляции

клеточного цикла или клеточной гибели. Активность систем репарации была частично исследована, однако на данном этапе однозначных результатов получить не удалось. Поэтому возможная роль этих механизмов требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Экспрессия отобранных 13 генов пока не была экспериментально подтверждена. Следующим этапом станет её оценка методом RT-qPCR в исходных линиях и линиях после накопления 60 Гр, а также в паре AdMer-35/AdMer-43. Сопоставление уровня экспрессии с особенностями радиационного ответа позволит выделить гены для последующего функционального анализа.

Использование клеточных линий с различной исходной радиочувствительностью, линий после длительного фракционированного облучения, пары AdMer-35/AdMer-43 и результатов биоинформатического анализа создаёт основу для дальнейшего изучения механизмов, определяющих различия радиационного ответа РШМ.

5. Выводы

1. Клеточные линии SiHa, HeLa и CaSki различались по исходной радиочувствительности и характеру ответа на облучение дозой 5 Гр. Наименьшей чувствительностью обладала линия CaSki, для которой были характерны наиболее высокая способность образовывать колонии после облучения, отсутствие выраженного увеличения доли клеток в стадии позднего апоптоза, выраженное накопление клеток в фазе G2/М и снижение пролиферативной активности. Наиболее чувствительной была линия SiHa, для которой отмечались наиболее низкая способность образовывать колонии и выраженное увеличение доли клеток в стадии позднего апоптоза, тогда как HeLa занимала промежуточное положение по большинству исследованных показателей.

2. Линии AdMer-35 и AdMer-43, полученные из опухолевого материала одной пациентки до и после ХЛТ, различались по ответу на облучение. Для AdMer-43 после воздействия 5 Гр были характерны сниженный уровень апоптоза и накопления клеток в фазе G2/М клеточного цикла, менее выраженное подавление пролиферативной активности и сохранение высокой жизнеспособности. Полученные результаты указывают на более высокую устойчивость AdMer-43 к облучению по сравнению с AdMer-35, однако отсутствие возможности проведения клоногенного анализа не позволяет с высокой уверенностью характеризовать AdMer-43 как радиорезистентную линию.

3. Фракционированное облучение клеточных линий HeLa, SiHa и CaSki до суммарной дозы 60 Гр приводило к разнонаправленным изменениям их радиочувствительности. Для HeLa 60 были характерны повышение способности образовывать колонии после повторного облучения и снижение уровня апоптоза, что указывает на формирование приобретённой радиорезистентности. Для SiHa 60 способность образовывать колонии практически не изменялась, несмотря на снижение уровня апоптоза, тогда как для CaSki 60 наблюдались снижение способности образовывать колонии и повышение уровня апоптоза. Таким образом, фракционированное облучение не обязательно приводит к формированию приобретённой радиорезистентности, а характер изменений зависит от исходных свойств клеточной линии.

4. Биоинформатический анализ транскриптомных данных позволил выделить 13 генов, потенциально связанных с радиационным ответом РШМ: RAD51, CXCL12, NEK2, EXO1, BLM, DTL, CDC45, NUSAP1, TK1, TIMELESS, RPA3, FANCI и RAD54L. Полученный

список будет использован для последующей валидации на исследуемых клеточных моделях и дальнейшей оценки связи отобранных генов с особенностями радиационного ответа.

Заключение

Полученные результаты показывают, что радиационный ответ клеток рака шейки матки существенно различается между клеточными линиями и не может быть описан одним универсальным признаком. Различия проявляются сразу на нескольких уровнях, включая способность к образованию колоний, апоптоз, изменения клеточного цикла и пролиферативную активность. При этом отдельные показатели не всегда изменяются согласованно, что подчёркивает необходимость комплексной оценки радиочувствительности.

Проведённое фракционированное облучение показало, что повторное воздействие радиации не всегда приводит к формированию приобретённой радиорезистентности. Направление изменений различалось между клеточными линиями, что указывает на существенную роль их исходных биологических особенностей и подтверждает, что ответ на фракционированное облучение может формироваться по разным сценариям.

Совокупность использованных моделей позволяет рассматривать полученную систему как основу для дальнейшего изучения молекулярных механизмов, определяющих различия радиационного ответа. Наибольший интерес для дальнейшего анализа представляют HeLa 60 и пара AdMer-35/AdMer-43, в которых были выявлены наиболее выраженные признаки приобретённой радиорезистентности. Биоинформатический этап позволил выделить гены, потенциально связанные с радиационным ответом, а их последующая валидация на этих моделях позволит сопоставить молекулярные изменения с выявленными функциональными особенностями.

Список литературы

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory: Cancer Today. GLOBOCAN 2022: Cervix uteri fact sheet. Version 1.1 [Электронный ресурс]. – Lyon : IARC, 2024. – URL: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/23-cervix-uteri-fact-sheet.pdf> (дата обращения: 11.09.2026).
2. Cohen P. A., Jhingran A., Oaknin A., Denny L. Cervical cancer // *Lancet*. – 2019. – Т. 393. – С. 169–182. – DOI 10.1016/S0140-6736(18)32470-X.
3. Francoeur A. A., Monk B. J., Tewari K. S. Treatment advances across the cervical cancer spectrum // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2025. – Т. 22. – С. 182–199. – DOI 10.1038/s41571-024-00977-w.
4. Yamada T. et al. The current state and future perspectives of radiotherapy for cervical cancer // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2024. – Т. 50. – Suppl. 1. – С. 84–94. – DOI 10.1111/jog.15998.
5. Sagae S. et al. Improvement in radiation techniques for locally advanced cervical cancer during the last two decades // *International Journal of Gynecological Cancer*. – 2023. – Т. 33. – С. 1295–1303. – DOI 10.1136/ijgc-2022-004230.
6. Wang J. S., Wang H. J., Qian H. L. Biological effects of radiation on cancer cells // *Military Medical Research*. – 2018. – Т. 5. – Ст. 20. – DOI 10.1186/s40779-018-0167-4.
7. Price J. M., Prabhakaran A., West C. M. L. Predicting tumour radiosensitivity to deliver precision radiotherapy // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2023. – Т. 20. – С. 83–98. – DOI 10.1038/s41571-022-00709-y.
8. Wei W. et al. Ionizing radiation: molecular mechanisms, biological effects, and therapeutic targets // *Molecular Biomedicine*. – 2026. – Т. 7. – Ст. 3. – DOI 10.1186/s43556-025-00358-4.
9. Groelly F. J., Fawkes M., Dagg R. A., Blackford A. N., Tarsounas M. Targeting DNA damage response pathways in cancer // *Nature Reviews Cancer*. – 2023. – Т. 23. – № 2. – С. 78–94. – DOI 10.1038/s41568-022-00535-5.
10. Brand D. H., Kirby A. M., Yarnold J. R., Somaiah N. How Low Can You Go? The Radiobiology of Hypofractionation // *Clinical Oncology*. – 2022. – Т. 34. – С. 280–287. – DOI 10.1016/j.clon.2022.02.009.
11. Liu C., Nie J., Wang R., Mao W. The Cell Cycle G2/M Block Is an Indicator of Cellular Radiosensitivity // *Dose-Response*. – 2019. – Т. 17. – № 4. – Ст. 1559325819891008. – DOI 10.1177/1559325819891008.
12. Schwarz K. et al. Modification of radiosensitivity by Curcumin in human pancreatic cancer cell lines // *Scientific Reports*. – 2020. – Т. 10. – Ст. 3815. – DOI 10.1038/s41598-020-60765-1.
13. Wang Z. et al. The PPAR γ Agonist Rosiglitazone Enhances the Radiosensitivity of Human Pancreatic Cancer Cells // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2020. – Т. 14. – С. 3099–3110. – DOI 10.2147/DDDT.S242557.
14. de Bakker T., Maes A., Dragan T. et al. Strategies to Overcome Intrinsic and Acquired Resistance to Chemoradiotherapy in Head and Neck Cancer // *Cells*. – 2024. – Т. 14. – Ст. 18. – DOI 10.3390/cells14010018.
15. Tam K. F., Ng T. Y., Liu S. S. et al. Potential application of the ATP cell viability assay in the measurement of intrinsic radiosensitivity in cervical cancer // *Gynecologic Oncology*. – 2005. – Т. 96. – С. 765–770. – DOI 10.1016/j.ygyno.2004.11.025.

16. Eastham A. M., Atkinson J., West C. M. L. Relationships between clonogenic cell survival, DNA damage and chromosomal radiosensitivity in nine human cervix carcinoma cell lines // *International Journal of Radiation Biology*. – 2001. – T. 77. – C. 295–302. – DOI 10.1080/09553000010017108.
17. Hall J. S., Iype R., Senra J. et al. Investigation of Radiosensitivity Gene Signatures in Cancer Cell Lines // *PLoS ONE*. – 2014. – T. 9. – Cr. e86329. – DOI 10.1371/journal.pone.0086329.
18. Saxena A., Yashar C., Taylor D. D., Gercel-Taylor C. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2005. – T. 192. – C. 1399–1403. – DOI 10.1016/j.ajog.2004.12.045.
19. Bose M. V., Gopisetty G., Selvaluxmy G., Rajkumar T. Dominant negative Ubiquitin-conjugating enzyme E2C sensitizes cervical cancer cells to radiation // *International Journal of Radiation Biology*. – 2012. – T. 88. – C. 629–634. – DOI 10.3109/09553002.2012.702299.
20. Banáth J. P., MacPhail S. H., Olive P. L. Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines // *Cancer Research*. – 2004. – T. 64. – C. 7144–7149. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-1433.
21. López J., Poitevin A., Mendoza-Martínez V., Pérez-Plasencia C., García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance // *BMC Cancer*. – 2012. – T. 12. – Cr. 48. – DOI 10.1186/1471-2407-12-48.
22. Kumazawa S., Kajiyama H., Umezu T. et al. Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2014. – T. 40. – C. 1389–1398. – DOI 10.1111/jog.12357.
23. Chopra S., Bosse T., Horeweg N. et al. Biomarker Expression and Clinical Outcomes in International Study of Chemoradiation and Magnetic Resonance Imaging-Based Image-Guided Brachytherapy for Locally Advanced Cervical Cancer: BIOEMBRACE // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2025. – T. 121. – № 1. – C. 97–106. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2024.07.2316.
24. Girbovan A. H., Balan C., Kirsch-Mangu A. T. et al. Molecular Biomarkers of Radiosensitivity and Radioresistance in Cervical Cancer: A Systematic Review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2026. – T. 27. – Cr. 7033. – DOI 10.3390/ijms27157033.
25. Wursthorn A., Schwager C., Kurth I. et al. High-Complexity cellular barcoding and clonal tracing reveals stochastic and deterministic parameters of radiation resistance // *International Journal of Cancer*. – 2022. – T. 150. – C. 663–677. – DOI 10.1002/ijc.33855.
26. Yang D., Zhang W., Liu Y. et al. Single-cell whole-genome sequencing identifies human papillomavirus integration in cervical tumour cells prior to and following radiotherapy // *Oncology Letters*. – 2018. – T. 15. – C. 9633–9640. – DOI 10.3892/ol.2018.8567.
27. Shi Z., Hu C., Liu J. et al. Single-Cell Sequencing Reveals the Role of Radiation-Induced Stemness-Responsive Cancer Cells in the Development of Radioresistance // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – T. 26. – Cr. 1433. – DOI 10.3390/ijms26041433.
28. Huang C., Lu H., Li J. et al. SOX2 regulates radioresistance in cervical cancer via the hedgehog signaling pathway // *Gynecologic Oncology*. – 2018. – T. 151. – C. 533–541. – DOI 10.1016/j.ygyno.2018.10.005.
29. Qing Y., Yang X. Q., Zhong Z. Y. et al. Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252Cf neutron and X-rays // *BMC Cancer*. – 2010. – T. 10. – Cr. 71. – DOI 10.1186/1471-2407-10-71.
30. Werts E. D., Burholt D. R., Paljug W. R., Polizotto S. L., Yann V. M. Radiation survival of two human cervical carcinoma cell lines after multifraction irradiation // *International*

- Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 1996. – T. 35. – C. 941–950. – DOI 10.1016/0360-3016(96)00144-7.
31. Hu Q., Zuo X., Gu X. et al. CXCL8 is essential for cervical cancer cell acquired radioresistance and acts as a promising therapeutic target in cervical cancer // *Scientific Reports*. – 2025. – T. 15. – Cr. 20467. – DOI 10.1038/s41598-025-05435-w.
 32. Zhang H. et al. Review of possible mechanisms of radiotherapy resistance in cervical cancer // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – T. 13. – Cr. 1164985. – DOI 10.3389/fonc.2023.1164985.
 33. Roossink F., Wieringa H. W., Noordhuis M. G. et al. The role of ATM and 53BP1 as predictive markers in cervical cancer // *International Journal of Cancer*. – 2012. – T. 131. – № 9. – C. 2056–2066. – DOI 10.1002/ijc.27488.
 34. Beskow C. et al. Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86 // *British Journal of Cancer*. – 2009. – T. 101. – C. 816–821. – DOI 10.1038/sj.bjc.6605201.
 35. Pranatharthi A. et al. RhoC regulates radioresistance via crosstalk of ROCK2 with the DNA repair machinery in cervical cancer // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2019. – T. 38. – Cr. 392. – DOI 10.1186/s13046-019-1385-7.
 36. Du H. et al. YTHDF3 mediates HNF1 α regulation of cervical cancer radio-resistance by promoting RAD51D translation in an m6A-dependent manner // *FEBS Journal*. – 2023. – T. 290. – C. 1920–1935. – DOI 10.1111/febs.16681.
 37. Deng Y. R. et al. Sp1 contributes to radioresistance of cervical cancer through targeting G2/M cell cycle checkpoint CDK1 // *Cancer Management and Research*. – 2019. – T. 11. – C. 5835–5844. – DOI 10.2147/CMAR.S200907.
 38. Zhou J., Guo X., Chen W., Wang L., Jin Y. Targeting survivin sensitizes cervical cancer cells to radiation treatment // *Bioengineered*. – 2020. – T. 11. – № 1. – C. 130–140. – DOI 10.1080/21655979.2020.1717297.
 39. Xiang L. S. et al. Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – T. 1833. – C. 2996–3005. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2013.08.003.
 40. Rashmi R. et al. Radio-resistant cervical cancers are sensitive to inhibition of glycolysis and redox metabolism // *Cancer Research*. – 2018. – T. 78. – C. 1392–1403. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-17-2367.
 41. Liu C. H. et al. Inhibition of Uncoupling Protein 2 Enhances the Radiosensitivity of Cervical Cancer Cells by Promoting the Production of Reactive Oxygen Species // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – T. 2020. – Cr. 5135893. – DOI 10.1155/2020/5135893.
 42. Jiang W. et al. The PIK3CA-E545K-SIRT4 signaling axis reduces radiosensitivity by promoting glutamine metabolism in cervical cancer // *Cancer Letters*. – 2023. – T. 556. – Cr. 216064. – DOI 10.1016/j.canlet.2023.216064.
 43. Che Y. et al. TRIP4 promotes tumor growth and metastasis and regulates radiosensitivity of cervical cancer by activating MAPK, PI3K/AKT, and hTERT signaling // *Cancer Letters*. – 2019. – T. 452. – C. 1–13. – DOI 10.1016/j.canlet.2019.03.017.
 44. Teng Y. et al. Molecule interacting with CasL-2 enhances tumor progression and alters radiosensitivity in cervical cancer // *Journal of Translational Medicine*. – 2025. – T. 23. – Cr. 44. – DOI 10.1186/s12967-024-06065-y.
 45. Song Q. et al. HSP90 promotes radioresistance of cervical cancer cells via reducing FBXO6-mediated CD147 polyubiquitination // *Cancer Science*. – 2022. – T. 113. – C. 1463–1474. – DOI 10.1111/cas.15269.

46. Yang S. S. et al. Inhibition of Delta-like Ligand 4 enhances the radiosensitivity and inhibits migration in cervical cancer via the reversion of epithelial–mesenchymal transition // *Cancer Cell International*. – 2020. – T. 20. – Ст. 344. – DOI 10.1186/s12935-020-01434-1.
47. Fyles A. et al. Long-term performance of interstitial fluid pressure and hypoxia as prognostic factors in cervix cancer // *Radiotherapy and Oncology*. – 2006. – T. 80. – С. 132–137. – DOI 10.1016/j.radonc.2006.07.014.
48. Wu N. et al. ZNF582 promoter methylation predicts cervical cancer radiosensitivity and ZNF582 protein overexpression reduces radiosensitivity by cell cycle arrest in S phase // *Epigenetics*. – 2022. – T. 17. – С. 1786–1799. – DOI 10.1080/15592294.2022.2080995.
49. Nin D. S. et al. GAGE mediates radio resistance in cervical cancers via the regulation of chromatin accessibility // *Cell Reports*. – 2021. – T. 36. – Ст. 109621. – DOI 10.1016/j.celrep.2021.109621.
50. Ke G. et al. MiR-181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the pro-apoptotic PRKCD gene // *Oncogene*. – 2013. – T. 32. – С. 3019–3027. – DOI 10.1038/onc.2012.323.
51. Li Q. et al. LncRNA-EME1 enhances BRCA1 recruitment and alters repair of DNA damage in cervical cancer radioresistance // *Non-coding RNA Research*. – 2026. – T. 16. – С. 57–69. – DOI 10.1016/j.ncrna.2025.09.006.
52. Spiotto M. T. et al. Biology of the radio- and chemo-responsiveness in HPV malignancies // *Seminars in Radiation Oncology*. – 2021. – T. 31. – № 4. – С. 274–285. – DOI 10.1016/j.semradonc.2021.02.009.
53. Ruiz F. J. et al. HPV transcript expression affects cervical cancer response to chemoradiation // *JCI Insight*. – 2021. – T. 6. – № 16. – Ст. e138734. – DOI 10.1172/jci.insight.138734.
54. Joo J. et al. Integration Pattern of Human Papillomavirus Is a Strong Prognostic Factor for Disease-Free Survival After Radiation Therapy in Cervical Cancer Patients // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2017. – T. 98. – № 3. – С. 654–661. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2017.02.226.
55. Shin H. J. et al. Human papillomavirus 16 E6 increases the radiosensitivity of p53-mutated cervical cancer cells, associated with up-regulation of aurora A // *International Journal of Radiation Biology*. – 2010. – T. 86. – № 9. – С. 769–779. – DOI 10.3109/09553002.2010.484477.
56. Leung T. H. Y., Tang H. W. M., Siu M. K. Y. et al. CD71+ Population Enriched by HPV-E6 Protein Promotes Cancer Aggressiveness and Radioresistance in Cervical Cancer Cells // *Molecular Cancer Research*. – 2019. – T. 17. – № 9. – С. 1867–1880. – DOI 10.1158/1541-7786.MCR-19-0068.
57. Cosper P. F. et al. Decreased local immune response and retained HPV gene expression during chemoradiotherapy are associated with treatment resistance and death from cervical cancer // *International Journal of Cancer*. – 2020. – T. 146. – С. 2047–2058. – DOI 10.1002/ijc.32793.
58. Ballman K. V. Biomarker: Predictive or Prognostic? // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – T. 33. – № 33. – С. 3968–3971. – DOI 10.1200/JCO.2015.63.3651.
59. Ho C. K. et al. Expression of DNA damage response proteins in cervical cancer patients treated with radical chemoradiotherapy // *Gynecologic Oncology*. – 2017. – T. 145. – С. 176–184. – DOI 10.1016/j.ygyno.2016.12.025.
60. Fu H. C. et al. Increased Expression of SKP2 Is an Independent Predictor of Locoregional Recurrence in Cervical Cancer via Promoting DNA-Damage Response after Irradiation // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7. – С. 44047–44061. – DOI 10.18632/oncotarget.10057.

61. Leonardi S. et al. The relevance of prelamin A and RAD51 as molecular biomarkers in cervical cancer // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8. – C. 94247–94258. – DOI 10.18632/oncotarget.21686.
62. Burri P. et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1 α with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2003. – T. 56. – C. 494–501. – DOI 10.1016/S0360-3016(02)04579-0.
63. Fjeldbo C. S. et al. Combining imaging- and gene-based hypoxia biomarkers in cervical cancer improves prediction of chemoradiotherapy failure independent of intratumour heterogeneity // *EBioMedicine*. – 2020. – T. 57. – Ct. 102841. – DOI 10.1016/j.ebiom.2020.102841.
64. Shen L. et al. High Expression of SOX2 and OCT4 Indicates Radiation Resistance and an Independent Negative Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2014. – T. 62. – C. 499–509. – DOI 10.1369/0022155414532654.
65. Chopra S. et al. Cancer Stem Cells, CD44, and Outcomes Following Chemoradiation in Locally Advanced Cervical Cancer // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2019. – T. 103. – C. 161–168. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2018.09.003.
66. Javed S. et al. ALDH1 & CD133 in invasive cervical carcinoma & their association with the outcome of chemoradiation therapy // *Indian Journal of Medical Research*. – 2021. – T. 154. – C. 367–374. – DOI 10.4103/ijmr.IJMR_709_20.
67. Choi C. H. et al. Chemoradiotherapy response prediction model by proteomic expressional profiling in patients with locally advanced cervical cancer // *Gynecologic Oncology*. – 2020. – T. 157. – C. 437–443. – DOI 10.1016/j.ygyno.2020.02.017.
68. Li X. et al. PAX1 hypomethylation as a prognostic biomarker for radioresistance of cervical cancer // *Clinical Epigenetics*. – 2023. – T. 15. – Ct. 123. – DOI 10.1186/s13148-023-01538-1.
69. Li X. et al. Methylation of PAX1 gene promoter in the prediction of concurrent chemoradiotherapy efficacy in cervical cancer // *Journal of Cancer*. – 2021. – T. 12. – C. 5136–5143. – DOI 10.7150/jca.57460.
70. Mahantshetty U. et al. Impact of HPV 16/18 infection on clinical outcomes in locally advanced cervical cancers treated with radical radio (chemo) therapy - A prospective observational study // *Gynecologic Oncology*. – 2018. – T. 148. – C. 299–304. – DOI 10.1016/j.ygyno.2017.11.034.
71. Sammouri J., Wong M. C., Lynn E. J. et al. Serial Genotyping of the Human Papillomavirus in Cervical Cancer: An Insight Into Virome Dynamics During Chemoradiation Therapy // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2023. – T. 116. – № 5. – C. 1043–1054. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2023.02.018.
72. Kitahara O. et al. Classification of Sensitivity or Resistance of Cervical Cancers to Ionizing Radiation According to Expression Profiles of 62 Genes Selected by cDNA Microarray Analysis // *Neoplasia*. – 2002. – T. 4. – C. 295–303. – DOI 10.1038/sj.neo.7900251.
73. Weidhaas J. B. et al. Changes in Gene Expression Predicting Local Control in Cervical Cancer: Results from Radiation Therapy Oncology Group 0128 // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – T. 15. – C. 4199–4206. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-2257.
74. Buttarelli M. et al. A combined ANXA2-NDRG1-STAT1 gene signature predicts response to chemoradiotherapy in cervical cancer // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2019. – T. 38. – Ct. 279. – DOI 10.1186/s13046-019-1268-y.
75. Zuccherato L. W. et al. Cervical Cancer Stem-Like Cell Transcriptome Profiles Predict Response to Chemoradiotherapy // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – T. 11. – Ct. 639339. – DOI 10.3389/fonc.2021.639339.

76. Kim K. H. et al. A novel gene signature associated with poor response to chemoradiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer // *Journal of Gynecologic Oncology*. – 2022. – T. 33. – Cr. e7. – DOI 10.3802/jgo.2022.33.e7.
77. Zhang Z., Xiang K., Tan L. et al. Identification of critical genes associated with radiotherapy resistance in cervical cancer by bioinformatics // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – T. 12. – Cr. 967386. – DOI 10.3389/fonc.2022.967386.
78. Yang H., Zheng Q., Li X., Wang J. Multi-Omics Analysis Identifies Phosphoglucomutase 2 as a Potential Target to Alleviate Chemoradiotherapy Resistance in Cervical Cancer Cells // *OncoTargets and Therapy*. – 2026. – T. 19. – Cr. 613657. – DOI 10.2147/OTT.S613657.
79. Wang Y., Gan N., Ning S., Qiu Y. Prognostic value and early response stratification of a multi-biomarker panel in cervical cancer patients undergoing chemoradiotherapy // *Frontiers in Oncology*. – 2025. – T. 15. – Cr. 1686716. – DOI 10.3389/fonc.2025.1686716.
80. Lin G., Yang L. Y., Lin Y. C. et al. Prognostic model based on magnetic resonance imaging, whole-tumour apparent diffusion coefficient values and HPV genotyping for stage IB-IV cervical cancer patients following chemoradiotherapy // *European Radiology*. – 2019. – T. 29. – № 2. – C. 556–565. – DOI 10.1007/s00330-018-5651-4.
81. Lucia F. et al. Prediction of outcome using pretreatment 18F-FDG PET/CT and MRI radiomics in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2018. – T. 45. – C. 768–786. – DOI 10.1007/s00259-017-3898-7.
82. Lucia F. et al. External validation of a combined PET and MRI radiomics model for prediction of recurrence in cervical cancer patients treated with chemoradiotherapy // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2019. – T. 46. – C. 864–877. – DOI 10.1007/s00259-018-4231-9.
83. Wang W., Yang G., Liu Y. et al. Multimodal deep learning model for prognostic prediction in cervical cancer receiving definitive radiotherapy: a multi-center study // *npj Digital Medicine*. – 2025. – T. 8. – Cr. 503. – DOI 10.1038/s41746-025-01903-9.
84. He B., Chen W., Liu L. et al. Prediction Models for Prognosis of Cervical Cancer: Systematic Review and Critical Appraisal // *Frontiers in Public Health*. – 2021. – T. 9. – Cr. 654454. – DOI 10.3389/fpubh.2021.654454.
85. Hatt M., Lucia F., Schick U., Visvikis D. Multicentric validation of radiomics findings: challenges and opportunities // *EBioMedicine*. – 2019. – T. 47. – C. 20–21. – DOI 10.1016/j.ebiom.2019.08.054.
86. Torlakovic E. E. et al. Indirect clinical validation for predictive biomarkers in oncology: International Quality Network for Pathology (IQN Path) Position Paper // *Virchows Archiv*. – 2025. – T. 487. – C. 565–572. – DOI 10.1007/s00428-025-04169-4.
87. European Society of Radiology (ESR) ESR Statement on the Validation of Imaging Biomarkers // *Insights into Imaging*. – 2020. – T. 11. – Cr. 76. – DOI 10.1186/s13244-020-00872-9.
88. Polley M. Y. C. et al. Statistical and Practical Considerations for Clinical Evaluation of Predictive Biomarkers // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2013. – T. 105. – C. 1677–1683. – DOI 10.1093/jnci/djt282.
89. Mandrekar S. J., Sargent D. J. Clinical Trial Designs for Predictive Biomarker Validation: Theoretical Considerations and Practical Challenges // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – T. 27. – C. 4027–4034. – DOI 10.1200/JCO.2009.22.3701.
90. Xing B., Pu C., Chen Y. et al. Insights into the characteristics of primary radioresistant cervical cancer using single-cell transcriptomics // *Human Cell*. – 2023. – T. 36. – C. 1135–1146. – DOI 10.1007/s13577-023-00882-x.

91. Злокачественные новообразования в России в 2024 году (заболеваемость) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой, Н. Ю. Золотарева. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 178 с.



Отчет о проверке

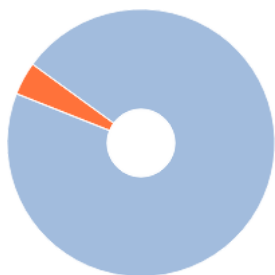
Автор: Мирошниченко Светлана Константиновна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: итоговая_аттестация_ТалышевВА_безСЛ

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
4,5%



Оригинальность:
95,5%



ИИ-контент:
0%
(Версия 1.6.0 от 17.09.2026)



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

Проверено: 99,5% текста документа, исключено из проверки: 0,5% текста документа. Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 8

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 21.09.2026 08:32:13

Дата корректировки: Нет

Количество страниц: 77

Символов в тексте: 159018

Слов в тексте: 19650

Число предложений: 1288

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

Модули поиска: Шаблонные фразы, Перефразирования по коллекции IEEE, СМИ России и СНГ, IEEE, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, PubMed, Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Перефразирования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Профессиональная лексика. АПК и биотех, Рувики, Сводная коллекция научных работ Беларуси, Перефразирования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Коллекция НБУ, Патенты СССР, РФ, СНГ, Профессиональная лексика. Медицина, Медицина, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования IEEE, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Публикации eLIBRARY, Сводная коллекция ЭБС, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Коллекция INVENTORUS, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Профессиональная лексика. Юриспруденция, Цитирование, ИПС Адилет, Переводные заимствования, СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Публикации РГБ, Кольцо вузов, Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Коллекция открытых публикаций международных издательств, Интернет Плюс Онлайн

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	0,77%	0,65%	Кичкина_ДО_диплом	11 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[02]	0,61%	0,26%	Бирюков, Михаил Михайлович М... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[03]	0,61%	0,13%	"Чувствительность клеток плоско...	24 Мая 2024	Кольцо вузов	
[04]	0,55%	0,55%	ФРАКЦИОНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙ... http://elibrary.ru	01 Янв 2019	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[05]	0,54%	0,22%	Диплом Морозов С.В. v2	25 Мая 2026	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[06]	0,53%	0,14%	"Чувствительность клеток плоско...	24 Мая 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[07]	0,46%	0,36%	Малахов, Филипп Андреевич Рол... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[08]	0,41%	0,38%	Юрьева КО - магистерская диссе...	16 Июн 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[09]	0,32%	0,32%	Цишнатти, Андрей Андреевич Ос... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[10]	0,32%	0,32%	Цишнатти, Андрей Андреевич Ос... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[11]	0,31%	0%	не указано	11 Мар 2026	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,29%	0,29%	Рукопись диссертации Житкевич ...	03 Окт 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[13]	0,27%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,27%	0,15%	Киселева, Любовь Николаевна И... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[15]	0,25%	0%	Мохамед_Ислам_Сабер_Диплом	19 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,23%	0%	Влияние составляющих микроок...	20 Мая 2026	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,22%	0,22%	Индивидуальная радиочувствите...	01 Янв 2026	Публикации eLIBRARY (переводы и	

			http://elibrary.ru		перефразирования)	
[18]	0,2%	0%	7_11_22_Dissertatsiya_Linyi_Alhadd... https://istina.msu.ru	26 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,19%	0,19%	ВКР_Кулаков_ИА	30 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[20]	0,19%	0%	Надырова, Алсу Ильдаровна Сек... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[21]	0,18%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://platform.inventorus.ru	03 Июн 2024	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,18%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://openalex.org	03 Июн 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,18%	0%	Тема работы: ОПТИМИЗАЦИЯ МЕ...	26 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,18%	0,18%	Гусаченко, Олеся Николаевна Су... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2008	Публикации РГБ	
[25]	0,16%	0%	Вьюшков, Владимир Сергеевич В... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,16%	0%	Гареев, Ильгиз Фанилевич Роль ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,16%	0%	https://vak.gisnauka.ru/adverts-list... https://vak.gisnauka.ru	12 Июн 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,15%	0%	Диплом. Колобенко МВ. Для реце...	19 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,15%	0,15%	Targeting HMGB3/hTERT axis for ra... https://openalex.org	13 Ноя 2020	Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств	
[30]	0,15%	0%	Основы клинической радиобиол... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,14%	0%	http://journal.waocp.org/article_90... http://journal.waocp.org	02 Дек 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,13%	0%	https://mediatum.ub.tum.de/doc/1... https://mediatum.ub.tum.de	22 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,13%	0%	https://www.tnimc.ru/dissertatsion... https://tnimc.ru	23 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,13%	0%	Сформированная резистентност... http://elibrary.ru	01 Янв 2020	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,13%	0%	Судебная экспертиза контролиру... http://ivo.garant.ru	16 Мар 2024	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,13%	0%	https://vak.gisnauka.ru/adverts-list... https://vak.gisnauka.ru	12 Июн 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,12%	0%	Способ оценки активности систе... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,12%	0%	RU 2014620509 https://fips.ru	13 Мая 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,12%	0%	Неинвазивный способ лазерной ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,12%	0%	Нанокompозит с активным лиган... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,12%	0%	Диплом Ефимов Николай	21 Июн 2026	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,11%	0%	вкр Донскова А.П.	08 Июн 2026	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,11%	0%	https://incras.ru/wp-content/uploa... https://incras.ru	05 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[44]	0,11%	0%	http://www.cytspb.rssi.ru/referates... http://cytspb.rssi.ru	17 Янв 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,1%	0%	БачковаИК_диплом_маг_ЕЛ без с...	20 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,1%	0%	ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ <i>IN VITRO... http://elibrary.ru	01 Янв 2026	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,1%	0%	Диссертация ОсиповААфинал.pdf https://dissovet.msu.ru	05 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,02%	0%	не указано	06 Мая 2026	Профессиональная лексика. Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ им. Д. Г. Кнорре СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Талышев Вадим Алексеевич

«Молекулярные механизмы, опосредующие возникновение и развитие
радиорезистентности опухолевых клеток при злокачественных заболеваниях
шейки матки»

Оригинальность работы составляет 95.5%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко