

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В.А. Вінніков

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України, Харків

Біомаркери радіаційного опромінення: короткий огляд. III. Протеоміка, метаболоміка, геноміка

Biomarkers of radiation exposure:
a short review.
III. Proteomics, methabolomics, genomics

Біомаркери радіаційного впливу призначені для вирішення чотирьох типів клінічних задач, а саме — дозиметрії, предикції індивідуальної реакції на опромінення, діагностики і прогнозу перебігу променевої патології [1, 2]. Вважають, що саме використання біомаркерів дозволить повномірно враховувати феномен індивідуальної радіочутливості, тобто залежність проявів радіаційного ефекту не тільки від еволюційно закріплених видо- і тканинно-специфічних детермінант, але й від стану репаративно-компенсаторних і регуляторних систем на всіх рівнях — від молекулярного до організмового — в конкретної особи.

Як і для маркерів будь-якого патологічного процесу, загальна схема розробки біомаркерів опромінення включає відкриття, валідацію — оцінку чутливості, специфічності та надійності в лабораторних умовах та клініці, оптимізацію протоколів для вирішення тих чи інших клінічних питань і стандартизацію для широкого використання в системі охорони здоров'я [3, 4]. Нині цей шлях пройдено від початку до кінця тільки для аналізу радіаційно-індукованих аберацій хромосом у лімфоцитах крові — «золотого стандарту» біологічної дозиметрії [5]. Решта біомаркерів перебуває у стадії апробації, причому найперспективнішим вважається мультипараметричний підхід, заснований на об'єднанні результатів декількох тестів [6]. Значного прогресу досягнуто у розробці панелей («мікрочіпів») на базі аналізу мРНК — продуктів

транскрипції генів, залучених до механізмів радіаційної відповіді [7]. Недоліками транскриптоміки є складна динаміка досліджуваних ефектів, хімічна нестійкість мРНК і необхідність отримувати клітинний матеріал для дослідження. Альтернативою є вимірювання кінцевих результатів активності генів, тобто оліго- і поліпептидів, а також продуктів життєдіяльності клітин та деструктивних процесів — метаболітів. Внаслідок «омікової революції» високопродуктивні технології протеоміки і метаболоміки швидко ввійшли до арсеналу молекулярної біодозиметрії.

Розробка біомаркерів *реального* променевого ураження відбувається паралельно із пошуком показників, за якими можна передбачувати *потенційну* реакцію на опромінення [8]. Існує достатньо обґрунтована і підтверджена теорія того, що індивідуальні варіації в процесах розвитку радіаційного ураження і подальшого відновлення несуть у собі значну компоненту спадковості, тобто залежать від наявності та функціонального стану певних детермінант у геномі. Внаслідок цього в галузі предикторів індивідуальної радіочутливості домінує геноміка.

Метою даного циклу оглядів є узагальнення сучасних відомостей про можливість оцінки радіаційно-індукованих ефектів у людини за допомогою біомаркерів і представлення низки методів, які пройшли апробацію або вважаються перспективними у прикладній молекулярній

радіобіології. Для цього були проаналізовані матеріали спеціалізованих конференцій і статей в іноземних (англомовних) наукових виданнях. У перших двох публікаціях було надано опис автономних біомаркерів, багатопараметричного підходу в біодозиметрії та молекулярних платформ на основі вимірювання транскрипційної активності генів [6, 7]. Нинішня робота присвячена біомаркерам радіаційного впливу і предикторам індивідуальної радіочутливості, що створюються за допомогою технологій протеоміки, метаболоміки і геноміки, а також ймовірним напрямкам подальшого розвитку і вдосконалення біомаркерів опромінення.

Були проаналізовані матеріали спеціалізованих радіобіологічних конгресів і конференцій за період 2001–2011 рр. [9–23], а також понад 90 повнотекстових версій статей у періодичних наукових виданнях Radiation Research, International Journal of Radiation Biology, International Journal of Radiation Biology, Oncology and Physics, Radiation Measurements, Journal of Radiation Research (Tokyo), Cancer Research, Radiation Protection Dosimetry, Mutation Research та ін., відібраних за результатами пошуку в інформаційній базі PubMed і за перехресними посиланнями.

Розглядалися відомості щодо розробки, тестування і практичного використання тих біомаркерів опромінення і предикторів індивідуальної радіочутливості, які можна застосовувати *post factum*. В даний огляд свідомо не були включені дані щодо предикторів радіочутливості нормальних тканин, які ґрунтуються на різноманітних радіобіологічних тестах з опроміненням *ex vivo* (клоногенна виживаність, цитогенетичні ефекти, апоптоз тощо). Такий підхід вимагає, по-перше, одержання біологічного матеріалу до початку радіаційного впливу, що є *a priori* неможливим при роботі з потерпілими внаслідок радіаційних аварій, а по-друге, чіткого дотримання певних «стандартних» умов тест-опромінення, що є поки що недосяжним в масовій лабораторній практиці. До того ж, через значну розбіжність висновків щодо кореляції між результатами таких тестів і розвитком променевих реакцій у пацієнтів, питання про їхню принципову працездатність має становити тему окремого аналізу.

Протеоміка

Активні відповіді біологічних систем на вплив будь-яких чинників передбачають широке розмаїття шляхів внутрі- і міжклітинних процесів, в якому обов'язково присутні зміни концентрації, структури і функціонального стану білків. Технологічним підґрунтям для оцінки цих змін є протеоміка, яка дозволяє одномоментно отримувати інформацію про якісний склад білків у зразку, кількісний вміст кожного з них, їхню структуру, характер взаємодій і посттрансляційні модифікації.

Завдяки інтенсивним дослідженням постійно зростає кількість відомих білків в організмі людини, які зазнають посттрансляційної модифікації або змін концентрації протягом перших хвилин чи годин після радіаційного впливу.

Первинну ідентифікацію відповіді білків в оригінальних дослідженнях здійснюють методами біохімії (вестерн-блотінг) чи протеоміки — з використанням білкових наборів або лазерної десорпції/іонізації за допомогою 2D-гелевих матриць (MALDI). В умовах практичного використання білкових біомаркерів найпростішим способом детекції змін і вимірювання концентрації є імуноферментний аналіз і нині серед технічних проблем у цій галузі на перше місце виходить досяжність потрібних афінних реагентів (антитіл).

Істотним ускладненням є варіабельність експресії певних білків (наприклад, TP53) в нормі та за дії радіації в різних тканинах. Внаслідок цього біомаркер, який добре працює в експериментальних тест-системах *in vitro*, може бути непридатним для широкого практичного використання через проблематичність отримання клітин потрібного типу (зокрема, фібробластів) від пацієнтів. Набагато зручнішим матеріалом для визначення біомаркерів є плазма крові.

За результатами масштабного аналізу даних літератури було визначено 173 білки людини, стан чи концентрація яких змінюються у відповідь на радіаційний вплив протягом перших 24 год після опромінення [24]. З них 29 білків було ідентифіковано в клітинах нормальних тканин (лімфоцити, фібробласти шкіри, епітеліальні клітини), отриманих від пацієнтів після локально-

го терапевтичного опромінення, і тільки одичні білки були визначені як «відповідачі» за умов тотального опромінення при променевої терапії та у жертв атомного бомбардування — амілаза, С-реактивний білок, інтерлейкін-6, фактор некрозу пухлини-альфа.

Серед усіх білків найкращими біомаркерами були визнані АТМ, H2АХ, інгібітор циклінзалежної кінази 1А (CDKN1А) і пухлинний білок р53 (ТР53). Крім того, автори запропонували панель з 20 білкових біомаркерів, кожен з яких має власні оптимуми відповіді в залежності від інтервалу радіаційних доз і часу, що минув після опромінення. На думку авторів [24], за профілем цієї панелі, тобто за конкретним переліком білків, що «відповіли», можна розрізнити три інтервали доз (< 1 Гр, 1–4 Гр і > 4 Гр) і три інтервали часу (< 4 год, 4–24 год і 24–48 год) після радіаційного впливу.

Масштабне профілювання протеому плазми крові методом мас-спектрометрії у варіанті поверхнево-підсиленої лазерної десорпції та часу іонізації польоту (surface-enhanced laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS) було проведено у онкохворих з пухлинами різної локалізації під час променевої терапії [25]. При цьому було встановлено, що в плазмі крові пацієнтів до опромінення специфічно визначаються 82 білкових фрагменти, а в умовах радіаційного впливу замість них з'являються інші 23 білки та олігопептиди. На думку авторів, цей спектр складається з молекул, що були екскретовані опроміненими клітинами як компоненти сигналіngu чи були втрачені внаслідок апоптозу або некрозу. Одним з ідентифікованих компонентів радіаційно-індукованого профілю був фрагмент-прекурсор інтерлейкіну-6 (IL-6). Комп'ютерний аналіз SELDI-TOF-профілю вможливив розпізнання опроміненого та неопроміненого статусу пацієнтів із чутливістю 91–100% та специфічністю 97–100%.

Перша доба після опромінення, коли відбувається формування початкової фази ураження і відповіді організму, є критично значущою для тріажу потерпілих при радіаційних інцидентах. Проте не менш важливим є моніторинг пост-

радіаційних ефектів у більш віддалений період, коли баланс процесів тканинної деструкції і відновлення визначає клінічну картину радіаційно-зумовленої патології. Для цього в експерименті на мишах за допомогою двовимірного електрофорезу в поєднанні з мас-спектрометрією було досліджено зміни протеому плазми крові у строки 2 і 7 діб після γ -опромінення в дозі 3 Гр [26]. Було встановлено, що через 2 доби після радіаційного впливу відбувається підвищення вмісту 17 білків: α -2-НС-глікопротеїну (Хереманса–Шмідта), прекурсора аполіпопротеїну-АII, аполіпопротеїну-Е, β -2-глікопротеїну-І, кластерину, α -ланцюга фібриногену, γ -поліпептиду фібриногену, фетуїну-В, гаптоглобіну, кініногену високої молекулярної ваги (НМW-Кng), кініногену низької молекулярної ваги, прекурсора кініногену-1, прекурсора печінкової карбоксилестерази-І, прекурсора головного білка сечі-6, прекурсора манозозв'язувального білка С, манозозв'язувального лектину С і прекурсора протромбіну, і при цьому зникав гелісолін, на відміну від контролю. На 7-му добу після опромінення знижувалася концентрація холестерол-7- α -гідроксилази, фактора коагуляції-II, фактора коагуляції-XIII, прекурсора α -1-антитрипсину, карбоксилестерази-N, контраспіну, гелісоліну, важкого ланцюга імуноглобуліну G, неурексину, прекурсора протромбіну, протеїн-фосфатази, кальцієвого каналу, вітамін-D-зв'язувального білка та пептиду 1110018G07Rik. При цьому в експонованих тварин визначався підвищений рівень експресії 15 білків: α -1-кислого глікопротеїну, аполіпопротеїнів ApoA-IV, ApoC-I і ApoH, α -1-протеазоінгібітора-2, β -ланцюга фібриногену, n- β -ланцюга, α -2-НС-глікопротеїну, β -1-глобіну, кластерину, фактора комплемента-3, ретинобластома-асоційованого білка-140, головного комплексу гістосумісності класу Ia-H2-K, НМW-Кng, інгібітора серин-(цистеїн)-протеази і молекули адгезії васкулярних клітин-1. За висновком авторів, більшість білків, вміст яких зростав унаслідок опромінення, є ефекторами чи продуктами запальних реакцій. Оскільки в обидва досліджені терміни спостерігали зниження концентрації

гельсоліну та підвищення вмісту кініногену, α -2-HS-глікопротеїну і кластерину, саме ця комбінація була запропонована як найперспективніша для створення дієвого протеомного набору біомаркерів радіаційного впливу у людини.

У дослідженні [27] лімфоцити людини піддавали дії γ -променів *in vitro* в дозах 1, 2 і 4 Гр і через 2 год після опромінення визначали глобальні зміни протеома методом двовимірного електрофорезу у поліакриламідному гелі. Результати глобального скринінгу, тобто білки, що виявилися відповідачами на радіаційний вплив, додатково верифікували за допомогою вестерн-блотінгу. Найістотніші дозозалежні зміни концентрації визначалися для білків клітинної структури — β -актину, таліну-1 (TLN1), таліну-2, циксину-2, білків імунних і захисних реакцій — білка, що зв'язує головний комплекс гістосумісності (MBP2), інтерлейкіну-17E та інтерферону- γ , білків контролю клітинного циклу — CDKN1A, мишачого подвійного мініту-2 (MDM-2), білка процесу детоксифікації (пероксин-1), а також фосфогліцераткінази-1 та рівня фосфорильованості анексину-А6 (ANXA6). Можливо, ці дані знайдуть підтвердження і практичне застосування в умовах опромінення *in vivo*.

Зараз у світі активно продовжується вивчення тонких молекулярних механізмів відповіді на радіаційний вплив, що неодмінно приведе до розробки нових панелей на базі посттрансляційно модифікованих білків, наприклад, із кількісним визначенням специфічного фосфорильовання [28].

Найінформативніший опис стану проблеми білкових маркерів радіаційного впливу представлено в огляді [29], де автори також розглянули технічні засоби для одночасного кількісного та якісного аналізу протеомного профілю радіаційної відповіді, зокрема систему Luminox™100 (система проточної флуориметрії мікросфер із мультиплексною флуоресценцією, що несуть білок-специфічні антитіла), а також представили технічно обґрунтовану і деталізовану схему відбору потенційних білкових маркерів для створення клінічного тест-набору. Перспективні напрямки подаль-

шого розвитку радіаційної протеоміки та найбільш типові проблеми в цій галузі висвітлено за матеріалами I Міжнародної робочої зустрічі з радіаційної протеоміки в короткому огляді [30].

Метаболоміка

Окреме поле в царині біомаркерів становить метаболоміка із визначенням вмісту метаболітів у сечі, випорожненні, слині, поті. Метаболіти є кінцевими продуктами клітинних процесів, і їхній вміст розцінюється як завершальний елемент відповіді біологічних систем на ендогенні чи зовнішні впливи чи зміни умов. Метаболіти здебільшого належать до класу малих молекул; в цілому їх спектр молекулярної ваги представляє бімодальний розподіл із $\sim 30\%$ в інтервалі 100–400 Да і стільки ж — в інтервалі 700–900 Да, причому їх фізико-хімічні характеристики властивості чітко відрізняються від властивостей ксенобіотиків, таких як ліки і токсини. Повідомлення про якісні і кількісні зміни метаболітів в опромінених тварин є вельми нечисленими.

Зокрема, було встановлено, що в сечі мишей протягом перших 24 год після радіаційного впливу зростає концентрація N-гексаноїлгліцину, β -тимідину і таурину, а також з'являється 3-O-сульфат 3-гідрокси-2-метилбензоєвої кислоти, хоча вміст останнього метаболіту проявив парадоксальну залежність «доза–ефект», а саме зниження при високих дозах опромінення [31]. Особливо інформативним щодо ідентифікації опромінених тварин виявився двопараметричний підхід — одночасний розгляд вмісту β -тимідину і N-гексаноїлгліцину та β -тимідину і таурину в пласкій (двовимірній) системі координат. Крім тимідину, позитивну залежність від поглинутої радіаційної дози спостерігали для вмісту в сечі інших метаболітів розпаду нуклеїнових кислот: 2'-деоксиуридину, 2'-деоксирибозину, ксантину і ксантозину [32]. Концентрація цих біомаркерів в сечі мишей досягала максимуму через 8–12 год після опромінення і поверталася до норми через 36 год після радіаційного впливу.

Як метаболічні біомаркери в сечі щурів після γ -опромінення в дозі 3 Гр були визначені тимін, урацил, p-крезол (4-метилфенол), гліюксилат і

треонат [(2R,3S)-2,3,4-тригідроксибутаноева кислота], концентрація яких зростала, а також цитрат, 2-оксиглутарат, адипат, пімелат, суберат і азелат, вміст яких істотно знижувався [33]. Наприкінці даного циклу досліджень було вивчено динаміку метаболітів у сечі щурів протягом 7 д після γ -опромінення в дозі 7 Гр [34]. Перелік сполук, концентрація яких зростала у відповідь на радіаційний вплив, містив тимідин, 2'-деоксіурин, 2'-деоксиксантозин, N1-ацетилспермидин, N-гексаногліцин, таурин, N-ацетилглюкозамін/галактозамін-6-сульфат, N-ацетилтаурин та ізотіонову кислоту. Біохімічні шляхи для означених метаболітів вказують на їхнє походження з реакцій розпаду нуклеїнових кислот та окиснювального стресу.

Іншою групою дослідників було показано, що в сечі щурів через 24 год після ікс-опромінення у дозі 10 Гр відбувається зростання вмісту 188 білків і падіння концентрації 76 білків, порівняно з неопроміненим контролем [35]. Найбільш значуще підвищувався вміст тканинної калікреїн 1-залежної пептидази, інгібітора цистеїнпротеїнази — цистатину С та окисненого гістидину, а зниження вмісту в сечі було найвиразнішим для альбуміну та інгібітора серин-протеїнази — калікреїн-зв'язувального білка. Зміни у калікреїн-кініновій системі можуть бути пов'язані із запальними та деструктивними процесами в судинах і порушеннями в системі коагуляції.

Деякий ширший спектр біомаркерів визначався за білковим профілем сечі мишей після тотального ікс-опромінення в дозі 10 Гр: тканинний калікреїн, β -глюкоронідаза, вітамін-Д-залежний кальцієв зв'язувальний білок, фетуїн-Б і хондроїтинсульфат-протеоглікан НГ2 [36]. Крім того, в сечі опромінених тварин падав вміст альбуміну і знижувалося кількісне співвідношення загального білка і креатиніну.

В експерименті з аналізом сечі мишей щоденно протягом 7 діб після ікс-опромінення в дозі 8 Гр спостерігали виразні зміни метаболітів: зниження вмісту сукцинату, цитрату, 2-оксиглутарату, гіпурату і метиламіну та підвищення концентрації креатину, N-метил-нікотинаміду, холіну і таури-

ну [37]. Оскільки зміни за кожним кандидатним метаболітом мали власну, характерну динаміку в часі, автори зазначили, що найкращого результату в ідентифікації опромінених мишей (а потенційно — і людей) можна досягти, розглядаючи цілісний профіль метаболічних маркерів, за яким є можливим не тільки детекція опромінення, але й оцінка часу, що минув після радіаційного впливу.

При спробі визначити специфічність метаболомного профілю відносно дії іонізуючої радіації, був проведений компаративний аналіз сечі у мишей після γ -опромінення в дозах 3, 8 і 15 Гр та у мишей, підданих дії бактеріального ліпополісахариду, що викликав тяжке запалення, цитокіновий шторм та інші симптоми, що імітують деякі загальні променеві реакції і можуть призвести до хибно-позитивного діагнозу променевої хвороби [38]. З'ясувалося, що зростання вмісту кортизолу є характерним за дії обох факторів, натомість аденін, цитозин, O-пропаноїлкарнітин, ізетіонова кислота і кортизол є маркерами дії ліпополісахариду, тоді як сечова кислота, алантоїн, таурин і нікотинат дозволяють специфічно диференціювати радіаційне опромінення, зокрема в дозах 8 і 15 Гр, від запального стресу.

У галузі метаболоміки людини слід навести роботу [39], в якій досліджували екскрецію колагенових зшивок в сечі пацієнтів під час терапевтичного опромінення для лікування кісткових метастазів. Вміст лізилпіридиноліну виявився підвищеним через 6 тижнів після опромінення, а концентрація гідроксилізилпіридиноліну — як через 6 тижнів, так і одразу по завершенні курсу променевої терапії, порівняно з величинами показників до лікування. Механізми такого ефекту, на думку авторів, вочевидь полягають у виведенні продуктів деструкції колагену чи перебудови/резорбції кісткової тканини за дії радіації. Цікавим фактом стала статистично більша екскреція гідроксилізилпіридиноліну в сечі пацієнтів, які отримали дози 35–46 Гр, ніж у хворих із сумарною дозою 30 Гр. Така позитивна залежність від поглинутої дози опромінення дає надію на можливе використання вимірювання вмісту колагенових зшивок у сечі як способу біоіндикації

у віддалені строки після радіаційного впливу у високих дозах.

Крім цієї роботи, на сьогодні існує тільки одна згадка про вивчення біомаркерів опромінення в сечі людини. В огляді з радіаційної метаболоміки [40], поруч із короткою історичною довідкою, детальним розглядом технічної бази і методології метаболоміки та даних експериментів (розглянуті вище [31–34]), автори сповістили про дослідження метаболітів у сечі, плазмі крові та слині хворих на рак простати, які отримували променевою терапією в режимі гіпофракціонування дози (5 фракцій по 8 Гр протягом 1–2 тижнів) на установці «КіберНіж». З глобального метаболомного профілю, побудованого в сечі хворих до опромінення, через 1 год, 48 год і 3 місяці після променевого лікування було виділено набір із 500 найбільш явних кандидатних метаболітів, і в пілотному тестуванні він показав здатність класифікувати пацієнтів із точністю 91,2%, що є дуже обнадійливим результатом.

Сучасна метаболоміка заснована на методах газово-хроматографічної мас-спектрометрії (gas chromatography — mass spectrometry, GCMS) та рідинно-хроматографічної мас-спектрометрії (ultra-performanceliquid chromatography-time-offlight mass spectrometry, UPLC-TOFMS), поєднаних зі спеціальними прийомами біоінформатики для багатовимірного статистичного аналізу даних. Нещодавно технічний арсенал було розширено за рахунок ядерно-магнітно-резонансної спектроскопії (nuclear magnetic resonance spectroscopy), яка в прикладному аспекті вигідно відрізняється від мас-спектрометрії неселективністю, кращою відтворюваністю результатів, менш жорсткими вимогами до обробки зразків і швидшим отриманням даних, що робить цей метод більш придатним для дозиметрії у чисельній когорті потерпілих при масштабній радіологічній події. Проте чутливість ядерно-магнітно-резонансної спектроскопії щодо детекції метаболітів є нижчою, ніж у випадку мас-спектрометрії.

Висока вартість обладнання для цих методів і недостатня апробованість результатів на людині поки що обмежують використання метаболо-

міки в широкій практиці радіаційної медицини і клінічної радіобіології. Проте, дуже привабливим аспектом є неінвазивність способу отримання матеріалу для дослідження. Нині у США розробляються зручні індивідуальні аналізатори-мікрочіпи, які слід приклеювати пластирем на шкіру для визначення метаболітів у поті; після зростання концентрації метаболітів-маркерів опромінення (пропорційно поглинутій дозі радіації) до певної критичної межі, поверхня аналізатора змінює колір, і людина має терміново припинити контакт із променевим чинником та звернутися по медичну допомогу. Крім того, для швидкого інструментального скринінгу пропонується застосовувати портативні пошукові аналізатори, які нині використовуються в службах безпеки і митниці для визначення слідових кількостей вибухівки і наркотичних речовин у повітрі; після відповідного перепрограмування ці прилади виявилися дуже ефективними для детекції набору відомих метаболічних біомаркерів опромінення.

Маркери індивідуальної радіочутливості

З досвіду роботи із тисячами хворих, які отримували променевою терапією, а також із потерпілими внаслідок радіаційних аварій є відомим факт значної варіабельності клінічних наслідків радіаційного впливу при опроміненні у схожих дозах. Прояви цього феномену об'єднуються поняттям «індивідуальна радіочутливість» (radiosensitivity), яке є багатокомпонентним. На клітинному рівні радіочутливість постає як результат складної мережі взаємодій первинних уражень ДНК, радіаційної модифікації мембран, численних сигнальних каскадів, активності репаративної машинерії і вибору між проліферацією чи загибеллю [41–43]. На іншому кінці шкали перебуває соціальний рівень, в якому радіочутливість може розглядається в таких аспектах, як матеріальні витрати на лікування (скажімо, ускладнень після променевої терапії), внесок істерії в комплекс пострадіаційних симптомів чи терміни збереження працездатності опроміненої особи (без лікування) при її участі у ліквідації наслідків широкомасштабної радіаційної катастрофи, ядерного тероризму чи війни.

У медичній науці вважається, що найефективнішою тактикою дій за будь-якої хвороби є передбачення і профілактика. Тому докладається значних зусиль для встановлення біологічного підґрунтя індивідуальної радіочутливості і розробки відповідних предиктивних маркерів. За спільним визначенням [1, 2], предикторами є біологічні чи клінічні показники, рівні яких визначаються до радіаційного впливу і мають статистику асоційованість з імовірністю появи чи ступенем прояву певного наслідку опромінення у даної особи. Очікується, що такі предиктори у комбінації із дозиметричними маркерами і маркерами променевого ураження нададуть можливість максимально індивідуалізувати діагностику і вибір тактики лікування радіаційно-індукованої патології.

Проте, до недавнього часу успіхи в цьому напрямку були досить помірними, а зусилля дослідників концентрувалися переважно в галузі молекулярної генетики і геноміки. Найвідомішим прикладом є встановлення причини аномально високої радіоуразливості нормальних тканин у осіб, гомозиготних за мутацією в гені АТМ. Ця мутація викликає дефект в одному з центральних елементів у системі репарації ДНК і відповідне захворювання — атаксію-телеангіектазію (АТ). Частота появи АТ становить < 1 на 40 000 народжених. Гетерозиготність за мутацією АТМ супроводжується підвищеною радіочутливістю клітин *in vitro*, але не супроводжується посиленими променевими реакціями при опроміненні *in vivo*, тому не вважається надійним предиктором [1, 2]. Відомо ще понад 20 синдромів, пов'язаних зі спадковими дефектами системи репарації ДНК і конституційними аномаліями каріотипу, для яких характерна висока радіотоксичність: АТ-подібні хвороби, синдром ламкості Ніджмегена, пігментна ксеродерма, анемія Фанконі, мутації BRCA1 і BRCA2 при сімейному раку грудної залози та ін. [44, 45]. До впровадження методів геноміки і молекулярно-генетичного скринінгу такі випадки у практиці радіології виявлялися за аномальними гострими клінічними реакціями чи ускладненнями під час променевої терапії і до-

сліджувалися *post factum* за допомогою тестів на клітинну чи хромосомну радіочутливість *in vitro* (типovим прикладом таких ранніх робіт є повідомлення [46]).

Проте, такі мутації трапляються дуже рідко і роблять кількісно дуже незначний внесок до когорти осіб із підвищеною радіочутливістю. Набагато серйознішу проблему представляють аномальні реакції на опромінення у тих пацієнтів, які не мають вищезазначених спадкових порушень геному. Врутинній радіологічній практиці гострі токсичні реакції в нормальних тканинах і органах у відповідь на стандартні дози терапевтичного опромінення спостерігаються, за різними оцінками, у 2–10% пацієнтів [13, 45, 47], хоча для деяких локалізацій пухлин цей внесок сягає 15–40% [48–50]. Це дає орієнтовний порядок величини для очікування пропорції гіперчутливих до радіації осіб серед пересічного населення у випадку масштабної радіологічної події. Інший підхід, а саме підрахунок частоти гомо- і гетерозиготних носіїв дефектних генів репарації ДНК чи синдромів хромосомної нестабільності, з припущенням про існування загалом 40 таких спадкових захворювань, дав оцінку пропорції високо-радіочутливих осіб 0,04% і помірно-радіочутливих осіб — до 16% [13]. Висловлювалася думка про те, що особливості в реакції на опромінення у таких осіб можуть вплинути на ступінь прояву гострої променевої хвороби у випадку широкомасштабної радіологічної аварії чи ядерного тероризму, і саме ці індивіди потребують першочергової уваги і посиленних медичних заходів [13]. Отже, питання предикторів індивідуальної радіочутливості набуло актуальності в царині не тільки радіаційної онкології, але й радіаційної безпеки.

В останнє десятиліття активно розвивається гіпотеза про те, що радіочутливість тканин та органів є комплексним феноменом, генетично складною кількісною ознакою, яка залежить від варіацій у декількох генетичних детермінантах. Деяку частину цих варіацій забезпечує поліморфізм поодиноких нуклеотидів (ППН) — заміна пари основ у нуклеотиді певної локалізації, що трапляється в геномі людини з частотою при-

близно 1 на 1000–1200 нуклеотидів. Вважається, що поліморфні варіації можуть впливати на рівень транскрипції мРНК, стабільність мРНК, рівень її трансляції в білки чи/та білок-білкові взаємодії, зумовлюючи ступінь їх функціонування [43, 51–53]. Визнається асоційованість ППН із численними хворобами та синдромами, чий прояв підсилюється дією несприятливих умов навколишнього середовища [54]. Аналіз ППН є найуживанішим методом для визначення змін у кандидатних генах, якими вважаються ті, що можуть бути асоційованими із підвищеною радіоуразливістю чи прямо відповідають за репаративні процеси [52, 55, 56]. Технічно виявлення ППН здійснюють у лейкоцитах чи фібробластах за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (real time polymerase chain reaction, RT-PCR) і секвенування ДНК; інколи RT-PCR доповнюють мас-спектрометрією, а секвенування — хроматографією. Альтернативними методами є електрофорез ДНК із попередньою її гібридизацією або денатурацією, а в останні роки набуває розвитку технологія мікронаборів («мікрочіпів»). Пошук ППН сконцентровано на замінах пар осн. які або розташовані у регуляторних ділянках гена (отже, впливають на рівень експресії гена або секреції білка), або спричиняють неконсервативні заміни амінокислот у кінцевому продукті.

Тривалий час існувала парадигма, згідно з якою центральну роль в реалізації радіочутливості відіграють молекулярні і субклітинні механізми — системи розпізнання і реагування на ушкодження геному, антиоксидантного захисту, репарації ДНК, і пов'язані з ними різноманітні сигнальні шляхи [41–45, 54, 57]. Це зумовило сконцентрованість пошуку мутацій чи ППН саме на тих кандидатних генах, які залучені до вказаних процесів [43, 45, 49–53, 55–67]. У значній частині досліджень, заснованих на такому підході, вдавалося знайти деяку асоційованість між ризиком маніфестації ранніх чи пізніх променевоїх реакцій у пацієнтів після променевої терапії та ППН у таких генах, як ATM, XRCC1, XRCC3, XRCC5, ERCC4, OGG1, APEX, XPD, TGFB1, SOD2, hHR23, CYP2D6, CSTP1, CAT, Ku70. Проте, вистачало і

повідомлень про відсутність зв'язку між досліджуваними генетичними детермінантами і радіочутливістю пацієнтів *in vivo*. Всі опубліковані результати підлягали періодичному мета-аналізу, і протягом десятиліття кінцевий висновок авторів таких оглядів залишався невтішним: отримані дані є недостатніми для констатації прямого та однозначного зв'язку між певними варіантами ППН у кандидатних генах і клінічними проявами індивідуальної радіочутливості [2, 47, 52, 55, 56]. Головною причиною цього було визнано методологічну недосконалість проведених досліджень — недостатня кількість обстежених пацієнтів у вибірках та неоднозначність реєстрації ефектів у нормальних тканинах за різними системами обліку, яких за 10 років було запропоновано декілька [69]. Другим глобальним недоліком визнана хибність самого підходу — інтуїтивного вибору кандидатних генів, тому що недостатність поточних знань про тонкі механізми радіаційної відповіді, особливо на тканинному рівні, викликала обмеженість переліку об'єктів для аналізу. Якщо уявити собі аналіз ППН як пошук голки у копиці сіна, то проблема постає як вибір декількох перспективних копиць на полі, де їх стоїть від 10 000 до 30 000. Є дуже привабливою теоретична можливість знайти предикторні маркери радіочутливості у вигляді зміни числа копій певного гена (в ідеалі це має бути ампліфікація), на кшталт того, що утворюється в процесі малігнізації і становить технічне підґрунтя в одному з різновидів молекулярної діагностики пухлин [70], проте такі спроби в радіаційній геноміці поки що невідомі. У цілому, ще п'ять років тому вважалося, що жодна із запропонованих на той час тест-систем не була здатна повністю передбачати клінічні реакції на опромінення [45].

Поступово набула обґрунтованості думка про те, що на реалізацію радіочутливості в умовах *in vivo* впливає дуже велика кількість як генетичних, так і епігенетичних факторів, наприклад, стан імунної системи [71]. Крім того, вміст фолатів в організмі людини позитивно корелює з ефективністю репарації ДНК, і їх нестача чи порушення їх метаболізму, в т.ч. опосередковані поліморфізмом

відповідних генів, призводить до надмірного утворення цитогенетичних пошкоджень [72, 73]. Саме у таких пацієнтів можна очікувати маніфестації радіаційно-зумовленої патології внаслідок посиленого спустошення клоногенних клітинних пулів. Неврахування навіть одного з подібних критичних факторів може радикально змінити результати, що, власне, і відбувалося у більшості досліджень.

Утім, нещодавно в галузі геноміки була запропонована альтернатива інтуїтивно-таргетному вибору кандидатних генів для аналізу ППН. Це — одномоментне визначення асоційованості генетичних маркерів у межах всього геному (genome-wide association studies, GWAS). За цією методологією здійснюють пошук цілісного гаплотипу — певних варіантів ППН у декількох генах поспіль, що успадковуються у комплексі. Технологія виконання дослідження включає вміщення мікронабору гаплотипів (фрагментів ДНК із ППН) на платформу, якою може бути лунковий планшет або предметне скло зі спеціальним покриттям, потім — нанесення на дану платформу ДНК, екстрагованої зі зразка, її гібридизація і проведення полімеразної ланцюгової реакції за допомогою Taq-полімерази і мічених попередників ДНК; варіантами візуалізації є капілярний електрофорез або зчитування на лазерному ридері; завершальним етапом є опрацювання даних спеціальними математичними методами, визначення функціональних шляхів і побудова онтогенетичних мап для генів із виявленими асоціаціями ППН.

Поки що існують одиничні приклади такого генотипування лейкоцитів крові у пацієнтів із різними променевими реакціями, але кількість повідомлень поступово зростає [47]. Коректне використання GWAS потребує великих за обсягом вибірок пацієнтів (від 1000 до 10 000) в одному дослідженні для отримання надійних результатів. Це є досяжним тільки в межах міжнародних проєктів на кшталт GENEPI (GENetic pathways for the Prediction of the effects of Irradiation—European Normal and Tumour tissue Bank and database) [55, 60], GenePARE (Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects) [61] або Japanese RadGenomics study [74, 75].

Так, було встановлено асоційованість пізніх променевих реакцій у нормальних тканинах хворих на рак простати із гаплотипами спорідненого поліморфізму за маркерними генами цитоскелета, протеаз, запалення, метаболізму стероїдів та імунної модуляції [49]. Технологія GWAS із використанням мікронабору з 909 000 генотипованих ППН дозволила виявити гаплотип поліморфізму в гені рецептора фолікулоstimулюючого гормону, 2 генах, що відповідають за регуляцію рівня заліза в крові, і гені негативної регуляції рецептора простагландину F2, асоційований із розвитком еректильної дисфункції після променевої терапії у афроамериканців, хворих на рак простати [76]. Звичайно, таке променеве ускладнення не належить до категорії критичних для життя у випадку позапланового опромінення, але в даному випадку важливими є успішність методології дослідження *per se*, а також демонстрація важливості врахування в такому аналізі супутніх факторів: у роботі [76] таким була популяційна частота означеного поліморфізму в залежності від расового генетичного фону (відсотка африканської спадковості в геномі), без чого результати не були вірогідними.

На підставі аналізу 999 ППН у 137 кандидатних генах було виявлено низку гаплотипів, за якими можна передбачувати ранні променеві реакції шкіри у хворих на рак грудної залози [74]. Цікаво, що тільки один із шести гаплотипів (поліморфізм щодо гена CD44) був асоційованим із підвищеним ризиком променевих реакцій, тоді як п'ять інших гаплотипів проявили зв'язок зі зниженим ризиком. На підґрунті цих досліджень було створено новий геномний чіп для аналізу гаплотипних маркерів індивідуальної радіочутливості в онкохворих [77]. Нещодавно ця ж група дослідників запропонувала для радіаційної геноміки альтернативу ППН, а саме — аналіз поліморфізму мікросателітних послідовностей. За допомогою технології GWAS в геномі онкохворих, які отримували променеве лікування, були виявлені 47 мікросателітних ДНК-маркерів гострої радіотоксичності, один з яких було ідентифіковано як поліморфізм щодо гена, який кодує білок

семафорин-3А [75]. До цього моменту було відомо, що семафорин-3А відіграє певну роль в процесах регуляції спрямування аксонів, рухливості клітин, імунної відповіді та ангіогенезу, але його ніколи не розглядали як учасника комплексу детермінант радіочутливості. Важливо, що автори [77] ефективно довели залученість виявленого мікросателітного маркера до радіаційної відповіді шляхом його вимкнення за допомогою малої інтерферуючої РНК (міРНК) в модельному експерименті на опромінених фібробластах шкіри людини.

Аналогічно було виконано складне дослідження з визначення предикторів радіаційної токсичності у 277 лімфоцитоїдних лініях клітин людини за допомогою GWAS [78]. Усього було виявлено 27 локусів, кожен із щонайменше двома ППН у межах 50 тисяч пароснов, які були асоційовані із фенотипом радіочутливості за тестом виживаності клітин. При цьому 50 ППН у 14 локусах були асоційовані з конституційною експресією 39 генів, чия диференційна активність, оцінювана паралельно, також виявилася пов'язаною з радіочутливістю. Кінцева, функціональна ідентифікація генів, які істотно впливали на радіочутливість клітинних ліній, була проведена методом їх вимкнення міРНК; такими генами виявилися C13orf34, MAD2L1, PLK4, TPD52 і DEPDC1B.

Отже, перші ж спроби використання GWAS в клінічній радіобіології виявили два важливих факти. По-перше, гени, асоційовані з розвитком токсичних ефектів у нормальних тканинах після опромінення *in vivo*, не могли бути обрані розсудно-аналітичним способом як кандидатні предиктори, на підставі наших поточних знань (точніше, уявлень) про детермінанти клітинної радіочутливості. По-друге, успішність GWAS багато в чому зумовлена можливістю попереднього обґрунтування такого аналізу чи верифікації його результатів шляхом, відповідно, глобального скринінгу чи таргетного вимірювання експресії генів.

Із впровадженням методів транскриптоміки стало зрозумілим, що нестільки наявність мутації чи поліморфізму гена, скільки його активність може стати ключом для визначення і передба-

чення індивідуальної радіочутливості. Постійне накопичення даних про механізми, часову і просторову організацію активності генів репарації ДНК, регуляції клітинного циклу та сигнальних шляхів, залучених до формування цитогенетичних пошкоджень, покращує розуміння їх ролі у реалізації радіочутливості на тому рівні, що зумовлюється репродуктивною загибеллю клітин [79, 80]. З іншого ж боку виявилось, що в транскрипційному профілі у лейкоцитах, який корелював із хромосомною радіочутливістю у жінок зі спадковим раком грудної залози, на першому місці за рівнем асоційованості із фенотипом стояли ніяк не гени ферментів репарації, а гени ядерного фактора каппа-В1, пухлинного білка D52, анексину А1, хемокінового рецептора-4, GATA-зв'язувального білка-3 і циклооксигенази-2 [81].

Транскриптоміка активно використовується в сучасній радіобіології пухлин для прогнозування їх виживаності за дії іонізуючої радіації, у т.ч. за профілем конститутивної експресії генів, наявної до опромінення [82–88]. Більш того, з'ясувалося, що технології транскриптоміки можна ефективно використовувати для моніторингу чи предикції клінічних результатів лікування онкопатології. Аналіз експресії генів здійснюють методом qRT-PCR або мікронаборами як у нормальних тканинах (лімфоцитах, фібробластах), так і в біоптатах пухлин чи персоніфікованих клітинних лініях, зокрема з опроміненням *ex vivo* [89–97]. Більш детально технічні аспекти транскриптоміки описано в нашому попередньому огляді [7].

При методологічній розробці проблеми транскриптомних профілів-предикторів радіочутливості нормальних тканин фахівці дійшли висновку, що їх розробка має відбуватися на тих самих засадах, що й предикторів терапевтичної відповіді на лікування [98]. Проте, на сьогодні існує дуже обмежена кількість публікацій із результатами таких досліджень.

Так, шляхом аналізу мікронаборів РНК з культивованих лімфоцитів крові хворих на рак передміхурової залози після ікс-опромінення клітин *ex vivo* в дозі 2 Гр були побудовані транскриптомні профілі, які дозволяли класифікувати осіб із

пізними променевими реакціями та без них з точністю 55–75% [99]. При цьому також спостерігали радіаційно-індуковану модуляцію добре відомих генів-відповідців на опромінення — CDKN1A, GADD45A, FAS, DDB2 і XPC, аlezміни рівня їх експресії не мали жодної кореляції зі статусом пацієнта щодо променевих реакцій.

Аналогічне за дизайном дослідження було виконано з використанням фібробластів, узятих від хворих на рак грудної залози із різним ступенем розвитку пізніх променевих фіброзів [100–102]. Автори отримали профіль з 13–18 генів, який при вимірюванні методом мікронаборів чи qRT-PCR давав можливість класифікувати хворих за тяжкістю фіброзу. Проте рівень експресії цих генів у неопромінених зразках не мав жодної кореляції з променевими реакціями.

Становить певний інтерес робота [91], в якій проводили моніторинг експресії генів у лейкоцитах хворих на рак шийки матки під час хемопротерапевтичного лікування, яке викликало гематологічні реакції. У межах профілю генів, модульованих під час лікування, було виявлено ген IGKVID-13, зниження активності якого через короткий час після початку лікування було асоційованим із гематологічною токсичністю 3–4-го ступеня. Тобто, індуковані зміни активності цього кандидатного гена можуть бути маркерними для прогнозування аномальної супресії кісткового мозку у випадку переопромінення.

Ще кілька прикладів транскриптомних досліджень на клітинах онкохворих із побудовою радіаційно-модульованого профілю експресії генів для предикції ранніх чи пізніх променевих ефектів у нормальних тканинах можна знайти в огляді [47]. Проте, в контексті нашої роботи більший інтерес становлять конститутивні предикторні профілі, побудова яких не потребує опромінення *ex vivo*. Повідомлялося про конститутивний предикторний профіль, який дозволяє передбачати одне з тяжких пізніх променевих ускладнень — інтенсивну ректальну кровотечу — після лікування раку простати, причому один із генів у межах цього профілю — DRAP-1 — виявився маркером радіорезистентності за означеним критерієм [103].

В публікації [104] було представлено профілі експресії генів у лімфоцитах хворих на рак грудної залози для передбачення променевих реакцій. Опромінення лімфоцитів *ex vivo* ікс-променями в дозі 2 Гр викликало модуляцію 81 гена, порівняно із неопроміненим контролем, і ці зміни експресії генів радіаційної відповіді не були ніяк асоційовані із променевими реакціями чи ускладненнями *in vivo*. Натомість, в опромінених лімфоцитах було виявлено профіль для предикції ранньої токсичності, що включав інші 29 генів з функціональних груп регуляції актинового цитоскелета, клітинного циклу, сигнального шляху TGF- β і фосфатидилінозитол-сигнальної системи. Сегрегаційний профіль для пізньої токсичності у лімфоцитах, підданих опроміненню *ex vivo*, не проявився. В неопромінених лімфоцитах хворих (0 Гр) були побудовані два профілі: для предикції ранньої токсичності (20 генів) і предикції пізніх ускладнень (26 генів). В першому випадку функціональні групи конститутивних генів-предикторів включали білковий транспорт, регуляцію автофагії, відповідь на інфекцію холерним вібрионом, фосфатидилінозитол-сигнальної системи, фокальної адгезії, регуляції актинового цитоскелета, конфірмаційної перебудови хроматину, регуляції проліферації клітин ендотелію, перехоплення вільних радикалів і клітинного дихання. В другому випадку до спектра функціональних груп генів увійшли регуляція актинового цитоскелета, MAPK-сигналінг, сигналінг епітеліальних клітин у відповідь на *Helicobacter*, карцинома ренальних клітин, сигналінг рецептора T-клітин, спрямування аксонів, фокальна адгезія, процеси біосинтезу ліпідів, холестеролу і стеролів, організація цитоскелета, позитивна регуляція специфічної транскрипції генів, розвиток волосяних фолікулів, сигнальний шлях ексцизійної репарації та особливо відмічалася роль гена PAK1 (p21-Cdc42/Rac)-активованої кінази 1. Важливо, що всі чотири транскриптомні профілі (прямої радіаційної відповіді, предикції ранніх реакцій в опромінених *ex vivo* лімфоцитах, предикції ранніх і пізніх реакцій в неопромінених лімфоцитах) не перекривалися, тобто не містили спільних генів.

Із практичного погляду також значущими були результати аналізу конститутивної експресії 143 генів репарації ДНК та суміжних систем у лімфоцитах (без додаткового опромінення), отриманих від 58 хворих на рак простати після променевого лікування [105]. У цьому макронаборі було виявлено 19 генів із диференційною експресією, причому відмінності за їх активністю між окремими пацієнтами сягали 7 разів. З'ясувалося, що високий конститутивний рівень експресії саме цих генів (здебільшого, генів репарації двониткових розривів ДНК) був присутнім у 9 пацієнтів (15% групи), і всі вони не мали ранніх променевих реакцій під час лікування. Тобто, цей профіль дозволив ідентифікувати радіорезистентних осіб, у яких висока активність молекулярних механізмів забезпечила ефективніший захист від променевого ураження. Характерно, що низький рівень експресії цих кандидатних генів у решти осіб не проявив статистичної асоційованості із розвитком тяжких променевих реакцій у нормальних тканинах.

Отже, впровадження транскриптоміки забезпечило становлення нової стратегії в розробці предиктивних біомаркерів радіочутливості:

виявлення генів із диференційною активністю *de facto*, що дозволяють провести сегрегацію осіб із променевими ушкодженнями та без них;

функціональна ідентифікація та онтогенетична структуризація процесів, за які відповідають виявлені гени радіочутливості;

аналіз структури цих генів (ППН) і визначення гаплотипів (GWAS);

створення прогностичних геномних платформ.

Проте транскриптомне профілювання із наступною трансляцією його результатів у геноміку — це надто тривала і дуже високовартісна процедура. Існує альтернативний шлях, який ще більше пов'язаний із кінцевими продуктами відповідних процесів транскрипції, а саме визначення повного спектра білків-відповідачів методами протеоміки, і вже за їх профілем — окреслення кола потенційних кандидатних генів. В досяжній літературі поки що не вдалося знайти при-

кладів повномірного виконання такого циклу досліджень, але існує повідомлення про успішне створення конститутивного протеомного профілю плазми крові (низькомолекулярної фракції в інтервалі 2000–10 000 Да) у хворих на раки голови та шиї, обстежених до променевої терапії, за яким можна передбачувати розвиток гострих муккозальних реакцій під час променевого лікування. В іншій роботі було побудовано протеомний профіль із 76 білків для предикції радіаційно-індукованої токсичності легенів (РІЛТ) у хворих на недрібноклітинний рак легенів під час променевого лікування, причому найкращу предиктивну здатність проявила комбінація у складі ангіотензиногену, альфа-ланцюга С4b-зв'язувального білка, комплементу С3, кератин/тип II цитоскелетного білка 5 і вітронектину, рівні яких були істотно підвищені у хворих із проявами РІЛТ, у т.ч. при вимірюванні білків до радіаційного впливу, що вказує на генетичну детермінованість ефекту [107].

Слід пам'ятати, що з точки зору радіаційної медицини та гігієни реальна цінність і працездатність предиктивних профілів поза межами радіаційної онкології поки що є дуже обмеженою. По-перше, фактично всі запропоновані маркери радіочутливості є специфічними до певної тканини чи органа і відповідного комплексу реакцій в них, і далеко не всі відображають життєво-небезпечні ураження, оскільки таких у практиці променевої терапії не допускається. По-друге, предиктивні маркери вказують на підвищений ризик (тобто, ймовірність) негативного ефекту, залишаючи певний, часто — дуже високий — відсоток ймовірності хибно-позитивного чи хибно-негативного результату. По-третє, в реальній широкомасштабній аварії для переважної більшості потерпілих (за винятком частини учасників ліквідації) не буде можливості отримати зразки для аналізу до моменту опромінення, щоб визначити базовий профіль експресії генів чи вихідний вміст інших маркерів. Натомість, у зразку від експонованої особи *a priori* будуть присутні зміни експресії маркерів радіаційної відповіді. Отже, при розробці комбінованих транскриптомних чи

протеомних платформ не можна допустити конфлікту між дозиметрією і предикцією радіочутливості. Навпаки, слід досягти того, щоб переліки дозиметричних маркерів і предиктивних маркерів не перекривалися і не містили функціонально-регуляторних зв'язків між собою, тобто, предиктивний профіль радіочутливості повинен складатися з генів/білків, які не підлягають радіаційній модуляції. Оскільки в експериментах із профілюванням пухлинних ліній з колекції Національного Інституту Раку США [82, 85] та з опроміненням *ex vivo* клітин пацієнтів із різним ступенем токсичності в нормальних тканинах після променевої терапії [99, 100, 104] були отримані дані, що вказують на реальність цього факту, вищевикладена ідея представляється цілком досяжною на практиці.

Інакше, на додаток до низки генів/білків радіаційної відповіді доведеться формувати переліки маркерів, які по-різному реагують на одну й ту ж дозу опромінення в осіб із різною радіочутливістю нормальних тканин, і робити це слід для кількох діапазонів поглинутих радіаційних доз, які можна ідентифікувати за допомогою біодозиметричних платформ. Така робота не є неможливою, але потребує ретельно спланованого дослідження на пацієнтах із тотальним опроміненням, і для неї можна передбачити значно вищий рівень складності інтерпретації даних (отже, відповідно, більшу непевність результатів при використанні на практиці), ніж у випадку варіанту з переліком конститутивних предикторів радіочутливості, що не модулюються радіаційним впливом і не потребують реферування до вихідного рівня експресії та «істинної» дози опромінення.

Альтернативою вимірюванням конститутивної експресії предикторів радіочутливості, які не підлягають радіаційній модуляції, залишається підхід, заснований на тестах із опроміненням *ex vivo*. Досі було запропоновано тільки одну розробку, яку теоретично можна використовувати в масовій практиці поруч із «пасивними» предикторними маркерами. Це — високопотужна біодозиметрична роботизована система RABIT [108] у спеціальній модифікації [13]. Принцип дії зали-

шається той самий — зразок крові з пальця вміщується у багатолункову планшетну платформу, де підлягає процесінгу за двома методиками *in situ* на вибір — на мікроядра чи γ -H2AX фокуси. Сутність модифікації полягає в тому, що зразок крові розподіляється на дві порції, одна з яких досліджується стандартно з метою біодозиметрії, а друга підлягає опроміненню в дозі, «що значно перевищує очікувану від радіологічної події», а потім переводиться на вимірювання того самого маркера, що й перша порція. Додатково опромінений зразок дасть функціональну оцінку радіочутливості, що підсилить об'єктивність оцінки дози в основному зразку. Оскільки треба опромінити *ex vivo* маленький об'єм крові (близько 30 мкл), для цього планується використати маленьке джерело β -випромінення — кільцевий набір з 5 зерен $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ з активністю близько 4 мКі (148 МБк). Проте, поки що відсутні повідомлення про апробацію такого приладу в практичних умовах. Крім того, із досвіду біодозиметрії можна передбачити щонайменше три технологічні недоліки:

надмірно висока доза опромінення *ex vivo* призведе до неможливості коректного вимірювання ефекту внаслідок коалесценції мікроядер і сатураційного змішування сигналів γ -H2AX фокусів;

доза опромінення *in vivo* може виявитися все ж таки вищою, ніж *ex vivo*, що дасть надмірний «фон»;

при опроміненні потерпілого у досить високій дозі, особливо при локальному радіаційному впливі на зону верхніх кінцівок, є шанс потрапляння невизначеної кількості уражених *in vivo* клітин у зразок, опромінюваний *ex vivo*, що може істотно викривити результат оцінки радіочутливості.

Проблеми і перспективи

Розробка біомаркерів радіаційного впливу нині переживає період бурхливого росту, що є наслідком поєднання двох обставин: об'єктивної потреби в них з боку радіаційної медицини, гігієни та онкології, та можливості задовільнити це замовлення завдяки успіхам фундаментальної біології і достатній розвиненості біотехнологій. «Омікова революція» забезпечила прорив одра-

зу в двох напрямках клінічної радіобіології. По-перше, відбулося стрімке збагачення бази фундаментальних знань про механізми радіаційної відповіді; були відкриті численні, часто несподівані, ланки відповідних процесів. Це зумовило перехід від напівінтуїтивного пошуку потенційних маркерів до емпірично обґрунтованого створення цілісних платформ, що включають **всі** елементи «біопідпису» радіаційної відповіді, у тому числі ті, що мали дуже невисокі шанси бути включеними до перевірки звичайним чином внаслідок простого браку даних чи вихідного скептичного ставлення дослідників. По-друге, всі прикладні розробки на базі «омікових» технологій є придатними для автоматизації і використання як методи швидкого скринінгу. Це вирішує проблему організації триажу у сценаріях масового опромінення людей, наприклад після терористичної атаки чи масштабної радіаційної катастрофи.

Біомаркери істотно варіюють за природою і способами вимірювання, потребують різних методів і апаратури, розрізняються за характером і значущістю клінічної інформації, мають різний ступінь апробованості на практиці, різну вартість, недоліки, обмеження та ускладнення. Попри всі відмінності, сам процес розробки і використання біомаркерів є спільним для різних індикаторів радіаційного впливу [3, 4, 29, 40, 98, 109]. «Технічну» класифікацію біологічних показників-індикаторів опромінення згідно з методом їх вимірювання було замінено на класифікацію за їх призначенням: предикція, діагностика, прогноз чи дозиметрія [1, 2, 98].

На сьогодні найкраща ситуація (різноманітність і водночас достатня методологічна розвиненість) визначається за дозиметричними маркерами, що вимірюються за допомогою цитогенетичного аналізу, протеоміки і транскриптомних платформ. Також активно розробляються прогностичні маркери (маркери ураження та інших форм відповіді тканин на опромінення) на базі протеоміки крові і метаболоміки, а також за допомогою транскриптомного профілювання — стратегії, що стає провідною в оцінці та моніторингу клінічних результатів лікування будь-яких захворювань.

На відміну від цих успіхів, численні спроби знайти предиктивні маркери — генетичні детермінанти підвищеної радіоуразливості поки що не мали значного успіху, і жоден із запропонованих методів/показників не досягає достатнього рівня чутливості і специфічності для впровадження в практику [13]. Найбільші надії в цьому напрямку покладаються на геноміку в її варіанті аналізу комплексів конститутивних детермінант радіочутливості, асоційованих у межах всього геному, які попередньо слід визначати за допомогою транскриптоміки. Що стосується діагностичних маркерів, то автори [1] заявили про відсутність відомих їм показників, які з'являються разом із клінічним симптомом і при цьому специфічно вказують на опромінення як причину патології. Втім, дані сучасної літератури показали, що цю нішу можуть ефективно зайняти транскриптомні профілі, які вже є спроможними диференційно вказувати на радіаційну етіологію пухлин.

Порівнюючи протеоміку і транскриптоміку, можна відзначити, що кожен з цих підходів має певні переваги і обмеження. Так, білки є стабільнішими в часі, ніж РНК, і за ними можна визначити ще й посттрансляційні зміни, що значно розширює спектр біохімічних процесів і продуктів, які можна детектувати. Крім того, вміст і склад білків можна вимірювати як у лізатах клітин, так і в плазмі крові, що розширює перелік кандидатних показників, а вимірювання метаболітів також в інших рідинах тіла (слина, піт, сеча) взагалі вможливує неінвазивні дослідження. Транскриптоміка ж обов'язково передбачає одержання клітинного матеріалу від пацієнта. Проте, для аналізу РНК вже є готові геноспецифічні праймери, тоді як протеоміка вимагає розробки високоспецифічних і чутливих антитіл до обраних білків, що потребує значних витрат часу і ресурсів. До недоліків протеоміки слід віднести залежність білкового профілю від органів і тканин у зоні опромінення і розподілу доз на ці органи. У випадку ж транскриптоміки негативну роль відіграє задіяність генів радіаційної відповіді також в інших процесах та активних реакціях клітин на зовнішній токсичний вплив.

Існує перелік спільних методологічних ускладнень для застосування різних біомаркерів. Головним чином, труднощі виникають при відхиленні умов опромінення *in vivo* від тих, у яких відбувалося калібрування тест-системи, — як правило, це зовнішнє гостре рівномірне гамма- чи ікс-опромінення в діапазоні середніх доз. Виділяють сім факторів, які негативно впливають на інформативність біологічної дозиметрії: (1) великий проміжок часу між експозицією та обстеженням; (2) подовжена тривалість і (3) нерівномірність опромінення; (4) дія випроміненнь із високим лінійним передаванням енергії; (5) присутність компоненти внутрішнього опромінення; (6) опромінення в діапазонах дуже низьких чи дуже високих доз (відповідно, $< 0,1-0,25 \text{ Гр} >$ $5-8 \text{ Гр}$) і (7) велика кількість осіб, які потребують обстеження, що обмежує час і погіршує точність дослідження [110].

Всі запропоновані біомаркери повинні пройти валідацію в сценаріях опромінення, які включають щонайменше один з перелічених вище факторів, а краще — всі можливі комбінації кількох із них. Для всіх нових методів біодозиметрії слід чітко визначити межі їх інформативності, щоб встановити найефективніший спосіб їх застосування в системі медико-біологічної оцінки та моніторингу радіаційних ефектів за різних умов променевого впливу та при різних масштабах радіологічної події [111, 112]. У фаховій літературі відзначається, що найбільші труднощі виникають із розробкою та впровадженням біомаркерів для умов нерівномірного опромінення. Насамперед, це пов'язано із необхідністю оцінки променевого ураження окремих органів і тканин в опроміненій ділянці тіла. Проблеми, що постають при цьому, є вельми специфічними, і відповідно змінюються вимоги до біомаркерів. Питання біологічної детекції ефектів локального опромінення є достатньо об'ємним і важливим, тому має бути предметом окремого аналізу.

Ще доведеться здійснити масштабні дослідження для чіткого з'ясування впливу на результати молекулярної біодозиметрії різних супутніх факторів, таких як вік, стать, професійні чинники,

життєві звички, дія хімічних агентів, фізичний стрес, травма, сепсис, інші патології нерадіаційного генезу та способи їх лікування.

Для тих маркерів, що вимірюються за допомогою нових технологій — мас-спектрометрії, мікронаборів, RT-PCR, гелевого електрофорезу і рідинного мультиплексного імуноферментного аналізу, — постали питання інтра- та міжлабораторної відтворюваності результатів, їх варіабельності під впливом побічних факторів. Особливе занепокоєння викликає факт розбіжності складу будь-яких маркерів — генів, білків і мРНК — фактично в усіх «омікових» профілях, отриманих у різних лабораторіях навіть при калібруванні відповідних тест-систем *in vitro*, не кажучи вже про результати досліджень *in vivo*. Отже, джерела цієї варіабельності повинні бути встановлені, а всі методи ще мають пройти шлях валідації і стандартизації.

У випадку мультипараметричної дозиметрії можуть виникнути труднощі з одержанням консолідованої оцінки при об'єднанні результатів кількох тестів. Зокрема, тут виникає статистичне ускладнення внаслідок різного характеру даних — дискретний, інтервальний, ймовірнісний, — що походять із різних досліджень [110]. Для проблем у статистичній методології цитогенетичної біодозиметрії вже намічено перспективні шляхи їх вирішення [113]. У випадку ж «омікових» технологій зараз існує надзвичайна різноманітність математичних стратегій аналізу даних, і найближчим завданням у цій галузі є запровадження оптимального алгоритму статистичного опрацювання та інтерпретації результатів заради того, щоб ці методи стали досяжними для ясного розуміння кінцевими користувачами.

Оскільки методи геноміки, протеоміки, метаболоміки і цитогенетики мають високу вартість і вимагають висококваліфікованого персоналу, нині фундаментальні дослідження і тестування прикладних розробок в царині біомаркерів зосереджено у спеціалізованих лабораторіях дослідних інститутів та університетів розвинених країн світу — США, Японії, Німеччини, Бельгії, Франції, Швейцарії, Швеції. Проте, радіаційні аварії та

інциденти достатньо часто виникають в країнах третього світу, де досяжність і відтворюваність таких високих технологій є дуже сумнівними. У випадку ж широкомасштабної аварії радіологічна служба жодної країни не є самодостатньою, що зумовлює актуальну потребу в налагодженні міжнародного співробітництва. В галузі цитогенетичної біодозиметрії ці питання вирішуються шляхом встановлення систем телеаналізу зображень метафазних хромосом (телецитогенетика) через Інтернет [114] та організації мережевих систем типу BioDoseNet [115]. Для решти методів біологічної оцінки радіаційного впливу міжнародна інтеграція поки що перебуває у фазі становлення, і найуспішнішим прикладом є проект Європейської Співпраці MultiBioDose (<http://www.multibiodose.eu/>).

Віддаленою перспективою розвитку біомаркерів радіаційного опромінення для масового використання є створення комплексних мікрочіпів на основі поєднання білкових, метаболічних, генетичних і транскриптомних маркерів. Крім того, пропонуються інші «омікові» технології, засновані на вимірюванні глобальних змін складу ліпідів (ліпідоміка), регуляторних мікроРНК (мікроРНКоміка), фосфорильованих білків (фосфопротеоміка), молекулярних взаємодій молекул одного чи різних типів (інтерактоміка) та системно-біологічному підході (інтегроміка) [28, 116, 117, 118].

Отже, загальна проблема біомаркерів опромінення і предикторів радіогенних реакцій перебуває у стані, далекому від повного вирішення. Усі фахівці у даній галузі констатують водночасі значний технологічний прогрес, і методологічні труднощі у справі оцінки ефектів радіаційного опромінення шляхом вимірювання змін величин біологічних показників.

Нині домінує думка (яка навряд чи зміниться протягом наступних 10 років), що універсальний єдиний біомаркер опромінення є примарою, а оптимальним шляхом є мультипараметрична біодозиметрія. Її технологічною базою, найімовірніше, буде комбінація цитогенетики, протеоміки, метаболоміки і геноміки. Показниками вибору, що складуть такий набір, на сьогодні є хромосомні

аберації, цитокіни, мРНК низки генів (як з підвищенням, так і зі зниженням експресії внаслідок дії радіації), певні поліпептиди і продукти тканинного метаболізму. Такий підхід надасть можливість поєднувати і співставляти еволюційно-закріплені, детерміновані ефекти, що відображують фізичну поглинуту дозу радіації (хромосомні перебудови), з індивідуальними відповідями загального рівня (стресорні реакції, регуляторні сигнали) та орган-специфічними (метаболічними) реакціями. Можна передбачити, що транскриптоміка буде використовуватися для детекції і верифікації дози загального опромінення, а протеоміка постачатиме діагностичні і прогностичні маркери для детекції локального опромінення та ураження окремих тканин, систем і органів. Предиктори індивідуальної радіочутливості, оцінюваної переважно за генотипом (наявність мутацій, поліморфізм і транскрипційна активність генів, задіяних у реалізації радіостійкості чи радіоуразливості нормальних тканин), стануть важливими допоміжними факторами.

Майже всі біомаркери опромінення ще повинні пройти шлях методологічного вдосконалення та апробації, для того, щоб їх можна було використовувати за різних сценаріїв радіаційного впливу. Залишається нерозв'язаною проблема досягнення консолідованої оцінки за даними різних тестів у межах мультипараметричної дозиметрії. Найгострішу проблему становить детекція та вимірювання наслідків локального опромінення. Багатоаспектність та актуальність цього питання вимагає проведення спеціального аналітичного дослідження із порівнянням біомаркерів, які вможливають оцінку ураження, відновлення і функціонального стану тканин та органів в опроміненій ділянці тіла.

Література

1. Okunieff P., Chen Y., Maguire D.J., Huser A.K. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2008. – Vol. 27. – P. 363–374.
2. 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.
3. Albertini R.J. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2001. – Vol. 97, iss. 1. – P. 47–54.
4. Schulte P.A. // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 592, iss. 1–2. – P. 155–163.

5. IAEA (International Atomic Energy Agency) *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. EPR-BIODOSIMETRY 2011. – Vienna, IAEA, 2011. – 247 p.
6. Вітніков В.А. // *УРЖ*. – 2010. – Т. XIX, вун. 4. – С. 442–452.
7. Вітніков В.А. // *Там же*. – 2011. – Т. XX, вун. 1. – С. 70–83.
8. Hansson S.O. // *Proceed. 38th Ann. Meet. European Radiation Research Society «European Radiation Research'2010»*. – Stockholm, 2010. – P. 10.
9. Coleman C.N., Blakely W.F., Fike J.R. et al. // *Radiat Res.* – 2003. – Vol. 159. – P. 812–834.
10. Alexander G.A., Swartz H.M., Amundson S.A. et al. // *Radiat. Meas.* – 2007. – Vol. 42. – P. 972–996.
11. Straume T., Amundson S.A., Blakely W.F. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 393–405.
12. DiCarlo A.L., Hatchett R.J., Kaminski J.M. et al. // *Ibid.* – 2008. – Vol. 169. – P. 712–721.
13. Ramakrishnan N., Brenner D. // *Ibid.* – 2008. – Vol. 170. – P. 666–675.
14. Blakely W.F., Carr Z., Chu M.C-M. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 171. – P. 127–139.
15. *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.
16. *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.
17. Begg A.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 1. – P. 71–78.
18. Prasanna P.G.S., Blakely W.F., Bertho J.-M. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – P. 245–253.
19. *International Conference «EPRBiodose-2010»*. Abstract book. – Rome: Prioda Imaging. – 209 p.
20. *The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society*. Abstract book. – Kyiv: Chornobylinterinform, 2006. – 250 p.
21. *The 36th Annual Meeting of the European Radiation Research Society // Radioprotection*. – 2008. – Vol. 43, iss. 5. – P. 23–284.
22. *The 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society «European Radiation Research'2010»*. Abstract book. – Stockholm, 2010. – 236 p.
23. *14th International Congress of Radiation Research*. Abstract book. – Warszawa, 2011. – 299 p.
24. Marchetti F., Coleman M.A., Jones I.M., Wyrobek A.J. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82, iss. 9. – P. 605–639.
25. Münard C., Johann D., Lowenthal M. et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1844–1850.
26. Rithidech K.N., Honikel L., Rieger R. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, iss. 5. – P. 432–447.
27. Turtoi A., Sharan R.N., Srivastava A., Schneeweiss F.H.A. // *Ibid.* – 2010. – Vol. 86, iss. 10. – P. 888–904.
28. Yang F., Waters K.M., Miller J.H. et al. // *Plos ONE*. – 2010. – Vol. 5, iss. 11. – e14152.
29. Guipaud O., Benderitter M. // *Ann. Ist. Super Sanita.* – 2009. – Vol. 45, iss. 3. – P. 278–286.
30. Tapio S., Hornhardt S., Gomolka M. et al. // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1–4.
31. Tyburski J.B., Patterson A.D., Krausz K.W. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170, iss. 1. – P. 1–14.
32. Tyburski J.B., Patterson A.D., Krausz K.W. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 172, iss. 1. – P. 42–57.
33. Lanz C., Patterson A.D., Slavuk J. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 172, iss. 2. – P. 198–212.
34. Johnson C.H., Patterson A.D., Krausz K.W. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 175, iss. 4. – P. 473–484.
35. Sharma M., Halligan B.D., Wakim B.T. et al. // *Proteomics – Clinical Applications*. – 2008. – Vol. 2, iss. 7–8 (Special Issue: «Renal and Urinary Proteomics (Thongboonkerd)»). – P. 1065–1086.
36. Sharma M., Halligan B.D., Wakim B.T. et al. // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 186–195.
37. Chen C., Brenner D.J., Brown T.R. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175. – P. 622–630.
38. Laiakis E.C., Hyduke D.R., Fornace Jr. A.J. // *Ibid.* – 2012. – Vol. 177. – P. 187–199.
39. Niehoff P., Wiltfang J., Springer I.N. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82, iss. 7. – P. 503–509.
40. Coy S.L., Cheema A.K., Tyburski J.B. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 87. – P. 802–823.
41. Bourguignon M.H., Gisone P.A., Perez M.A. et al. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2005. – Vol. 32. – P. 229–246.
42. Szumiel I. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 169. – P. 249–258.
43. Chistiakov D.A., Voronova N.V., Chistiakov P.A. // *Acta Oncologica*. – 2008. – Vol. 47. – P. 809–824.
44. Gatti R.A. // *Ibid.* – 2001. – Vol. 40. – P. 702–711.
45. Bourguignon M.H., Gisone P.A., Perez M.A. et al. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2005. – Vol. 32. – P. 351–368.
46. Matsubara S., Saito F., Suda T. et al. // *Acta Oncologica*. – 1988. – Vol. 27. – P. 67–71.
47. Ghilotti M., Pierotti M.A., Gariboldi M. // *J. Nucleic Acids Investigation*. – 2010. – Vol. 1. – P. 55–61.
48. Lypez E., Năceş I., Guerrero R. et al. // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2002. – Vol. 73. – P. 127–134.
49. Damaraju S., Murray D., Dufour J. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 2545–2554.
50. Sterpone S., Cornetta T., Padua L. et al. // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 684. – P. 43–48.
51. Andreassen C.N., Alsner J., Overgaard J. // *Radiotherapy and Oncology*. – 2002. – Vol. 64. – P. 131–140.
52. Popanda O., Marquardt J.U., Chang-Claude J., Schmezer P. // *Mutat. Res.* – 2009. – Vol. 667. – P. 58–69.
53. Alsbeih G., Al-Harbi N., Al-Hadyan K. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – P. 505–511.
54. Korrea S. // In: Mothersill C. et al. (eds.). *Multiple stressors: a challenge for the future*. – Springer, 2007. – P. 103–123.
55. Andreassen C.N. // *Acta Oncologica*. – 2005. – Vol. 44. – P. 801–815.
56. Andreassen C.N., Alsner J. // *Radiother. and Oncol.* – 2009. – Vol. 92. – P. 299–309.
57. Hall E.J., Brenner D.J., Worgul B., Smilenov L. // *Advances in Space Research*. – 2005. – Vol. 35. – P. 249–253.
58. Borgmann K., Roper B., El-Awady R. et al. // *Radiother. Oncol.* – 2002. – Vol. 64. – P. 141–152.
59. De Ruyck K., Van Eijkeren M., Claes K. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2005. – Vol. 62. – P. 1140–1149.
60. Andreassen C.N., Alsner J., Overgaard M. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82. – P. 577–586.
61. Ho A.Y., Atencio D.P., Peters S. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2006. – Vol. 65. – P. 646–655.
62. Cornetta T., Festa F., Testa A., Cozzi R. // *Ibid.* – 2006. – Vol. 66. – P. 537–545.

63. Tan X.-L., Popanda O., Ambrosone C.B. et al. // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2006. – Vol. 97. – P. 255–262.
64. Ambrosone C.B., Tian C., Ahn J. et al. // *Breast Cancer Research*. – 2006. – Vol. 8. – P. 2–7.
65. Giotopoulos G., Symonds R.P., Foweraker K. et al. // *Brit. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 96. – P. 1001–1007.
66. Thierens H., De Ruyck K., Werbrouck J. et al. // *Radio-protection*. – 2008. – Vol. 43. – P. 227–229.
67. Burri R.J., Stock R.G., Cesaretti J.A. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 49–59.
68. Chang-Claude J., Ambrosone C.B., Lilla C. et al. // *Brit. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 100. – P. 1680–1686.
69. Chen Y., Trotti A., Coleman C.N. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2006. – Vol. 64. – P. 1442–1451.
70. Lisovich A., Chandran U.R., Lyons-Weiler M.A. et al. // *BMC Medical Genomics*. – 2011. – Vol. 4. – 14. – 11 p.
71. Schae D., McBride W. H. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – P. 406–417.
72. Wang X., Wu X., Liang Z. et al. // *Mutagenesis*. – 2006. – Vol. 21. – P. 41–47.
73. Skjelbred C.F., Svendsen M., Haugan V. et al. // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 602. – P. 151–162.
74. Suga T., Ishikawa A., Kohda M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2007. – Vol. 69. – P. 685–693.
75. Michikawa Y., Suga T., Ishikawa A. et al. // *BMC Medical Genetics*. – 2010. – Vol. 11. – 123. – 11 p.
76. Kerns S.L., Ostrer H., Stock R. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 78. – P. 1292–1300.
77. Michikawa Y., Suga T., Ohtsuka Y. et al. // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8. – P. 2722–2735.
78. Niu N., Qin Y., Fridley B.L. et al. // *Genome Res.* – 2010. – Vol. 20. – P. 1482–1492.
79. Zhang Y., Rohde L.H., Emami K. et al. // *DNA Repair*. – 2008. – Vol. 7. – P. 1835–1845.
80. Mateuca R.A., Roelants M., Iarmarcovai G. et al. // *Mutagen*. – 2008. – Vol. 23, № 1. – P. 35–41.
81. Sims A.H., Finnon P., Miller C.J. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2007. – Vol. 83. – P. 409–420.
82. Torres-Roca J.F., Eschrich S., Zhao H. et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 7169–7176.
83. Guo W.F., Lin R.X., Huang J. et al. // *Radiat. Res.* – 2005. – Vol. 164. – P. 27–35.
84. Zschenker O., Borgmann K., Streichert T. et al. // *Radiother Oncol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 236–249.
85. Amundson S.A., Do K.T., Vinikoor L.C. et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, iss. 2. – P. 415–424.
86. Chaudhry M/A. // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2008. – Article ID 541678 – 7 p.
87. Du X.L., Jiang T., Wen Z.Q. et al. // *Oncol. Rep.* – 2009. – Vol. 21. – P. 625–634.
88. Chaudhry M.A., Kreger B., Omaruddin R.A. // *Int. J. of Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86. – P. 569–583.
89. Santucci M.A., Barbieri E., Frezza G. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2000. – Vol. 46. – P. 411–416.
90. Pramana J., Van den Brekel M.W.M., van Velthuysen M.-L.F. et al. // *Ibid.* – 2007. – Vol. 69. – P. 1544–1552.
91. Chao A., Wang T.H., Lee Y.S. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 169. – P. 76–86.
92. Nuyten D.S., Hastie T., Chi J.T. et al. // *Eur. J. Cancer*. – 2008. – Vol. 44. – P. 2319–2329.
93. Piening B. D., Wang P., Subramanian A., Paulovich A. G. // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 171. – P. 141–154.
94. Santos E.S., Blaya M., Raez L.E. // *Clinical Lung Cancer*. – 2009. – Vol. 10. – P. 168–173.
95. Eschrich S.A., Pramana J., Zhang H. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2009. – Vol. 75. – P. 489–496.
96. Begg A.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85. – P. 825–836.
97. Hsu F., Chuang E.Y., Lee Y. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 78. – P. S662.
98. Kruse J.J., Stewart F/A. // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13. – P. 2669–2674.
99. Svensson J.P., Stalpers L.J.A., Esveldt-van Lange R.E.E. et al. // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3. – e422.
100. Rodningen O.K., Alsner J., Hastie T. et al. // *Breast Cancer Res.* – 2005. – Vol. 7, suppl. 2. – P. 542–543.
101. Alsner J., Rodningen O.K., Overgaard J. // *Radiother. and Oncol.* – 2007. – Vol. 83. – P. 261–266.
102. Rodningen O.K., Borresen-Dale A.L., Alsner J. et al. // *Radiother. Oncol.* – 2008. – Vol. 86. – P. 314–320.
103. Valdagni R., Rancati T., Ghilotti M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2009. – Vol. 74. – Vol. 1431–1440.
104. HERNÁNDEZ Hernández L.A., Lara P.C., Pinar B. et al. // *Radiat. Oncol.* – 2009. – Vol. 4. – Article 17. – 7 p.
105. Hämmerich J., Werle-Schneider G., Popanda O. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82. – P. 593–604.
106. Pietrowska M., Polacska J., Walaszczyk A. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 87. – P. 711–719.
107. Cai X.W., Shedden K., Ao X. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 77. – P. 867–876.
108. Garty G., Chen Y., Salerno A. et al. // *Health Physics*. – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 209–217.
109. Flood A.B., Nicolalde R.J., Demidenko E. et al. // *Radiat. Meas.* – 2011. – Vol. 46. – P. 916–922.
110. Vinnikov V.A., Ainsbury E.A., Maznyk N.A. et al. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 174. – P. 403–414.
111. Fenech M. // *Radiat. Meas.* – 2011. – Vol. 46. – P. 737–741.
112. Swartz H.M., Williams B.B., Nicolalde R.J. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 46. – P. 742–748.
113. Vinnikov V.A., Ainsbury E.A., Lloyd D.C. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 46. – P. 1004–1008.
114. Livingston G.K., Wilkins R.C., Ainsbury E.A. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 46. – P. 912–915.
115. Blakely W.F., Carr Z., Chu M. C-M. et al. // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 171. – P. 127–139.
116. Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Kapralova V.I. et al. // *Ibid.* – 2011. – Vol. 175. – P. 610–621.
117. Koturbash I., Zemp F.J., Pogribny I., Kovalchuk O. // *Mutat. Res.* – 2011. Vol. 722. – P. 94–105.
118. Amundson S.A. // *Int. Conf. «EPRBiodose-2010» (Mandelieu-La-Napoule, France). Abstract book. – Rome: Prioda Imaging. – P. 97.*

Надходження до редакції 08.06.2012.

Прийнято 14.07.2012.

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