

Національна академія медичних наук України

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник лікувально-
організаційного управління

НАМН України, д. м. н., проф.

І. Д. Шкробанець

«10» *лютого* 2018 р.



**ЗАСТОСУВАННЯ НОВИХ БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ У
ДІАГНОСТИЦІ ЕФЕКТІВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ В ІМУННІЙ
СИСТЕМІ ЛЮДИНИ**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ - 2018

Установа-розробник:

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України»

Укладачі:

академік НАМН України,

д. мед. н., професор

д. б. н., старший дослідник

к. б. н.

м. н. с.

м. н. с.

Базика Д. А.

Ільєнко І. М.

Голярник Н. А.

Лясківська О. В.

Беляєв О. А.

Контактний телефон – (044) 409 29 55

Рецензент: д. б. н. Дружина М. О.

Рішення експертної проблемної комісії «Радіаційна медицина» МОЗ та
НАМН України,
протокол №3 від 27 червня 2018 р

Голова Експертної проблемної комісії «Радіаційна медицина» МОЗ та
НАМН України, академік НАМН України, д. мед. н., професор Базика Д.А.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	11
1. ГЕННА ЕКСПРЕСІЯ, ЯК БІОЛОГІЧНИЙ МАРКЕР РАННІХ ТА ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ.....	14
1.1. Методи визначення генної експресії.....	14
1.2. Генна експресія у ранньому періоді після опромінення...	17
1.3. Гени-маркери віддалених ефектів опромінення.....	21
1.4 Гени-маркери при професійному опроміненні.....	24
2. ПРОТЕОМНІ БІОМАРКЕРИ РАДІАЦІЙНОГО ОПРОМІНЕННЯ...	28
2.1. Експресія цитоплазматичного білка Cyclin D1 у лімфоцитах ПК, як маркер ранніх та віддалених ефектів опромінення.....	29
2.2. Визначення гістону гамма-H2AX.....	32
3. ДОВЖИНА ТЕЛОМЕР ЯК БІОМАРКЕР ОПРОМІНЕННЯ.....	33
ВИСНОВКИ.....	37
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	39

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Гр	Грей
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ІР	іонізуюча радіація
кДНК	комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
мГр	Мілігрей
мЗв	Мілізіверт
МКАТ	моноклональне антитіло
мРНК	матрична РНК
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПК	периферична кров
РНК	рибонуклеїнова кислота
УЛНА	Учасник ліквідації наслідків аварії
ФГА	фітогемаглютинін-Р
ЧАЕС	Чорнобильська атомна електростанція
<i>ANKRD33</i>	ankyrin repeat domain 33 (домен анкіринових повторів, 33)
<i>APOBEC3</i>	apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3H (ген, який кодує каталітичну субодиницю 3H ферменту, спорідненого редагуючому комплексу аполіпопротеїна В)
<i>H</i>	який кодує каталітичну субодиницю 3H ферменту, спорідненого редагуючому комплексу аполіпопротеїна В)
<i>ASTN2</i>	astrotactin 2 (астротактин 2)
<i>ATM</i>	serine-protein kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) (серин/треонінова протеїнкіназа ATM)
<i>ATP5E</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit (ген, який кодує субодиницю епсілон H ⁺ -транспортуючого мітохондріального F1-комплексу, АТФ-синтаза)
<i>BAX</i>	Bcl-2-associated X protein (ген, який кодує Bcl-2-асоційований білок X)
<i>BBC3</i>	Bcl-2-binding component 3/ p53 upregulated modulator of apoptosis

(PUMA)	(Bcl-2- зв'язуючий компонент 3/ p53-регульований медіатор апоптозу)
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/ lymphoma 2 (ген 2 В-клітинної ХЛЛ/ лімфоми)
BD	«Becton Dickinson», компанія
BER	base excision repair (ексцизійна репарація азотистих основ)
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat containing 5 (ген, який кодує бакуловірусний інгібітор апоптозних повторів 5)
<i>BRCA1</i>	breast cancer type 1 (ген, який кодує білок-онкосупресор раку молочної залози)
<i>CCND1</i>	cell cycle regulator cyclin D1 (ген, який кодує G1/S-специфічний білок циклін-D1)
<i>CCNG1</i>	cell cycle regulator cyclin G1 (ген, який кодує білок циклін-G1)
CDK4	cyclin-dependent kinase 4 (циклінзалежна кінза 4)
CDK6	cyclin-dependent kinase 6 (циклінзалежна кінза 6)
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (ген, який кодує інгібітор циклін-залежної кінзи 1A)
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (ген, який кодує інгібітор циклін-залежної кінзи 2A)
<i>CDKN1B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (ген, який кодує інгібітор циклін-залежної кінзи 1B)
<i>CLSTN2</i>	calsyntenin 2 (кальсинтенін-2)
<i>COX8A</i>	cytochrome c oxidase subunit 8A (субодиниця 8A оксидази цитохрому с)
<i>CSF2</i>	granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2 (ген, який кодує гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор 2)
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10 (ген, який кодує СХС-хемокін ліганд 10/ інтерферон- γ індуцибельний білок 10 (IP-10))

Cyclin D1	G1/S-специфічний білок циклін-D1
Cyclin G	G1-специфічний білок циклін-G
D	доза зовнішнього опромінення
<i>DDB</i>	DNA damage-binding protein (ген, який кодує білок, що зв'язує пошкоджену ДНК)
<i>DDB2</i> (<i>XPE</i>)	DNA damage-binding protein 2/ xeroderma pigmentosum, complementation group E (ген, який кодує білок, що зв'язується зі специфічними пошкодженнями ДНК, тип 2/ ген, який кодує білок, асоційований з пігментною ксеродермою тип E)
DDR	DNA damage response (універсальний механізм відновлення ушкоджень генома клітини)
DSBs	double-strand breaks (подвійні розриви ДНК)
E2F	E2F family of transcription factors (родина факторів транскрипції E2F)
<i>FAS</i>	first apoptosis signal (перший апоптотичний сигнал, рецептор програмованої загибелі клітин)
<i>FASLG</i>	first apoptosis signal ligand (ген, який кодує ліганд першого апоптотичного сигналу)
<i>FCGR1A</i>	Fc fragment of IgG receptor Ia (ген, який кодує Fc-фрагмент IgG, високоафінний Ia рецептор (CD64))
FDXR	ferredoxin reductase (ферредоксин редуктаза)
<i>FHL2</i>	four and a half LIM domains 2 (ген, який кодує білок з родини чотирьох з половиною білків домену LIM, які взаємодіють з інтегринами та функціонують як транскрипційний коактиватор після ядерної транслокації)
FITC	fluorescein isothiocyanate (флуорисцеїнізоціанат)
Flow-FISH	проточно-цитометрична флюоресцентна гібридизація in situ

<i>GADD45</i>	growth-arrest-and-DNA-damage- inducible 45 gene family (родина генів, які кодують білки, що приймають участь в регуляції експресії генів, зупинці клітинного циклу, репарації ДНК і апоптозу)
<i>GADD45A</i>	growth-arrest-and-DNA-damage-inducible alpha (ген, який кодує білок, індукований блокуванням росту та пошкодженнями ДНК, альфа)
<i>GDF15</i>	growth differentiation factor 15 (фактор росту і диференціювання 15)
<i>GNLY</i>	granulysin (ген, який кодує гранулолізин)
<i>GSTM1</i>	glutathione S-transferase mu 1 (ген, який кодує глутатіон S-трансферазу класу мю-1)
<i>GZMA</i>	granzyme A (ген, який кодує гранзим А)
<i>H2AX</i>	hyston H2AX (ядерний протеїн, гістон H2AX)
γ -H2AX	фосфорильована форма гістону H2AX
<i>hOGG1</i>	human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (ген, який кодує 8-оксигуанін-ДНК-глікозилазу людини)
<i>IFNG</i>	interferon gamma (ген, який кодує γ -інтерферон)
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta (ген, який кодує інтерлейкін 1 бета)
<i>MADD</i>	MAP kinase-activating death domain protein (ген, який кодує білок домену смерті MAP-кінази)
<i>MAPK14</i>	mitogen-activated protein kinase 14 (ген, який кодує мітоген-активовану протеїнкіназу 14)
<i>MCF2L</i>	MCF2 cell line derived transforming sequence-like (ген, який кодує Rho-специфічний DBS фактор обміну гуанінового нуклеотиду, та виконує функцію регуляції діяльності фактору росту нервів)
<i>MDM2</i>	murine double minute 2 homolog (ген, який кодує мишачий подвійний гомолог 2 мініхромосоми)

<i>MEX3D</i>	mex-3 RNA binding family member D (ген, який кодує білок D родини mex-3 РНК-зв'язуючих білків)
<i>MKNK2</i>	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (ген, який кодує взаємодіючу з MAP-кіназою серин/треонінову кіназу 2)
<i>MYC</i>	Мус proto-oncogene protein (ген, який кодує протоонкогенний білок Мус (фактор транскрипції))
<i>ND2</i>	NADH dehydrogenase subunit 2 (ген, який кодує другу субодиницю НАДФ-дегідрогенази)
<i>NDUFA4</i>	NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Alpha Subcomplex, 4 (ген, який кодує НАДФ-дегідрогеназу (убіхінон) 1, альфа-субкомплекс, 4)
<i>NFKB1</i>	nuclear factor NF-kappa-B subunit 1 (ген, який кодує білок-субодиницю 1 ядерного транскрипційного фактору карра-В)
<i>NFKB2</i>	nuclear factor карра В subunit 2 (ген, який кодує білок-субодиницю 2 ядерного транскрипційного фактору карра-В)
<i>NKG7</i>	natural killer cell granule protein 7 (білок 7 гранул природних кілерних клітин)
p53	білок, який регулює клітинний цикл та апоптоз
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (ядерний антиген проліферуючих клітин)
<i>PFKFB3</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (ген, який кодує 6-фосфофрукто-2-кіназу/фруктозо-2,6-бісфосфатазу-3)
PHPT1	phosphohistidine phosphatase 1 (фосфогістидин фосфатаза 1)
PNA	peptide nucleic acid (пептидна нуклеїнова кислота)
pS139	білок серин 139
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (кількісна полімеразна ланцюгова реакція)
Rb	retinoblastoma protein (білок ретинобластоми)

<i>RPL19</i>	60S ribosomal protein L19 (ген, який кодує 60S рибосомний білок L19)
<i>RPL21</i>	60S ribosomal protein L21 (ген, який кодує 60S рибосомний білок L21)
<i>RPS6</i>	40S ribosomal protein S6 (ген, який кодує 40S рибосомний білок S6)
<i>RQ</i>	relative quantification (середнє значення відносного рівня генної експресії)
<i>RTL</i>	relative telomere length (відносна довжина теломер)
<i>SERPINB9</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 (ген, який кодує інгібітор серпін пептидази)
<i>SESN1</i>	sestrin-1(ген, що кодує білок сестрин 1)
<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3/ acute-phase response factor (ген, який кодує сигнальний білок та активатор транскрипції 3/ фактор гострої фази відповіді)
<i>TER</i>	DNA replication terminus site-binding protein (ген, який кодує білок, що зв'язує сайт термінації реплікації ДНК)
<i>TERF1</i>	telomeric repeat-binding factor 1 (ген, який кодує теломерний зв'язуючий фактор 1)
<i>TERF2</i>	telomeric repeat-binding factor 2 (ген, який кодує теломерний зв'язуючий фактор 2)
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase (ген, який кодує зворотню теломеразну транскриптазу людини)
<i>TFAM</i>	Transcription factor A, mitochondrial (ген, який кодує мітохондріальний транскрипційний фактор А)
<i>TGFBR1</i>	transforming growth factor beta receptor 1 (ген, який кодує рецептор 1 типу до трансформуючого фактору росту бета)

<i>TIGAR</i>	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (ген, який кодує TP53-індукований білок-регулятор гліколізу та апоптозу)
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor (ген, який кодує фактор некрозу пухлин)
<i>TP53</i>	tumor protein 53 (ген, який кодує онкопротеїн p53)
<i>TP53I3</i>	tumor protein 53 inducible protein 3 (ген, який кодує онкопротеїн p53, що індукує білок 3)
<i>TRAIL-R2</i>	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 2 (ген, який кодує рецептор смерті-5 до TRAIL)
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A (ген, який кодує фактор росту ендотелію судин A)
<i>XPC</i>	xeroderma pigmentosum group C protein complex (ген, який кодує білок, асоційований з пігментною ксеродермою тип C: фактор розпізнавання пошкодження ДНК та компонент системи ексцизійної репарації нуклеотидів)
<i>XRCC1</i>	X-ray-induced damage repair cross-complementing protein 1 (ген, який кодує регуляторний білок репарації пошкоджень ДНК, викликаних іонізуючою радіацією)

ВСТУП

Професійне або аварійне радіаційне опромінення може спричинити серйозні наслідки для здоров'я людини. Негативний досвід, який був отриманий після аварій у Чорнобилі та Фукусімі яскраво ілюструє критичну потребу у пошуці чутливих біологічних маркерів для ретроспективної оцінки індивідуальної дози опромінення, що може бути вкрай необхідним не тільки для визначення шляхів лікування, але і для прогнозування віддалених стохастичних ефектів таких, як геномна нестабільність та рак [Zeegers D. et al., 2017].

На сьогодні широко використовують низку методів біологічної дозиметрії. Аналіз діцентричних хромосом, цей метод розглядається як "золотий стандарт" для оцінки дози опромінення; метод цитокінового блокування мікроядер, аналіз хромосомних транслокацій за допомогою багатокольорової флуоресцентної гібридизації *in situ* [Пилинская М.А., 2006; Hande M.P. et. al., 2003], аналіз гістону H2AX та дослідження профілю генної експресії. Визначення дицентричних хромосом та комплексних хромосомних порушень є складним, потребує часу, частина методів є на стадії розробки, що затримує використання під час невідкладних радіаційних ситуацій. Зведені дані щодо існуючих методів біологічної дозиметрії наведено у табл. 1.

Існує нагальна необхідність розробки маркерів, придатних для біологічної дозиметрії у ранньому періоді після дії малих доз, та для віддаленого періоду після опромінення.

У ННЦРМ проводяться дослідження, які спрямовані на пошук нових біологічних маркерів іонізуючої радіації (ІР) з використанням комплексу вищезазначених інструментів біодозиметрії. Дані методичні рекомендації ґрунтуються на новітніх наукових досягненнях в області біологічної дозиметрії.

Таблиця 1. Існуючі біологічні маркери дії ІР у людини

№ зч	Біомаркер	Предмет аналізу	Метод	Дозовий інтервал	Період після опромінення	Специфічність	Джерело
1	Мікроядра	Кров, мононуклеари, ретикулоцити, букальні клітини	Мікроскопія, проточна цитометрія, FISH	0.2–4 Гр	Ранній, віддалений	ІР, генотоксичні агенти	IAEA (2001)
2	Кількість нейтрофільних гранулоцитів/лімфоцитів	Кров	Мікроскопія, гематологічний аналізатор	> 0.5 Гр	1- 10 дні	Не специфічний	А. К. Гуськова, Б. Д. Байсоголов (1971)
3	Поверхневий імунологічний фенотип	Лейкоцити, мутації у локусі Т-клітинного рецептору	Проточна цитометрія	0.1 – 4 Гр	Ранній, віддалений	ІР	М. Akiyama (1995)
4	Дицентричні хромосоми	Мононуклеарні лейкоцити	Аналіз метафаз	0.1–5 Гр	Ранній - 2 роки	Переважно ІР	IAEA (2001)
5	Комплексні хромосомні аберації	Мононуклеарні лейкоцити	FISH WCP-1,2,4; FISH WCP-1,2,8 COBRA- FISH	> 1Gu	Ранній, віддалений	Переважно ІР	IAEA (2001)
7	Передчасна конденсація хромосом (PCC)	Мононуклеарні лейкоцити	Звичайне визначення PCC, FISH	0.02–20 Гр	Ранній: від 3-4 годин	ІР, генотоксичні агенти	IAEA (2001)
8	Мутація у локусі глікофору А	Еритроцити периферичної крові	Проточна цитометрія	0.25 -2 Гр	Ранній, віддалений	ІР, АТМ, пігментна ксеродерма, визначення тільки у MN-гетерозиготних пацієнтів (до 30% популяції)	R.H. Jensen (1997)
9	Генні мутації HPRT	Мононуклеарні лейкоцити	HPRT, ПЛІР	Від 0.1 Гр	Віддалений період	ІР, інші генотоксини	J. Kiefer et al. (1999)

Методичні рекомендації складено за результатами власних досліджень, які доповняють класичні види біологічної дозиметрії та можуть бути використані в разі аварійного або професійного опромінення. Наведено рекомендації щодо використання перспективних новітніх експериментальних методів, таких як експресія фосфорильованого гістону гамма-H2AX [Barnard S. et al., 2015; Rothkamm K. et. al., 2013] та профілю генної експресії [Lu T. P. et al., 2014] у персоналу, що зазнає опромінення у професійних лімітах та у віддаленому періоді після опромінення.

Методичні рекомендації розроблені у рамках науково-дослідної роботи «Вивчення асоціації радіаційно-індукованих змін генної експресії з непухлинними ефектами віддаленого періоду після опромінення в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС» (УДК 577.218:577.27:616-028:614.876, № держреєстрації 0116U003573, термін виконання 2016-2018 рр.), яка виконувалась у лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології Державної установи “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”. Методичні рекомендації призначені для спеціалістів у галузі радіаційної медицини /радіобіології, клінічної імунології та молекулярної біології.

1. ГЕННА ЕКСПРЕСІЯ, ЯК БІОЛОГІЧНИЙ МАРКЕР РАННІХ ТА ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ ІВ

Вплив ІВ веде до активації шляхів сигнальної трансдукції та пов'язаних змін експресії генів. Дослідження змін генної експресії після впливу ІВ є одним із способів забезпечити більш швидке оцінювання індивідуальних доз, який ґрунтується на визначенні змін на рівні РНК-транскриптів [Amundson S. A. et al., 1999; Fan F. et al., 2002; Kabacik S. et al., 2011]. В деяких дослідженнях пропонується розробка профілів генної експресії у лімфоцитах периферичної крові (ПК) у якості альтернативного підходу у радіаційній біодозиметрії [Amundson S. A et al., 2004; Kang C. M. et al., 2003], який легко може забезпечити визначення перспективних молекулярних біомаркерів [Amundson S. A et al., 2000; Blakely W. F. et al., 2002]. Останні дослідження показали, що генний підпис, індукований ІВ, є специфічним, тривалим і точним при дозиметричній оцінці як у мишей, так і у людини [Meadows S. K. et al., 2010; Dressman H. K. et al., 2007]. У більшості цих досліджень використовували клітини ПК (мононуклеарні клітини ПК, цільну кров, культивовані лімфоцити) з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

1.1 Методи визначення генної експресії

Дослідження генної експресії за допомогою ПЛР у реальному часі та *TaqMan* технології, а саме *TaqMan Gene Expression Assays* – набору специфічних зондів та праймерів дозволяє визначати експресію 24 генів одночасно. Основний принцип *TaqMan* технології базується на 5'-3' ендонуклеазній активності *Taq*-полімерази. У реакційну суміш додають ДНК-зонди, до складу яких входять флуоресцентна мітка в 5'-положенні та гаситель флуоресценції в 3'-положенні, а також фосфатна група в 3'-положенні. Ці зонди мають місця посадки всередині області ампліфікації.

Гаситель поглинає випромінення флуоресцентної мітки, а фосфатна група в 3'-положенні блокує полімераза. В ході ПЛР під час стадії віджигу праймерів відбувається приєднання ДНК-зонда до комплементарного ланцюга ДНК. Під час стадії елонгації Таq-полімераза синтезує комплементарний ланцюг ДНК і при досягненні зонда починає його розщеплювати завдяки наявності 5'-екзонуклеазної активності. Таким чином, відбувається роз'єднання флуоресцентної мітки і гасителя, що призводить до зростання інтенсивності флуоресценції пропорційно кількості молекул синтезованого амплікона.

Основний алгоритм дослідження відносного рівня генної експресії складається з наступних етапів: виділення РНК із лейкоцитів ПК, проведення зворотної транскрипції, підготовка реакційної суміші та завантаження TLDA (TaqMan Low Density Array)-плашок, ампліфікація кДНК (кодує ДНК) у режимі ПЛР у реальному часі.

Виділення тотальної РНК проводять із лейкоцитів ПК ручним методом або автоматизовано з використанням наборів для виділення нуклеїнових кислот шляхом стабілізації, лізису та гомогенізації клітин, додавання етанолу та зв'язування тотальної РНК, відмивки та DNase обробки, елюції тотальної РНК. Синтез кДНК із зразків виділеної РНК проводять у реакції зворотної транскрипції за допомогою High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit – набору реагентів, які при комбінуванні у відповідних кількостях (за стандартним протоколом) формують реакційну суміш 2x Reverse Transcription Master Mix (RT-MM). Рівні об'єми зразку РНК (10 мкл) та RT-MM (10 мкл) змішують та проводять реакцію зворотної транскрипції. Для проведення ампліфікації, отриманий зразок кДНК з'єднують із реакційною сумішшю – PCR Master mix для генної експресії та вносять до мікропроточної 384-луночної TLDA плашки – Micro Fluidic Card із специфічною конфігурацією нанесених в них наборів реагентів TaqMan для дослідження експресії дослідних генів. Мікропроточну плашку із внесеними зразками центрифугують протягом

2 хв при 1200 об/хв для рівномірного розподілу зразків. Ампліфікацію кДНК проводять за допомогою генетичного аналізатора. Показники відносного рівня генної експресії (RQ – relative quantification) розраховують за допомогою $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методу, де

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{sample}}}-C_{t_{\text{ref}}})_{\text{control}}-(C_{t_{\text{sample}}}-C_{t_{\text{ref}}})_{\text{irradiated}}.$$

З розвитком *технологій мікрочіпів* (microarray), стало можливим дослідження оцінки геному в цілому. У мікрочіпових експериментах тисячі специфічних генних зондів іммобілізуються на твердій поверхні з подальшою їх гібридизацією з флуоресцентно міченою кДНК. Після декількох відмивок, комплементарні зондам транскрипти зберігаються на матриці та можуть бути детектовані за допомогою лазерного сканера. Оскільки були виявлені значні відмінності між різними платформами мікрочіпів, була розроблена та видана система стандартизації даних, що включає 57 рекомендацій щодо аналізу, відповідних контролів та дизайну зразків, що значно покращило відтворюваність експериментів з мікрочіпами.

Дослідження загальної транскриптоми забезпечується *секвенуванням РНК* (RNA-Seq). РНК фрагментується, зворотно транскрибується та лігується до адаптерів з відомою послідовністю, що дозволяє проводити ампліфікацію та секвенування. Короткі фрагменти послідовностей відображаються у референсному геномі, а кількість фрагментів, що зіставляються з конкретним транскриптом, відображає рівень його експресії.

Всі описані вище способи базуються на ферментативній реакції (ПЛР-ампліфікації або зворотній транскрипції), яка зазвичай призводить до певних відхилень. У системах вивчення генної експресії *nanoString* та *nCounter* використовуються зонди, які мічені унікальними штриховими кодами, що гібридизуються з РНК, таким чином минаючи необхідність

будь-якої ферментативної реакції. Така технологія дозволяє мультиплексувати до 800 мішеней в одній реакції з чутливістю, порівняною з qPCR [Manning G. et al., 2011].

Таким чином, пошук нових методів генетичного аналізу для біологічної дозиметрії привів до появи сучасних, точних, чутливих та високопродуктивних технологій дослідження генної експресії, які пропонуються як доповнення до існуючих цитогенетичних методів оцінки дози та можуть застосовуватись у разі виникнення радіологічних надзвичайних ситуацій.

1.2 Генна експресія у ранньому періоді після опромінення

В дослідженнях, що присвячені вивченню впливу низьких та середніх доз γ -променів (0,2 – 2 Гр), була виявлена дозозалежна індукція низки генів у лімфоцитах ПК людини до трьох днів після опромінення [Amundson S. A. et al., 2000]. Більшість з цих генів були включені до p53-регульованих шляхів, таких як репарація пошкоджень ДНК, блок клітинного циклу та апоптозу. У подальшому було підтверджено ці дані з використанням інших методів (різні мікрочипові платформи, дозові інтервали, якість випромінювання та типи клітин). Грунтуючись на експериментальних даних гени, залучені до p53-регульованих процесів, вважають найкращими для індикації опромінення [Kang C.-M. et al., 2003; Mori M. et al., 2004; Paul S., Amundson S. A., 2008].

При дослідженні впливу низьких доз γ -опромінення (5, 10, 20, 50 сГр) на експресію генів репарації ДНК у клітинах ПК людини (*ex vivo*), було продемонстровано, що при більшій дозі γ -радіації пригнічується експресія мРНК двох репараційних генів *hOGG1* та *XRCC1* з пороговим значенням дози 200 мГр. Таким чином, γ -опромінення не тільки викликає ушкодження ДНК, але й одночасно впливає на рівні експресії відповідних репараційних генів [Sudprasert W. et al., 2006].

Ген *XPC* є одним з транскрипційно регульованих генів репарації ДНК (NER-шлях), що індукується як ультрафіолетовим так і іонізуючим випромінюванням [Amundson S. A. et al., 2004] як частина p-53 опосередкованої відповіді на стрес [Wiebalk K. et al., 2007; Adimoolam S, Ford J. M., 2002]. В 2007 році Wiebalk et al. дослідили індукцію експресії мРНК *XPC* у лімфоцитах ПК 99 пацієнтів, хворих раком передміхурової залози, через 4 години після γ -опромінення у дозі 5 Гр. Була визначена індивідуальна варіація *XPC* генної експресії до 20 разів. Не зважаючи на те, що ген *XPC* не відіграє ключову роль у процесах радіаційно-індукованих ушкоджень ДНК, він виявився геном-кандидатом в якості біомаркера радіаційного ураження [Wiebalk K. et al., 2007].

Ген *GADD45* є специфічним геном, який індукується ІВ і є лінкерним між репарацією ДНК та p53 опосередкованим «чекпойнтом» клітинного циклу в S-фазі [Hwang B. J. et al., 1999]. Grace et al. було досліджено експресію гена *GADD45* через 24 та 48 годин після *ex vivo* опромінення цільної крові при експозиціях 1 Гр, 2 Гр та 3 Гр. Результати показали дозозалежну гіперекспресію *GADD45A* та можливість його використання в якості таргетного як при променевої терапії, так і у біодозиметрії при аварійних ситуаціях [Grace M. et al., 2002]. У 2003 році автори доповнили результати експериментальних досліджень, зокрема було визначено збільшення відносного рівня експресії генів *GADD45*, *DDB2 (XPE)* (зв'язує p53 відповідь та ДНК NER) та *BAX* після впливу ІВ (1-3 Гр) та 48 годин відновлення *ex vivo*.

Kang et al. ідентифікували *TRAIL-R2*, *FHL2*, *Cyclin G*, як гени, що корелювали з індивідуальними експозиціями та дозами опромінення [Kang C. M. et al., 2003]. Amundson et al. у хворих після променевої терапії визначили гіперекспресію генів *CDKN1A* та *DDB2 (XPE)* та зниження експресії *GADD45A* [Amundson S. A. et al., 2000]. Автори припустили, що гени *CDKN1A* та *DDB2* регулюються p53 у відповідь на вплив ІВ, що є важливим для регуляції p-53 шляху при формуванні генного підпису ІВ. У

дослідженнях Paul S. та Amundson S.A. ПК 10 здорових донорів була опромінена *ex vivo* (0,5, 2,5 та 8 Гр), а експресія генів визначалась через 6 та 24 години після впливу ІР. *CDKN1A*, *SESNI* (індукується пухлинним супресором p53 та відіграє роль у клітинній відповіді на ушкодження ДНК та окисний стрес), *PHPT1*, *BBC3 (PUMA)* та *FDXR* були детерміновані як біомаркерні гени, що пов'язані з контрольними точками клітинного циклу та апоптозом. У подальших дослідженнях з використанням мікрочіпової технології автори підтвердили відповідь генів *CDKN1A*, *FDXR*, *BBC3*, *PHPT1*, *SESNI*, *DDB2* та *PCNA* на вплив ІВ [Paul S., Amundson S. A., 2008].

У 2011 році Kabacik et al. було проведено порівняльне дослідження генної відповіді на вплив ІР (*ex vivo*) у лімфоцитах людини [Kabacik S., et al., 2011]. Авторами була визначена група чутливих до радіації генів, які були запропоновані як генетичні біодозиметри з використанням ПК, зокрема *SESNI* (Sestrin 1), *GADD45A*, *CDKN1A* (інгібітор циклін-залежної кінази 1A), *CCNG1* (Cyclin G1), *FDXR* (фередоксинредуктаза), p53-регульований медіатор апоптозу *BBC3 (PUMA)* та *MDM2*. Визначені біомаркери рекомендовано використовувати після радіаційних аварій та для контролю доз під час променевої терапії.

Таким чином, генна експресія є чутливою до впливу ІР. Існує достатня кількість даних для того, щоб рекомендувати аналіз профілів генної експресії у лімфоцитах ПК з метою пошуку біомаркерів дії ІР. У табл. 2 представлені узагальнені результати наукових досліджень, які демонструють що генний підпис, індукований ІР є специфічним, тривалим та точним маркером при біодозиметричній оцінці опромінення. Як видно з табл. 2, вказані зміни відображують реакції геному у перший період після опромінення.

Таблиця 2. Узагальнені результати генної відповіді на опромінення у людини, що пропонуються як біологічні маркери раннього періоду (Kabacik S., et al., 2015)

<i>Гени</i>	<i>Час після опромінення (год.)</i>	<i>Вид та дози опромінення</i>	<i>Об'єкт дослідження</i>	<i>Джерело (публікації)</i>
<i>DDB2, CDKN1A, XPC</i>	4; 24; 48, 72	0; 0,2; 0,5; 1 та 2 Гр γ -опромінення	лімфоцити периферичної крові	(Amundson S. A. et al., 2000)
<i>CDKN1A, CXCL10, DDB2, FCGR1A</i>	6; 12; 18; 24; 30, 36	0 та 1,5 Гр рентгенівське опромінення фракційно кожні 6 год. до 9 Гр	периферична кров осіб, які зазнали повне опромінення організму	(Amundson S. A. et al., 2004)
<i>FDXR, CDKN1A, PHPT1, BBC3, SESN1</i>	6, 24	0; 0,5; 2; 5 та 8 Гр. γ -опромінення	периферична кров	(Paul S. and Amundson S. A., 2008)
<i>RPL19, RPS6, ATP5E, COX8A, NDUFA4, RPL21</i>	3	0; 0,05 та 0,5 Гр γ -опромінення	CD4 ⁺ Т-лімфоцити	(Gruel G., 2006)
<i>DDB, CDKN1A АРОВЕС3Н</i>	6	0; 0,1; 0,5 та 2 Гр. γ -гопромінення	периферична кров	(Paul S. and Amundson S. A., 2011)
<i>FDXR, PFKFB3</i>	24, 48	0; 0,02 та 0,1 Гр γ -опромінення	лімфоцити периферичної крові	(Knops K. et al., 2012)
<i>FDXR, PHPT1, DDB2, GADD45A, CCNG1, CDKN1A, BBC3, MDM2, SESN1, TIGAR, FAS, PCNA, MYC</i>	2, 24	0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 1; 2 та 4 Гр. Рентгенівське опромінення	периферична кров	(Manning G. et al., 2013)

<i>MDM2, XPC, FDXR, ND2, MEX3D, ANKRD33, TFAM</i>	2,5; 5; 7,5 . 10	0; 5; 10; 25; 50; 100 та 500 мГр γ - опромінення	CD4 ⁺ Т- лімфоцити	(Nosel I. et al., 2013)
<i>CDKN1A, DDB2, PCNA, RHPT1, GNLY, GZMA, NKG7</i>	48	0; 0,5; 2; 5 та 8 Гр γ - опромінення	периферична кров	(Paul S. et al., 2011, 2013)
<i>ASTN2, CDKN1A, GDF15, ATM</i>	12; 24, 48	0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8 та 10 Гр γ - опромінення	периферична кров	(Tucker M. A. et al., 2014)

1.3 *Гени-маркери віддалених ефектів опромінення*

Проведено визначення експресії генів, які приймають участь у регуляції репараційних процесів ДНК, клітинного циклу, апоптозу, клітинного старіння та імунної відповіді: *TP53, TP53I3, FASLG, BAX, BIRC5, NFKB1, NFKB2, TERF1, TERF2, TERT, DDB2, BRCA1, TGFB1, CDKN1B, CDKN2A, CCND1, CDKN1A, MKNK2, MADD, MAPK14, CSF2, VEGFA, CLSTN2, GSTM1, IFNG, IL1B, MCF2L, SERPINB9, STAT3*. Основну групу обстеження склали УЛНА на ЧАЕС. Для визначення ефектів опромінення основну групу було розділено відповідно до інтервалів доз: до 100 мЗв (I підгрупа); 100–500 мЗв (II підгрупа) та понад 500 мЗв (III підгрупа).

Для визначення ефектів ІР рекомендується дослідження експресії генів *TP53, FASLG, BIRC5, NFKB1, NFKB2, TERT, DDB2, CDKN2A, VEGFA, IFNG, MCF2L*, гіперекспресія яких пов'язана з дією ІР та має дозозалежний характер (рис. 1) та дослідження генів *BAX, TERF2, BRCA1, MAPK14, STAT3, TNF, SERPINB9*, рівень експресії яких у віддаленому періоді після опромінення є зниженим в залежності від дози опромінення (рис. 2).

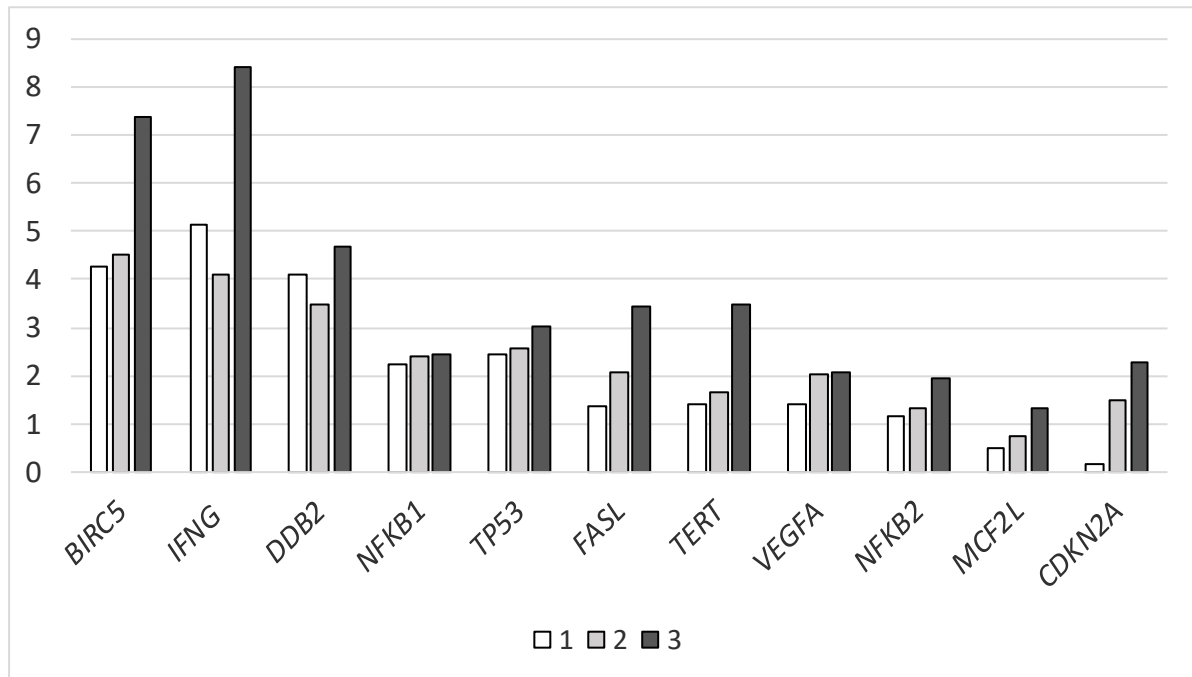


Рис. 1 – Гіперекспресія генів-кандидатів, що пов'язана з дією ІР. 1 – I підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($0 < D \leq 100$ мЗв), 2 – II підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($100 < D \leq 500$ мЗв), 3 – III підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($D > 500$ мЗв).

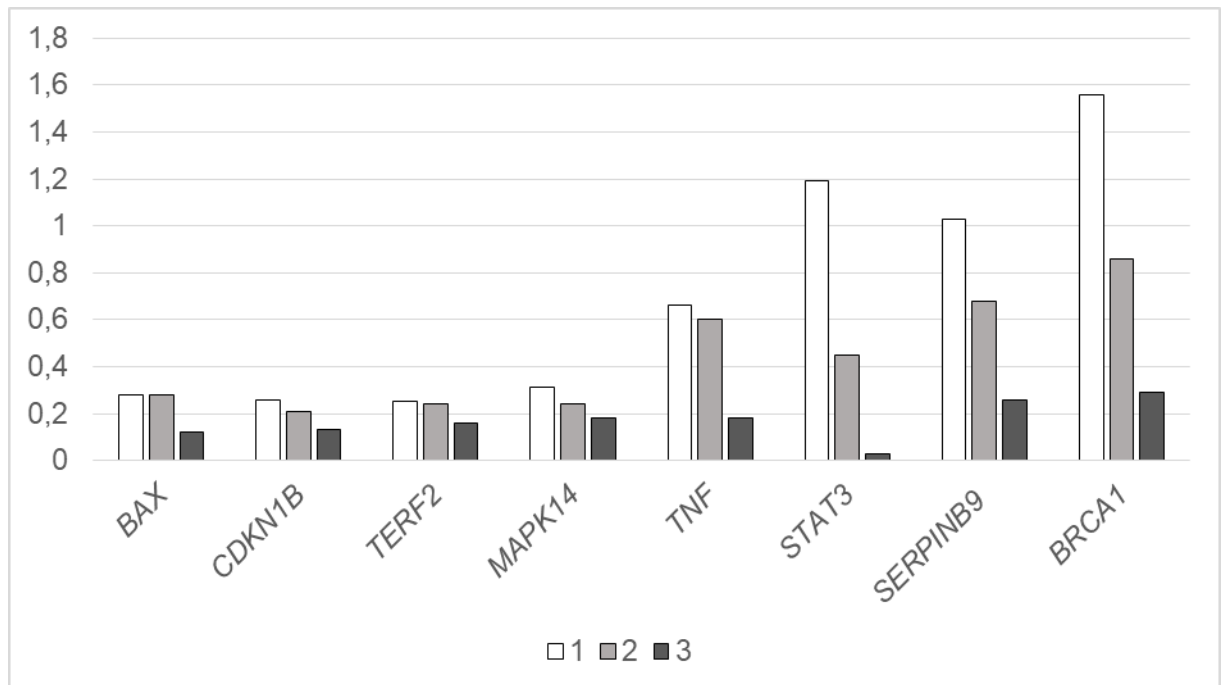


Рис. 2 – Зниження експресії генів-кандидатів, що пов'язане з дією ІР. 1 – I підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($0 < D \leq 100$ мЗв), 2 – II підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($100 < D \leq 500$ мЗв), 3 – III підгрупа УЛНА на ЧАЕС ($D > 500$ мЗв).

У табл. 3 представлені узагальнені результати досліджень, які демонструють зміни генної експресії, що виявлені у лейкоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення (30 років по тому) у різних дозових інтервалах.

Таблиця 3. Варіанти змін генної експресії у групах УЛНА на ЧАЕС через 30 років після опромінення у різних інтервалах доз

Дозовий інтервал, мЗв	Підвищена експресія генів	Знижена експресія генів	Значимо змінена експресія генів (p<0,05)
≤ 100	<i>TP53, TP53I3, DDB2, NFKB1</i>	<i>MADD, FASL, MKNK2, TER1, TERF2, BRCA1, MAPK14, GFBR1, CCND1, DKN1A, CDKN1B</i>	<i>MKNK2, TERF1, TERF2, DDB2, TGFBRI, CCND1, CDKN1A, CDKN1B</i>
100 - 500	<i>TP53, TP53I3, FASLG, TERT, DDB2, NFKB1, VEGFA, MCF2L</i>	<i>MADD, MKNK2, TERF1, TERF2, BRCA1, NFKB2, MAPK14, GFBR1, CCND1, DKN1A, CDKN1B, IL1B, STAT3</i>	<i>TERF1, TERF2, BRCA1, FKB1, NFKB2, MAPK14, TGFBRI, DKN1A, CDKN1B</i>
> 500	<i>TP53, TP53I3, BIRC5, BAX, BIRC5, FASLG, TERT, DDB2, CSF2, VEGFA, MCF2L, IFNG</i>	<i>BAX, MADD, MKNK2, TERF1, TERF2, BRCA1, MAPK14, GFBR1, CCND1, DKN1A, CDKN1B, DKN2A, IL1B, CLSTN2, STAT3</i>	<i>TP53, BAX, BERC5, FASL, MADD, TERF2, TERT, BRCA1, DDB2, NFKB1, MAPK14, GFBR1, CDKN1B, DKN2A, MCF2L, IFNG, IL1B, CLSTN2, STAT3</i>

Оснoву розвитку імунологічної недостатності та підвищення ризику клітинної трансформації віддаленого періоду після опромінення складають пов'язані з дозою порушення генної регуляції основних гомеостатичних механізмів клітини. Встановлено дисбаланс експресії про- та антиапоптотичних генів (*TP53, TP53I3, FASLG, BAX, BIRC5*) та незавершеності процесу апоптозу у дозовому інтервалі понад 500 мЗв;

клітинному старінні та *TERT* пов'язаному ризику трансформації імунокомпетентних клітин за посередництвом *TP53*-опосередкованої регуляції; порушеннях циклін-кіназної регуляції клітинного циклу, диференціювання та сигнальної трансдукції (*CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*, *TGFBR1*, *MAPK14*) [Льєнко І. М., 2016].

1.4 Гени-маркери при професійному опроміненні

Впровадження іновваційних технологій приводить до зростання дозових навантажень при професійному та медичному опроміненні. Є актуальним визначення біологічних маркерів, які підвищують ефективність діагностики радіаційних ефектів та професійного відбору. До професійних груп, які потребують такого підходу у першу чергу, відноситься персонал об'єктів 30-кілометрової зони, зокрема проммайданчику ЧАЕС. Дослідження, проведені ННЦРМ, сприяють досягненню консенсусу щодо генетичних механізмів відповіді на опромінення у професійних лімітах, у т.ч. за інкорпорації трансуранових елементів.

Зміни у геномі людини внаслідок дії ІВ низької інтенсивності можуть змінювати сигнальну трансдукцію, апоптоз, проліферативну активність, інтенсивність старіння клітин. Спрямованість змін експресії генів є різною, наявною є певна пороговість змін експресії. Загальна картина змін при професійному опроміненні до 35 мЗв – гальмування експресії генів, тоді як при інтегрованій дозі опромінення понад 35 мЗв більшість досліджуваних генів гіперекспресовані (рис. 3).

Гени *BAX*, *BIRC5*, *CDKN1B*, *CSF*, *DDB2*, *NFKB2*, *TERF1* та *TERF2* гіпоекспресовані при дозах до 35 мЗв та демонструють підвищену експресію при дозах вищих за 35 мЗв. Експресія генів *BRCA1*, *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *VEGFA* згичена і при дозах опромінення, вищих за 35 мЗв (табл. 4). Одним з ключових маркерів є зниження експресії гену

BRCA1 після опромінення у дозах до 35 мЗв. Цей ген та одноіменний білок приймають участь у репарації ДНК, регуляції клітинного циклу та підтримці генетичної стабільності. Зміни *BRCA1* на тлі зниженої експресії гену *CDKN1A* вказують на зниження генетичного контролю, дисрегуляцію репарації ДНК та активації проліферативної активності.

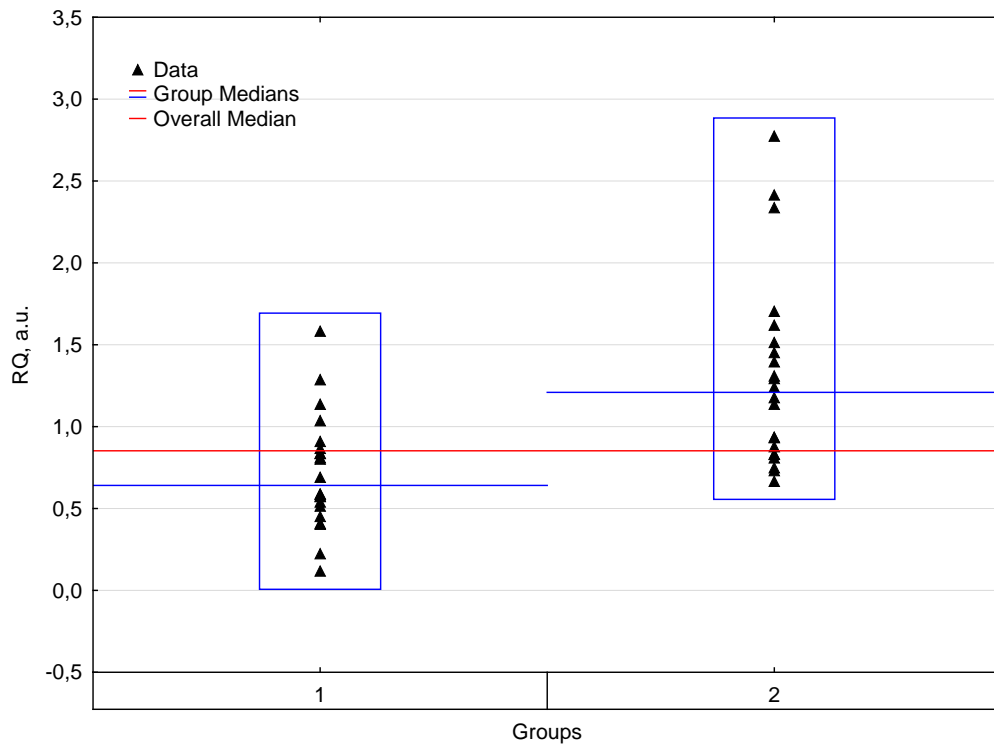


Рис. 3 – Інтегральні зміни генної експресії у лейкоцитах ПК при професійному опроміненні (0 – контрольна група; 1 – доза зовнішнього опромінення до 35 мЗв; 2 – доза зовнішнього опромінення більша за 35 мЗв).

Визначена гіперекспресія генів, що беруть участь у регуляції апоптозу та реакції на стрес - *TP53*, *MAPK14*, а також гена-регулятора імунної відповіді *NFKB1* після опромінення у дозах до 35 мЗв. Зміни експресії гену *NFKB* описані при аутоімунних захворюваннях, онкологічній трансформації та персистуючих вірусних інфекціях. Підвищення експресії гена *DDB2* при професійному опроміненні в дозах за 35 мЗв має наслідком репарацію ДНК та альтернативний сплайсинг (табл. 4). Гіперекспресія гену *DDB2* також може бути пов'язана з активацією адаптивних процесів.

Одним з ефектів опромінення є зміни експресії генів-регуляторів довжини теломер, теломер-теломеразного комплексу та клітинного старіння - *TERF1*, *TERF2*, *TERT* (табл. 4). У дозах до 35 мЗв експресія цих генів була пригнічена, тоді як при інтегральній дозі понад 35 мЗв виявлена гіперекспресія гену *TERT*, активність якого сприяє неконтрольованому подовженню теломерних послідовностей, характерному для злоякісно трансформованих клітин. Гіперекспресія гену *TP53* залишалася незмінною незалежно від величини дози.

Таблиця 4. Варіанти змін генної експресії при професійному опроміненні

Дозовий інтервал, мЗв	Підвищена експресія генів	Знижена експресія генів	Значимо змінена експресія генів (p<0,05)
2,16 - 84,16	<i>TP53, CDKN1B, CSF2, DDB2, MAPK14, MKNK2, NFKB1, NFKB2</i>	<i>BAX, BIRC5, BRCA1, CCND1, CDKN1A, CDKN2A, FASLG, MADD, TERF1, TERF2, TERT, TGFBRI, TP53I3, VEGFA</i>	<i>BRCA1, CCND1, CDKN1A, CDKN2A, VEGFA, FASLG</i>
< 35	<i>TP53, MAPK14, NFKB1</i>	<i>BAX, BIRC5, CSF2, DDB2, BAX, BIRC5, BRCA1, CCND1, CDKN1A, CDKN2A, CDKN1B, MADD, NFKB2, TERF1, TERF2, TERT, TGFBRI, TP53I3, VEGFA</i>	<i>BRCA1, CCND1, CDKN1A, CDKN2A, VEGFA</i>
> 35	<i>TP53, TP53I3, BAX, BIRC5, CDKN1B, CSF, DDB2, MAPK14, MKNK2, NFKB1, NFKB2, TERF1, TERF2</i>	<i>CCND1, CDKN2A, FASLG, MADD, TERT, TGFBRI, VEGFA</i>	<i>TP53, DDB2</i>

Встановлена кореляція між RQ експресії генів та дозою професійного опромінення для генів *BAX*, *CCND1*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *DDB2*, *MKNK2*, *TERF2*, *TP53*, *FASLG* у загальній когорті працівників об'єкта «Укриття» (основна група); для генів *MKNK2*, *CDKN1B*, *NFKB1*, *CSF2*, *FASLG*, *TERF2*

при дозі опромінення < 35 мЗв; для генів *BRCA1*, *CCND1*, *CDKN1A* при дозі опромінення > 35 мЗв (табл. 5).

Таблиця 5. Коефіцієнт кореляції Пірсона (RQ vs Доза) у різних інтервалах доз при професійному опроміненні

Ген	Основна група	Ген	Група 1 (< 35 мЗв)	Ген	Група 2 (> 35 мЗв)
	Коефіцієнт кореляції Пірсона (r)		Коефіцієнт кореляції Пірсона (r)		Коефіцієнт кореляції Пірсона (r)
	p≤0,05		p≤0,05		p≤0,05
<i>BAX</i>	0,40	<i>MKNK2</i>	0,43	<i>BRCA1</i>	0,97
<i>CCND1</i>	0,78	<i>CDKN1B</i>	0,70	<i>CCND1</i>	0,60
<i>CDKN1B</i>	0,58	<i>NFKB1</i>	0,51	<i>CDKN1A</i>	0,38
<i>CDKN2A</i>	0,38	<i>CSF2</i>	0,53		
<i>DDB2</i>	0,73	<i>FASLG</i>	0,38		
<i>MKNK2</i>	0,39	<i>TERF2</i>	0,52		
<i>TERF2</i>	0,60				
<i>TP53</i>	0,37				
<i>FASLG</i>	0,46				

Таким чином, при професійному опроміненні у дозах, що перевищують 35 мЗв маркерними є порушення генної регуляції клітинного старіння імункомпетентних клітин: тенденція до зниження відносного рівня експресії генів *TERF1* і *TERF2* на тлі надмірної експресії *TERT*; при професійному опроміненні в дозах до 35 мЗв маркерними процесами є зміни генної регуляції адаптаційно-репаративних процесів: інактивація *BRCA1*-опосередкованого шляху репарації ДНК та регуляції клітинного циклу на фоні гіперекспресії гена *DDB2*; порушення генної регуляції клітинного циклу: зменшення експресії гену-регулятора сигнальної трансдукції *TGFBR1*, дисбаланс у системі контролю основних чекпойнтів клітинного циклу (зниження експресії генів *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN1A*,

CDKN2A; напруженість у системі протипухлинного нагляду: гіперекспресія гену *TP53*.

Отримані результати свідчать, що порушення експресії генів-регуляторів сигнальної трансдукції, проліферативної активності, клітинного старіння та апоптозу і можуть бути використані як біологічні маркери ефектів при професійному опроміненні.

2. ПРОТЕОМНІ БІОМАРКЕРИ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

Ідентифікація радіаційно-асоційованих протеїнових біомаркерів є складним завданням у зв'язку із часовою та дозовою варіабельністю їх рівня експресії. Чисельні протеомічні дослідження присвячені вивченню порушень рівня протеїнів після дії високих доз ІВ у різних біологічних рідинах, зокрема в сечі, сироватці та ін. присвячені ідентифікації біологічних маркерів опромінення та чутливості до ІВ та можуть бути застосованим при радіаційних надзвичайних ситуаціях. Chaze T. et al. (2013) було визначено зростання експресії генів, які залучені до регуляції процесів гліколізу в печинці та підвищення рівня сироваткових цитокінів. Автори припустили наявність системної відповіді на локальне γ -опромінення шкіри 20, 40 та 80 Гр [Chaze T. et al., 2013]. Аналіз трьох протеїнів (аполіпопротеїну Е, фактору Х та пантотенатної кінази) у зразках крові дозволив їх дискримінувати у термін до 1 місяця після опромінення дозами < 2 Гр та > 10 Гр у хворих на рак молочної залози, хоча різниця при опроміненні < 2 Гр була незначною [Deperas-Kaminska M. et al., 2014]. Подібними виявилися результати, які демонстрували зміни сироваткового рівня амілоїду А (SAA), що дозволило розробити прогностичну модель дискримінації опромінення мишей у дозовому інтервалі ≤ 1 Гр та ≥ 2 Гр [Sproull M., et al., 2014].

Для дослідження механізмів, що лежать в основі індивідуальної чутливості Skiöld S. et al. (2015) порівняли протеїнові профілі у лейкоцитах

ПК, опроміненої *ex novo* 0,1 та 150 мГр в осіб з різною радіочутливістю. Протеомічний аналіз продемонстрував унікальний «протеїновий підпис» у різних групах обстежених. Це дало підстави припустити, що відповідь на оксидативний стрес, коагуляція та гостра фаза відповіді є маркерними при визначенні радіочутливості [Skiöld S. et al., 2015]. Не зважаючи на те, що дослідження присвячені вивченню впливу низьких доз ІВ на протеомічний баланс залишаються небагаточисельними такі дані демонструють, що вплив високих доз ІВ призводить до детектованих змін у біологічних рідинах, які можуть бути маркерними і при впливі низьких доз опромінення. Невирішеними залишаються питання: чи є порушення протеїнового балансу радіаційно-асоційованими, унікальними, а не обумовлені загальним фізіологічним станом, зокрема запаленням; чи є маркерним протеїновий баланс при впливі низьких доз ІВ.

У лабораторії імуноцитології проведена оцінка внутрішньоклітинної експресії білка-регулятора клітинного циклу та проліферації Cyclin D1, а також маркеру подвійних розривів ДНК – гістона γ -H2AX, визначення яких обумовлено участю цих білків у підтримці геномної стабільності після радіаційного впливу.

2.1. Експресія цитоплазматичного білка Cyclin D1 у лімфоцитах ПК, як маркер ранніх та віддалених ефектів опромінення

ІР викликає затримку проходження клітини через G₁-S та G₂-M фази клітинного циклу [Kastan M. B., Bartek J., 2004], що обумовлене активацією контрольних точок (checkpoints) у відповідь на ушкодження ДНК, що в свою чергу блокує або сповільнює перехід до наступної фази [Shrivastav M. et al., 2008].

Cyclin D1 білок, який регулює проліферацію та фазовий перехід G₁/S – контрольній точці клітинного циклу. У людини він кодується геном *CCND1*, розташованим в хромосомному локусі 11q13. В еукаріотичній

клітині Cyclin D1 є першим з циклінів, який у відповідь на стимуляцію мітогенів і факторів транскрипції формує комплекси з CDK4 і CDK6. Cyclin D1 – CDK4 комплекс фосфорилує Rb, що сприяє вивільненню E2F фактора, який активує експресію необхідних генів і їх продуктів для переходу у S-фазу клітинного циклу. Реалізація E2F залежить від інтенсивності процесів фосфорилування активних сайтів Rb, що в свою чергу пов'язується з концентрацією, функціональною активністю та терміном стабільності Cyclin D1, від чого залежить проходження клітиною першої G₁/S – контрольної точки клітинного циклу для подальшого синтезу ДНК [Копнін Б. П., 2000].

В експерименті гостре опромінення у дозах, більше 10 Гр сприяє зниженню експресії *CCND1* та зниженню експресії білку [Agami R., Bernards R., 2000]. Порушення фосфорилування Cyclin D1 відіграють суттєву роль у пухлинній трансформації та канцерогенезі, а збільшення рівня Cyclin D1 в цитоплазмі може бути ознакою раннього онкогенезу [Diehl J. A. et al., 1997].

Спонтанний та мітоген-індукований рівень експресії Cyclin D1 в лімфоцитах ПК визначають за стандартною методикою імунофлуоресцентного забарвлення внутрішньоклітинних білків методом проточної цитометрії.

У віддаленому періоді після опромінення дослідження експресії гена *CCND1* та спонтанного рівня його продукта – білка Cyclin D1 у лімфоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС продемонструвало зниження експресії *CCND1* та підвищення спонтанного рівня Cyclin D1 при максимальному зростанні спонтанної експресії цитоплазматичного Cyclin D1 у лімфоцитах у діапазоні доз 500–1000 мЗв (рис. 4).

Проліферативний потенціал лімфоцитів залежить від спонтанного рівня Cyclin D1. Зниження ФГА-індукованої експресії Cyclin D1 в лімфоцитах відображує звуження можливостей реагування на додаткову стимуляцію.

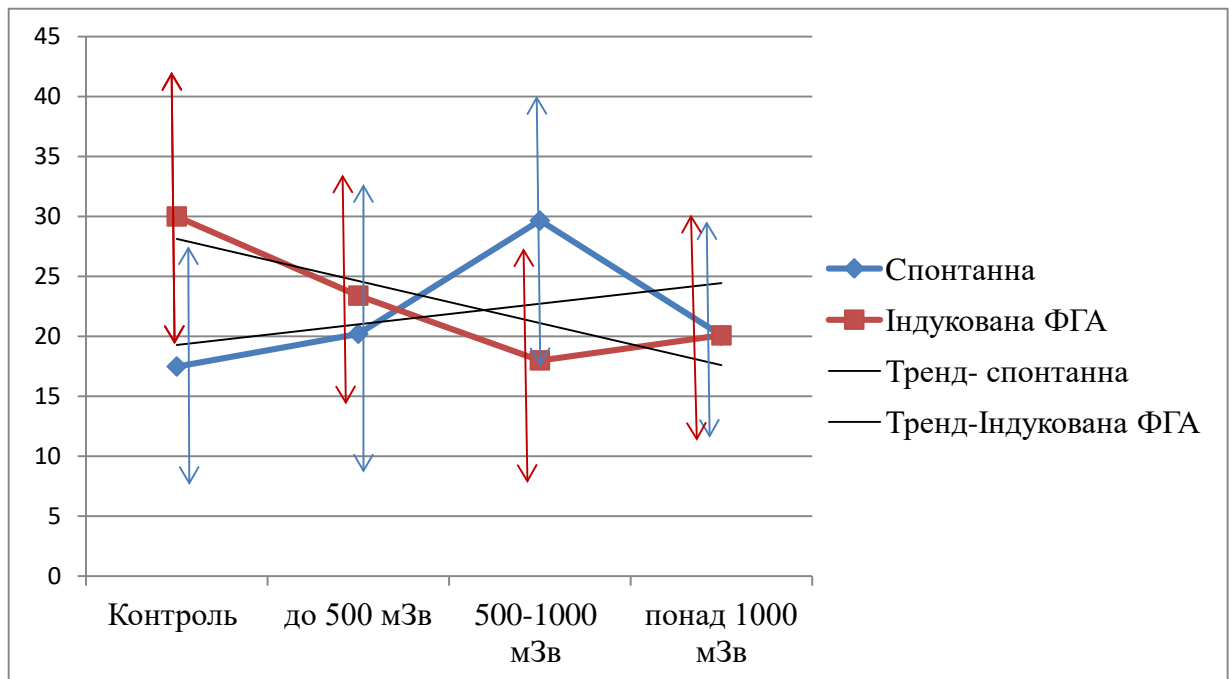


Рис. 4 - Залежність спонтанної та ФГА-індукованої експресії Cyclin D1 у лімфоцитах в залежності від дози опромінення у віддаленому періоді (у відсотках, $M \pm SD$)

Підвищення рівня Cyclin D1 у віддаленому періоді після опромінення ймовірно відбувається завдяки інактивації механізмів його деградації. При надвисоких рівнях спонтанної експресії Cyclin D1 в лімфоцитах ПК пацієнтів включають до груп ризику розвитку віддалених ефектів опромінення.

У ранньому періоді після професійного опромінення низькими дозами радіації у лімфоцитах ПК визначається дозозалежна гіперекспресія цитоплазматичного білка Cyclin D1; найвищі середні значення відносного рівня Cyclin D1 зафіксовано при дозах, які перевищують 35 мЗв. Сила кореляційного зв'язку «доза-ефект» зростає при дозах вище 35 мЗв ($r = 0,69$; $p < 0,05$) тоді, як у інтервалі до 35 мЗв кореляційної залежності дози опромінення та експресії Cyclin D1 не виявлено.

Поєднання підвищеної спонтанної експресії Cyclin D1 в лімфоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС зі зниженням відповіді після стимуляції ФГА

відображає зміни регуляції проліферації та клітинного циклу лімфоцитів, можливо для забезпечення блоку клітинного циклу у контрольній точці – G1/S (checkpoint1), ініціації старіння та апоптозу дефектних клітин в G1/S фазі клітинного циклу та збереження подвійних розривів ДНК у віддаленому періоді після опромінення, як прояву нестабільності геному.

Cyclin D1 може бути біологічним маркером, для оцінки, як медичних ефектів, пов'язаних з дією ІР, так і додатковим показником біодозиметрії при професійному чи випадковому опроміненні.

2.2. Визначення гістону гамма- H2AX

Гістон H2AX - варіант гістона H2A, який швидко фосфорилується по серину 139 через наявність дволанцюгових розривів ДНК, виникнення яких викликане дією несприятливих агентів, в тому числі ІВ [Rogakou E. P. et al., 1998]. Фосфорильована форма H2AX (γ -H2AX) накопичується у ділянках хромосом з подвійними розривами та розглядається як додатковий маркер хромосомних порушень [Bonner W. M. et al., 2008]. Не зважаючи на швидку кінетику утворення локусів γ -H2AX та їх зникнення протягом 6-8 годин, γ -H2AX вважають надійним маркером двониткових розривів ДНК, з високою чутливістю до ІР та інших [Jen K. Y., Cheung V. G., 2005; Gruel G., 2006]. Аналіз внутрішньоклітинної експресії γ -H2AX може бути більш корисним як біологічний індикатор радіаційного впливу, аніж біодозиметр.

Аналіз відносного вмісту γ -H2AX у лімфоцитах ПК проводять на лазерному проточному цитофлюориметрі за стандартною методикою імунофлуоресцентного забарвлення внутрішньоклітинних білків методом проточної цитометрії. В УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення відзначено зростання вмісту гістону γ -H2AX у лімфоцитах. Найбільш виражені зміни експресії фосфорильованої форми гістону H2AX

виявлено у лімфоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС, які були опромінені в інтервалі 500 - 1000 мЗв (рис. 5).

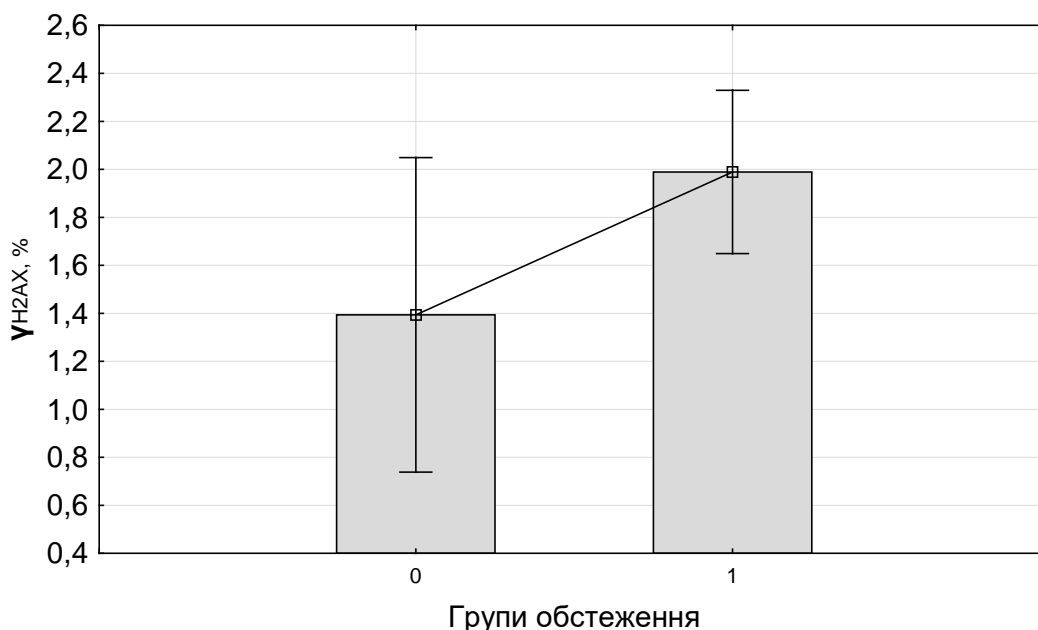


Рис. 5 - Відносний рівень експресії гістону γ -H2AX у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження. 0 – контрольна група, 1 – УЛНА на ЧАЕС

Таким чином, у УЛНА на ЧАЕС спостерігається тенденція до підвищення експресії фосфорильованої форми гістону γ -H2AX у лімфоцитах ПК, переважно при опроміненні 500 - 1000 мЗв, що може бути асоційованим із дією радіації і відображати неефективність механізмів репарації та наявність вторинної нестабільності геному.

3. ДОВЖИНА ТЕЛОМЕР ЯК БІОМАРКЕР ОПРОМІНЕННЯ

Довжина теломер варіює на індивідуальному рівні та знижується з віком. Клітини з короткими або ушкодженими теломерними послідовностями характеризуються підвищеною генетичною нестабільністю, що є фактором канцерогенезу. У багатьох дослідженнях була продемонстрована стійка кореляція між довжиною теломер та радіочутливістю як *in vitro* так і *in vivo* [Gilson E., Londoño-Vallejo A.,

2007]. Скорочення теломер зареєстровано після радіотерапії у середній дозі 52 Гр [Maeda T. et al., 2014]. Порівняння довжини теломер опромінених осіб, хворих на лімфому Ходжкіна з та без кардіоваскулярної патології показало, що особи у яких розвинулась хвороба серця після радіотерапії мали значне скорочення теломерних послідовностей [M'kacher R. et al., 2015]. Тому визначення довжини теломер та теломерної дисфункції має важливе значення у прогнозуванні індивідуальної радіочутливості та віддалених ризиків розвитку патологічних станів, які можуть виникнути в результаті дії ІР.

Основними методами визначення довжини теломер є високотехнологічні ПЛР у реальному часі та флуоресцентна гібридизація *in situ* з використанням проточної цитометрії (flow-FISH). Чутливість методів відрізняється незначно, водночас метод flow-FISH дозволяє комбінувати визначення довжини теломер з субпопуляційним аналізом та визначенням параметрів клітинного циклу, що дає переваги при діагностиці ефектів опромінення.

Визначення відносної довжини теломер у лейкоцитах периферичної крові у суб'єктів, які зазнали дії ІР, рекомендується проводити методом flow-FISH. Результати обробляють за допомогою проточної цитометрії із застосуванням джерела лазерного випромінювання з довжиною хвилі 488 нм. Методика проведення аналізу складається з декількох етапів, а саме: попередньої обробки, денатурації, гібридизації (1-ий день); промивання, фарбування ДНК, аналізу (2-ий день). В якості контролю використовують клітини з стабільною довжиною теломер. Рекомендується гіпотриплоїдні клітини лінії K-562. При аналізі порівнюють зразки, які гібридизуються із зондом PNA, міченим FITC, що демонструють флуоресцентний сигнал по FL1, який вищий, ніж фоновий / аутофлуоресцентний сигнал, отриманий від зразків таких самих клітин, але гібридизованих за допомогою гібридизаційного розчину без зонду. Аналіз проводять у режимі dot plot : FL1–H/ FL2–H. Робочі регіони відокремлюють для дослідних клітин

(лейкоцити людини) та контрольних (К-562) клітин у фазі G0/1. Відносна довжина теломер (RTL) розраховують за формулою 1:

Формула 1

$$RTL = \frac{\left(\frac{\text{середнє значення FLI у дослідних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FLI у дослідних клітин без PNA зонду}}{\text{середнє значення FLI у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FLI у контрольних клітин без PNA зонду}} \right) \times 100$$

Багаторічні дослідження відносної довжини теломер у лейкоцитах ПК, які проведені у ННЦРМ, підтвердили припущення про взаємозв'язок між змінами довжини теломер та дозою радіації у віддаленому періоді після опромінення (табл. 6).

Таблиця 6. Відносна довжина теломер у лейкоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення, (M ± SD)

В умовних одиницях

Показник	Групи обстеження		
	Контроль (n=21)	УЛНА на ЧАЕС	
		0,64 < D ≤ 500 мЗв (n=39)	D ≥ 500 мЗв (n=12)
RTL	17,22 ± 1,70	15,57 ± 3,63	15,47 ± 2,02*

* p ≤ 0,01 порівняно з контрольною групою.

Радіаційно-індуковане зниження довжини теломер лейкоцитів визначали після гострої променевої хвороби, опромінення у дозах понад 500 мЗв, та меншою мірою, в інших групах постраждалих. Скорочення теломер ділянок хромосом може бути сигналом для запуску клітинного старіння. Наявність реплікативного старіння призводить до зниження ефективності системи, яка детектує пошкодження ДНК та бере участь у репарації геномної ДНК. Подібні порушення системи відновлення ДНК у віддаленому періоді після опромінення можуть призводити до

патологічних станів, таких як злоякісна трансформація, і бути ознакою геномної нестабільності в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення. Проведені дослідження експресії генів-регуляторів довжини теломер-теломеразного комплексу *TERT*, *TERF1*, *TERF2* у лейкоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС (рис. 6).

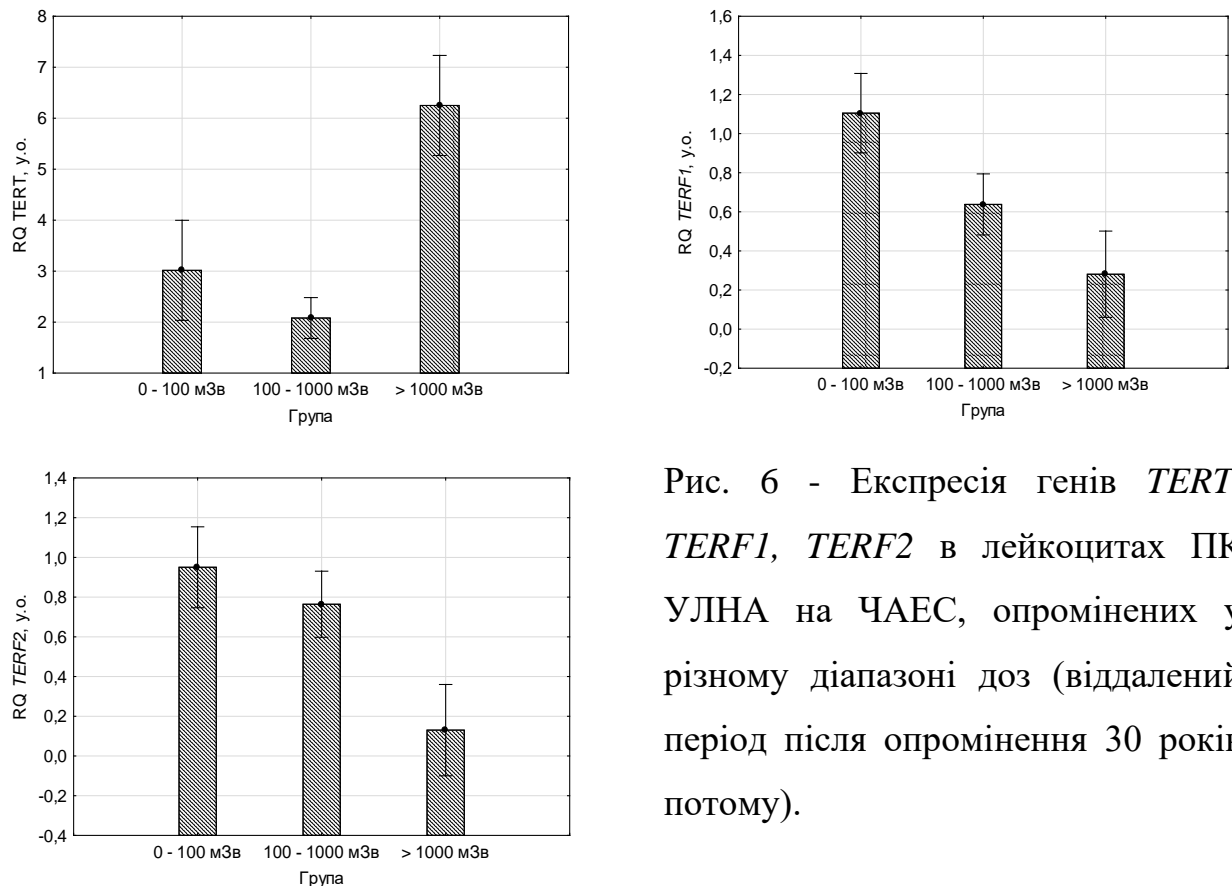


Рис. 6 - Експресія генів *TERT*, *TERF1*, *TERF2* в лейкоцитах ПК УЛНА на ЧАЕС, опроміненних у різному діапазоні доз (віддалений період після опромінення 30 років потому).

Факторами, що змінюють залежність від дози, є наявність соматичної та психосоматичної патології, підвищення експресії гена *TERT*, який кодує теломеразну зворотню транскриптазу. Радіаційно-індуковане пригнічення експресії генів-інгібіторів теломерази *TERF1*, *TERF2* в лейкоцитах, що виявляється у віддаленому періоді після опромінення, може ініціювати активацію механізмів передчасного реплікативного старіння лейкоцитів, а за умов гіперекспресії гена *TERT* – бути фактором клітинної трансформації.

ВИСНОВКИ

1. Впровадження сучасних молекулярних технологій дозволяє запропонувати новітні біологічні маркери дози опромінення, впровадження яких дозволить підвищити ефективність біологічної дозиметрії та ідентифікації радіаційних ефектів в інтервалі малих доз та потужностей дози, у тому числі при опроміненні у професійних лімітах. За результатами досліджень ННЦРМ та світового досвіду розроблено рекомендації щодо впровадження функціональних біологічних маркерів - експресії генів, довжині теломер, а також вмісту внутрішньоклітинних протеїнів, які приймають участь в епігенетичній регуляції ядерних процесів - транскрипції, реплікації та репарації.

2. У віддаленому періоді після опромінення біологічними маркерами доз до 100 мЗв є зміни експресії генів *MKNK2*, *TERF1*, *TERF2*, *DDB2*, *TGFBR1*, *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN1B* та відносної довжини теломер; у дозовому інтервалі від 100 до 500 мЗв – експресії генів *TERF1*, *TERF2*, *BRCA1*, *FKB1*, *NFKB2*, *MAPK14*, *TGFBR1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, відносної довжини теломер та спонтанної експресії протеїну Cyclin D1; у дозах понад 500 мЗв – експресії генів *TP53*, *BAX*, *BIRC5*, *FASL*, *MADD*, *TERF2*, *TERT*, *BRCA1*, *DDB2*, *NFKB1*, *MAPK14*, *GFBRI*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *MCF2L*, *IFNG*, *IL1B*, *CLSTN2*, *STAT3*, відносної довжини теломер та експресії гістону гамма-H2AX.

3. Після професійного опромінення у дозах, що не перевищують встановлених лімітів рекомендується застосування біологічних маркерів - експресії генів *BRCA1*, *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *VEGFA*, відносної довжини теломер, спонтанної експресії протеїну Cyclin D1 та гістону гамма-H2AX. Після професійного опромінення у дозах понад 35 мЗв, рекомендується застосування біологічних маркерів - експресії генів *TP53*, *DDB2*, відносної довжини теломер, спонтанної експресії протеїну Cyclin D1 та гістону гамма-H2AX.

4. Рекомендовані біологічні маркери є доповненням до існуючих цитогенетичних методів оцінки дози у ранньому періоді після опромінення та альтернативою їм при хронічному опроміненні у професійних лімітах, або у віддаленому періоді після опромінення, коли більшість існуючих цитогенетичних методів демонструють недостатню ефективність.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Базика Д. А., Ільєнко І. М. Зв'язок генної регуляції довжини теломер, клітинної проліферації та апоптозу з дозою опромінення у віддаленому періоді після Чорнобильської катастрофи. *Журнал Національної академії медичних наук України*. 2016. Т. 22, № 2. С. 123–134.
2. Бебешко В. Г., Базыка Д. А., Логановский К. Н. Биологические маркеры ионизирующих излучений. *Український медичний часопис*. 2004. Т. 1, № 39. С. 85–104.
3. Ільєнко І. М. Генна регуляція апоптозу, проліферації та старіння імункомпетентних клітин людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення : автореф. дис. ... д-ра біол. Наук. Київ, 2016. 38 с.
4. Ільєнко І. М., Базика Д. А. Особливості генної регуляції довжини теломер у лімфоцитах периферичної крові людини у ранній та віддалений періоди після опромінення. *ScienceRise*. 2016. Т. 3, № 1. С. 6–14.
5. Amundson S. A., Grace M. B., McLeland C. B., Epperly M. W., Yeager A., Zhan Q., Greenberger J. S., Fornace A.J. Jr. Human In vivo Radiation - Induced Biomarkers Gene Expression Changes in Radiotherapy Patients. *Cancer Res*. 2004. Vol. 64. P. 6368–6371.
6. Barnard S., Ainsbury E. A., Al-hafidh J., Hadjidekova V., Hristova R., Lindholm C., Monteiro G. O., Moquet J., Moreno M., Robler U., Thierens H., Vandevoorde C., Vral A., Rothkamm K. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEW. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015. Vol. 164. P. 265–270.
7. Bazyka D. A., Loganovsky K. M., Ilyenko I. M. Gene expression, telomere and cognitive deficit analysis as a function of Chernobyl radiation dose and age: from in utero to adulthood. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol*. 2015. Vol. 20. P. 283–310.
8. M'kacher R., Girinsky T., Colicchio B., Ricoul M., Dieterlen A., Jeandidier E., Heidingsfelder L., Cuceu C., Shim G., Frenzel M., Lenain A., Morat L., Bourhis J., Hempel W., Koscielny S., Paul J., Carde P., Sabatier L. Telomere shortening: a new prognostic factor for cardiovascular disease post-radiation exposure. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015. Vol. 164. P. 134–137.
9. Shimura T., Fukumoto M., Kunugita N. Nuclear accumulation of cyclin D1 following long-term fractionated exposures to low-dose ionizing radiation in normal human diploid cells. *Cell Cycle*. 2014. Vol. 13, No. 8. P. 1248–1255.
10. Zeegers D., Venkatesan S., Wen Koh Shu, Kah Mun Low Grace, Srivastava P., Sundaram N., Sethu S., Banerjee B., Jayapal M., Belyakov O., Baskar R., Balajee A., Prakash Hande M. Biomarkers of Ionizing Radiation Exposure: A Multiparametric Approach. *Genome Integr*. 2017. Vol. 8, iss. 1. P. 6.