

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В.А. Вінніков

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

Біомаркери радіаційного опромінення: короткий огляд. II. Транскриптоміка

Biomarkers of radiation exposure:
a short review.
II. Transcriptomics

Аварії на атомних електростанціях унаслідок людських помилок (Чорнобиль, 1986 р.) або стихійного лиха (Фукусіма, 2011 р.), порушення правил використання джерел радіації у промисловості, інциденти в радіологічній практиці і високімовірні ядерні терористичні атаки в місцях з високою щільністю населення — все це може призвести до опромінення від однієї особи до кількох десятків тисяч людей, які не мають при собі засобів індивідуального дозиметричного контролю. За таких умов медичне забезпечення потерпілих — тріаж, лікування радіаційних синдромів, профілактичні заходи та епідеміологічна оцінка ризику стохастичних ефектів — повинно ґрунтуватися на інформації, що постається біологічними показниками — маркерами радіаційного впливу [1–4].

Дія іонізуювальних випромінень спричиняє широкий спектр біохімічних, молекулярних, клітинних і тканинних ефектів, і тому перелік запропонованих біомаркерів є різноманітним і охоплює пошкодження ДНК, активовані елементи внутріклітинної системи глобальної відповіді на опромінення, інші модифіковані білки, сигнальні молекули, метаболіти і продукти клітинного розпаду, морфологічні зміни у клітинах і кількісні зміни співвідношення клітинних популяцій у тканинах [5]. Проте добре відомо, що майже всі активні клітинні відповіді та реакції відбуваються через посилення чи зниження рівня експресії відповідних генів. Тому одним з провідних напрямів розробки біомаркерів опромінення зараз є ідентифікація генів радіаційної відповіді та вимірювання їх активності за змінами вмісту мРНК.

Завдяки впровадженню високотехнологічних і високопродуктивних методик біохімічного і молекулярного аналізу в останні 10 років у біології та медицині відбулася «омікова революція», яка полягає у можливості одночасного визначення всіх якісних і кількісних змін у складі молекул певного класу. У випадку аналізу мРНК «оміковий» підхід має назву «транскриптоміка». Його застосування одразу ж показало, що радіаційний вплив викликає в клітинах людини істотні зміни профілю експресії генів, і це можна використовувати на практиці з метою біологічної дозиметрії. Більше того, з'ясувалося, що значна частина модуляції генів опосередковує невідомі механізми та непередбачувані процеси, що відкрило нові фундаментальні аспекти променевої патології.

Метою даного циклу оглядів є узагальнення відомостей про сучасні підходи до оцінки радіаційно-індукованих ефектів у людини за допомогою біомаркерів і представлення тих методів детекції опромінення, які пройшли апробацію чи вважаються перспективними у прикладній радіобіології. Для цього було проведено аналіз матеріалів спеціалізованих радіобіологічних форумів і повнотекстових версій статей з міжнародних англійських наукових журналів, відібраних за результатами пошуку в інформаційній базі PubMed і перехресними посиланнями. Перший огляд було присвячено усталеним біомаркерам опромінення і розвитку біодозиметрії за рахунок впровадження мультипараметричного підходу [5]. У цій роботі представлені радіаційні біомаркери, що створюються на основі вимірювання транскрипційної активності генів.

Вибір генів радіаційної відповіді та способи оцінки їх активності

При пошуку потенційних біомаркерів опромінення у вигляді продуктів експресії генів — транскриптів — існує дві стратегії:

1. Оцінка змін рівня експресії тих генів, що кодують учасників відомих процесів і механізмів відповіді на вплив іонізуючої радіації — репарацію ДНК, регуляцію клітинного циклу, сигналінг, апоптозі т.ін. Існують роботи з вимірюванням експресії одного, двох чи трьох обраних генів радіаційної відповіді [6–10]. Кількісні зміни у виході транскриптів визначають методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (*real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR*) із застосуванням відповідних праймерів до транскриптів генів-мішеней. У такий спосіб можна оцінювати експресію будь-яких відомих генів радіаційної відповіді. Проте, невідомі гени залишаються поза увагою, що обмежує інформативність цього підходу.

2. Визначення глобальної картини реакції значної частини всього геному шляхом одномоментного скринінгу мРНК кількох тисяч (до 30–40 тис.) генів за допомогою технології мікронаборів (*microarrays*). Метод полягає у тому, що з клітин виділяють мРНК, яку ампліфікують і перетворюють на комплементарну РНК або ДНК з одночасним флуоресцентним міченням ціаніном-3 (Cy3, зелена флуоресценція) і ціаніном-5 (Cy5, червона флуоресценція), причому одну мітку використовують для мРНК з опроміненого зразка, а іншу — для мРНК з референтного неопроміненого контролю. Отриманий продукт наносять на предметне скло з підготовленим мікронабором олігонуклеотидів від кількох тисяч генів, і після гібридизації здійснюють аналіз на лазерному сканері. Зміни експресії генів вимірюють за співвідношенням інтенсивності флуоресценції різних кольорів (Cy5/Cy3 або Cy3/Cy5), де знаменником є значення в неопроміненому контролі. В результаті виникає специфічний профіль — певна картина співвідношення транскриптів генів зі збільшеною, зменшеною і незміненою експресією.

Після встановлення переліку генів-відповідачів починається копітка робота з генної онтології — встановлення ролі і місця кожного транскрипта в реалізації радіаційно-індукова-

них ефектів: чи це є участь у радіаційно-специфічному і додозалежному процесі, чи в загальній, неспецифічній стресовій або сигнальній реакції, чи щось інше. Інколи функція і причини модуляції якогось гена залишаються нез'ясованими, але це не є перешкодою для його включення до панелі транскриптомної відповіді на опромінення. Недоліком такого підходу є дуже великий обсяг даних, отримуваних при аналізі навіть одного зразка, через що підвищується ризик хибно-позитивного результату. Багато генів, що змінюють рівень експресії, не є безпосередньо задіяними в механізмах радіаційної відповіді, тим самим формують «шум» і забруднюють картину.

Слід одразу зазначити, що встановлення залежності «доза — ефект» у транскриптоміці за дії будь-якого фактора, зокрема радіаційного, принципово розрізняється при вищевказаних методах вимірювання. Мікронабори дозволяють отримати специфічний профіль, що відповідає конкретній дозі і жодній іншій (бінарний підхід, «так чи ні»). Для класичної оцінки градієнтного підвищення рівня експресії при зростанні радіаційної дози використовують метод RT-qPCR. Якщо проводити аналогію з військовою технікою, то співвідношення між мікронаборами і RT-qPCR є таким, як між фугасною бомбою і снайперською гвинтівкою: перша має малу селективність при великій потужності і значному радіусі ураження, а друга уособлює високу точність при обмеженому переліку цілей. Але обидві є ефективними при правильному застосуванні, і, як це часто буває, оптимальною стратегією став компромісний гібрид між цими двома підходами (застосований, наприклад, у праці [10]). Зараз стандартна схема транскриптомного дослідження виглядає так: спочатку мікронабори, потім — валідація відповіді найкращих кандидатних генів за допомогою RT-qPCR.

Для отримання надійного транскриптомного «підпису» слід визначати профіль експресії значної кількості генів, щоб не пропустити чогось важливого і не зашкодити чутливості методу, але ця кількість не має бути надто великою, щоб радіаційно-індукований ефект не загубився на фоні «шуму». Такий баланс досягається за допомогою біоінформатики та спеціальних обчислювальних методів: аналізу головних компонент, ієрархічної кластеризації, самовпорядкованих

map [11]. При створенні прикладних систем, призначених для ідентифікації і класифікації опромінених зразків за використання мікронаборів, застосовують такі математичні алгоритми, як *Supporting Vector Machine classification (SVM)*, «К-найближчий сусід» (*the K-nearest neighbor, KNN*), перехресна валідація з викиданням одного елемента (*leave-one-out cross validation, LOOCV*) і навчання на обмеженій (пілотній) вибірці з подальшим тестуванням в основній групі. Статистична методологія радіаційної транскриптоміки постійно вдосконалюється [12].

Фундаментальні аспекти радіаційної транскриптоміки

За останні 10 років у світі було проведено багато експериментальних робіт, спрямованих на визначення радіаційно-індукованих змін профілю експресії генів у різних тканинах і клітинних тест-системах, зі встановленням залежності цих змін від поглиненої радіаційної дози і часу, що минув після опромінення, а також з аналізом ролі продуктів цих генів у пострадіаційних процесах [10–34]. Завдяки цьому було відкрито багато нових елементів системи відповіді на радіаційний вплив: процесингу пошкодження ДНК, проведення сигналів, затримки клітинного циклу, апоптозу, мітотичної загибелі клітин, трансформації, утворення мутацій чи нестабільності геному.

Стало відомо, що першою транскрипційною подією після опромінення є швидка активація генів системи сигнальних шляхів, продукти яких викликають зміни експресії відповідних генів-мішеней: регуляції клітинного циклу, факторів росту, цитокінів, трансформації, апоптозу, репарації ДНК, метаболічних циклів. З'ясувалося, що радіаційно-індуковані зміни профілю експресії генів можуть істотно відрізнятися в нормальних клітинах і клітинах пухлин, у різних нормальних тканинах, а в межах однієї тканини — між гістотипами і субпопуляціями клітин [16, 17, 21, 22, 28–30, 33].

Наприклад, транскриптомна відповідь у лімфоцитах, які перебувають у фазі G_0 , мають розвинути систему цитокінового сигналіngu і високу схильність до апоптозу, буде значно відрізнятися від картини у фібробластах, що проліферують, спілкуються через міжклітинні контакти і мають помірну активність апоптотичних шляхів. Так, у

дослідженні на нестимульованих G_0 -лімфоцитах серед генів, які активувалися у відповідь на опромінення, визначили кілька генів цитокінів і факторів росту, сигналіngu у відповідь на стрес і репарації ДНК [13]. У субпопуляції CD4+ лімфоцитів після дії ікс-проміння було виявлено підвищення активності у 2,5–3 рази за 3 генами внутріклітинних сигнальних каскадів, 2 генами клітинної проліферації, 2 генами фосфатного метаболізму і 2 генами модифікації білків, а активація більш ніж у 3 рази відбулася за 4 генами апоптозу, 4 — регуляції клітинного циклу і 3 генами репарації ДНК [22]. У дослідженні [11] у фібробластах людини після опромінення найбільш репрезентативними групами активованих генів були 6 генів регуляції клітинного циклу, внутріклітинних сигналів та апоптозу і 9 генів зовнішньоклітинних процесів і міжклітинного спілкування, а серед генів, що замовкли, 7 відповідали за підготовку і здійснення мітозу, і 7 — за міжклітинне спілкування. Цікаво, що при цьому не виявлено змін активності генів системи репарації ДНК. В експерименті з інкорпорацією $5\text{-}^{125}\text{I}\text{-}2'$ -деоксіуридину в культуру клітин шкіри (фібробласти, кератиноцити) спостерігали індукцію генів протеїнказнавої активності, регуляції клітинного циклу та апоптозу (зокрема, негативної регуляції клітинного циклу через контрольні точки); при цьому замовкали гени цитокінів, мітотичної фази клітинного циклу, хромосомної архітектури, метаболізму ДНК, пакування ДНК, репарації ДНК і відповіді на ушкодження ДНК [34].

У літературі мають місце значні розбіжності в оцінках таких базових параметрів, як кількість генів радіаційної відповіді та напрямок їх модуляції. Так, у фібробластах людини після опромінення зростала експресія 26 і знижувалася активність 27 генів [11]. У дослідженні на нестимульованих (G_0) лімфоцитах науковці встановили, що у відповідь на радіаційний вплив активуються 46 генів, а 7 — замовкають [13]. В експерименті з інкорпорацією $5\text{-}^{125}\text{I}\text{-}2'$ -деоксіуридину в культуру фібробластів і кератиноцитів співвідношення активованих і репресованих генів становило 11:16, 33:16 і 164:171, залежно від гістотипу клітин [34].

Одним із джерел цієї варіабельності є зміни профілю експресії генів з плином часу після

опромінювання. У деяких роботах знаходили розширення спектра модульованих генів на шкалі «час–ефект», в деяких — навпаки, зменшення їх кількості, а в одному випадку — взагалі хвилеподібну динаміку цього параметра [35]. Ситуація ускладнена тим, що кінетика кількості генів-відповідачів із часом істотно відрізняється у різних тканинах, а в межах однієї тест-системи — проявляє варіабельність при різних термінах культивування клітин і різних дозах опромінення [13–18, 23, 29, 36].

Наприклад, у дослідженні на клітинах мієлоїдної лімфоми показано, що після γ -опромінення в дозі 0,2 Гр через 3 год активується 86 генів, через 24 год — 114 генів, з них 33 — ті самі, що й в раніший термін; після опромінення в дозі 10 Гр через 3 год зростає експресія тільки 46 генів, але 15 з них є спільними для всіх сценаріїв [14].

У лінії лімфобластів людини після γ -опромінення в дозах 0,05 — 10 Гр кількість генів-відповідачів на різних дозових точках варіювала від 43 до 245, що становило 0,5–2,0% від загальної кількості опрацьованих генів (понад 14000) у мікронаборі [37]. На кожній дозовій точці науковці виявили 20–30 активованих генів, а кількість генів зі зниженою експресією становила 18–62 при низьких та помірних дозах і сягала 219 при дозі 10 Гр.

Слід підкреслити, що і кількість модульованих генів, і співвідношення кількості генів зі збільшеною і зменшеною активністю є дуже суб'єктивними показниками, оскільки у різних випадках встановлювали неоднакові пороги значущості змін: дехто вважав достатніми зміни у 1,5 разу відносно неопроміненого зразка [11], інші підвищували поріг до відмінності в три рази від контролю [25].

Залежність «доза–ефект» для ступеня активації генів за даними RT-qPCR зазвичай описують лінійною функцією [10, 13, 36, 38], хоча деякі результати можна інтерпретувати як логарифмічну залежність із сатурацією при дозах γ -випромінення понад 1 Гр [8]. Найнижча доза випромінення, яка підлягає детекції, при використанні мікронаборів варіює, за різними оцінками, від 0,2 до 0,05 Гр [9, 14, 15, 28, 37, 39], а вірогідні зміни активності окремих генів можуть бути вловлені кількісно при дозі γ -випромінення 0,02 Гр [27].

До тверджень про ексклюзивність реакції окремих генів на вплив радіації слід ставитися обережно, оскільки переліки модульованих генів за дії різних ДНК-ушкоджувальних агентів значною мірою перекриваються. Так, бромат калію, пероксид водню та ультрафіолет здатні викликати в клітинах зміни експресії саме тих груп генів, що, як і за дії радіації, відповідають за підтримку стабільності геному та загальну реакцію на окиснювальний стрес [19, 40]. Проте, специфічність цілісного транскриптомного профілю (у складі від десятків до тисяч генів) до дії променевого чинника може переважити вплив таких факторів, як гістологічний тип клітин та їхній p53-статус, і тому радіаційні «біопідписи» для нормальних і пухлинних клітин значною мірою схожі між собою та чітко відрізняються від картини за дії інших фізичних і хімічних генотоксинів [17].

Тест-системи і кандидатні гени для транскриптомної дозиметрії

Переважну більшість переліків генів радіаційної відповіді було отримано в експериментах на трансформованих клітинних лініях, рідше — на нормальних клітинах, і тільки в одиничних випадках вони були верифіковані *in vivo*. Зараз вже можна впевнено констатувати, що пострадіаційний профіль експресії генів має власні особливості в кожній тест-системі.

Найбільше експериментів з радіаційної транскриптоміки непухлинних клітин людини на сьогоднішній день виконано на фібробластах і кератиноцитах шкіри [11, 19, 25–27, 34, 35, 41–49]. У цих працях було виявлено зміни активності генів p53-регульованої відповіді на ушкодження ДНК, регуляції клітинного циклу і проліферації, різних елементів системи репарації ДНК, метаболізму ДНК, апоптозу, відповіді на окиснювальний стрес і перехоплення вільних радикалів, металопротеїназного і цитокіно-хемокінового сигналіngu та перебудови позаклітинного матриксу. Заслуговує на увагу праця [49], у якій у культурі фібробластів визначили транскрипційний профіль, що дозволив чітко відрізнити зразок через 6 дб після γ -опромінення в дозі 0,5 Гр від неопроміненого контролю.

Існує цикл досліджень радіаційного біопідпису у фібробластах після опромінення *in vivo* [50, 51]. У біопсійних зразках шкіри людини через

3 години після опромінення в дозах 10, 100 і 1000 мГр в умовах променевої терапії (ПТ) раку простати було встановлено зростання рівня експресії генів груп BCL6, цитокінів, мітоген-активованих протеїнази і цинкових пальців; водночас зі зниженням активності груп генів кератинів, протеїн-дисульфід-ізомераз і S100 [50]. Показано дозозалежну активацію груп генів, що мали ключову роль у регуляторних шляхах: інсуліновому/факторів росту, TGF- β /циклін/убіквітинівому, Akt/фосфоінозитид-3-кіназному, запальному, стресу/апоптозу. Виявлені ефекти мали достатньо високу міжіндивідуальну варіабельність. Науковці підкреслюють, що цю картину змін транскриптому було отримано в нормальних фізіологічних умовах, зі збереженням тривимірної архітектури судин і міжклітинних контактів між епітеліальними і стромальними клітинами. У продовженні цієї роботи на таких самих пацієнтах вивчали динаміку змін транскриптому в часі [51]. Встановлено, що протягом 24 год після опромінення в низьких дозах поступово зникає первинно-індукована модуляція груп генів цинкових пальців, кератинів, циклінів, білків теплового шоку, інтерлейкінів, S100 і TNF. У поєднанні з даними «доза–ефект» це дало комплексний біопідпис, який виконавці роботи запропонували для біодозиметрії, ігноруючи відзначений ними ж факт високої міжіндивідуальної варіабельності транскриптомної відповіді. Цілком зрозуміло, що досить травматичний спосіб отримання матеріалу і технічно складна процедура культивування виключають можливість широкого використання фібробластів у клінічній практиці.

Значно краще для транскриптомної біодозиметрії у людини підходять лімфоцити крові. В цій тест-системі одним з найінформативніших виявився GADD45a — ген затримки клітинного поділу, індукованої пошкодженням ДНК, який разом із p53 відіграє важливу роль у підтримці стабільності геному [7, 8, 52]. До цієї ж групи генів радіаційної відповіді, що так само регулюються p53, належать: ген DDB2 субодиниці p48 в ХРЕ — білка репарації УФ-індукованих пошкоджень ДНК, ген CDKN1A (також відомий як CIP1/WAF1 чи p21) інгібітора циклін-залежної кінази, ген FDXR ферредоксин-редуктази, ген ХРС комплементарної групи С пігментної ксеро-

дерми, ген BCC3 bcl2-зв'язувального компонента 3 В-клітинної лімфоми і ген SESN1 сестрину 1 [8, 52]. На відміну від транскриптома опромінених клітинних ліній, картина експресії у нестимульованих G₀-лімфоцитах майже не містить зниження активності генів регуляції клітинного циклу. На додаток до вищезазначених генів, що підлягають регуляції з боку p53, кількісні зміни експресії в G₀-лімфоцитах людини були показані за допомогою RT-qPCR для генів Haras [6], BAX і BCL2 та співвідношення їх транскриптів [7, 8], TRAIL рецептора 2 (індукція апоптозу), DRAL (також відомого як FHL2, родина малих ГТФаз), циклінового білка і цикліну G (регуляція клітинного циклу) [36]. В експерименті з γ -опроміненням лімфоцитів людини у низьких дозах — від 50 до 500 мГр — виявлено дозозалежне зниження (!) активності двох генів системи репарації ДНК — hOGG1 та XRCC1 [9].

Було запропоновано платформу RadChip із 384 генів радіаційної відповіді, яка начебто є універсальною для різних типів пухлинних і непухлинних клітин людини (зокрема лейкоцитів крові) і дозволяє відрізнити при кластерному аналізі зразки після γ -опромінення від підданих дії цисплатину, доксорубіцину чи ультрафіолетового проміння [17].

У циклі експериментів [38, 53–55] було досліджено пострадіаційні зміни транскриптома лімфоцитів людини у ранні терміни — протягом перших 2 год після дії γ -променів чи α -часток ²¹¹At за схемою «мікронабори плюс валідація за RT-qPCR». За сукупністю, найкращими відповідями на дію рідко- та щільноіонізувального випромінювання (навіть із наявністю певної кореляції з поглиненою радіаційною дозою) виявилися гени BCC3, CDKN1A, GADD45A, EGR1 (рання відповідь росту 1), EGR4 (рання відповідь росту 4), IFN- γ (інтерферон- γ), c-JUN (онкоген jun), MDM2 (мишачий подвійний мінит 2), TNFSF9 (член 9 суперсім'ї фактора некрозу пухлин), DUSP8 (ген фосфатази подвійної специфічності), ISG20L1 (20 кДа-подібний ген інтерферон-стимульованої екзонуклеази) і PCNA (антиген ядер клітин, що проліферують). Попри безсумнівну теоретичну значущість цих даних, їх цінність для практичної біодозиметрії обмежена внаслідок замалого інтервалу часу після опромінення. Крім того, на думку самих науковців [38]

міжіндивідуальна варіабельність виходу означених транскриптів у клітинах різних донорів була надто високою, щоб дані RT-qPCR можна було використовувати для кількісної оцінки дози.

Важливим аспектом в оптимізації транскриптомної тест-системи стало порівняння радіаційно-індукованих біопідписів у різних субпопуляціях лімфоцитів. У праці [22], отримавши перелік генів радіаційної відповіді у субпопуляції CD4+ лімфоцитів через 8 год після дії ікс-проміння в дозі 1 Гр *in vitro*, автори провели порівняння експресії трьох найкращих відповідачів — BAX, DDB2 і TNFRSF10B — методом RT-qPCR у субпопуляціях CD4+, CD8+, CD19+, CD56+ і загалом у всіх лімфоцитах від 10 донорів. Радіаційно-індуковані зміни активності DDB2 були подібними між досліджуваними субпопуляціями клітин, проте серед CD56+ визначався найнижчий, а в CD8+ і CD19+ — найвищий ступінь активації TNFRSF10B і BAX, і це корелювало з відомим ефектом диференціальної радіочутливості означених субпопуляцій за тестом виживаності. За висновком науковців, вимірювання активності р53-залежних проапоптозних генів селективно у субпопуляціях CD8+ і CD19+, а не в усіх лімфоцитах, може підвищити чутливість транскриптомної детекції радіаційного впливу.

У праці [28] досліджено ефект радіаційного впливу в дозах 0,05 і 0,5 Гр *in vitro* через 3 і 24 год після опромінення в субпопуляціях CD4+, CD8+ і CD56+ з крові 5 донорів. Найвиразніші зміни відбувалися через 24 год після опромінення в дозі 0,5 Гр за рівнем експресії ATM, BAX, PCNA, GADD45, DDB2 і CDKN1A. Спостерігали значні відмінності за кількістю модульованих генів між різними субпопуляціями лейкоцитів; зокрема у лімфоцитах CD4+ визначалося в 10 разів більше генів зі зниженою активністю через 3 год після дози 0,05 Гр, ніж в інших типах клітин. Як висновок, дослідники запропонували враховувати підвищену чутливість геному субпопуляції CD4+ при детекції дії радіації в низьких дозах.

Такі відмінності у транскриптомній реактивності різних субпопуляцій лейкоцитів певною мірою нагадують різницю у радіаційній індукції та кінетиці апоптозу [56] і γ -H2AX-фокусів [57] (детально проаналізовано в [1]). В огляді з радіаційної транскриптоміки [58] даний факт слушно відмічався як недолік тест-системи, оскільки

модуляція активності генів у цілісній популяції лейкоцитів периферичної крові залежатиме від поточного співвідношення різних субпопуляцій, що є достатньо варіабельним параметром. З практичного погляду, вимірювання експресії генів у якійсь одній субпопуляції клітин поки що є небажаним внаслідок технічної складності і високої вартості процедури їх виділення, що є неможливим в умовах масового скринінгу.

Окремо слід розглядати роботи на культурі лімфоцитів, стимульованих до мітотичної активності фітогемаглютиніном або в інший спосіб. Так, за даними [39], у 48-годинній культурі стимульованих лімфоцитів на трьох дозових точках — 0,1, 0,25 і 0,5 Гр γ -опромінення було знайдено 34 спільних модульованих генів. Встановлено лінійну залежність «доза–ефект» для зростання експресії генів KIF13A, RPTN1, EPB41L3 і VHC80 і зниження активності C2orf30, REV3L та BAG4. Основними функціональними групами генів-відповідачів виявилися групи регуляції каталітичної активності білків, внутріклітинного метаболізму, нуклеотид-фосфатазного зв'язування, відповіді на стрес і серин-типової ендопептидазної активності. На відміну від G_0 -лімфоцитів ці культивовані клітини, стимульовані до поділу, не мали явної кластерної активації групи генів відповіді на ушкодження ДНК і контролю клітинного циклу.

У дослідженні на гомогенній популяції неіморталізованих Т-лімфоцитів, стимульованих до клонової експансії в культурі протягом 7–9 д, було використано діапазон доз γ -випромінення 0,15–12 Гр [59]. Вірогідні дозозалежні модуляції транскрипційної активності визначалися через 3 год після опромінення — для 61 гена, через 8 год — для 512, через 24 год — для 1310 генів. Знайдено істотні відмінності у складі генів-відповідачів при дії низьких і високих доз опромінення. Спільну для всіх трьох точок часу закономірність змін експресії на шкалі «доза–ефект» проявили 37 генів. З них для практичної біодозиметрії запропоновано панель з трьох генів — CDKN1A, PSRC1 і TNFSF4, профіль експресії яких через 24 год після опромінення, що вимірювався методом RT-qPCR та був об'єднаний у лінійну регресію, давав можливість оцінювати поглинуті дози в незалежній серії експериментів із точністю 86%.

Безпосереднє порівняння транскрипційних біопідписів у лейкоцитах периферичної крові та культурі стимульованих лімфоцитів від одних і тих самих донорів після опромінення *in vitro* було проведено у праці [10], причому з використанням одразу трьох методів — мікронаборів, мультиплексної RT-qPCR та системи аналізу nCounter® — нової технології, що вможливує безпосередній підрахунок копій мРНК певного гена у зразку. В обох тест-системах спрацювали як відповідачі гени SESN1, GADD45A, CDKN1A, CCNG1, FDXR, BBC3, MDM2, FAS, FBXW2, RBM15, c-MYC, PPM1D, PLK3, BLOC1S2 та DDB2. Специфічними для тест-систем генами-відповідачами були PCNA у випадку лейкоцитів цільної крові та ATF3 (активація транскрипційного фактора 3) у випадку стимульованих лімфоцитів у культурі. Зниження активності певних генів спостерігали тільки у стимульованих лімфоцитах; такими були гени циклінів, центромірних білків і контрольних точок клітинного циклу, зокрема асоційовані з хромосомною нестабільністю і канцерогенезом. Важливо, що кількісна залежність «доза–ефект» в інтервалі доз 2–4 Гр для виходу транскриптів (зокрема для їх зниження) була майже відсутня за 2 год, але чітко проявлялася за 24 год після опромінення, тобто в критично важливий термін для отримання матеріалу для біодозиметрії в реальних умовах. Модуляція генів SESN1, GADD45A і CDKN1A залишалася вірогідною навіть по 48 год після радіаційного впливу.

При розробці транскриптомних біодозиметричних платформ на базі стимульованих лімфоцитів можуть стати у пригоді переліки кандидатних генів, отриманих у дослідженнях на лімфобластоїдних лініях [37, 40, 60, 61]. Найчисельніші функціональні групи генів радіаційної відповіді у цих працях включали апоптозний сигналінг (bcl2, BAX, GADD45a, BBC3), шлях p53 (TNFRSF10B і MDM2), регуляцію клітинного циклу (CDKN1A), репарацію ДНК (XPC, DDB2 і PCNA), антиоксидантні системи (SESN1), енергетичний метаболізм (FDXR), запалення та імунну відповідь, відповідь на стрес, метаболізм ліпідів, сигналінг редокс-чутливих транскрипційних факторів, цистеїновий/глутатіоновий метаболізм тощо. Діапазон радіаційних доз в експериментах охоплював від 0,05 до 10 Гр [37, 60],

досліджений інтервал часу після радіаційного впливу сягав 24 год [60], а заради виключення фактора міжіндивідуальної варіабельності зміни транскриптома оцінювали на лініях клітин, отриманих від 10–15 осіб поспіль [60, 61].

Як і у випадку G₀-лімфоцитів, у зазначених експериментах на стимульованих клітинах і лімфобластоїдних лініях визначалися гени, специфічно модульовані тільки при якійсь одній з використаних радіаційних доз, що вказує на їх потенційну придатність для напівкількісної (інтервальної) дозиметрії, а в комбінації з транскриптами із лінійним дозозалежним виходом дає транскрипційний профіль, придатний для уточненої кількісної оцінки дози опромінення.

Але при всій популярності тест-системи зі стимульованих лімфоцитів слід пам'ятати про такі їх вади, як висока внутрішньо- та міжіндивідуальна варіабельність кінетики поділу клітин у культурі, коли у зразках щоразу присутнє різне, непередбачуване співвідношення клітин першого, другого і подальших мітотичних циклів. Звідси виникає лабільність радіаційних маркерів. У цитогенетичній дозиметрії цьому запобігає жорстке правило обмежувати облік аберацій хромосом виключно метафазами першого пострадіаційного мітозу, що визначається за специфічним забарвленням хромосом при інкорпорації бромдеоксіуридину [62]. У межах радіаційної транскриптоміки даний аспект поки не досліджувався, способу нівелювання варіацій у швидкості клітинного циклу поки не існує, і це неодмінно вплине на відтворюваність результатів при спробі стандартизації методу.

Найбільшого прогресу в розробці прикладних біодозиметричних наборів було досягнуто на основі вимірювання експресії відносно невеликої кількості генів у нестимульованих G₀-лімфоцитах людини, відібраних за результатами профілювання 41 000 транскриптів в експериментах *ex vivo* із γ -опроміненням цих клітин у дозах від 0,5 до 8 Гр [14, 52, 63]. Найвищу точність оцінки радіаційної дози показала платформа із профілем експресії 74 генів, яка дозволила розпізнавати чотири категорії поглинених доз γ -випромінення: 0; 0,5; 2 і 5–8 Гр зі специфічністю 88–100% і чутливістю 97–100% у терміни від 6 до 24 год після опромінення [52]. Тестування показало здатність цього набору генів розпізнавати і

нижчі дози — 0,1 Гр [63]. Понад третину генів із цього набору становлять ті, що підлягають регуляції з боку TP53. Зміни експресії у відповідь на опромінення для генів CDKN1A, FDXR, SESN1, BBC3 і РНРТ1 були підтверджені методом RT-qPCR. Завдяки низькій міжіндивідуальній варіабельності радіаційно-індукованих змін експресії та їх незалежності від статі донора і звички до тютюнопаління, даний набір генів уможливає надійну інтервальну оцінку дози опромінення протягом вказаного часу без індивідуального допроменевого контролю, що є важливою перевагою з погляду практичної біодозиметрії.

Найвищу пропускну спроможність сьогодні має платформа з 14 генів радіаційної відповіді з додатковим позитивним і негативним контролем (відповідно, гени GAPDH і ANT), експресію яких вимірюють кількісним хемілюмінесцентним нуклеазахисним методом (quantitative Nuclease Protection Assay, qNPA) у зразку цільної крові об'ємом 30 мкл [64]. Дана система призначена для тріажу постраждалих внаслідок широкомасштабної аварії чи ядерного тероризму і гарантує розпізнавання інтервалів доз опромінення до 2 Гр, близько 2 Гр і близько 8 Гр; вся «мікролабораторія» (скарифікатор, реактиви, помпа, клапани, електронні чіпи) вміщена у картридж розміром із долоню людини, який можна носити на поясі. При взятті зразка крові у термін 24–48 год після опромінення результат одержується через 10–12 год шляхом зчитування на спеціальному ридері. Одна лабораторія, оснащена цим приладом, може здійснити процесинг до 200 000 зразків на тиждень, при вартості близько 7 доларів США за 1 зразок. Подальше удосконалення платформи буде спрямоване на вміщення більшої кількості генів (до 100) і досягнення точнішої кількісної оцінки поглинутих радіаційних доз у діапазоні 0,2–10 Гр.

Транскриптомна дозиметрія *in vivo*

Дослідження транскрипційних профілів у лімфоцитах людини після опромінення *in vivo* є покищо нечисельними.

Так, у транскрипційному біопідписі з лімфоцитів крові трьох працівників медичної сфери, які зазнали професійного хронічного опромінення в дозах 19–391 мЗв, при порівнянні з картиною у лімфоцитах неопромінених донорів була виявлена активація 195 генів [41]. Серед генів із відо-

мою функцією науковці виділили кілька асоційованих із клітинною відповіддю на радіаційний вплив та окиснювальний стрес: p53, TRRAP (регуляція клітинного циклу), лігаза IV (репарація ДНК), RASSF2 (індукція апоптозу/туморогенез), GPR30 (рецептор до G-білка), DNAJA1 (білок теплового шоку), MAPK8IP1 і MAPK10 (проведення сигналів). У продовженні цього дослідження, за результатами обстеження 14 радіологів із накопиченими дозами опромінення 0,7–39 мЗв було встановлено підвищення активності 21 гена і зниження рівня транскрипції 57 генів, порівняно з групою референтного контролю [65]. Для практичної індикації опромінення було сформовано перелік із 9 генів із найсильнішою активацією і 12 репресованих генів. З використанням різних математичних підходів до інтерпретації даних цей профіль дозволив класифікувати представників опроміненої та контрольної груп із точністю 91–96%.

Було обстежено групу працівників радіологічної служби одного з італійських шпиталів зі стажем роботи у радіаційній сфері 1–32 роки і накопиченими дозами опромінення 0,1–166,9 мЗв [66]. Для кожної особи було підбрано неопромінений контроль з персоналу того ж шпиталю. Профіль експресії у лейкоцитах крові опромінених осіб містив 256 модульованих генів, зокрема 156 генів — у підгрупі працівників із дозами опромінення > 2,5 мЗв. Хронічний радіаційний вплив викликав зниження активності генів метаболізму ДНК (CDK2AP1, GTF2H2, KUB3), підтримки архітектури хроматину та пакування ДНК (SIRT1 і гістони H2A, H2B, H3) і мітохондріального транспорту електронів НАДФ до убіхінону (група генів MTND). У осіб із дозами > 2,5 мЗв додатково визначалася активація генів катіонного гомеостазу — металотіонеїнів і модуляція генів програмованої клітинної загибелі, спрямована на зниження рівня апоптозу.

Через 11–13 років після аварії на ЧАЕС у лейкоцитах крові мешканців радіоактивно забруднених територій Білорусі, які зазнали хронічного опромінення в дозах 0,18–49 мЗв, було виявлено кластер модульованих генів системи цитокінової регуляції, зокрема IL1R1, IL1R2, IL2, IL2A, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL8, IL8RA, IL10, IL12A, IFN, MCP1, CSF1R, SCYA5, TNFRSF (Fas), TNF α і TGFR3 [67, 68].

Апробацію транскриптомної дозиметрії *in vivo* за дії радіації у високих дозах проведено на пацієнтах після тотального терапевтичного опромінення. Так, у групі з 5 пацієнтів з різними лімфопроліферативними захворюваннями і 3 хворих на множинну мієлому через 6 год після тотального опромінення в дозі 1,5 Гр метод RT-qPCR показав значну гетерогенність транскрипційної відповіді генів GADD45A, CDKN1A, DDB2; при цьому DDB2 не відповів на опромінення у хворих на мієлому, але перші два гени були активовані в усіх осіб порівняно з допроменевим контролем [69]. Крім того, у цих пацієнтів після опромінення було виявлено активацію (хоча й досить гетерогенну) генів FCGR1A (фрагмент Fc рецептора 1a імуноглобуліну IgG) і CXCL10 (мотив ліганду 10 хемокіну C-X-C), які не підлягали модуляції в умовах опромінення *in vitro* [13–15]. В одного хворого у праці [69] проводили дослідження після кожного сеансу ПТ протягом трьох діб (дві фракції по 1,5 Гр на добу), і при цьому спостерігали дозозалежне зростання виходу транскриптів CDKN1A, CXCL10, FCGR1A і DDB2, із тенденцією до виходу на плато при дозах > 6 Гр. За допомогою мікронаборів у цієї особи було визначено профіль транскрипції за 6 год після перших 1,5 Гр і за 18 год після сумарної дози 3 Гр. Кілька генів, зокрема гени білків теплового шоку HSPCB, DNAJA1, FKBP4, HSPA1L, ANSA1 і HSPA8 активувалися після першої фракції дози, але замовкали після другого сеансу опромінення. Також було відзначено модуляцію 23 генів імунної відповіді та запалення, що відрізняло картину після опромінення *in vivo* від профілю транскрипції, побудованого в умовах *in vitro* [13–15].

Незважаючи на це, дана група дослідників вважає побудову профілю генів радіаційної відповіді з опроміненням *ex vivo* за допомогою мікронаборів найкращою методологією для транскриптомної дозиметрії. У спеціальному дослідженні [70] такий підхід показав здатність відрізняти пацієнтів після тотального опромінення від контрольних донорів із точністю 100% і класифікувати зразки після опромінення *in vivo* в дозах 0, 1,25 чи 3,75 Гр із точністю 98%, тоді як профіль експресії генів, отриманий на тих самих пацієнтах *in vivo*, дозволяв розрізняти вказані радіаційні дози із точністю тільки 94%.

У своїй останній праці [71] ця група науковців запропонувала елегантне розв'язання проблеми кількісного визначення ефекту за тими генами, які **знижують** активність у відповідь на опромінення і тому не підлягають аналізу методом RT-qPCR, отже до цього моменту не могли бути використані у практичній біодозиметрії. Для подолання перешкоди науковці здійснили аналіз мікроРНК — малих молекул РНК, які не кодують білків, натомість регулюють експресію інших генів, зокрема знижуючи їх активність. В лімфоцитах крові 8 пацієнтів через 4 год після тотального опромінення в дозі 1,25 Гр було виявлено накопичення 45 мікроРНК, причому 27 з них — в усіх хворих. Методом мікронаборів було встановлено модуляцію 223 генів, з яких 37 мали зниження активності і водночас були мішенями для накопичених мікроРНК. За онтологією ці гени-відповідачі та їх регулятори-мікроРНК були залучені до процесів гемопоезу й імунної відповіді. На підставі ієрархічної кластеризації і багатовимірного шкалювання було створено класифікатор, який при врахуванні всіх 45 мікроРНК, залучених до радіаційної відповіді, дозволяв визначати опромінений чи неопромінений статус кодованих зразків із точністю 100%. За методологією ця робота виходить за межі транскриптоміки і є прикладом **інтерактоміки**, оскільки ґрунтується на вимірюванні молекулярних взаємодій.

У дослідженні [72] було визначено профіль експресії генів у лейкоцитах крові 27 пацієнтів з онкопатологією через 6 год після тотального терапевтичного опромінення у дозах 1,5–2,0 Гр, для яких контроль складався з 18 здорових донорів і 33 пацієнтів до опромінення (зокрема 20 — обстежених після радіаційного впливу). Як результат, було складено перелік із 25 генів радіаційної відповіді *in vivo*; вимірювання їх транскриптів дозволило ідентифікувати опромінених осіб із точністю 90% (чутливість 85%, специфічність — 94%). У межах групи індивідуальної динаміки правильна класифікація опромінених і неопромінених зразків відбулася, відповідно, у 85 і 90% випадків. Дослідники зазначили, що їх перелік генів радіаційної відповіді за єдиним винятком — ген білка 2, що зв'язується з пошкодженнями ДНК, — не збігався із запропонованим на підставі обстеження одного пацієнта у цито-

ваній вище праці [69]. Причиною розбіжностей було визнано різні мікронабори, якими користувалися дослідники.

За даними експериментальної частини дослідження [72], виконаної на мишах, метод RT-qPCR не показав чіткої закономірності «доза–ефект» для активності генів радіаційної відповіді у межах профілів, специфічних для поглинутих доз 0,5, 2 і 10 Гр. Висловлено думку, що при зростанні радіаційної дози не відбувається поступової, односторонньої модуляції певних генів, натомість різні інтервали поглинутих доз викликають унікальні, специфічні ієрархії транскрипційних подій (цей постулат знаходить все більше підтверджень у незалежних експериментах, наприклад, [37, 59, 60]). Цікаво, що за «миша-чим» профілем транскрипції після опромінення в дозі 10 Гр (із конвертацією в перелік гомологічних генів людини) зразки від здорових донорів були ідентифіковані з точністю 100 %, а від неопромінених пацієнтів — з точністю 61 % [72].

У продовженні даного циклу досліджень були представлені результати обстеження 18 здорових донорів, 36 онкопацієнтів до опромінення, 34 — після тотального опромінення в дозах 1,5 чи 2,0 Гр, 36 — до хемотерапії та 32 пацієнтів після хемотерапії (на базі алкілаторних агентів) [73]. З'ясувалося, що профіль експресії 25 генів радіаційної відповіді у лейкоцитах дозволяє класифікувати опромінених онкохворих із точністю 91 %, здорових донорів і неопромінених пацієнтів — із точністю 100 %, хворих до і після хемотерапії (як неопромінених) — відповідно, з точністю 89 і 75 %. При цьому два пацієнти після хемотерапії, помилково класифіковані як опромінені, насправді проходили в минулому курс променевого лікування.

У клітинах крові пацієнтів до і після хемотерапії був побудований профіль експресії генів, специфічний для даного виду лікування. Перелік генів-відповідачів за хемотерапії не перекривався із переліком генів радіаційної відповіді і давав точність ідентифікації 81 % для нелікованих пацієнтів і 78 % — для тих, які отримали хемотерапію. Щодо інших груп, то «постхемотерапевтичний» профіль експресії дозволив правильно визначити статус «нелікованих» у 100 % здорових осіб, 92 % — до радіаційного впливу і 62 %

пацієнтів після сеансу ПТ. Але з'ясувалося, що всі 12 опромінених хворих, яких було неправильно класифіковано як «лікованих», насправді отримали курс комбінованої хемотерапії за рік до обстеження.

В умовах експерименту на мишах було встановлено, що профілі експресії генів у лейкоцитах крові після опромінення в дозах 0,5, 2 і 10 Гр дозволяють правильно класифікувати дозову групу через 6 і 24 год, а за доз 0,5 і 2,0 Гр — навіть через 7 діб після радіаційного впливу [73]. Проте склад генів радіаційної відповіді виявився мінливим з плином часу: загальний перелік містив менше 20 % спільних генів для точок часу 6 год, 24 год і 7 діб. У практичному аспекті це вказує на необхідність побудови одразу кількох транскриптомних профілів у координатах «доза–час–ефект» для забезпечення достатньої інформативності біодозиметрії.

Іншим обмеженням стала повна неможливість безпомилкової ідентифікації нерівномірного і локального опромінення за профілем генів-відповідачів, отриманим в умовах тотального опромінення, що було встановлено в експерименті на мишах [74]. Самі ж по собі профілі експресії генів при різних сценаріях нерівномірного радіаційного впливу показали здатність розрізняти дози опромінення 0,5, 2 і 10 Гр у межах одного сценарію із точністю не вище 60 %, а розрізняти локалізацію опромінення при одній і тій самій дозі з точністю не вище 43 %. Ці бентежні дані свідчать про потребу масштабних досліджень експресії генів *in vivo* за різної анатомічної локалізації опромінення, щоб досягти надійної детекції нерівномірного радіаційного впливу у разі аварійного контакту з променевим чинником.

У праці [75] представлено перелік із 46 генів радіаційної відповіді, що визначався за аналізом літератури і власних даних дослідників. Щонайменше у двох незалежних дослідженнях було знайдено радіаційну модуляцію для генів ACTA2, BAX, BBC3, BTG2, CCNG1, CDKN1A, DDB2, FDXR, GADD45A, HSPE1, PCNA, PPM1D, TP53I3, TNF α та XPC. У власному спостереженні науковці [75] оцінили експресію означених 46 генів-відповідачів методом RT-qPCR у лейкоцитах крові 4 пацієнтів із гострим мієлоїдним лейкозом до опромінення, через 5 год після дози тотального опромінення 2 Гр, через 17 год після

другого сеансу (сумарна доза 4 Гр) і ще через 18 год після четвертого сеансу (сумарна доза 8 Гр). Радіаційну індукцію спостерігали для 8 генів — ACTA2, BBC3, CCNG1, GADD45A, CDKN1A, MDK, SERPINE1 і TNFRSF10B, причому для останніх чотирьох із них — із вірогідним лінійним накопиченням мРНК впродовж курсу ПТ. При верифікації цієї панелі генів радіаційної відповіді в експерименті на мишах з'ясували, що найточнішу класифікацію дози (0, 1, 2, 4, 6 і 8 Гр) забезпечує множинна лінійна регресія для комбінації кількісного виходу транскриптів CCNG1 і CDKN1A, яка за алгоритмом «зваженого голосування» дозволила правильно ідентифікувати всіх здорових донорів, трьох з чотирьох пацієнтів до лікування та всіх пацієнтів на точці 18 год після четвертого сеансу ПТ.

Проте, при інтерпретації картини експресії генів *in vivo* слід завжди проявляти обережність, оскільки результати вимірювання змін активності навіть найкращих генів-відповідачів можуть бути викривлені внаслідок їх можливої задіяності в реакціях на сторонні чинники і внутрішні супутні фактори. Так, у дослідженні [59] серед 787 генів радіаційної відповіді у Т-лімфоцитах людини в 11 випадках зміни експресії залежали від статі, а в 41 — від віку донорів; зокрема асоційованість водночас із факторами віку і статі проявили модуляції експресії генів GADD45A і MDM2. В експерименті з опроміненням *ex vivo* лімфоцитів хворих на рак грудної залози і здорових донорів з'ясувалося, що радіаційно-індуковані зміни CDKN1A вірогідно сильніше виражені у хворих на множинний рак, ніж у пацієнтів з однією пухлиною і контрольних донорів [76]. В аналогічних умовах опромінення лімфоцитів *ex vivo* експресія цього ж гена проявила негативну (!) кореляцію із розвитком тяжких ранніх променевих ушкоджень шкіри у пацієнтів під час ПТ [77]. Зрозуміло, що у випадку масштабної аварії чи ядерного тероризму існує висока ймовірність помилкової класифікації таких людей щодо поглинутих доз радіації, і це матиме трагічні наслідки, зокрема для осіб із підвищеною радіочутливістю. Отже, оцінка впливу різних життєвих звичок, професійних чинників і захворювань зараз становить важливу частину роботи з валідації транскриптомної біодозиметрії.

Транскриптомна діагностика радіаційно-індукованих патологій

Окрім детекції опромінення і вимірювання поглинутої радіаційної дози, не менш важливим завданням в царині радіаційної медицини, гігієни та епідеміології є визначення радіогенності променевої патології — насамперед радіаційної етіології пухлин. Донедавна вважалося майже неможливим розрізнити спонтанні та індуковані (наприклад, ятрогенні) пухлини, якщо вони не відрізнялися за геномом, гістоморфологічними ознаками та біологічними параметрами (наприклад, радіочутливістю і кінетикою поділу клітин). Впровадження транскриптомної діагностики зруйнувало цей постулат, принаймні в експерименті — для раку грудної залози [78], а у спостереженнях на людині — для раку щитоподібної залози. Так, були показані чіткі відмінності у транскриптомі тироїдних пухлин, які виникли спонтанно чи внаслідок інкорпорації ¹³¹I після аварії на Чорнобильській АЕС [79, 80]. Аналогічно, при дослідженні зразків пухлинної тканини, отриманих від пацієнтів із тироїдними пухлинами, що виникли спонтанно чи як другі пухлини після зовнішнього терапевтичного опромінення, виявлено радіаційно-асоційований транскриптомний «підпис» із 322 модульованих генів [81]. Зокрема, у радіаційно-індукованих пухлинах спостерігали змінену активність генів клітинної відповіді на оксидативний стрес, опромінення та гіпоксію, регуляції функції p53 та різних сигнальних шляхів. У валідаційній частині роботи [81] цей «підпис» дозволив правильно класифікувати 26 із 29 кодованих зразків пухлин згідно з їх етіологією, тобто як спонтанні чи радіаційно-індуковані.

Іншою радіаційно-індукованою патологією, що зустрічається з високою частотою, є променеві фібрози. У праці [82] було проведено транскриптомне профілювання лейкоцитів крові 254 хворих на рак грудної залози через 3–7 р. після ПТ і встановлено, що у осіб із фіброзом визначалася істотна модуляція 87 генів порівняно з пацієнтами, які не мали фіброзу. Найбільш значущими функціональними групами фіброз-асоційованих генів були гени сигнальних шляхів TGF- β 1 і IL-2. За даними генної онтології науковці [82] запропонували схему молекулярних подій і пов'язаних із ними біохімічних та фізіологічних механізмів

розвитку радіаційно-індукованого фіброзу шкіри.

Крім вищезгаданих праць, у літературі за останні 10 років накопичилося десятки повідомлень про результати транскрипційного профілювання нормальних і пухлинних клітин людини з метою отримання специфічних предикторних біопідписів при променевому чи хемопроменевому лікуванні різних хвороб, які вможливають передбачення клінічного результату чи ускладнень та відповідну індивідуалізацію схем лікування (наприклад, [83–90]), проте аналіз цих даних виходить за межі даного огляду.

Серед усіх напрямків «омікової революції» найбурхливіший розвиток переживає транскриптоміка. Це пов'язано з тим, що зміни активності генів є базовим аспектом життєдіяльності, і водночас — первинним елементом біологічної реакції на дію будь-яких чинників. Тому транскриптомний аналіз, зокрема у варіанті «глобальний — методом мікронаборів + прецизійний — методом RT-qPCR», дозволяє отримати найповнішу картину механізмів біологічної події, визначити в ній ключові елементи (стартові точки для запуску каскадів, фокуси регуляторних шляхів, специфічні кінцеві продукти) і на цій основі — створити панелі найінформативніших маркерів для поточної оцінки чи динамічного моніторингу біологічних ефектів.

Факт утворення специфічних транскриптомних «біопідписів» після дії радіації вже не викликає сумнівів. Проте, застосування транскриптоміки в радіобіології одразу ж показало, наскільки обмеженими були наші знання про механізми радіаційної відповіді на молекулярному, клітинному, тканинному та, особливо, організменому рівні. Поступово в дослідженнях *in vitro* та *in vivo* розкривається складна картина дозо- і часозалежної кінетики різноманітних процесів, більшість яких не можна було передбачити і змодельовати. Отже, єдиним коректним шляхом розвитку системи транскриптомної дозиметрії залишається накопичення емпіричних даних.

На сьогоднішній день у такий спосіб створено декілька платформ для детекції радіаційного опромінення за модуляцією генів радіаційної відповіді. Найбільш вдалою тест-системою для цього є лейкоцити крові, з використанням яких можна калібрувати залежність «доза–ефект» *ex vivo* і відсутня потреба в неопромінену конт-

ролі. Такі платформи можуть вмішувати до кількох десятків генів, хоча для тріажу та інтервальної дозиметрії достатньо профілю з 8–25 генів, а при використанні RT-qPCR можна обмежитися вимірюванням активності 1–4 з них, що мають пряму залежність накопичення транскриптів від поглинутої дози радіації. Відбулася успішна перевірка працездатності розроблених транскриптомних профілів у незалежних спостереженнях на пацієнтах після тотального терапевтичного опромінення, і також доведено наявність радіаційних «підписів» у транскриптомі людини при хронічному та віддаленому за часом опроміненні в низьких дозах.

Певною проблемою для прикладної радіаційної транскриптоміки є те, що переліки генів-відповідачів істотно відрізняються у різних дослідженнях, та ще й підлягають неоднозначним змінам із плином часу в ранній постпроменевий період. Окрім міжлабораторної валідації транскриптомних платформ, на дослідників чекає ще багато роботи з оцінки індивідуальної варіабельності та впливу сторонніх факторів на радіаційну модуляцію експресії генів. Особливо складним завданням є створення панелей експресії генів для детекції нерівномірного чи локального опромінення.

Попри це, безперечною перевагою транскриптоміки є можливість повної автоматизації і застосування її при скринінгу багатотисячних контингентів. Транскриптоміка також є унікальним джерелом діагностичних маркерів для променевої патології, оскільки профіль експресії генів дозволяє вказати на дію радіації як специфічну причину утворення променевих фіброзів, радіогенної пухлини чи ураження системи гемопоезу. Є надія, що транскриптомні біомаркери радіаційного впливу ніколи не доведеться використовувати з причини ядерного тероризму. Натомість, ці прогресивні технології неодмінно знайдуть використання в практиці радіаційної онкології при прогностичних оцінках результатів лікування і стану нормальних тканин у пацієнтів під час радіологічних процедур.

Література

1. Alexander G.A., Swartz H.M., Amundson S.A. et al. // *Radiat. Meas.* – 2007. – Vol. 42. – P. 972–996.
2. Straume T., Amundson S.A., Blakely W.F. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 393–405.

3. *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.
4. *International Conference «EPRBioDose-2010». Abstract book.* – Rome: Prioda Imag. – 209 p.
5. Вітніков В.А. // *УПЖ.* – 2011. – Т. XIX, вун. 4. – С. 442–452.
6. Blakely W.F., Prasanna P.G.S., Grace M.B., Miller A.C. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2001. – Vol. 97, iss. 1. – P. 17–23.
7. Grace M.B., McLeland C.B., Blakely W.F. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2002. – Vol. 78. – P. 1011–1021.
8. Grace M.B., Blakely W.F. // *Radiat. Meas.* – 2007. – Vol. 42, iss. 6–7. – P. 1147–1151.
9. Sudprasert W., Navasumrit P., Ruchirawat M. // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* – 2006. – Vol. 209, iss. 6. – P. 503–511.
10. Kabacik S., Mackay A., Tamber N. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2011. – Vol. 87, iss. 2. – P. 115–129.
11. Chaudhry M.A. // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 597. – P. 98–112.
12. Chou J.F., Zhou T., Kaufmann W.K. et al. // *BMC Bioinformatics.* – 2007. – Vol. 8. – P. 427. – doi:10.1186/1471-2105-8-427.
13. Amundson S.A., Do K.T., Shahab S. et al. // *Radiat. Res.* – 2000. – Vol. 154, iss. 3. – P. 342–346.
14. Amundson S.A., Bittner M., Meltzer P. et al. // *Ibid.* – 2001. – Vol. 156, iss. 5. – P. 657–661.
15. Amundson S.A., Fornace Jr. A.J. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2001. – Vol. 97, iss. 1. – P. 11–16.
16. Amundson S.A., Do K.T., Vinikoor L.C. et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, iss. 2. – P. 415–424.
17. Park W.Y., Hwang C.I., Im C.N. et al. // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, iss. 55. – P. 8521–8528.
18. Fält S., Holmberg K., Lambert B., Wennborg A. // *Carcinogen.* – 2003. – Vol. 24, iss. 11. – P. 1837–1845.
19. Heinloth A.N., Shackelford R.E., Innes C.L. et al. // *Mol. Carcinog.* – 2003. – Vol. 37, iss. 2. – P. 65–82.
20. Snyder A.R., Morgan W.F. // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 568, iss. 1. – P. 89–96.
21. Tomascik-Cheeseman L.M., Coleman M.A., Marchetti F. et al. // *Ibid.* – Vol. 561. – P. 1–14.
22. Mori M., Benotmane M.A., Tirone I. et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62. – P. 1489–1501.
23. Akerman G.S., Rosenzweig B.A., Domon O.E. et al. // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2005. – Vol. 45, iss. 2–3. – P. 188–205.
24. Dai J.M., Sun D.Ch., Lin R.X. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82, iss. 7. – P. 511–521.
25. Zhou T., Chou J.W., Simpson D.A. et al. // *Environ. Health Perspect.* – 2006. – Vol. 114. – P. 553–559.
26. Zhou T., Chou J., Zhou Y. et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 5, iss. 8. – P. 813–822.
27. Zhang Y., Rohde L.H., Emami K. et al. // *DNA Repair.* – 2008. – Vol. 7, iss. 11. – P. 1835–1845.
28. Gruel G., Voisin P., Vaurijoux A. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 335–344.
29. Chaudhry M.A. // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2008. – 541678. – 7 p.
30. Chaudhry M.A., Kreger B., Omaruddin R.A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 7. – P. 569–583.
31. Pawlik A., Delmar P., Bosse S. et al. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 85 (8). – P. 656–671.
32. Rzeszowska-Wolny J., Herok R., Widel M., Hancock R. // *DNA Repair.* – 2009. – Vol. 8, Iss. 6. – P. 732–738.
33. Matsumura S., Demaria S. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173, iss. 4. – P. 418–425.
34. Sokolov M.V., Neumann R.D., Panyutin I.G. // *BMC Genomics.* – 2007. – Vol. 8:192. – doi:10.1186/1471-2164-8-192. – 12 p.
35. Tachiiri S., Katagiri T., Tsunoda T. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2006. – Vol. 64, iss. 1. – P. 272–279.
36. Kang C.M., Park K.P., Song J.E. et al. // *Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 159, iss. 3. – P. 312–319.
37. Long X.-H., Zhao Z.-Q., He X.-P. et al. // *Int. J. Molec. Med.* – 2007. – Vol. 19. – P. 607–615.
38. Turtoi A., Brown I., Oskamp D., Schneeweiss F.H.A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2008. – Vol. 84, iss. 5. – P. 375–387.
39. Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P. et al. // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 168, iss. 6. – P. 650–665.
40. Platel A., Gervais V., Sajot N. et al. // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 689, iss. 1–2. – P. 21–49.
41. Sakamoto-Hojo E.T., Mello S.S., Pereira E. et al. // *Ibid.* – 2003. – Vol. 544, iss. 2–3. – P. 403–413.
42. Goldberg Z., Schwietert Ch.W., Lehnert B. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58, iss. 2. – P. 567–574.
43. Rudningen O.K., Overgaard J., Alsner J. et al. // *Radiother. Oncol.* – 2005. – Vol. 77, iss. 3. – P. 231–240.
44. Ding L.H., Shingyoji M., Chen F. et al. // *Radiat. Res.* – 2005. – Vol. 164, iss. 1. – P. 17–26.
45. Koike M., Shiomi T., Koike A. // *J. Radiat. Res. (Tokyo).* – 2005. – Vol. 46. – P. 173–184.
46. Kis E., Szatmári T., Keszei M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2006. – Vol. 66, iss. 5. – P. 1506–1514.
47. Iwakawa M., Hamada N., Imadome K. et al. // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 642, № 1–2. – P. 57–67.
48. Ghandhi S.A., Yaghoubian B., Amundson S.A. // *BMC Medical Genomics.* – 2008. – Vol. 1, № 63. – doi:10.1186/1755-8794-1-63.
49. Mello S.S., Fachin A.L., Junta C.M. et al. // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2011. – Vol. 52, iss. 2. – P. 117–129.
50. Goldberg Z., Roche D.M., Schwietert Ch. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12, iss. 12. – P. 3723–3729.
51. Berglund S.R., Roche D.M., Dai J. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – Vol. 70, iss. 1. – P. 229–234.
52. Paul S., Amundson S.A. // *Ibid.* – Vol. 71, iss. 4. – P. 1236–1244.
53. Turtoi A., Schneeweiss F.H.A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, iss. 5. – P. 403–412.
54. Turtoi A., Brown I., Schlödger M., Schneeweiss F.H.A. // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 174, iss. 2. – P. 125–136.
55. Turtoi A., Sharan R.N., Srivastava A., Schneeweiss F.H.A. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, iss. 10. – P. 888–904.
56. Wilkins R.C., Kutzner B.C., Truong M., McLean J.R.N. // *Ibid.* – 2002. – Vol. 78. – P. 681–688.
57. Andrievski A., Wilkins R.C. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 85, iss. 4. – P. 369–376.
58. Roy L., Gruel G., Vaurijoux A. // *Ann. Ist. Super Sanita.* – 2009. – Vol. 45, iss. 3. – P. 272–277.
59. Pogosova-Agadjanyan E.L., Fan W., Georges G.E. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, iss. 2. – P. 172–184.
60. Jen K.-Y., Cheung V.G. // *Genome Res.* – 2003. – Vol. 13. – P. 2092–2100.
61. Reiger K.E., Chu G. // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, iss. 16. – P. 4786–4803.
62. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. IAEA Techn. Report Series № 405.* – Vienna: IAEA, 2001. – 127 p.
63. Paul S., Amundson S.A. *Robust in vivo prediction of radiation dose using gene expression // Proceed. of International Conference «EPRBioDose-2010» (Mandelieu-la-Napoule, France, 2010).* – Rome: Prioda Imaging. – P. 200.
64. Brengues M., Paap B., Bittner M. et al. // *Health Phys.* – 2010. – Vol. 98, iss. 2. – P. 179–185.
65. Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P. // *J. Rad. Res. (Tokyo).* – 2009. – Vol. 50. – P. 61–71.
66. Morandi E., Severini C., Quercioli D. et al. // *Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 172, iss. 4. – P. 500–508.
67. Albanese J., Martens K., Karanitsa L.V. et al. // *Exp. Hematol.* – 2007. – Vol. 35, iss. 4 (Suppl. 1). – P. 47–54.
68. Straume T., Amundson S.A., Blakely W.F. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 393–405.
69. Amundson S.A., Grace M.B., McLeland C.B. et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 6368–6371.
70. Paul S., Barker C.A., Turner H.C. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 175, iss. 3. – P. 257–265.
71. Radplin T., Paul S., Amundson S.A. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2011. – Vol. 80, iss. 2. – P. 549–557.
72. Dressman H.K., Muramoto G.G., Chao N.J. et al. // *PLoS Med.* – 2007. – Vol. 4, iss. 4. – P. e106.

-
73. Meadows S.K., Dressman H.K., Muramoto G.G. et al. // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3, iss. 4. – P.e1912.
 74. Meadows S.K., Dressman H.K., Daher P. et al. // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, iss. 7. – P. e11535.
 75. Filiano A.N., Fathallah-Shaykh H.M., Fiveash, J. et al. // *Radiat. Res.* – 2011. – Vol. 176, iss. 1. – P. 49–61.
 76. Mitsuhashi M., Peel D., Ziogas A., Anton-Culver H. // *Biomarker Insights*. – 2009. – Vol. 4. – P. 201–209.
 77. Badie C., Dziwura S., Raffy C. et al. // *Brit. J. Cancer*. – 2008. – Vol. 98. – P. 1845–1851.
 78. Imaoka T., Yamashita S., Nishimura M. et al. // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. – 2008. – Vol. 49, № 4. – P. 349–360.
 79. Detours V., Delys L., Libert F. et al. // *Brit. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 97. – P. 818–825.
 80. Port M., Boltze C., Wang Y. // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 168. – P. 639–649.
 81. Ory C., Ugolin N., Levalois C. et al. // *Endocrine-Related Cancer*. – 2011. – Vol. 18. – P. 193–206.
 82. Landmark-Huyvik H., Dumeaux V., Reinertsen K.V. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2011. – Vol. 79, iss. 3. – P. 875–883.
 83. Santucci M.A., Barbieri E., Frezza G. et al. // *Ibid.* – 2000. – Vol. 46, iss. 2. – P. 411–416.
 84. Svensson J.P., Stalpers L.J.A., Esveldt-van Lange R.E.E. et al. // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3, iss. 10 – e422.
 85. Pramana J., Van den Brekel M.W.M., van Velthuysen M.-L.F. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2007. – Vol. 69, iss. 5. – P. 1544–1552.
 86. Ньттерич J., Werle-Schneider G., Popanda O. et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2006. – Vol. 82, Iss. 8. – P. 593–604.
 87. Chao A., Wang T.H., Lee Y.S. et al. // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 169. – P. 76–86.
 88. Piening B.D., Wang P., Subramanian A., Paulovich A.G. // *Ibid.* – 2009. – Vol. 171, iss. 2. – P. 141–154.
 89. Begg A.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, Iss. 10. – P. 825–836.
 90. Hsu F., Chuang E.Y., Lee Y. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2010. – Vol. 78, iss. 3. *Suppl. 1.* – P. S662.

Надходження до редакції 08.08.2011.

Прийнято 14.09.2011.

Адреса для листування:

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