

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В.А. Вінніков

*ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України, Харків***Біомаркери радіаційного
опромінення: короткий огляд
I. «Самостійні» маркери
і мультипараметричний підхід****Biomarkers of radiation exposure:
a short review
I. Autonomous markers
and multiparametric approach**

Контакт людини з променевим чинником може відбуватися за різними сценаріями: від хронічного опромінення в наднизьких дозах у професіоналів радіаційної сфери і мешканців регіонів із природним підвищеним фоном до гострого субтотального опромінення в летальних дозах при аваріях на ядерному виробництві на кшталт випадку на Токаї-мура, Японія, 1999 р.

У випадках позапланового опромінення клінічні наслідки зазвичай варіюють у дуже широкому діапазоні, а оцінки дозових навантажень, що ґрунтуються на фізичних вимірюваннях і моделюванні, часто страждають неточністю. Це спричиняє труднощі і помилки у діагностиці, профілактиці й лікуванні радіаційних синдромів. Як наслідок, виникає необхідність використання в діагностичному процесі клініко-біологічних показників, що відображають структурні, фізіологічні та біохімічні зміни, пов'язані із розвитком променевого ураження і пострадіаційного відновлення в опроміненіх тканинах і органах.

Такі показники дістали назву «біомаркери». Їх застосування при оцінці радіаційних ефектів є центральним моментом у новій концепції протирадіаційного захисту, згідно з якою пропонується вимірювати не фізичну дозу опромінення, а шкоду, якої воно реально заподіяло чи може потенційно заподіяти залежно від рівня індивідуальної радіочутливості [1–4].

Донедавна головною сферою, що визначала актуальність такої роботи, була радіаційна онкологія через потребу в моніторингу і профілактиці побічних реакцій у пацієнтів під час променевої терапії. Загроза ядерного тероризму спричинила

сплеск інтересу до клінічної радіобіології і призвела до активізації фундаментальних і прикладних досліджень біомаркерів за фінансової підтримки з боку державного сектора в розвинених країнах світу. Цілеспрямоване виділення значних коштів уможливило залучення високих технологій — протеоміки, геноміки, метаболоміки, транскриптоміки — і тим самим забезпечило швидкий прогрес у цьому напрямку.

Метою даного циклу оглядів є узагальнення сучасних відомостей про можливість оцінки радіаційно-індукованих ефектів у людини за допомогою біомаркерів і представлення низки методів біологічної детекції опромінення, які пройшли апробацію чи вважаються перспективними у прикладній радіобіології. Для цього був проведений аналіз матеріалів спеціалізованих радіобіологічних форумів [4–17] і досяжних повнотекстових версій статей у закордонних (англомовних) періодичних наукових виданнях, відібраних за результатами пошуку в інформаційній базі PubMed і перехресних посилань. Перша частина огляду присвячена усталеним біомаркерам опромінення і можливостям підвищення ефективності біодозиметрії шляхом упровадження мультипараметричного підходу.

**Визначення і класифікація біомаркерів
радіаційного впливу**

Біомаркери — це придатні для вимірювання параметри біологічної системи, які є індикаторами нормальної функції системи чи її патологічного стану, або її відповіді (реакції) на вплив зовнішнього фактора [18]. У більшості оглядових публікацій з питань маркерів радіаційного впливу

ву їх класифікація ґрунтується на природі вимірюваних параметрів (фізичній чи біологічній) і технічних способах вимірювання ефекту [5, 19]. Проте в сучасній клінічній радіобіології біомаркери розподіляють на категорії згідно з часом їх вимірювання (до чи після радіаційного впливу) і характером інформації, яку вони несуть. Найпростішим варіантом є розподіл на предиктивні маркери і маркери відповіді [18]. Більш деталізована класифікація [20] включає такі категорії біомаркерів:

предиктивні — вимірюються до опромінювання і призначені для передбачення підвищеного ризику органоспецифічної радіотоксичності в нормальних тканинах;

діагностичні — з'являються після опромінення синхронно з клінічними симптомами і вказують на дію радіації як специфічну причину патології; прогностичні — вимірюються після радіаційного впливу і свідчать про тяжкість подальшого перебігу радіогенної патології; дозиметричні — визначаються на певних точках часу після опромінювання і вможливають оцінку поглинутої дози на один чи кілька органів і систем.

У контексті даного огляду найбільший інтерес становлять саме дозиметричні маркери. Їх розглядають як цінний додаток до фізичної дозиметрії, оскільки вони привносять істотну вигоду — автоматичне врахування енергії випромінювання і потужності дози при оцінці кінцевого біологічного чи клінічного ефекту, що дозволяє оминати одне з важливих джерел похибки — конвертацію поглинутої дози в очікуваний ефект через відносну біологічну ефективність випромінювання [6].

На сьогоднішній день перелік показників, придатних для детекції опромінення чи вимірювання поглинутої радіаційної дози, включає:

електрон-парамагнітний резонанс (ЕПР) у твердих тканинах — зубах, кістках, нігтях, волоссі;

клінічні ознаки і симптоми, які зазвичай ґрунують залежно від критичної системи — гемопоетичної (лімфопенія, гранулоцитопенія, тромбоцитопенія), гастроінтестинальної (нудота, блювання, діарея), центральної нервової системи (головний біль, анорексія, порушення свідомості, дезорієнтація, атаксія, конвульсії, прострація, артеріальна гіпотензія, лихоманка) та

шкіри (еритема, едема, пухирі, суха чи волога десквамація, виразка, оніхолізіс, епіляція);

пошкодження клітинного геному (цитогенетичні — аберації хромосом та похідні від них мікроядра; генні мутації — *hprt*, *GPA*; нефіксовані пошкодження ДНК — «кометні хвости», γ -H2AX фокуси);

біохімічні та молекулярні показники, які відображають фізіологічні ефекти, що виникають унаслідок фізичного пошкодження клітин, а також певних біохімічних процесів і змін у клітинному складі тканин. Такими маркерами можуть бути внутріклітинні білки, олігопептиди і продукти окиснювального пошкодження ДНК, які потрапляють до міжклітинного простору після лізису клітини, нові метаболіти, зміни концентрації сигнальних молекул та мРНК або кінцевих продуктів певних генів.

З наведеного переліку до категорії «біомаркери» належать цитогенетичні та молекулярно-біохімічні показники.

«Самостійні» біомаркери опромінення

Незважаючи на численність літератури з питань біологічної детекції променевого впливу, серед досяжних джерел трапився тільки один чітко сформульований перелік вимог — критеріїв «ідеального біодозиметра» [21]. Перш за все, зміни такого біологічного показника обов'язково мають проявляти чітку залежність «доза-ефект» у широкому діапазоні клінічно-значущих радіаційних доз — від кількох десятків міліґрей до летальних для людини; причому бажано без порогу виявлення змін показника при низьких дозах і без ефекту сатурації при високих рівнях опромінення. Також важливими характеристиками біологічного дозиметра виступають специфічність до дії іонізуючої радіації, можливість калібрування залежності «доза-ефект» *in vitro* (тобто її повна адекватність досліджуваній тест-системі *in vivo*), здатність враховувати такі особливості умов опромінення, як відносна біологічна ефективність іонізуючих випромінень різної якості, тривалість променевого впливу і ступінь гомогенності розподілу дози опромінення в організмі. Бажаними якостями для біологічного дозиметра є відомі параметри його динаміки з плином часу після опромінення (в ідеалі — стабільність з часом), низький спонтанний рівень (це визначає поріг чутливості методу) і

низька міжіндивідуальна варіабельність змін показника на одиницю дози. До цього переліку додається бажана висока швидкість одержання результатів та високий ступінь їх відтворюваності, придатність до автоматизації і масового використання.

Серед багатьох радіобіологічних ефектів біофізичної, біохімічної, молекулярної та цитоморфологічної природи, запропонованих для біологічної детекції опромінення, немає жодного показника, який задовольняє одразу всім означеним вимогам, існує дуже обмежена кількість таких, що відповідають хоча б декільком критеріям «ідеального» біодозиметра.

Для будь-якого методу, запропонованого як інструмент біомедичного моніторингу, критичним аспектом вважається стан методології, тобто вивченість фундаментальних механізмів процесу, рівень стандартизованості технічних протоколів виконання дослідження, наявність системи контролю якості, чітких рекомендацій і розвиненої статистичної бази для інтерпретації результатів, визначеність можливостей та обмежень методу, ступінь апробованості на практиці за різних сценаріїв радіаційного опромінення. Відповідно до цього критерію, «золотим стандартом» біодозиметрії нині є аналіз аберацій хромосом у лімфоцитах крові, і цитогенетичні пошкодження завжди розглядають окремо від решти біомаркерів.

Принцип цитогенетичної дозиметрії полягає в тому, що для оцінки поглинутої дози радіації в опроміненого індивіда визначають частоту хромосомних перебудов (аберацій) у метафазах першого мітозу культури лімфоцитів крові і співвідносять результат *in vivo* із калібрувальною кривою «доза–ефект», побудованою *in vitro* для цього показника при дії випромінення певної енергії у певному діапазоні доз. За необхідності до базового рівняння «доза–ефект», за яким обчислюють поглинуту дозу, вносять додаткові модифікації для врахування ступеня рівномірності опромінення та тривалості експозиції і часу, що минув після радіаційного впливу.

Цитогенетична дозиметрія має потужне біофізичне підґрунтя, забезпечує достатньо інформативні з клінічної точки зору результати, а її методологічний розвиток досяг рівня міжнародних стандартів [22–24]. У широкій практиці викори-

стовують чотири провідні варіанти цитогенетичного методу: класичний хромосомний аналіз, флуоресценцію *in situ* гібридизації (FISH), хімічно-індуковану передчасну конденсацію хромосом (ПКХ) та мікроядерний тест (МЯТ) у біонуклеарах із цитохалазиновим блоком мітозу. Морфологічними об'єктами, що підлягають розпізнанню і кількісному обліку шляхом мікроскопії в зазначених методиках, відповідно, є дицентрики і кільцеві хромосоми із супутніми фрагментами, транслокації та інсерції, ПКХ-кільця і ПКХ-фрагменти та мікроядра.

При «ідеальному» сценарії опромінення — зовнішнє, гостре, тотальне, рівномірне, в діапазоні доз 0,1–4,0 Гр, від джерел з низьким лінійним передаванням енергії (ЛПЕ), з обстеженням через короткий час після радіаційного впливу — методом вибору є класичний хромосомний аналіз із обліком дицентриків. Показаннями до використання інших варіантів є: для FISH — віддалений за часом радіаційний вплив, для ПКХ — опромінення у високих дозах (> 5 Гр), для МЯТ — потреба у широкомасштабному скринінгу при масовому опроміненні. Технічні аспекти цитогенетичних методик викладено в рекомендаціях МАГАТЕ з хромосомної біодозиметрії [22].

Недоліками цитогенетичного методу вважаються слабка придатність для автоматизації, і звідси — висока часоємність аналізу та потреба в наявності штату висококваліфікованих мікроскопістів-цитогенетиків. Інші методологічні ускладнення і проблеми цитогенетичної дозиметрії детально розглянуті у критичному огляді [25].

Біохімічні маркери опромінення

Завдяки зусиллям радіаційної біохімії та молекулярної біології протягом останніх 60 років стала відомою велетенська кількість процесів, що відбуваються на клітинному і тканинному рівнях після дії радіації. Певна частина цих змін проявляє залежність від дози опромінення і може бути детектована у зручній тест–системі — плазмі крові. Серед них фізіологічні механізми, форма кривих «доза–ефект» і «час–ефект», ступінь індивідуальної варіабельності та вплив сторонніх факторів є достатньо вивченими щодо чотирьох показників — амілази, Flt-3 ліганду, цитруліну та С-реактивного білка, які можуть виступати «самостійними» маркерами опромінення.

Підвищення активності **амілази** у сироватці в короткий час після опромінення є наслідком інтрафазної загибелі серозних клітин слинних залоз. Пострадіаційна гіперамілаземія вважається вдалим критерієм для тріажу опромінених осіб, але кількісне вимірювання поглинутої дози за цим показником не може бути достатньо точним унаслідок його значної міжіндивідуальної варіабельності і сигмоїдної залежності «доза–ефект». Інформативність амілази як радіаційного біомаркера було позитивно оцінено у спостереженнях за ефектами тотального опромінення пацієнтів [26] та в експерименті з опроміненням макак-резусів [27, 28]. Активність амілази у сироватці оцінюють за допомогою клінічного біохімічного аналізатора. Підвищений рівень амілази є інформативним індикатором радіаційного ураження протягом 12–48 год після опромінювання.

Flt3-ліганд є цитокіном гемопоетичної системи, структурно гомологічним до фактора стовбурових клітин (stem cell factor, SCF) і фактора стимулювання росту колоній 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1). У синергізмі з іншими ростовими факторами Flt3 стимулює проліферацію та диференціацію різних попередників клітин крові. Концентрація Flt3 у крові зростає як компенсаторна відповідь на радіаційно-індуковану апластичну анемію. Сироватковий вміст Flt3 позитивно корелює з поглинутою дозою радіації протягом 5 діб після опромінювання і негативно — з кількістю колонієтворних клітин у кістковому мозку, що робить можливим передбачення тривалості й тяжкості аплазії та загальної гематологічної токсичності (лейкоцитопенії, тромбоцитопенії). Вміст Flt3-ліганду в плазмі вимірюють кількісним сендвіч-імуноферментним аналізом ELISA з використанням комерційних тест-наборів. Моніторинг цього показника для визначення тяжкості аплазії кісткового мозку було здійснено у постраждалих при радіаційних інцидентах у Франції та Сенегалі [29, 30]. Інформативність Flt3-ліганду як біомаркера може тривати кілька тижнів після опромінення, зокрема в умовах пролонгованого радіаційного впливу, як це було доведено у Сенегальському інциденті [31].

Цитрулін — амінокислота, що є фізіологічним маркером радіаційного ураження епітелію

тонкого кишечника. Цитрулін утворюється з орнітину та карбамоїлфосфату в одній з центральних реакцій циклу сечовини, або в результаті під'єднання азотистої групи до глутаміну, чи з аргініну як побічний продукт реакції за участю NO-синтаз. Цитрулін специфічно виробляється ентероцитами тонкого кишечника, і його концентрація позитивно корелює з чисельністю цих клітин при деяких патологіях тонкого кишечника, а також у випадку радіаційного опромінення. Концентрацію цитруліну вимірюють хроматографічним методом у плазмі з гепаринізованої крові. Динаміка вмісту цитруліну в сироватці дозволяє оцінювати ступінь ураження шлунково-кишкового тракту, і цей підхід пройшов апробацію на потерпілих при радіаційних інцидентах [29] та пацієнтах під час променевої терапії [32, 33].

C-реактивний білок (C-reactive protein, CRP) є білком гострої фази, відомим чутливим індикатором пошкодження тканин, оскільки його концентрація у сироватці крові при запаленні, некрозі, травмі зростає в десятки разів проти норми. Як біомаркер радіаційного впливу він був використаний у потерпілих при аварії на Чорнобильській АЕС через 1–9 діб після опромінення; для його концентрації у сироватці була встановлена кореляція з тяжкістю гострої променевої хвороби [34]. Існують приклади успішного використання CRP для моніторингу гострих радіаційно-індукованих ефектів у приматів після опромінення в експерименті [27] та у пацієнтів під час променевого лікування [35, 36], хоча даний показник не завжди проявляє специфічність до променевої патології [37]. Концентрацію CRP у сироватці крові оцінюють методами імунотурбідиметрії чи імуносорбції (ELISA); зростання його вмісту спостерігається через 4–6 годин від початку запального процесу, досягає піку через 1–2 доби і при одужуванні знижується з напівперіодом циркуляції близько 6 годин.

Певним індикатором радіаційного впливу може служити зростання в плазмі крові вмісту нуклеїнових кислот, зокрема **фрагментованої ДНК**. Потрапляння цих макромолекул до міжклітинного середовища є наслідком апоптотичної деструкції клітин, насамперед — лейкоцитів. На підґрунті праць російських дослідників 1980–1990 рр. [38, 39] у світі розробляють високочут-

ливий методики кількісного визначення ДНК, яка циркулює у плазмі. З використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі в експерименті з опроміненням мишей в діапазоні доз 2–10 Гр було показано дозозалежне зростання концентрації інтер-В1-последовностей геномної ДНК (аналогу А1и-последовностей у людини) у плазмі крові та зроблено висновок про можливість використання даного показника як біомаркера, особливо при автоматизації процесу [40].

Важливу роль у неспецифічній реакції організму на радіаційний вплив відіграють **про-запальні цитокіни**, секретовані макрофагами в результаті ураження судин і гемопоетичної системи: інтерлейкіни ІЛ-1, ІЛ-6, фактор некрозу пухлин альфа (TNF α). Зокрема, до природної резистентності при опроміненні у високих дозах істотний внесок робить **ІЛ-6**, і в експериментах на макаках-резус та мишах було показано його придатність виступати біомаркером дії радіації протягом перших 24–48 год після опромінювання [27, 41]. Відомо, що інтерлейкіни секретуються у відповідь на радіаційний вплив багатьма тканинами й органами: печінкою [42], шкірою [43, 44], епітелієм бронхів [45, 46], що зумовлює адитивне підвищення їх вмісту в плазмі в умовах опромінення *in vivo*. Висновок щодо зростання ІЛ-6 як універсального радіаційно-індукованого ефекту було підтверджено в експерименті з опроміненням декількох ліній нормальних клітин людини *in vitro* і мишей *in vivo*; до того ж, у плазмі мишей визначався підвищений вміст TNF α протягом перших 24 год після радіаційного впливу [47]. Але широка задіяність інтерлейкінів у різноманітних процесах може негативно впливати на їх специфічність до радіації. Так, у спостереженні на онкохворих під час променевої терапії було показано дозозалежне зростання в плазмі крові вмісту ІЛ-6 і CRP і відсутність дозової залежності для концентрації ІЛ-1 β та антагоніста рецепторів до ІЛ-1; натомість, зміни вмісту CRP і антагоніста рецепторів до ІЛ-1 виявили позитивну кореляцію з тривалістю і тяжкістю виснаження — побічного психоневрологічного синдрому при терапевтичному опроміненні [36].

Молекулярні внутріклітинні маркери опромінення

Внаслідок радіаційного опромінення в клітинах виникають численні пошкодження ДНК — кон-

формаційні зміни, зшивки і двониткові розриви (ДР). Їх поява є сигналами, що стимулюють глобальну відповідь на пошкодження геному, спрямовану на збереження клітини чи клітинної популяції через запуск різних шляхів репарації чи оминання пошкоджень, реалізації апоптозу чи продовження клітинного циклу [48–54]. Деякі молекулярні процеси, залучені до системи глобальної відповіді, зокрема появи і посттрансляційної модифікації білків, можна використовувати для детекції опромінення і передбачення радіаційної токсичності. Матеріалом для вимірювання ефекту може бути плазма, лімфоцити крові, біоптати шкіри.

Одне з центральних місць у механізмі глобальної клітинної відповіді на радіаційний вплив посідає білок **p53** — регулятор підтримки стабільності геному [50, 55–58]. Він може бути присутнім у плазмі крові в низькій концентрації, з коротким періодом життя. Після радіаційного впливу концентрація p53 зростає разом зі змінами його конформації і збільшенням тривалості існування, завдяки чому він набуває статусу біомаркера опромінення. Найкращим методом вимірювання концентрації p53 вважається проточна цитометрія [59]. Крім прямого вимірювання p53 можна оцінювати зміни концентрації тих білків системи глобальної відповіді, які підлягають регуляції з його боку, як-от інгібітор циклін-залежної кінази p21 WAF1/CIP1 чи білок затримки клітинного поділу, індукований пошкодженням ДНК GADD45b [49–51, 56, 57]. Приклади такого підходу описано в літературі [27, 41].

Оскільки всі ці білки є внутріклітинними, їх поява у плазмі крові залежить від інтенсивності руйнування клітин, що привносить істотну непевність у результати вимірювання. Значно надійнішим є визначення цих білків безпосередньо в клітинах, де їх появу чи пост-трансляційні модифікації можна ефективно детектувати в лізатах — вестерн-блотингом, а без руйнації клітин — методами імуноферментного аналізу, імуноцитохімії або проточної цитофлуориметрії [60–62]. У літературі регулярно з'являються праці, що пропонують нові біомаркери опромінення на підґрунті внутріклітинного аналізу. Так, з'ясувалося, що радіаційний вплив викликає АТМ-залежне фосфорилування одного з членів висококонсервативного когезинового комплек-

су — білка структурної підтримки хромосоми 1, **Smc1**, і його вимірювання у лейкоцитах людини методом ELISA було запропоновано як спосіб детекції опромінення [63]. Інформативність методу була перевірена на пацієнтах під час променевої терапії в умовах тотального і локального опромінення, а також внутрішнього опромінення при введенні ^{131}I .

У сучасній молекулярній біології при оцінках ушкодження ДНК є дуже популярним кількісне визначення фосфорилування гістонів H2AX, що стало вдалою альтернативою всім іншим тестам на репарацію ДНК. Фосфорилування H2AX — одного з компонентів гістонових октомерів у нуклеосомах — є елементом системи реагування на утворення двониткових розривів (ДР) ДНК. Фосфорилування здійснюють такі кінази, як АТМ (атаксія-телеангіектазія мутантна) і АТР (АТМ Rad3-релевантна) в межах шляху Р13К. Фосфорильований білок — $\gamma\text{-H2AX}$ — запускає процес рекрутування і «формування команди» ферментів репарації ДНК у потрібному локусі геному. Детальні схеми даного процесу можна знайти в оглядах, присвячених молекулярній машинерії репарації ДНК [52, 53, 63]. Фосфорилування H2AX відбувається через 1–3 хв після утворення ДР ДНК, і кількість $\gamma\text{-H2AX}$ лінійно зростає при накопиченні пошкоджень ДНК. Визначення $\gamma\text{-H2AX}$ здійснюють методами проточної цитометрії чи імунофлуоресцентної мікроскопії (причому існує можливість повної автоматизації процесу), і за наявності калібрувальної кривої, — оцінюють поглинуту дозу радіації. В наш час проводиться активна робота з валідації обліку $\gamma\text{-H2AX}$ у лімфоцитах людини як способу біодозиметрії [64–72]. На базі саме $\gamma\text{-H2AX}$ у поєднанні з МЯТ було створено роботизовану біодозиметричну систему Rapid Automated Biodosimetry Tool (RABIT), яка з високою швидкістю вимірює рівень цих фокусів у лімфоцитах зі зразка крові з пальця і вможливує біодозиметрію за відкаліброваною *in vitro* лінійною залежністю «доза–ефект» для γ -променів у діапазоні доз 0–8,0 Гр [73, 74]. Аналіз $\gamma\text{-H2AX}$ пропонується поєднувати із визначенням інших білків системи репарації ДНК — АТМ, 53BP1, MDC1, RAD51, комплексу MRN (MRE11/RAD50/NBS1), RNF8/KIAA0646, RNF168, комплексу BRCA1–A (BRCA1, BARD1, UIMC1/RAP80, FAM175A/

AbraXas, BRCC3/BRCC36, BRE/BRCC45 і MERIT40/NBA1) [60, 61].

Проте, як і з усіма тестами, заснованими на врахуванні репарації ДНК (наприклад, методом «комет» чи методиками електрофорезу виділеної ДНК), даний підхід має серйозне обмеження: маркер радіаційного впливу з часом стає нестійким, і його кінетика визначається швидкістю репарації ДР ДНК. У випадку $\gamma\text{-H2AX}$ тест є працездатним тільки в перші 24 год після опромінення, вимагає обов'язкового врахування часу, що минув між опромінюванням і забором матеріалу (лімфоцитів крові чи біоптатів шкіри), та охолодження матеріалу до $+4^\circ\text{C}$ одразу після одержання від пацієнта для зупинки репарації ДНК. Додатковими факторами непевності є варіації виходу $\gamma\text{-H2AX}$ -фокусів на одиницю дози та швидкості їх зникнення з часом у різних субпопуляціях лімфоцитів [67], через що результат вимірювання цього маркера в об'єднаному зразку мононуклеарів у певного індивіда істотно залежить від поточного співвідношення $\text{CD4}^+/\text{CD19}^+$.

Ті ж самі причини — нестабільність ДР ДНК за часом і висока варіабельність результатів вимірювань, а крім того — ще й технічна складність виконання дослідження перешкоджають широкому використанню на практиці біологічної дозиметрії решти методик, заснованих на оцінках нефіксованих пошкоджень ДНК, насамперед алкалінового методу «комет», незважаючи на його достатню методологічну розвиненість [75]. Проте, слід зазначити, що деяка частина фрагментованої ДНК, яка вимірюється методом «комет», є остаточними фрагментами із зарепарованими кінцевими ДР, і їхня надлишкова присутність у «хвостах комет» дозволяє відрізнити групи експонованих осіб від контролю навіть у віддалені терміни після опромінення в низьких дозах [76].

Апоптоз

Наприкінці 1990-х років почали з'являтися повідомлення про спроби створити біодозиметричні системи на базі вимірювання апоптозу в лімфоцитах крові людини [77–80]. Серед різних апоптотичних шляхів та пов'язаних з ними молекулярних перетворень найбільш уживаними кількісними маркерами є зміни структури зовнішньої клітинної мембрани, зниження мембранного потенціалу в мітохондріях і деградація

ДНК. Перетворення у клітинній мембрані оцінюють за змінами її проникності для різних барвників, або за виходом одного з її внутрішніх компонентів — фосфотидилсерину — на поверхню мембрани, де його присутність визначають за специфічним зв'язуванням із білком Анексин V, міченим флюорохромом [81–83]. Зниження мембранного потенціалу в мітохондріях вимірюють за відповідними змінами у зв'язуванні катіонного барвника DiOC₆ (3, 39-дигексилосакарбоціанін йодид) [79, 81]. Апоптотичну деградацію ДНК можна детектувати морфологічно — методом світлової мікроскопії [84], або флуориметричним аналізом розплітання ДНК (fluorometric analysis of DNA unwinding, FADU) [77, 79], або проточною цитофлуориметрією за наявністю відповідного піку на гістограмах молекулярної маси [78, 85, 86] чи після мічення кінців фрагментів ДНК термінальною деоксинуклеотидилтрансферазою (terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling, TUNEL) [77, 87].

Найчутливішим методом вважається мітохондріальний тест із DiOC₆, але найпопулярнішим стало мічення анексином V із додатковим включенням пропідій йодиду, що дозволяє розрізняти неушкоджені клітини, лімфоцити у фазах раннього чи пізнього апоптозу та некротизовані клітини. Існує приклад використання всіх трьох підходів (поверхнева мембрана, мітохондрії, фрагментація ДНК) в одному дослідженні [79].

Апоптоз — динамічний процес; його окремі компоненти мають власну кінетику, і цю залежність від часу необхідно враховувати при вимірюваннях. У нестимульованих лімфоцитах людини ознаки апоптозу масово виявляються не раніше, ніж через 10–16 год після опромінювання, і досягають максимуму через 72–96 год [79–81, 88]. Компромісним варіантом для оцінки радіаційно-індукованого апоптозу в даній тест-системі є витримування клітин у культурі протягом 24–48 год перед вимірюванням.

Лімфоцити крові людини дуже чутливі до радіаційної індукції апоптозу: вірогідне підвищення рівня апоптотичних клітин над контролем визначалося вже при дозах γ -опромінення 0,05–0,10 Гр [77, 78, 81], і залежність «доза–ефект» у діапазоні від 0 до 1–2 Гр найчастіше описувалася як лінійна. Проте, майже всі науковці відзна-

чали вихід рівня апоптозу в лімфоцитах на плато при дозах > 2–3 Гр, що перетворювало залежність «доза–ефект» на зворотно-експоненційну чи логарифмічну і не давало можливості кількісно розрізняти ефект при дозах 2–3 і 5–8 Гр [79, 80, 84, 86].

Для спонтанного рівня і кількісних параметрів радіаційної індукції апоптозу характерна висока міждонорська варіабельність при достатній відтворюваності цих індивідуальних особливостей; даний факт дозволяє використовувати тести на апоптоз з метою оцінки індивідуальної радіочутливості, але водночас обмежує їхню придатність для визначення дози опромінення [77, 82, 83, 85, 87, 89]. Частково ця варіабельність є наслідком поєднання флуктуацій у співвідношенні чисельності різних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів та відмінностей у їх радіочутливості. Відомо, що вихід апоптозу на одиницю радіаційної дози у В-лімфоцитах та нормальних кілерах є значно вищим, ніж у Т-клітинах, а серед останніх CD8⁺ є більш радіочутливими за критерієм апоптотичної загибелі, ніж CD4⁺ [80, 82, 83, 85, 89, 90]. Це викликає необхідність ведення диференціального або селективного вимірювання апоптозу в різних субпопуляціях лімфоцитів за допомогою їх мічення відповідними антитілами синхронно із маркерами апоптотичного процесу. Більш того, внаслідок істотної варіабельності спонтанної виживаності різних субпопуляцій лімфоцитів у культурі для порівняння їхніх кривих «доза — ефект» виникає необхідність нормалізувати дані, подаючи їх як відсоток від неопроміненого контролю, що є нонсенсом з погляду практичної біодозиметрії.

Проте на підґрунті одного з таких експериментів було запропоновано досить простий спосіб напівкількісної (інтервальної) оцінки радіаційної дози [80]. Виявилось, що чисельність популяції неуражених апоптозом нормальних кілерів (CD3-CD8⁺) у культурі стрімко падає пропорційно дозі опромінення і тривалості культивування. В культурі тривалістю 16 год падіння кількості цих клітин більш ніж удвічі може виступати дискримінатором доз опромінення > 5 Гр, а в культурі тривалістю 48 год означені кількісні зміни відповідають поглинутим дозам > 3 Гр. Тобто послідовні вимірювання на точках часу 0, 16 і 48 год культивування уможливають оцін-

ку інтервалів сублетальних і летальних доз опромінення.

Що стосується досліджень апоптозу після радіаційного впливу *in vivo*, то у праці [79] в експерименті з γ -опроміненням щурів у дозах 0,5 і 1,5 Гр єдиним інформативним методом виявилося мічення мітохондрій DiOC₆, яке показало позитивну кореляцію рівня апоптотичних лейкоцитів із поглинутою радіаційною дозою, причому пік апоптозу і найістотніші відмінності між дозовими точками (найвища розподільча здатність дозиметрії) припадали на 48 год після експозиції. На жаль, у доступній літературі не вдалося знайти даних про використання апоптозу лімфоцитів крові як радіаційного біомаркера у людини в умовах опромінення *in vivo*, хоча лунали заяви про наміри провести такі дослідження [79].

Мультипараметричний підхід при використанні біомаркерів

Цілком очевидно, що всі «самостійні» біомаркери не відповідають повному переліку вимог до «ідеального біодозиметра»; жоден з них не є універсальним через прив'язаність до певного типу тканин або міжтканинну варіабельність відповіді, і при вимірюванні поодиноці не надає вичерпної дозиметричної інформації. Натомість мультипараметричний, комплексний підхід значно розширює можливості детекції радіаційного впливу, вимірювання поглинутої дози і коректної оцінки клінічних наслідків опромінення. Сутність підходу полягає в об'єднанні даних вимірювання кількох показників, кожен з яких має помірну інформативність, із тим, щоб кінцевий результат значно підвищував точність, специфічність та інформативність оцінки. Це досягається за рахунок спеціальних математичних прийомів мультиваріативної статистики.

Прикладом мультипараметричного підходу щодо біохімічних маркерів є експериментальне дослідження із тотальним опроміненням свиней (вивчали низку параметрів — вміст амілази, аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), лужної та кислої фосфатази і заліза [91]). Для більшості цих параметрів визначали високий ступінь варіабельності, і жоден з параметрів, узятий окремо, не давав чіткої закономірності «доза–ефект». Проте із застосуванням мультипараметричної статистики вдалося показати, що комбі-

нація значень кількості лімфоцитів і нейтрофілів у поєднанні з оцінками вмісту ЛДГ, АЛТ, АСТ та рівня сечовини вможливила чітке визначення дози опромінення, причому незалежно від часу після радіаційного впливу. Цей набір параметрів ще потребує тестування на людині, наприклад із використанням зразків крові пацієнтів в умовах променевої терапії.

Мультипараметричний підхід було успішно апробовано в експериментах з опроміненням тварин [27, 41, 92, 93]. У першому циклі досліджень оцінювали в сироватці макак-резусів після опромінення в дозі 6 Гр рівні IL-6, p21 WAF1/CIP1, С-реактивного білка та α -амілази [27] або інший набір — вміст С-реактивного білка і α -амілази, чисельність нейтрофілів і лімфоцитів [92]. У другому циклі робіт у сироватці опромінених мишей вимірювали вміст GADD45 α , С-реактивного білка, IL-6 і сироваткового амлоїдного білка А [41] або тільки сироваткового амлоїдного білка А водночас із оцінкою гематологічних показників [93]. В обох серіях експериментів для статистичної обробки даних використовували мультиваріативний дискримінантний аналіз (multivariate discriminant analysis). Це дозволило розрізнити опромінені та неопромінені групи тварин із вірогідністю 95–100%, а точність кількісної оцінки дози радіації підвищувалася зі зростанням кількості біомаркерів, залучених до аналізу.

Мультипараметричний підхід вважається найперспективнішим для передбачення синдрому перемножувальної дисфункції органів (multiple organ dysfunction syndrom, MODS), оскільки значення поглинутої дози само по собі в даному випадку не є самодостатнім предиктором [94]. У потерпілого при радіаційному інциденті у Франції із поглинутою дозою на все тіло 4,2–4,8 Гр (за цитогенетичною оцінкою) водночас визначали вміст Flt3-ліганду як індикатора ураження гемопоетичної системи, цитруліну — як індикатора стану ШКТ і деяких оксистеролів — як маркерів стану судин і метаболізму ліпідів [29]. Паралельно вимірювали у плазмі крові ще 11 «класичних» біохімічних параметрів: креатинін, сечовину, АЛТ, АСТ, загальний холестерол, ліпопротеїни високої і низької густини, креатинін-кінази (КК і КК-МБ), аполіпопротеїни (АpoA1 та АpoB) і тригліцериди. Використання

біомаркерів дозволило коректно оцінити тяжкість аплазії кісткового мозку, виключити наявність ураження ШКТ, передбачити розвиток радіаційних ефектів у печінці та серцево-судинній системі. Результати предикції функціонального стану різних систем за біомаркерами проявили чітку кореляцію з «класичними» показниками, динаміка яких підтвердила висновки щодо стану печінки, гемопоезу і серцево-судинної системи.

Слід зазначити, що без залучення мультипараметричної статистики одномоментне вимірювання декількох маркерів само по собі не гарантує інформативного результату. Саме так сталося в дослідженні потенційних біохімічних маркерів для оцінки мукозальної токсичності в шлунково-кишковому тракті під час променевого лікування [33]. Науковці оцінювали вміст цитруліну, CRP та еозинофіл-катіонного білка у плазмі крові і фекального калпротеїну в пацієнтів у динаміці курсу терапевтичного опромінення органів малого таза. У процесі лікування спостерігали вірогідні зміни рівнів цитруліну і калпротеїну, але ці ефекти не корелювали із симптомами розладу ШКТ. Вочевидь, бракувало обробки даних із використанням мультиваріативної статистики, щоб оцінити прогностичну здатність спорідненого розгляду кількох маркерів.

«Омікова революція»

При всій привабливості багатопараметрична дозиметрія має дві істотні вади. По-перше, це абсолютна механістичність самого підходу до побудови множинних лінійних регресій, і така примітивізованість (фактична відсутність) біофізичного підґрунтя перешкоджає модифікації рівнянь «доза — ефект» при зміні сценарію опромінення. По-друге, це необхідність виведення консолідованої оцінки при об'єднанні даних, що мають різний характер — дискретний, інтервальний, ймовірнісний, коли ті походять із вимірювання показників різної природи (наприклад, чисельність клітин і їх розподіл за популяціями, концентрація сполук, наявність чи відсутність якісної ознаки). Наявність цього статистичного аспекту поки що майже не береться до уваги [25], попри заяви про бажаність і життєву необхідність мультипараметричної біодозиметрії [94].

Вочевидь, альтернативним шляхом є сукупний аналіз багатьох показників однієї природи із про-

веденням вимірювань одним методом. Нині цей напрямок переживає бурхливий розвиток завдяки «оміковій революції». Термін із закінченням «...ом» (...ome) означає абстрактну сутність, явище, групу або масу; щось, що є об'єднаним у сукупність. Відповідно, «...оміка» (...omics) — це вивчення цілісних сукупностей або груп сутностей, явищ, процесів. Згідно з об'єктом інтересів серед «омік» виділяють протеоміку (білки), метаболоміку (метаболіти), геноміку (ДНК, гени), транскриптоміку (РНК, активність генів), ліпідоміку (ліпіди), інтерактоміку (молекулярні взаємодії) та інтегроміку (системна біологія). «Оміковий» підхід, який можна сформулювати як «вимірюємо все й одразу», з одного боку представляє вичерпну інформацію про механізми радіаційної відповіді, а з другого — створює специфічні «біопідписи», що корелюють із поглинутою дозою і часом після опромінення, і тим самим є готовими панелями молекулярних маркерів радіаційного впливу. Саме з цими технологіями пов'язують подальший розвиток біологічної дозиметрії.

Таким чином, розробка біомаркерів радіаційного впливу сьогодні переживає бурхливий період, що є наслідком поєднання об'єктивної потреби в них з боку радіаційної медицини та онкології, можливості її задовольнити завдяки успіхам клітинної та молекулярної біології і достатнього фінансування з боку державного сектора в розвинених країнах, де уряди збагнули, якою серйозною є загроза ядерного тероризму.

Біомаркери уособлюють ідею «персоналізованої» медицини, надаючи можливість обґрунтувати діагноз та обирати тактику лікування згідно з індивідуальною реакцією організму пацієнта на радіаційний вплив. На сьогоднішній день чітко сформульовано перелік вимог до показників — кандидатів у біологічні дозиметри. Від їх використання очікується, з одного боку — якомога точніша оцінка «дійсної» поглинутої дози радіації за змінами еволюційно-закріплених детермінант, а з іншого — лабільне відображення поточного рівня ураженості критичних органів і систем. Перший напрям уособлює цитогенетична дозиметрія; другий — вимірювання апоптозу, біохімічних і внутріклітинних молекулярних маркерів опромінення. З практичного досвіду прийшло розуміння неможливості

створення «ідеального» чи універсального біодозиметра, отже найкращого результату можна досягти тільки при поєднанні вищезазначених підходів, квінтесенцією чого є мультипараметрична дозиметрія.

Методологія розробки біомаркерів включає відкриття маркера, його валідацію — оцінку надійності, чутливості й специфічності в лабораторних умовах та клініці, оптимізацію протоколів для вирішення тих чи інших клінічних питань і стандартизацію для широкого впровадження в систему охорони здоров'я [95, 96]. Незважаючи на усталеність цієї схеми, у випадку нових маркерів радіаційної відповіді вона не завжди витримується, їм ще доведеться пройти шлях валідації, як це свого часу трапилося із радіаційною цитогенетикою. Зокрема, має бути здійснена перевірка нових маркерів при хронічному і пролонгованому, тотальному нерівномірному і локальному опроміненні, за дії випромінень із високим лінійним передаванням енергії та інкорпорації радіонуклідів. Залишаються нез'ясованими питання варіабельності цих маркерів у популяції, впливу на них сторонніх чинників, міжлабораторної відтворюваності результатів і стандартизації протоколів.

При пошуку балансу між точністю індивідуальної оцінки радіаційної дози і швидкістю отримання результату слід обов'язково зважувати на фактор часу після експозиції. На відміну від цитогенетичних маркерів, які працюють від кількох місяців (дицентрики) до десятків років («стабільні» транслокації), працездатність решти запропонованих показників радіаційної відповіді обмежується кількома годинами–добами після опромінення. Така ситуація зумовлена транзитивністю процесів, що лежать в основі молекулярних і біохімічних маркерів. У випадку мультипараметричного підходу виникає додаткове ускладнення, а саме необхідність одержання консолідованої оцінки при об'єднанні результатів декількох тестів.

Альтернативним шляхом є одномоментне вимірювання одним методом великої кількості показників єдиної природи. Даний підхід об'єднується під назвою «...оміки». «Омікова революція» визначила стратегію розробки нових маркерів радіаційного впливу на найближче майбутнє, і її досягнення буде розглянуто в наступних частинах огляду.

Література

1. Mothersill C., Seymour C.B. // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 597, iss. 1–2. – P. 5–10.
2. Baverstock K. // *Ibid.* – 2010. – Vol. 687, iss. 1–2. – P. 3–6.
3. Hansson S.O. *Ethics of radiation protection: should we protect the most sensitive people?* // *Proceed. 38th Ann. Meet. European Radiation Research Society «European Radiation Research' 2010»*. – Stockholm, 2010. – P. 10.
4. Coleman C.N., Blakely W.F., Fike J.R. et al. // *Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 159. – P. 812–834.
5. Alexander G.A., Swartz H.M., Amundson S.A. et al. // *Radiat. Meas.* – 2007. – Vol. 42. – P. 972–996.
6. Straume T., Amundson S.A., Blakely W.F. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 393–405.
7. DiCarlo A.L., Hatchett R.J., Kaminski J.M. et al. // *Ibid.* – Vol. 169. – P. 712–721.
8. Ramakrishnan N., Brenner D. // *Ibid.* – Vol. 170. – P. 666–675.
9. Blakely W.F., Carr Z., Chu M.C.M. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 171. – P. 127–139.
10. *The International Symposium on EPR Dosimetry and Dating (EPR) and the International Conference on Biological Dosimetry (BioDose) «EPRBioDose-2008»* // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 93–457.
11. *American Statistical Association Conference on Radiation and Health «New Developments and Future Directions in Radiation Research»*, Vail, Colorado, June 15–18, 2008 // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – P. 392–398.
12. Begg A.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 1. – P. 71–78.
13. Prasanna P.G.S., Blakely W.F., Bertho J.-M. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – P. 245–253.
14. *International Conference «EPRBioDose-2010»*. Abstract book. – Rome: Prioda Imaging. – 209 p.
15. *The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society*. Abstract book. – Kyiv: Chornobylinterinform, 2006. – 250 p.
16. *The 36th Annual Meeting of the European Radiation Research Society* // *Radioprotection.* – 2008. – Vol. 43, iss. 5. – P. 23–284.
17. *The 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society «European Radiation Research' 2010»*. Abstract book. – Stockholm, 2010. – 236 p.
18. Bentzen S.M., Parliament M., Deasy J.O. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 76, iss. 3. – Suppl 1. – P. S145–S150.
19. Swartz H.M., Flood A.B., Gougelet R.M. et al. // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 95–108.
20. Okunieff P., Chen Y., Maguire D.J., Huser A.K. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2008. – Vol. 27. – P. 363–374.
21. Мазник Н.О. Цитогенетичні ефекти як біологічний індикатор дії іонізуювальної радіації в низьких дозах у ранні та віддалені строки після опромінення у осіб чорнобильського контингенту. – Рукопис // *Дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.01* / НЦРМ АМН України. – К., 2005. – 485 с.
22. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual*. IAEA Techn. Report Series № 405. – Vienna: IAEA, 2001. – 127 p.
23. *Radiation protection – Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics*. ISO DIS 19238. ISO TC 85/SC2. – Geneva: ISO, 2004. – 21 p.
24. *Radiation protection – Performance criteria for service laboratories performing cytogenetic triage for assessment of mass casualties in radiological or nuclear emergencies – General principles and application to dicentric assay*. ISO DIS 21243. ISO TC 85/SC2. – Geneva: ISO, 2007. – 21 p.
25. Vinnikov V., Ainsbury E., Maznyk N. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 174. – P. 403–414.
26. Hofmann R., Schreiber G.A., Willich N. et al. // *Strahlenther. Onkol.* – 1990. – Vol. 166. – P. 688–695.
27. Ossetrova N., Farese A., MacVittie T. et al. // *Radiat. Meas.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1158–1163.
28. Blakely W.F., Ossetrova N.I., Manglapus G.L. et al. // *Ibid.* – P. 1164–1170.

29. Bertho J.M., Roy L., Souidi M. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 169. – P. 543–550.
30. Bertho J.M., Roy L., Souidi M. et al. // *Biomarkers.* – 2009. – Vol. 14. – P. 94–102.
31. Bertho J.M., Roy L. // *Br. J. Radiol.* – 2009. – Vol. 82. – P. 764–770.
32. Lutgens L., Lambin P. // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13. – P. 3033–3042.
33. Wedlake L., McGouh C., Hackett C. et al. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 27. – P. 980–987.
34. Мальцев В.Н., Иванов А.А., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К. // *Радиаци. биол. Радиоэкол.* – 2006. – Т. 46. – С. 152–156.
35. Ki Y., Kim W., Nam J. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2009. – Vol. 75, iss. 2. – P. 393–398.
36. Bower J.E., Ganz P.A., Tao M.L. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, iss. 17. – P. 5534–5540.
37. Khalid U., Norman A.R., Andreyev H.J. // *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* – 2007. – Vol. 16, iss. 4. – P. 346–350.
38. Владимирова В.Г., Тищенко Л.И., Суркова Е.А. и др. // *Радиаци. биол. Радиоэкол.* – 1993. – Т. 33. – С. 854–860.
39. Vasilyeva I.N. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 945. – P. 221–228.
40. Zhang H., Zhang S.B., Sun W. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2009. – Vol. 74, iss. 5. – P. 1592–1599.
41. Ossetrova N.I., Blakely W.F. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, iss. 10. – P. 837–850.
42. Wickremesekera J.K., Chen W., Cannan R.J., Stubbs R.S. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2001. – Vol. 49. – P. 1015–1021.
43. Peter R.U., Gottluber P. // *Mil. Med.* – 2002. – Vol. 167 (Suppl. 2). – P. 110–112.
44. Muller K., Meineke V. // *Exp. Hematol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 96–104.
45. Rbbe C.E., Wilfert F., Uthe D. et al. // *Radiother. Oncol.* – 2004. – Vol. 72, iss. 2. – P. 231–241.
46. Rbbe C.E., Uthe D., Wilfert F. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2005. – Vol. 61. – P. 1489–1492.
47. Partridge M.A., Chai Y., Zhou H., Hei T.K. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 4. – P. 321–328.
48. Iliakis G., Wang Y., Guan J., Wang H. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, iss. 37. – P. 5834–5847.
49. Zhan Q. // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 569. – P. 133–143.
50. Ljungman M. // *Ibid.* – Vol. 577. – P. 203–216.
51. Jeggo P., Lubrich M. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2006. – Vol. 122, iss. 1–4. – P. 124–127.
52. Kobayashi J., Iwabuchi K., Miyagawa K. et al. // *J. Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 49. – P. 93–103.
53. Iijima K., Ohara M., Seki R., Tauchi H. // *Ibid.* – P. 451–464.
54. Warmerdam D.O., Kanaar R. // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 704. – P. 2–11.
55. Lane D.P. // *Nature.* – 1992. – Vol. 358. – P. 15–16.
56. Robles A.I., Harris C.C. // *Acta Oncol.* – 2001. – Vol. 40, iss. 6. – P. 696–701.
57. Fei P., El-Deiry W.S. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, iss. 37. – P. 5774–5783.
58. El-Deiry W.S. // *Ibid.* – Iss. 47. – P. 7486–7495.
59. Cavalcanti M.B., de Jesus Amaral A., de Salazar E.F.T. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 308. – P. 127–131.
60. Van Veelen L.R., Cervelli T., van de Rakt M.W.M.M. et al. // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 574, iss. 1–2. – P. 22–33.
61. Belyaev I.Y. // *Ibid.* – 2010. – Vol. 704, iss. 1–2. – P. 132–141.
62. Vilasova Z., Rezacova M., Vavrova J. et al. // *Acta Biochim. Pol.* – 2008. – Vol. 55. – P. 381–390.
63. Ivey R.G., Moore H.D., Voytovich U.J. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, iss. 3. – P. 266–281.
64. Bhogal N., Jalali F., Bristow R.G. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, iss. 9. – P. 732–746.
65. Sak A., Grehl S., Erichsen P. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 83, iss. 10. – P. 639–652.
66. Golfier S., Jost G., Pietsch H. et al. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2009. – Vol. 134, iss. 1. – P. 55–61.
67. Andrievski A., Wilkins R.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, iss. 4. – P. 369–376.
68. Redon C.E., Dickey J.S., Bonner W.M., Sedelnikova O.A. // *Advan. Space Res.* – 2009. – Vol. 43. – P. 1171–1178.
69. Rothkamm K., Horn S. // *Ann. Ist. Super. Sanita.* – 2009. – Vol. 45, № 3. – P. 265–271.
70. Roch-Lefuvre S., Mandina T., Voisin P. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 174, iss. 2. – P. 185–194.
71. Schmid T.E., Dollinger G., Beisker W. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 8. – P. 682–691.
72. Beels L., Werbrouck J., Thierens H. // *Ibid.* – iss. 9. – P. 760–768.
73. Garty G., Chen Y., Salerno A. et al. // *Health Physics.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 209–217.
74. Turner H.C., Brenner D.J., Chen Y. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, iss. 3. – P. 282–290.
75. Trzeciak A.R., Barnes J., Evans M.K. // *Ibid.* – 2008. – Vol. 169, № 2. – P. 110–121.
76. Valverde M., Rojas E. // *Mutat. Res.* – 2009. – Vol. 681, iss. 1. – P. 93–109.
77. Boreham D.R., Gale K.L., Maves S.R. et al. // *Health Phys.* – 1996. – Vol. 71, iss. 5. – P. 685–691.
78. Menz R., Andres R., Larsson B. et al. // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1997. – Vol. 36. – P. 175–181.
79. Benderitter M., Durand V., Caux C., Voisin P. // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 158, iss. 4. – P. 464–474.
80. Vokurkova D., Sinkora J., Vavrova J. et al. // *Physiol. Res.* – 2006. – Vol. 55. – P. 689–698.
81. Hertveldt K., Philippe J., Thierens H. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1997. – Vol. 71, iss. 4. – P. 429–433.
82. Орлова Н.В., Смирнова С.Г., Замулаева И.А. и др. // *Радиаци. радиобиол. Радиоэкол.* – 2001. – Т. 41, № 4. – С. 366–372.
83. Schmitz A., Bayer J., Dechamps N., Thomas G. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2003. – Vol. 57. – P. 769–778.
84. Vral A., Cornelissen M., Thierens H. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1998. – Vol. 73, iss. 3. – P. 289–295.
85. Crompton N.E.A., Shi Y.-Q., Emery G.C. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2001. – Vol. 49, iss. 2. – P. 547–554.
86. Torudd J., Protopopova M., Sarimov R. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 81, iss. 2. – P. 125–138.
87. Barber J.B., West C.M., Kiltie A.E. et al. // *Radiat. Res.* – 2000. – Vol. 153, iss. 5. Pt. 1. – P. 570–578.
88. Payne C.M., Bjore C.G. Jr., Schultz D.A. // *J. Leukoc. Biol.* – 1992. – Vol. 52, iss. 4. – P. 433–440.
89. Ozsahin M., Ozsahin H., Shi Y. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1997. – Vol. 38, iss. 2. – P. 429–440.
90. Wilkins R.C., Kutzner B.C., Truong M., McLean J.R.N. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2002. – Vol. 78. – P. 681–688.
91. Donnadieu-Claraz M., Benderitter M., Joubert C., Voisin P. // *Ibid.* – 1999. – Vol. 75. – P. 165–174.
92. Blakely W.F., Ossetrova N.I., Whitnall M.H. et al. // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 153–159.
93. Ossetrova N.I., Sandgren D.J., Gallego S., Blakely W.F. // *Ibid.* – P. 204–208.
94. Riecke A., Ruf C.G., Meineke V. // *Ibid.* – P. 160–167.
95. Albertini R.J. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2001. – Vol. 97, iss. 1. – P. 47–54.
96. Schulte P.A. // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 592, iss. 1–2. – P. 155–163.

Надходження до редакції 27.05.2011.

Прийнято 04.07.2011.

Адреса для листування:

Вінніков Володимир Анатолійович,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна