

УДК: 575.113:575.117:577.24:612.112:616-001.28

І. М. Ільєнко✉, Н. А. Голярник, О. В. Лясківська, О. А. Беляєв, Д. А. Базика

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

ЕКСПРЕСІЯ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИХ БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ У ШИРОКОМУ ІНТЕРВАЛІ ДОЗ

Мета. Визначити біологічні маркери радіаційного ураження у віддаленому періоді після опромінення у широкому інтервалі доз.

Матеріали і методи. Обстежено 235 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) 1986–1987 рр. у віддаленому періоді після опромінення (доза зовнішнього опромінення: від 0,10 до 3500 мЗв ($M \pm SD$: 419,48 \pm 654,60)); вік обстежених становив 58,34 \pm 6,57 ($M \pm SD$) років). Контрольну групу склали 45 неопромінені особи віком від 41 до 67 років ($M \pm SD$: 50,60 \pm 5,37). Визначення експресії генів *BCL2*, *CDKN2A*, *CLSTN2*, *GSTM1*, *IFNG*, *IL1B*, *MCF2L*, *SERPINB9*, *STAT3*, *TERF1*, *TERF2*, *TERT*, *TNF*, *TP53*, *CCND1* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (RT-PCR 7900 HT). Відносну довжину теломер визначали методом flow-FISH. Лейкоцитарний фенотип, рівень експресії гістона γ -H2AX, білка Cyclin D1 визначали за допомогою проточної цитометрії.

Результати. У групі учасників ЛНА на ЧАЕС було продемонстровано дозозалежне зниження експресії генів *BCL2*, *SERPINB9*, *CDKN2A* та *STAT3*; підвищення експресії *MCF2L* та гіперекспресія гена *TP53* (до 100 мЗв). Активацію гена імунного запалення *IL1B* виявлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінені в інтервалі доз від 0 до 100 мЗв. Визначено негативну кореляцію між експресією *IL1B* та кількістю $CD19^{+}3^{-}$ і $CD3^{-}HLA-DR^{+}$ В-лімфоцитів, $CD4^{+}8^{-}$ клітин та співвідношенням $CD4^{+}/CD8^{+}$. Показано гіперекспресію гена *TNF* у дозовому інтервалі від 100 мЗв до 1000 мЗв. Виявлено комбінацію супресії *TNF* з підвищенням експресії гена *IFNG* та кореляцією з кількістю $CD3^{+}16^{+}56^{+}$ та $CD25^{+}$ лімфоцитів при дозах понад 1000 мЗв. Підвищення спонтанної експресії Cyclin D1 та γ -H2AX корелює з дозою опромінення, скороченням довжини теломер з віком та з модифікуючим ефектом супутньої патології.

Висновки. Аналіз зв'язку між показниками клітинного імунітету, експресії генів, довжини теломер, рівнем регуляторних білків та дозою опромінення демонструє перспективи використання їх в якості біологічних маркерів у віддалений період після опромінення.

Ключові слова: іонізуюча радіація, експресія генів, γ -H2AX, довжина теломер, Cyclin D1, Чорнобиль.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2018. Вип. 23. С. 331–350. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-331-350.

✉ Ільєнко Ірина Миколаївна, e-mail: ilyenko@ukr.net

I. M. Iliencko✉, N. A. Golyarnik, O.V. Lyaskivska, O. A. Belayev, D. A. Bazyka

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine

EXPRESSION OF BIOLOGICAL MARKERS INDUCED BY IONIZING RADIATION AT THE LATE PERIOD AFTER EXPOSURE IN A WIDE RANGE OF DOSES

Objective. To study radiation induced biological markers of the late period after exposure.

Subjects and methods. A study was performed in 235 Chernobyl accident male clean-up workers exposed in 1986–1987 (doses of external exposure: $(M \pm SD): 419.48 \pm 654.60$; range 0.10–3,500 mSv); age 58.34 ± 6.57 years. Control group included 45 non-exposed subjects (mean age: 50.60 ± 5.37 ($M \pm SD$)). Gene expression was performed by RT-PCR on 7900HT Analyzer using TLDA for *BCL2*, *CDKN2A*, *CLSTN2*, *GSTM1*, *IFNG*, *IL1B*, *MCF2L*, *SERPINB9*, *STAT3*, *TERF1*, *TERF2*, *TERT*, *TNF*, *TP53*, *CCND1* genes. Relative telomere length (RTL) was analysed by flow-FISH; immune cell subsets, γ -H2AX and CyclinD1 expression by flow cytometry.

Results. A statistically significant and dose-dependent decrease in expression of the *BCL2*, *SERPINB9*, *CDKN2A*, and *STAT3* genes was demonstrated in parallel to a dose-dependent overexpression of *MCF2L* and upregulation of *TP53* (up to 100 mSv). *IL1B* expression was the highest in exposed to doses from 0.1 to 100 mSv with a negative correlation between at *IL1B* expression and $CD19^+3^-$, $CD3^-HLA-DR^+$, $CD4^+8^-$ cell counts and $CD4^+/CD8^+$ ratio. Hyperexpression of *TNF* gene in doses above 100 mSv to 1,000 mSv was shown, and in higher doses a combination of *TNF* downregulation with increase in *IFNG* gene expression were demonstrated with correlations with numbers of $CD3^+16^+56^+$ and $CD25^+$ lymphocytes and inhibition of expression *CLSTN2*. An increased expression of γ -H2AX and Cyclin D1 correlated to radiation dose, telomere shortening to age and concomittant pathology.

Conclusions. Cellular immunity, gene expression, telomere length, intracellular protein parameters are shown to be among perspective biological markers at a late period after radiation exposure.

Key words: ionising radiation, gene expression, γ -H2AX, telomere length, Cyclin D1, Chernobyl.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2018;23:331-350. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-331-350.

ВСТУП

Професійне або випадкове радіологічне чи ядерне опромінення може спричинити серйозні наслідки для здоров'я людини. Досвід, отриманий після ядерних катастроф Чорнобиля та Фукусіми, показав, що перші, хто відреагував на такі радіаційно-небезпечні ситуації, мали високий рівень радіаційного опромінення. Ці випадки яскраво ілюструють критичну потребу у відповідних біомаркерах для оцінки персональної дози опромінення, що може бути вкрай необхідним не тільки для відповідного медичного/клінічного супроводу, але також для прогнозування уповільнених стохастичних ефектів, таких як геномна нестабільність та рак [1].

Хоча біодозиметри можуть допомогти в оцінці поглинутої дози радіації, все ще існує значна прогалина у знаннях щодо прогнозування ризиків для здоров'я від оціночної дози опромінення. Тому глибоке розуміння біологічних ефектів може допомогти прогнозувати коротко- та довгострокові наслідки радіаційного опромінення. На даний час широко використовують такі біодозиметричні технології: аналіз дицентричних хро-

INTRODUCTION

The professional or accidental radiological and nuclear exposure could induce serious consequences to a human health. Experience gained after nuclear accidents in Chernobyl and Fukushima has shown high doses values in workers of the early postaccidental period. These cases clearly demonstrate critical need in appropriate biomarkers for individual doses estimates that could be extremely important not only for health effects follow-up, but for prognosis of the remote stochastic effects such as genomic instability or cancer [1].

Although biological dosimeters could enable the estimates of the absorbed radiation doses, still there is a substantial gap in knowledge on the prognosis of risks to health basing on the estimated radiation doses. That is why; an in-depth understanding of biological effects could help to elucidate short- and long-acting consequences of radiation exposure. Several technologies of dosimetry are used now: chromosome dicentrics

мосом – цей метод розглядається як «золотий стандарт» для оцінки дози опромінення [2]; метод цитокінового блокування мікроядер [3–5]; аналіз хромосомних транслокацій за допомогою багатокольорової флуоресцентної гібридизації *in situ* [6]; аналіз експресії гістону H2AX [7, 8] та дослідження профілю генної експресії [9]. Сучасний рівень досліджень вперше дозволяє з необхідною точністю кількісно вимірювати зміни молекулярних процесів при дії низьких рівнів опромінення. У рекомендаціях наукової групи ARCH (2015), за результатами експертної оцінки, рекомендовані дослідження біологічних маркерів дози опромінення, захворювань, пов'язаних з опроміненням, та маркерів індивідуальної радіочутливості організму людини.

Проведене наукове дослідження спрямоване на інтегрування декількох підходів, які використовуються у біодозиметрії, для визначення найкращої комбінації біомаркерів, що доповнять класичні види радіаційної дозиметрії та можуть бути використані в разі радіологічного інциденту та при професійному опроміненні. Окрім оцінки дози іонізуючого випромінювання, біодозиметрія є потужним інструментом у прогнозуванні наслідків радіаційного ураження.

МЕТА

Метою дослідження було дослідити показники генної експресії, нестабільності генома, клітинного циклу та старіння лейкоцитів периферичної крові (ПК) учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС та визначити радіаційно-індуковані біологічні маркери віддаленого періоду після опромінення.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Для проведення імунологічних та молекулярно-генетичних досліджень було обстежено 280 осіб, з яких сформовано основну та контрольну дослідні групи. Основну групу склали 235 учасників ЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. (віддалений період після опромінення) чоловічої статі, які проходили комплексне обстеження у клінічних відділеннях і поліклініці радіаційного реєстру ННЦРМ за програмою Клініко-епідеміологічного реєстру та мали задокументовані дози зовнішнього опромінення від 0,10 до 3500 мЗв ($419,48 \pm 654,60$ (M \pm SD)). Середній вік обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС складав ($58,34 \pm 6,57$) років (M \pm SD).

До контрольної групи увійшли 45 неопроміненіх осіб віком від 41 до 67 років, середній вік складав ($50,60 \pm 5,37$) років (M \pm SD). Особи контрольної групи не брали участі в ліквідації наслідків аварії на

assay is regarded as a golden standard for dose estimates [2] and is used along with micronuclei cytokine block [3–5]; multicolor fluorescence hybridization *in situ* analysis of chromosome translocations [6]; analysis of histone H2AX expression [7, 8], and gene expression profiles [9]. Modern research approaches for a first time enable with a sufficient accuracy a qualitative estimate of molecular processes changes at low dose interval. The expert group ARCH (2015) recommended research on the biological markers of radiation dose, radiation-induced pathology and markers of the individual radiosensitivity in humans.

A performed scientific study is directed to an integration of several approaches that are used in biological dosimetry for a determination of the optimal biological markers combinations that would supplement classical radiation dosimetry approaches and could be implemented in a case of radiological emergency as well as in professional exposure. Alongside with radiation dose estimates biological dosimetry could serve as a potent tool in radiation injuries prognosis.

OBJECTIVE

Aim of the study was to investigate the relative quantitative parameters of gene expression, genome instability, cell cycle and peripheral blood (PB) leucocytes aging in clean-up workers of Chernobyl and to reveal radiation-induced biological markers of the late period after exposure.

SUBJECTS AND METHODS

A study of immunological and molecular genetic parameters for performed in 280 subjects, who were divided in two groups – exposed group and control group. Exposed group consisted from 235 Chernobyl accident male clean-up workers exposed in 1986–1987 y, who were under follow-up at a late period after exposure in-patient departments and outpatient polyclinic of radiation registry by the program of Clinical-Epidemiologic registry. Documented doses of external exposure varied from 0.10 to 3,500 mSv (M \pm SD: 419.48 ± 654.60). Mean age of the exposed was 58.34 ± 6.57 y (M \pm SD).

Control group included 45 non-exposed subjects aged from 41 to 67 y (mean age: 50.60 ± 5.37 (M \pm SD)). Subjects from the control group haven't served as clean-up workers of Chernobyl

ЧАЕС і не мешкали на радіоактивно забруднених територіях. Критеріями включення осіб до контрольної групи були відсутність тяжких інфекційних і пухлинних захворювань, гематологічні та імунологічні показники в межах вікових норм.

Проточна цитометрія. Визначення лейкоцитарного фенотипу, відносного рівня експресії гістона γ -H2AX, білка Cyclin D1 у лімфоцитах ПК проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням лазерного проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson (BD), США). Експресію диференційних та активаційних антигенів визначали за допомогою прямого імунофлуоресцентного тесту з використанням набору моноклональних антитіл (МКАТ) Simultest IMK Plus (BD, США), що включає комбінації CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56, IgG1/IgG2 та CD25/4, які були мічені флуоресцентними мітками: FITC (флуоресцеїнізоціанат) та PE (фікоеритрин).

Для визначення відносного числа лімфоцитів, які експресують гістон γ -H2AX використовували МКАТ миші Anti-H2AX (pS139) пов'язані з флуорохромом Alexa Fluor 488 (BD, США). Визначення проводили шляхом внутрішньоклітинного забарвлення з використанням Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD, США).

Для визначення проліферативного потенціалу (ініціації клітинного циклу) та експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК використовували мікрометод культивування лейкоцитів ПК. Лейкоцити ПК стимулювали ФГА в концентрації 10 мкг/мл та культивували у живильному середовищі RPMI-1640 Medium з L-глутаміном та гідрокарбонатом натрія NaHCO_3 (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 100 мкг/мл гентаміцину в стандартних умовах: в інкубаторі при 5 % CO_2 атмосфері, температурі $t = 37^\circ\text{C}$ і 95 % вологості. Реакцію проводили в 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах протягом 18 годин. Спонтанний та мітоген-індукований рівень експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК визначали за стандартною методикою імунофлуоресцентного забарвлення внутрішньоклітинних білків з використанням реагентів FITC Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set (BD, США).

Дослідження відносної довжини теломер лімфоцитів ПК людини за допомогою flow-FISH методу. Визначення відносної довжини теломер (RTL) лімфоцитів ПК проводили за допомогою набору Telomere PNA Kit/FITC (Dako Cytometry, Denmark) та flow-FISH методу (проточно-цитомет-

or inhabited at the radioactively contaminated territories. Inclusion criteria to the control group also included absence of a heavy infections and tumors, Hematological and immunological parameters were in a range of normal age limits.

Flow cytometry. Immunological phenotype, relative levels of γ -H2AX, Cyclin D1 protein in PB lymphocytes were studied by flow cytometry using the FACSCalibur laser flow cytometer (Becton Dickinson (BD), USA). Expression of differentiation and activation antigens was studied in direct immunofluorescence assay with a set of monoclonal antibodies (MoABs) Simultest IMK Plus (BD, USA), that includes combinations: CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56, IgG1/IgG2 and CD25/4, conjugated with fluorescent markers FITC (fluorescein isothiocyanate) and PE (phycoerythrin).

For detection of relative number of lymphocytes that express γ -H2AX histone mouse Anti-H2AX (pS139) MoABs were used conjugated with Alexa Fluor 488 fluorochrome (BD, USA). Quantification was performed by intracellular staining using the Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD, USA).

Analysis of proliferation potential (cell cycle initiation) and Cyclin D1 expression in PB lymphocytes were performed by a micromethod of cell culture. PB lymphocytes were stimulated with Phytohemagglutinine-P (PHA). PB lymphocytes in a concentration of 10 mkg/ml and cultured in RPMI-1640 Medium supplemented by L-glutamine and natrium hydrocarbonate NaHCO_3 (Sigma, USA) with 10 % of fetal bovine serum (Sigma, USA), 100 mkg/ml of gentamicin in standardized environment in CO_2 -incubator at 37°C , 5% of CO_2 and 95 % humidity. Incubation was performed in 96-well culture plates during 18 hours. Spontaneous and mitogen-induced levels of Cyclin D1 expression in PB lymphocytes were studied by a standard immunofluorescent assay for intracellular proteins using the FITC labelled Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set (BD, USA).

Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. The RTL was studied using the Telomere PNA Kit / FITC (Dako Cytometry, Denmark) for hematopoietic cells using PNA probe labeled with FITC. FISH stage included pre-processing, denaturation, hybridization (the 1st

рична флуоресцентна гібридизація *in situ*). Методика проведення flow-FISH аналізу складалась з декількох етапів: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-й день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-й день). Показник RTL був розрахований за формулою:

$$RTL = \frac{\text{середнє значення FL1 у дорослих клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у дорослих клітин без PNA зонду}}{\text{середнє значення FL1 у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у контрольних клітин без PNA зонду}} \times 100$$

ПЛР-аналіз генної експресії. Проведено визначення відносного рівня експресії генів: *BCL2* (ген В-клітинної ХЛЛ/лімфоми 2), *CDKN2A* (ген-інгібітор циклін-залежної кінази 2A), *CLSTN2* (ген кальсинтеніну 2), *GSTM1* (ген глутатіон S-трансферази M1), *IFNG* (ген γ -інтерферону), *IL1B* (ген β -інтерлейкіну 1), *MCF2L* (ген, що регулює трансформацію клітинної лінії MCF2), *SERPINB9* (ген-інгібітор серпін-пептидази serpin), *STAT3* (ген сигнальної трансдукції та активації транскрипції 3, фактор гострої фази), *TERF1* (ген, який кодує теломерний повтор-зв'язуючий фактор 1), *TERF2* (ген, що кодує теломерний повтор-зв'язуючий фактор 2), *TERT* (ген зворотної теломеразної транскриптази), *TNF* (ген фактора некрозу пухлин) *TP53* (ген онкопротеїну p53), *CCND1* (ген G₁/S-специфічного білка Cyclin D1, регулятора клітинного циклу).

Основний алгоритм дослідження відносного рівня генної експресії складався з наступних етапів: виділення РНК з лейкоцитів ПК, проведення зворотної транскрипції, підготовка реакційної суміші та завантаження TLDA (TaqMan Low Density Array)-плашок (Applied Biosystems, США), ампліфікація кДНК (комплементарна ДНК) у режимі ПЛР у реальному часі. Виділення РНК проводили за допомогою автоматичної станції QIAcube (QIAGEN, Германия) з використанням набору для виділення РНК – NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Германия). Синтез кДНК із зразків виділеної РНК проводили в реакції зворотної транскрипції за допомогою High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) – набору реагентів, які при комбінуванні у відповідних кількостях (за стандартним протоколом) формують реакційну суміш 2x Reverse Transcription Master Mix (RT-ММ). Рівні об'єми зразку РНК та RT-ММ (10 мкл) змішували та проводили реакцію зворотної транскрипції. Для проведення ампліфікації отриманий зразок кДНК з'єднували з реакційною сумішшю – PCR Master mix для генної експресії (Applied Biosystems, США) та вносили до мікропроточної TLDA плашки – Micro Fluidic Card (Applied Biosystems, США). Були використані

day), washing, DNA staining, and analysis (the 2nd day). K562 cell line with long and determined telomere length was used as control cells. Hybridized samples with FITC-labelled PNA were counted at FACSCalibur cytometer. RTL was calculated by the formula as a follows:

$$RTL = \frac{\text{mean FL1 sample cells with probe PNA} - \text{mean FL1 sample cells without probe PNA}}{\text{mean FL1 control cells with probe PNA} - \text{mean FL1 control cells without probe PNA}} \times 100$$

RT-PCR analysis of gene expression. Relative quantification (RQ) was performed for genes: *BCL2* (B-cell CLL/lymphoma 2), *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *CLSTN2* (calsyntenin 2), *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1), *IFNG* (interferon, gamma), *IL1B* (interleukin 1, beta), *MCF2L* (cell line derived transforming sequence-like), *SERPINB9* (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9), *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)), *TERF1* (telomeric repeat binding factor 1 (NIMA-interacting)), *TERF2* (telomeric repeat binding factor 2), *TERT* (telomerase reverse transcriptase), *TNF* (tumor necrosis factor), *TP53* (tumor protein p53), *CCND1* (cell cycle regulator cyclin D1).

The general algorithm of the approach for analysis of the RQ of gene expression included several stages: RNA extraction from the PB leukocyte, performing a reverse transcription, reactive mixture preparation and filling the TLDA (TaqMan Low Density Array) – plates (Applied Biosystems, USA), cDNA amplification (complementary DNA) in real-time PCR. RNA extraction was performed using QIAcube automated workstation (QIAGEN, Germany) with a NucleoSpin RNAII Kit for RNA separation (Macherey-Nagel, Germany). cDNA synthesis from the extracted RNA samples was performed in a reverse transcription using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), a kit of reagents that in combination in certain quantities by a standard protocol form a reaction mixture 2x Reverse Transcription Master Mix (RT-ММ). Equal volumes of RNA sample and RT-ММ (10 ml) were mixed to support the reverse transcription reaction. For amplification the obtained cDNA sample was mixed with a reactive solution of PCR Master mix for gene expression (Applied Biosystems, USA) and placed to a

384-лункові мікропроточні плашки з 8 портами та специфічною конфігурацією праймерів для дослідження експресії дослідних генів. Мікропроточну плашку з внесеними зразками центрифугували протягом 2 хв при 1200 об/хв за допомогою центрифуги Multifuge 3L (Heraeus, Германия) для рівномірного розподілу зразків. Ампліфікацію кДНК проводили за допомогою роботизованого генетичного аналізатора 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Показники відносного рівня генної експресії (RQ – relative quantification, відносна кількісна оцінка) розраховували за допомогою 2- $\Delta\Delta C_t$ методу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Імунологічні маркери радіаційного опромінення. У віддаленому періоді після опромінення (30 років по тому) в широкому діапазоні доз в учасників ЛНА на ЧАЕС зберігаються порушення імунного статусу. Субпопуляційний склад лейкоцитів ПК характеризується стабільним рівнем CD45⁺14⁻ лімфоцитів та гранулоцитів зі зниженням відносного вмісту CD45⁺14⁺ моноцитарної популяції. Виявлено дисбаланс імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів, ознаки імуносупресії зі зниженням коефіцієнта CD4⁺/CD8⁺, що поєднується із дозозалежним ($r = 0,23$; $p < 0,05$) підвищенням відносного рівня Т-регулюючих клітин супресорів. Імунодефіцитний стан, за показником CD4⁺/CD8⁺ ($< 1,2$), встановлено у 56,3 % обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС переважно у підгрупі з низькою дозою опромінення $0,06 < D \leq 100$ мЗв. Встановлено тенденцію до збільшення CD4⁺8⁺ клітин, передусім у підгрупі з дозою опромінення $D > 500$ мЗв. У віддаленому періоді після опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС зберігаються порушення імунореактивності Т-хелперів. Визначено зниження відсотку CD4⁺25⁺ активованих Т-хелперів з експресією рецептора до ІЛ-2. Характерними змінами в імунній системі опромінених $D > 500$ мЗв є наявність дисбалансу TCR⁺ субпопуляцій імунокомпетентних клітин (ІКК), зниження функціональних властивостей Т- та В-лімфоцитів. Зміни в Т-клітинній ланці імунітету залежать від потужності дози опромінення в період максимального радіаційного впливу.

Результати дослідження доповнюють наявні дані про порушення в імунній системі учасників ЛНА на ЧАЕС, які зазнали радіаційного впливу, що дозволяє простежити динаміку імунологічних змін і ступінь відновлення ІС.

Генетичні маркери радіаційного опромінення. При дослідженні особливостей генної експресії у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення основна група обстеже-

microfluidic TLDA plate – Micro Fluidic Card (Applied Biosystems, USA). The pre-filled 384-well microfluidic plates were used with 8 ports and 22 specific primers corresponding to the studied genes. Microfluidic plates filled with individual samples were centrifuged 2 min at 1,200 rpm on Multifuge 3L centrifuge (Heraeus, Germany) to obtain an equal fluid distribution. Amplification of cDNA was performed using a robotized genetic analyzer 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Parameters of RQ were calculated by an 2- $\Delta\Delta C_t$ approach.

RESULTS AND DISCUSSION

Immunological markers of radiation exposure. Immune system (IS) changes could be revealed after exposure in a wide range of doses in a remote period after exposure (30 years). Subset structure of the PB leukocytes is characterized by a stable numbers of CD45⁺14⁻ lymphocytes and granulocytes with a decrease of a proportion of CD45⁺14⁺ monocytic population. An imbalance between the subsets with immune depression and decrease of CD4⁺/CD8⁺ ratio is associated with a dose dependent increase in number of T-reg cells ($r = 0.23$; $p < 0.05$). Immune depression by the CD4⁺/CD8⁺ ratio (< 1.2), is registered in 56.3 % of studied Chernobyl clean-up workers, especially in a subgroup with lesser external doses ($0.06 < D \leq 100$ mSv). A tendency to increase numbers of CD4⁺8⁺ cells was demonstrated, first of all, in subjects exposed to high doses ($D > 500$ mSv). In a remote period after exposure changes in T-helper cell activation were conserved. A proportion of CD4⁺25⁺ activated T-helpers with decreased IL-2 receptor expression. Typical changes in IS in exposed over 500 mSv include imbalance in TCR⁺ immune cell subsets, decrease of the functional abilities of T- and B-cells. Changes in T-cell immunity depend on the amount of dose.

Results of a study contribute to existing data on the changes of immune system in Chernobyl clean-up workers, and enable to follow the dynamics of immunologic changes, as well as the stage of immune systems' repairment.

Genetic markers of radiation exposure. For analysis of the peculiarities of PB leukocytes gene expression in clean-up workers at a late period after radiation exposure the study group was divided in

них осіб була розподілена на три дозові підгрупи I – (0–100 мЗв), II – (100–1000 мЗв), III – (> 1000 мЗв). У дослідженні встановлено статистично достовірне та дозозалежне зниження показника експресії гена *BCL2* у підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС. Максимальне зниження середнього значення показника RQ встановлено у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 1000 мЗв (рис. 1). Виявлено кореляційну залежність між експресією гена-інгібітора апоптозу *BCL2* та дозою опромінення. Коефіцієнт кореляції за Пірсоном становить $r = -0,28$. Дослідження групи генів-інгібіторів апоптозу продемонструвало однонаправлені зміни. Ген *SERPINB9* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення дозозалежно гіпоекспресується (рис. 1).

Виявлена таргетність між генами *SERPINB9*, *BCL2* та *TP53*: встановлена кореляційна залежність між експресією цих генів позитивного характеру у групі учасників ЛНА на ЧАЕС. Коефіцієнт кореляції за Пірсоном *SERPINB9* vs *TP53* становить $r = 0,41$; $p < 0,05$, *SERPINB9* vs *BCL2* становить $r = 0,36$; $p < 0,05$. Такі дані свідчать про наявність TP53-опосередкованого модулюючого впливу на гени-інгібітори апоптозу у віддаленому періоді після опромінення. Кодований геном *SERPINB9* білок за функціями належить до інгібіторів протеаз, інгібіторів серинових протеаз. Задіяний у таких біологічних процесах, як ацетилювання, клітинній відповіді на естрогенну стимуляцію, імунній відповіді, негативній регуляції апоптотичних процесів та ендопептидазної активності [10]. Кодований білок належить до підродиної внутрішньоклітинних серпінів. Цей протеїн інгібує активність ефектор-

three subgroups according to radiation doses: I – (0–100 mSv); II – (100–1,000 mSv), and III – (above 1,000 mSv). In a study a significant statistically and dose dependent decrease in expression of *BCL2* gene was registered in clean-up workers group parameters. The most demonstrative decrease of the mean RQ parameter exhibited a group of exposed above 1,000 mSv (Fig. 1). A negative correlation was revealed between expression of apoptosis inhibition gene *BCL2* and radiation dose with Pearson's $r = -0.28$. Other genes – inhibitors of apoptosis demonstrate unidirectional changes. A Correlation also was shown between a decreased expression of *SERPINB9* gene in PB leukocytes of clean-up workers at a late period after exposure and radiation dose (Fig. 1).

A positive correlation was revealed between expression of genes *SERPINB9*, *BCL2* and *TP53* in clean-up workers. Pearson's quotient of correlation for *SERPINB9* vs *TP53* is $r = 0.41$ ($p < 0.05$), *SERPINB9* vs *BCL2* $r = 0.36$ ($p < 0.05$). Obtained data proof a TP53-mediated modulatory influence on the genes inhibitors of apoptosis at a late period after radiation exposure. Protein coded by gene functionally belongs to a family of serine protease inhibitors. It participate in a wide range of biological processes as acetylation, cell response to estrogene stimulation, immune response, negative regulation of apoptosis and endopeptidase activity [10]. A coded protein is a representative of a subfamily of intracellular serpins. It inhibits activity of an effector molecule of Granzyme B. Hyperexpression of

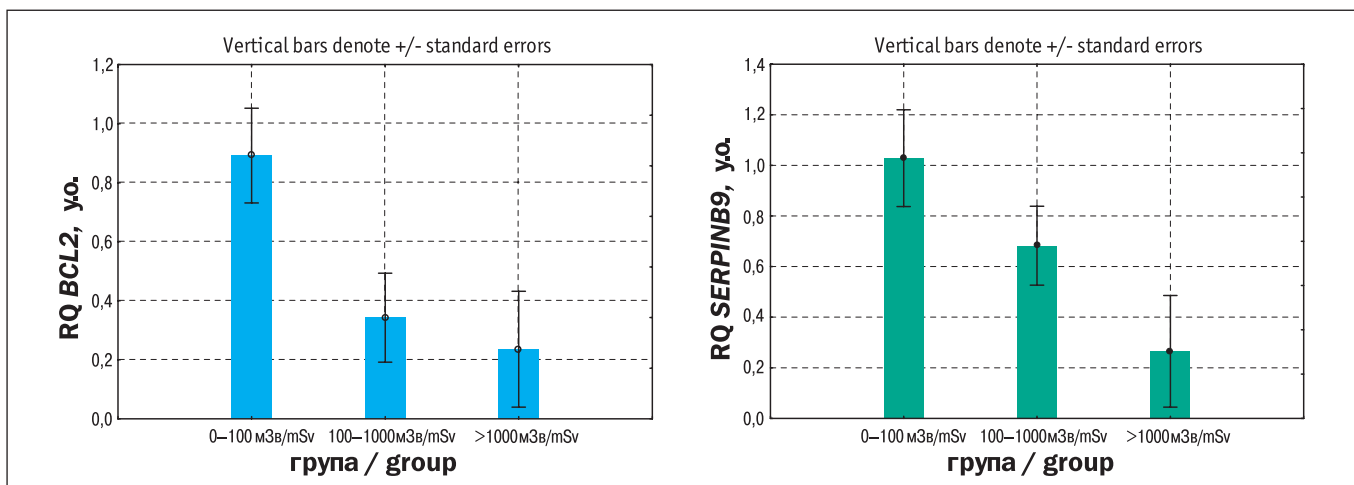


Рисунок 1. Експресія генів-інгібіторів апоптозу *BCL2* та *SERPINB9* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у різному інтервалі доз

Figure 1. Expression (RQ) of genes-negative regulators of apoptosis *BCL2* and *SERPINB9* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers exposed in a wide range of doses

ної молекули гранзима В. Гіперекспресія цього білка може блокувати цитотоксичний вплив Т-лімфоцитів на деякі види пухлинних клітин. Враховуючи значну роль гена *SERPINB9* відносно генної регуляції у формуванні імунної відповіді, було проведено дослідження особливостей його експресії з урахуванням показників клітинного імунітету учасників ЛНА на ЧАЕС у різних дозових інтервалах. Виявлені кореляційні, статистично достовірні результати, представлені у табл. 1.

this protein could block T-cytotoxic cell response to some types of cancer cells. Encountering the regulatory role of *SEPPINB9* gene in a response to ionizing radiation exposure a study was performed of peculiarities if gene expression with special attention to cellular immunity parameters in different doses range. Statistically significant correlations are presented at Table 1.

Таблиця 1

Кореляційна залежність між відносними значеннями показників клітинного імунітету та експресією гена *SERPINB9*

Table 1

Correlation dependencies between relative numbers of cellular immunity parameters and *SERPINB9* gene expression

Імунологічний показник, % Cellular immunity parameter, %	Імунологічний показник vs <i>SERPINB9</i> , кореляція за Пірсоном (r) Cellular immunity parameter vs <i>SERPINB9</i> , Pearson's correlation coefficient (r)
CD19 ⁺ 3 ⁻	-0,83*
CD4 ⁺ 8 ⁻	-0,72
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0,84*
CD3 ⁻ HLADR ⁺	-0,94*

Примітка. * p < 0,05.
Note. * p < 0.05.

Ген *MCF2L* та його кодований білок за молекулярними функціями є гуанін-нуклеотидним обмінним активаційним фактором, бере участь у зв'язуванні фосфатидилінозиту та задіяний у регуляції внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції, позитивній регуляції апоптозу, позитивній регуляції передачі сигналу Rho- протеїну та регуляцію сигнальної трансдукції, опосередкованої малими GTP-фазами. У нашому дослідженні встановлена дозозалежна гіперекспресія гена *MCF2L* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС (рис. 2). Найвищий середній показник RQ *MCF2L* визначено у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 1000 мЗв. Слід зазначити, опозитними за направленістю стали значення відносного рівня експресії гена-онкосупресора *TP53*. Найвищий рівень експресії гена *TP53* виявлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у наднизьких дозах від 0 до 100 мЗв, тоді як у II та III підгрупах середні значення RQ *TP53* були знижені, порівняно з такими показниками I підгрупи (рис. 2). Отримані дані свідчать про зниження *TP53*-опосередкованого контролю у репараційних процесах та протипухлинному «нагляді» у віддаленому періоді після опромінення у дозах понад 1000 мЗв.

MCF2L gene and a corresponding protein functionally belong to a guanine nucleotide exchange activation factors and participate in multiple regulatory pathways including phosphoinositol binding, and in regulation of the intracellular signal transduction, positive regulation of apoptosis and Rho-protein signaling as well as small GTP-phases signal transduction. In our study a dose-dependent hyperexpression of *MCF2L* gene was shown in PB leukocytes of Chornobyl clean-up workers (Fig. 2). The highest group RQ for *MCF2L* was determined in a group of clean-up workers exposed to doses over 1000 mSv. The oppositely directed were RQ parameters for *TP53* oncosuppressor gene. Highest elevation of *TP53* gene expression was demonstrated in a group of clean-up workers exposed to doses below 100 mSv, while n subgroups II and III the mean values of RQ for *TP53* gene were lower in comparison with su by group I (Fig. 2). Obtained results provide support to a decrease in *TP53*-mediated control of reparation processes and anti-tumor surveillance in a late period after exposure to doses over 1,000 mSv.

Проведено дослідження групи генів-регуляторів клітинного циклу та проліферації. Серед них ген

The study of the group of genes regulating the cell cycle and proliferation has been carried out. Among

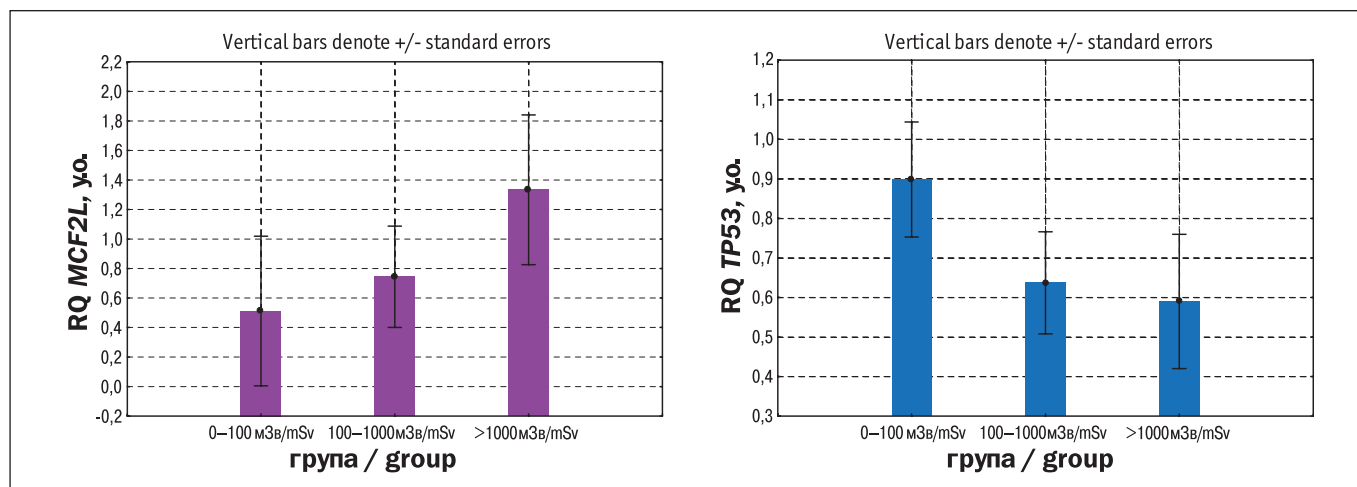


Рисунок 2. Експресія генів регуляторів апоптозу *MCF2L* та *TP53* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у різному інтервалі доз

Figure 2. Expression (RQ) of genes regulators of the apoptosis *MCF2L* and *TP53* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers exposed in a wide range of doses

CDKN2A – інгібітор циклін-залежної кінази 2A, який кодує два протеїни p16 (або p16INK4A) та p14ARF. Обидва протеїни функціонують як пухлинні супресори шляхом регуляції клітинного циклу. Соматичні мутації *CDKN2A* поширені у більшості злоякісних пухлин людини. Показано, що *CDKN2A* є другим після *TP53* найбільш часто інактивованим геном при онкологічних захворюваннях [11]. У нашому дослідженні встановлено зниження експресії гена *CDKN2A* залежно від дози зовнішнього опромінення учасників ЛНА на ЧАЕС (рис. 3). Також встановлена кореляційна залежність негативного характеру між відносним рівнем експресії гена *CDKN2A* та дозою опромінення (рис. 3). Коефіцієнт кореляції $r = -0,30$, $p < 0,05$.

them, the *CDKN2A* gene is a cyclin-dependent kinase 2A inhibitor that encodes two proteins p16 (or p16INK4A) and p14ARF. Both proteins act as tumor suppressors by regulating the cell cycle. Somatic mutations of *CDKN2A* are common in most human malignant tumors. It has been shown that *CDKN2A* is the second most commonly inactivated genome after *TP53* in cancerous conditions [11]. In our study, the reduction in expression of the *CDKN2A* gene was determined, depending on the dose of external exposure of clean-up workers (Fig. 3). Also, a correlation dependence of the negative nature between the relative level of expression of the *CDKN2A* gene and the dose of irradiation was established (Fig. 3) with Pearson's $r = -0.30$, $p < 0.05$.

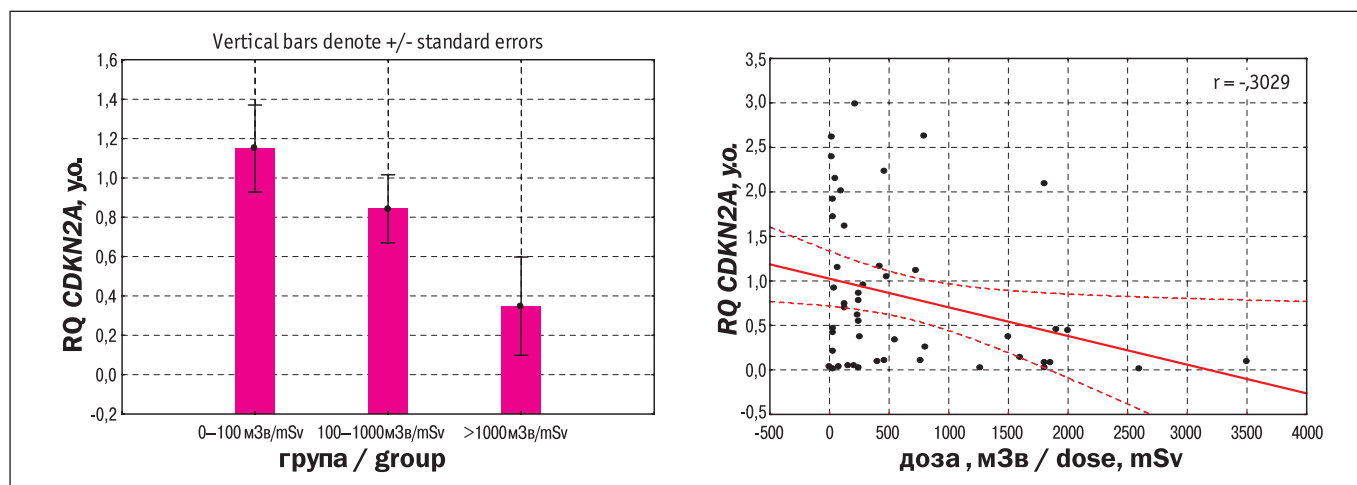


Рисунок 3. Експресія гена-інгібітора апоптозу *CDKN2A* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС та кореляційний зв'язок з дозою зовнішнього опромінення

Figure 3. Expression (RQ) of gene-negative regulator of the apoptosis *CDKN2A* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers. Pearsonis correlation with the dose of radiation

Зниження експресії гена є несприятливим фактором, оскільки пригнічення або інактивація експресії гена *CDKN2A* є одним з механізмів запуску клітинної трансформації. Підтвердженням цього є збереження TP53-модуючого впливу на експресію гена *CDKN2A*. Встановлена кореляційна залежність позитивного характеру між відносною експресією генів *CDKN2A* та *TP53*. Коефіцієнт кореляції становить $r = -0,41$, $p < 0,05$. Також встановлена кореляційна залежність незначної сили взаємодії між відносним рівнем експресії гена *CDKN2A* та відносним рівнем експресії внутрішньоклітинного білка Cyclin D1. Коефіцієнт кореляції становив $r = -0,26$.

Ще одним дослідженим геном-регулятором клітинного циклу був ген *STAT3*. Функції *STAT3* недостатньо досліджені, однак відомі біологічні процеси за участю *STAT3*, а саме: гострофазова реакція, старіння, негативна регуляція клітинної проліферації, клітинна відповідь на різноманітні сигнали, участь у цитокін-опосередкованих сигнальних шляхах, енергетичний гомеостаз, прозапальна відповідь, регуляція клітинного циклу, збереження популяції соматичних стовбурових клітин та інші [12, 13]. Показана гіпоекспресія гена *STAT3* у дозових підгрупах II (100–1000 мЗв) та III (>1000 мЗв) порівняно з групою учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненіх у дозах до 100 мЗв (рис. 4).

Порушення генної регуляції у віддаленому періоді після опромінення підтверджуються даними, отриманими при дослідженні генів *IL1B*, *IFNG* та *TNF*, які беруть безпосередню участь у регуляції імунної відповіді.

В дослідженні встановлена гіперекспресія гена *IFNG* у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненіх у дозах понад 1000 мЗв (рис. 5). Також виявлено кореляційні залежності з показниками клітинного імунітету: між

Reduction in gene expression is a disadvantage, as inhibition or inactivation of the expression of *CDKN2A* gene is one of the mechanisms for triggering cell transformation. The confirmation of this is the preservation of the TP53-modulatory effect on the expression of *CDKN2A* gene. The correlation between the positive nature of the relative expression of *CDKN2A* and *TP53* genes is established. The correlation coefficient $r = -0.41$, $p < 0.05$. Also, correlation dependence of the insignificant interaction strength between the relative expression level of the *CDKN2A* gene and the relative quantity of expression of the intracellular protein Cyclin D1 was established with Pearson's correlation coefficient $r = -0.26$.

Another gene-regulator of the cell cycle is *STAT3* gene. *STAT3* functions are not sufficiently investigated, but known are biological processes involving *STAT3*, such as acute phase reactions, aging, negative regulation of cell proliferation, cellular response to various signals, participation in cytokine-mediated signaling pathways, energy homeostasis, pro-inflammatory response, cell cycle regulation, preservation of the population of somatic stem cells and others [12, 13]. A decreased expression of *STAT3* gene in the dose subgroups II (100–1,000 mSv) and III (> 1,000 mSv) compared with the group of Chernobyl clean-up workers with radiation doses up to 100 mSv (Fig. 4) was shown.

Violations of the gene regulation in a late period after radiation exposure are confirmed by the data obtained in the study of *IL1B*, *IFNG* and *TNF* genes that are directly involved in the regulation of immune response effects.

The study revealed hyper-expression of the *IFNG* gene in a group of clean-up workers exposed to doses greater than 1,000 mSv (Fig. 5). Correlation relationships with cellular immunity were also found:

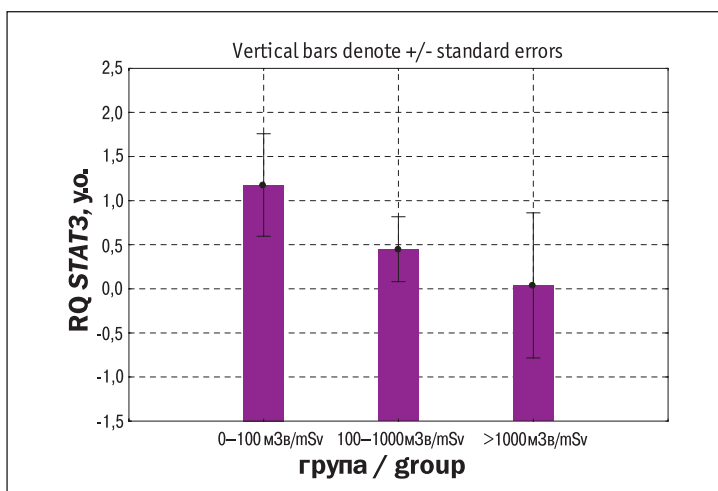


Рисунок 4. Експресія гена-регулятора сигнального протеїна *STAT3* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС в різному інтервалі доз

Figure 4. Expression (RQ) of gene regulator of the signal transducer *STAT3* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers exposed in a wide range of doses

відносним рівнем експресії гена *IFNG* та відсноною кількістю активованих $CD4^{+}25^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = -0,56$, $p < 0,05$; між відносним рівнем експресії гена *IFNG* та відсноною кількістю цитотоксичних $CD3^{-}16^{+}56^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = -0,35$, $p < 0,05$; між відносним рівнем експресії гена *IFNG* та відсноною кількістю Т-хелперів $CD4^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = 0,23$ та Т-супресорів $CD8^{+}$, коефіцієнт кореляції становив $r = -0,38$. Дослідження відносного рівня експресії гена *IL1B* продемонструвало найвищий рівень у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозовому інтервалі від 0 до 100 мЗв з поступовим зниженням середніх показників RQ *IL1B* у підгрупах II та III (рис. 5).

Дослідження кореляційних залежностей з показниками клітинного імунітету виявило такі закономірності: кореляцію між відносним рівнем експресії гена *IL1B* та відсноною кількістю активованих $CD4^{+}25^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = 0,60$, $p < 0,05$; між відносним рівнем експресії гена *IFNG* та відсноною кількістю $CD3^{-}HLADR^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = 0,34$, $p < 0,05$; між відносним рівнем експресії гена *IFNG* та відсноною кількістю цитотоксичних $CD3^{-}16^{+}56^{+}$ лімфоцитів, коефіцієнт кореляції становив $r = 0,26$.

Дослідження експресії гена *TNF* продемонструвало неоднозначні результати. Найбільш високий відносний рівень експресії цього гена виявлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозовому інтервалі 100–1000 мЗв, тоді як пригнічення *TNF* експресії виявлено у підгрупі осіб, опромінених

between the RQ of expression of *IFNG* gene and the relative number of activated $CD4^{+}25^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = -0.56$, $p < 0.05$; between the RQ of expression of the *IFNG* gene and the relative number of cytotoxic $CD3^{-}16^{+}56^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = -0.35$, $p < 0.05$; between the RQ of *IFNG* gene expression and the relative number of T-helper $CD4^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = 0.23$ and $CD8^{+}$ T-cells, the correlation coefficient $r = -0.38$. The study of the RQ of *IL1B* gene showed the highest level in the subgroup of clean-up workers, irradiated in the dose interval from 0 to 100 mSv, with a gradual decrease in the mean values of *IL1B* RQ in subgroups II and III (Fig. 5).

The study of correlation relationships with cellular immunity showed the following patterns: the correlation between the RQ of *IL1B* gene and the relative number of activated $CD4^{+}25^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = 0.60$, $p < 0.05$; between the RQ of *IFNG* gene and the relative number of $CD3^{-}HLADR^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = 0.34$, $p < 0.05$; between the RQ of *IFNG* gene and the relative number of cytotoxic $CD3^{-}16^{+}56^{+}$ lymphocytes, the correlation coefficient $r = 0.26$.

An examination of *TNF* gene expression showed mixed results. The highest relative expression level of this gene was detected in a subgroup of clean-up workers irradiated in the dose interval of 100–1,000 mSv, while the suppression of *TNF* expression was recognized in the subgroup of individuals exposed at doses greater than 1,000 mSv.

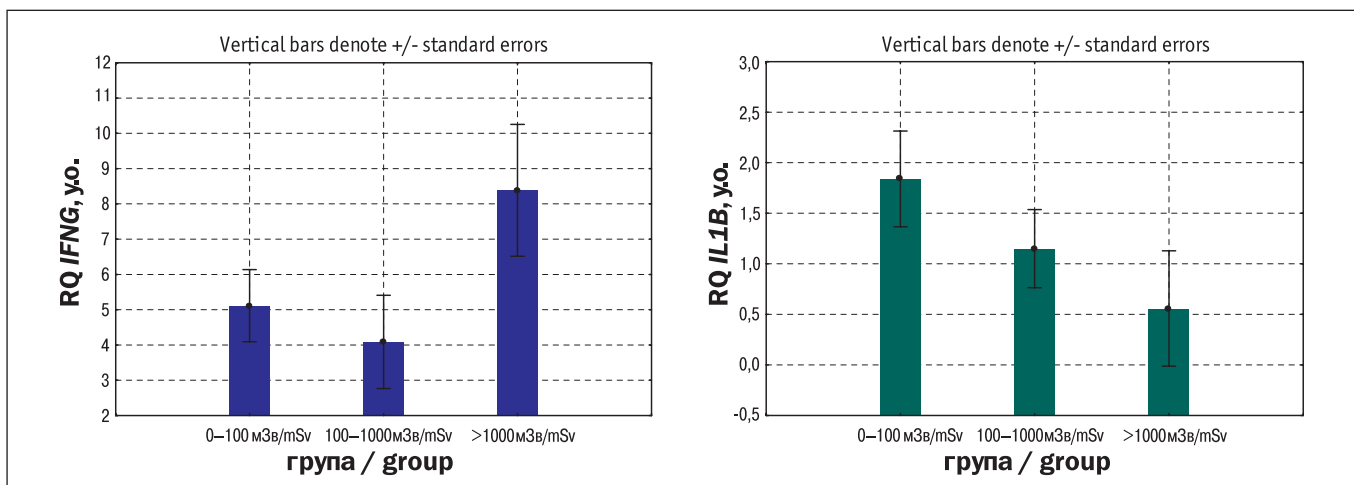


Рисунок 5. Експресія генів-регуляторів імунної відповіді *IL1B* та *IFNG* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС в різному інтервалі доз

Figure 5. Expression of genes regulators of the immune response *IL1B* and *IFNG* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers exposed in a wide range of doses

у дозах понад 1000 мЗв. З огляду на отримані результати, є підстави припустити наявність прозапальних реакцій в імунній системі учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення у дозах від 100 до 1000 мЗв. Підтвердженням цього стали встановлені кореляційні залежності між відносним рівнем експресії гена *TNF* та деякими показниками клітинного імунітету (табл. 2).

Таблиця 2

Кореляційна залежність між відносними значеннями показників клітинного імунітету та експресією гена *TNF*

Table 2

Correlation dependencies between relative numbers of cellular immunity parameters and *TNF* gene expression

Імунологічний показник, % Cellular immunity parameter, %	Імунологічний показник vs <i>TNF</i> , кореляція за Пірсоном (r) Cellular immunity parameter vs <i>TNF</i> , Pearson's correlation coefficient (r)
CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺	0.55*
CD4 ⁺ 25 ⁺	0.83*
CD4 ⁺ 25 ⁺	0.71*
TCRγδ	0.57*

Примітка. * p < 0,05.
Note. * p < 0.05.

Дослідженим був ген *CLSTN2*, який кодує білки кальсинтеніни, також відомі як алькадіни. Основними напрямками функціонування гена *CLSTN2* є: гомофільна адгезія клітин через молекули адгезії плазматичної мембрани, позитивне регулювання синаптичного з'єднання та передачі. У нашому дослідженні встановлена підвищена експресія гена *CLSTN2* у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозовому інтервалі 0–100 мЗв, тоді як у II та III підгрупах осіб, у віддаленому періоді після опромінення у дозах понад 100 мЗв цей ген був гіпоекспресованим.

Внутрішньоклітинні протеїни-маркери радіаційного опромінення. Одним із основних біологічних ефектів дії іонізуючої радіації є ураження генетичних структур клітини, що призводить до утворення DSBs (подвійних розривів ДНК). Наявність DSBs активує каскад біохімічних процесів у тому числі фосфорилування гістону H2AX [14]. На сьогодні накопичено достатню кількість фактів, які свідчать про те, що фосфорильована форма гістону H2AX – білок γ-H2AX в значній мірі корелює з наявністю DSBs, завдяки чому γ-H2AX вважають надійним маркером двониткових розривів ДНК гіперчутливим до радіаційного ураження та генотоксичних агентів [15, 16].

За даними середньогрупових значень в учасників ЛНА на ЧАЕС виявлені зміни вмісту білка γ-H2AX у лімфоцитах ПК у порівнянні з показниками

Taking into account the results obtained, there are grounds to assume the presence of pro-inflammatory reactions in the immune system of workers in a late period after irradiation at doses from 100 to 1,000 mSv. Confirmation of this effect has established in a correlation between the RQ of *TNF* gene and some indicators of cellular immunity (Table 2).

The studied was *CLSTN2* gene, which encodes calcium channel proteins, is also known as alcadins. The basic directions of the functioning of the *CLSTN2* gene are: homophilic adhesion of the cells through the adhesion of the plasma membrane, positive regulation of the synaptic connection and transmission. In our study, an elevated expression of the *CLSTN2* gene was shown in the subgroup of clean-up workers irradiated in the dose interval of 0–100 mSv, whereas in the second and third subgroups of subjects with doses greater than 100 mSv this gene was hypoeexpressed.

Intracellular protein-markers of radiation exposure. One of the main biological effects of the ionizing radiation is damage to the genetic structures of the cell, which leads to the formation of DSBs (double DNA breaks). The presence of DSBs activates a cascade of biochemical processes, including the phosphorylation of H2AX histone [14]. To date, sufficient evidence has been gathered that the phosphorylated histone form of H2AX, the γ-H2AX protein, greatly correlates with the presence of DSBs, so that γ-H2AH is considered a reliable marker of double-stranded DNA breaks hypersensitive to radiation damage and genotoxic agents [15, 16].

According to data of the mean group values, the changes in the content of γ-H2AX in the PB lymphocytes in clean-up workers were compared with

контрольної групи, які можна розцінювати як тенденцію до зростання. Найбільш виражені зміни експресії фосфорильованої форми гістону H2AX виявлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені в межах $500 < D \leq 1000$ мЗв. Результати наведено у табл. 3. З огляду на те, що у учасників ЛНА на ЧАЕС вміст білка γ -H2AX не залежить від віку, коефіцієнт кореляції ($r_s < 0,2$), підвищення експресії γ -H2AX може бути асоційованим із дією радіації і відображати неефективність механізмів репарації та наявність/накопичення DSBs у віддаленому періоді після опромінення.

Таблиця 3

Відносний рівень експресії гістону γ -H2AX у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення у різному інтервалі доз ($M \pm SD$)

Table 3

Expression of histone γ -H2AX in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers at a late period after radiation exposure in a wide range of doses ($M \pm SD$)

Показник Index	Групи обстеження / Groups			
	Контроль Control (n = 48)	Учасники ЛНА на ЧАЕС / Chernobyl accident clean-up workers		
		$0,1 < D \leq 500$ мЗв/mSv (n = 109)	$500 < D \leq 1000$ мЗв/mSv (n = 13)	$D \geq 1000$ мЗв/mSv (n = 16)
γ -H2AX	$1,4 \pm 1,71$	$1,58 \pm 2,09$	$2,36 \pm 3,17$	$2,00 \pm 2,89$

Cyclin D1 білок, який специфічно регулює проліферацію та фазовий перехід G₁/S – контрольної точки в клітинному циклі. Cyclin D1 розглядають як біомаркер для оцінки наслідків тривалого впливу низьких доз радіації [17], клітинного старіння [18], ризиків онкогенезу [19]. Проведено дослідження експресії гена *CCND1* і спонтанного рівня його продукту – білка Cyclin D1 у лімфоцитах ПК. За середньогруповими значеннями в учасників ЛНА на ЧАЕС відмічено підвищення спонтанного рівня Cyclin D1 у лімфоцитах ПК, однак значущих розбіжностей між показниками експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК контрольної групи та учасників ЛНА на ЧАЕС не встановлено. Розподіл основної групи обстеження на дозові підгрупи продемонстрував значне підвищення спонтанної експресії цитоплазматичного Cyclin D1 у лімфоцитах ПК у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені в діапазоні доз 500–1000 мЗв. В осіб з дозою опромінення $D \leq 500$ та $D \geq 1000$ мЗв даний показник був дещо підвищеним, однак не мав суттєвої різниці порівняно з таким в контрольній групі (табл. 4).

Виявлено кореляційну залежність спонтанного рівня Cyclin D1 та дози опромінення у підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені в до-

those of the control group and a tendency to increase was revealed. The most pronounced changes in the expression of phosphorylated histone H2AX form were revealed in the subgroup clean-up workers exposed to doses within 500-1,000 mSv interval. The results are showing in the Table 3. Given that in clean-up workers a γ -H2AX protein expression is independent of age, with a the correlation coefficient ($r_s < 0.2$), an increase in the expression of γ -H2AH may be associated with the action of radiation and reflect the ineffectiveness of the mechanisms of reparation and the presence/accumulation of DSBs in the late period after irradiation.

Cyclin D1 protein, which specifically regulates proliferation and phase transition of G₁/S – a checkpoint in the cell cycle. Cyclin D1 is considered as a biomarker to assess the effects of long-term exposure to low doses of radiation [17], cell aging [18], and carcinogenesis [19]. The study of expression of *CCND1* gene and its spontaneous level of the product – the Cyclin D1 protein in the PB lymphocytes of the groups was performed. At the Chernobyl clean-up workers group the spontaneous level of Cyclin D1 presence in PC lymphocytes was noted for the group average values. However, significant discrepancies between expression indices of Cyclin D1 in the lymphocytes of PB of the control group and clean-up workers were not established. Analysis by subgroups demonstrated a significant increase in the spontaneous expression of the cytoplasmic Cyclin D1 in PB in a dose range of 500–1,000 mSv. In subjects with a radiation doses less than 500 and over 1,000 mSv, the figures were somewhat elevated but did not have a significant difference compared to that in the control group (Table 4).

Correlation dependence of the spontaneous level of Cyclin D1 and irradiation doses in the subgroups of clean-up workers, irradiated at doses over 500 mSv

Таблиця 4

Відносний рівень спонтанної експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення в залежності від дози опромінення, (M ± SD; %)

Table 4

Spontaneous level of expression of Cyclin D1 in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers at a late period after radiation exposure in a wide range of doses (M ± SD; %)

Показник Index	Групи обстеження / Groups			
	Контроль Control (n = 24)	Учасники ЛНА на ЧАЕС / Chernobyl accident clean-up workers		
		0,1 < D ≤ 500 мЗв/mSv (n = 65)	500 < D ≤ 1000 мЗв/mSv (n = 12)	D ≥ 1000 мЗв/mSv (n = 11)
Cyclin D1	17,49 ± 12,0	20,21 ± 14,7	29,66 ± 14,3*	20,07 ± 12,3

Примітка. * p ≤ 0,01 порівняно з контрольною групою.
Note. * p < 0.01 vs the control group.

зах, що перевищували 500 мЗв: 500 < D ≤ 1000 та D ≥ 1000 мЗв (r_s = 0,49 та r_s = 0,41 відповідно). У підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, доза опромінення яких не перевищувала 500 мЗв, не виявлено залежності експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК від дози опромінення (r_s = -0,061). Кореляційний аналіз експресії цитоплазматичного Cyclin D1 у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС також не виявив залежностей між спонтанним рівнем Cyclin D1 і віком обстежених (r_s = -0,07).

За даними частотного аналізу, серед обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС виявлено 16 осіб (13,91 %), які не мали експресії Cyclin D1 в лімфоцитах ПК, та 32 пацієнта (27,8 %) з надвисоким рівнем (> 30 %) спонтанної експресії Cyclin D1 в лімфоцитах, табл. 5.

Для визначення проліферативного потенціалу лімфоцитів проведено культуральні дослідження мітоген-індукованої активації та проліферації лімфоцитів ПК 6 осіб, які не брали участі в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, та 22 учасників ЛНА на ЧАЕС. Проводили стимуляцію лімфоцитів *in vitro* мітогеном ФГА та через 18 годин оцінювали спонтанний і мітоген-активований рівень експресії Cyclin D1. Після мітогенної стимуляції лімфоцитів у пацієнтів контрольної групи (неопромінених) із низькими по-

including subgroups of 500–1, 000 and over 1,000 mSv (r_s = 0.49 and r_s = 0.41, respectively). In the subgroup of clean-up workers, with radiation doses not exceeding 500 mSv, the dependence of Cyclin D1 expression in PB lymphocytes on the dose of irradiation was not found (r_s = -0.061). Correlation analysis of the expression of cytoplasmic Cyclin D1 in lymphocytes of PB of clean-up workers also revealed no relationship between the spontaneous level of Cyclin D1 and the age of the examined (r_s = -0.07).

According to a frequency analysis, 16 subjects were identified (13.91 %) who had no expression of Cyclin D1 in PB lymphocytes and 32 patients (27.8 %) with super-high (> 30 %) spontaneous expression of Cyclin D1 in lymphocytes (Table 5).

For the determination of the proliferative potential of the lymphocytes, cultural studies of mitogen-induced activation and proliferation of PB lymphocytes in 6 persons from a control group in comparison with 22 Chernobyl clean-up workers were conducted. Lymphocyte stimulation was performed *in vitro* with PHA mitogen and after 18 hours the spontaneous and mitogen-activated expression level of Cyclin D1 were evaluated. After mitogenic immune cell stimulation in unexposed

Таблиця 5

Частотний аналіз обстежених осіб в залежності від рівня експресії Cyclin D1 (кількість осіб)

Table 5

Frequency analysis of the examined persons depending on the level of Cyclin D1 expression (number of persons)

Cyclin D1, %	Групи обстеження / Groups	
	Контроль / Control	Учасники ЛНА на ЧАЕС / Chernobyl accident clean-up workers
0–5 (не експресований / no expression)	7	16
5–20	5	32
20–30	11	35
> 30	2	32

казниками < 5 % спонтанного рівня Cyclin D1 відбувається підвищення експресії білка-регулятора G₁/S- фази клітинного циклу, а у осіб із більш високою – > 20 % спонтанною експресією Cyclin D1 спостерігаємо зниження даного показника. Виявлено зниження відносного рівня внутрішньоклітинного Cyclin D1 у лімфоцитах ПК основної групи після стимуляції ФГА, тоді як у осіб контрольної групи стимуляція мітогеном призводила до підвищення експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК в межах G₁/S- фази клітинного циклу (18 годин стимуляції ФГА) (рис. 6).

patients with low (under 5%) spontaneous levels of Cyclin D1, an increase in expression of the cell cycle G₁/S-phase regulator is observed. In subjects with a higher (20 % and higher) spontaneous expression of Cyclin D1, a decrease in presentation is registered after an activation. A decrease in the relative level of intracellular Cyclin D1 is shown in the PB lymphocytes of the main group after stimulation of the PHA, while in the control group, mitogenic stimulation led to an increase in the expression of Cyclin D1 (Fig. 6).

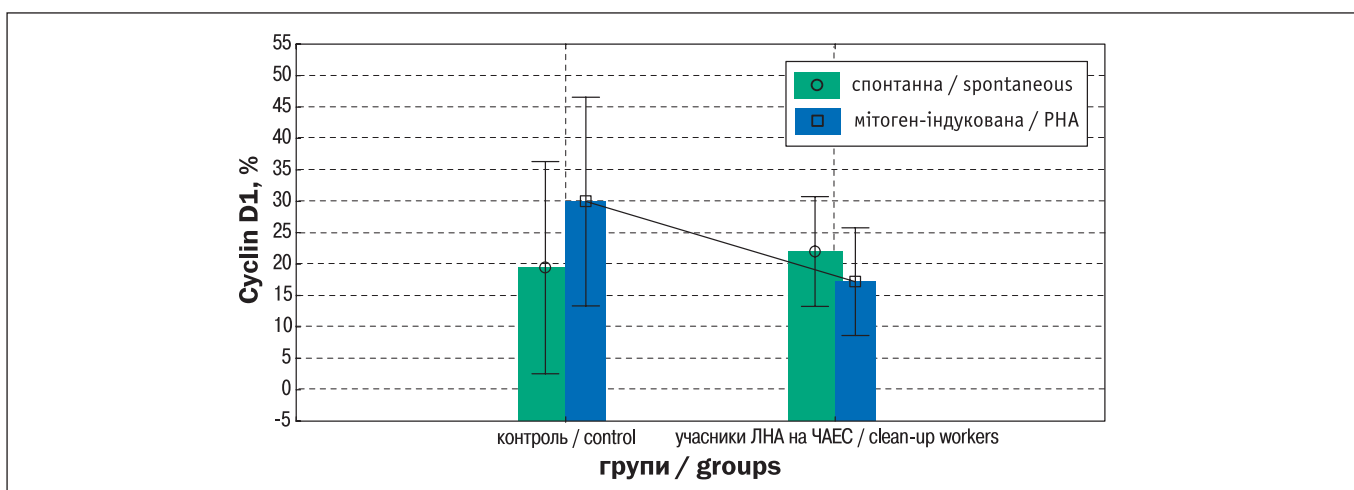


Рисунок 6. Відносний рівень спонтанної та мітоген-індукованої експресії Cyclin D1 у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження

Figure 6. Spontaneous and that mitogen-inducing (PHA) level of expression of Cyclin D1 in lymphocytes of PB

Довжина теломер, як маркер радіаційного опромінення. Наявність радіаційного старіння у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС відноситься до найбільш контроверсійних аспектів біологічних ефектів дії опромінення. Роль модуляції довжини теломер у клітинах людини продемонстрована при віддаленій хромосомній нестабільності, індукованій іонізуючою радіацією [20]. Низкою досліджень було показано різнонаправлені моделі змін довжини теломер. При обстеженні 565 ліквідаторів з Латвії зафіксовано подовження теломерних послідовностей в осіб, які працювали на деактиваційних роботах, при онкологічних захворюваннях, на фоні скорочення довжини теломер у ліквідаторів із катарактами, остеопорозом, атеросклерозом та захворюваннями коронарної системи серця [21]. У нашому дослідженні виявлено статистично значуще зниження середнього показника RTL у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у різних діапазонах доз, порівняно з контролем. Зниження довжини теломер у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у більшій мірі пов'язане з наявністю гострої променевої хворо-

Telomeric length as a marker of radiation exposure. The presence of radiation aging in the humans exposed as a result of the Chernobyl accident is among the most controversial aspects of the biological effects of radiation exposure. The role of telomeric modulation in human cells has been demonstrated with delayed chromosomal instability induced by ionizing radiation [20]. A number of studies have demonstrated different models of changes in telomere length. In the survey of 565 liquidators from Latvia, an extension of telomeric sequences was observed in subjects who worked on deactivation, in oncological patients, together with reducing of telomere lengths in exposed with cataracts, osteoporosis, atherosclerosis and coronary heart diseases [21]. In our study, a statistically significant decrease in the mean RTL in PB leukocytes was found in clean-up workers irradiated in different dose ranges compared with control. Decrease in telomere length in PB leukocytes is related to the presence of acute radiation syndrome in the history and doses over 500 mSv (Table 6). Obtained data demonstrate a relationship between reductions in

би в анамнезі та дозовим навантаженням $D \geq 500$ мЗв (табл. 6). Отримані дані, які демонструють зв'язок між скороченням відносної довжини теломер і клітинною проліферацією. Так, в учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення встановлено кореляційну залежність показників RTL та експресії Cyclin D1 ($r = -0,21$). Встановлено негативну кореляційну залежність ($r = -0,24$; $p < 0,05$) між середнім показником RTL у лімфоцитах ПК та віком всіх обстежених осіб, які увійшли до вибірки аналізу. Водночас, у групі обстежених учасників ЛНА на ЧАЕС простежуються лише загальні тенденції ($r = -0,18$; $p < 0,05$), які демонструють скорочення довжини теломер лімфоцитів ПК відносно віку, що може бути додатковим доказом радіаційно-ідукованого клітинного старіння імунокомпетентних клітин.

Проведено дослідження експресії генів-регуляторів довжини теломер-теломеразного комплексу *TERT*, *TERF1*, *TERF2* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС та осіб контрольної групи. Встановлено позитивну кореляційну залежність ($r = 0,21$; $p < 0,05$) відносного рівня RTL лімфоцитів ПК та експресії гена *TERT*, який регулює активність теломерази. Виявлена закономірність вказує на те, що у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддалений період після опромінення спрацьовує загальний механізм генної регуляції теломер-теломеразного комплексу, а процес відтворення теломерних ділянок залежить від теломеразної активності. Дослідження відносного рівня експресії гена *TERT* у лейкоцитах ПК показало достовірне зростання ($p < 0,01$) середнього значення показника RQ цього гена в лімфоцитах учасників ЛНА на ЧАЕС (рис. 7).

Гени *TERF1*, *TERF2* та білки, які ними кодуються, є основними негативними регуляторами довжини теломер – інгібіторами теломерази. У віддаленому періоді після опромінення в широкому діапазоні доз встанов-

the relative length of telomeres and cell proliferation. Thus, in the late period after exposure a correlation dependence of the RTL indices and expression of Cyclin D1 ($r = -0.21$) was revealed, which demonstrates an increase in the proliferative activity of the cells at the spontaneous expression level of Cyclin D1. The negative correlation dependence ($r = -0.24$; $p < 0.05$) was established between the mean RTL figures in the PB lymphocytes and the age in all subjects who were included in the sample for the analysis. At the same time, only the general tendencies ($r = -0.18$; $p < 0.05$) in the group of surveyed clean-up workers are observed, which demonstrate a reduction in the length of telomeres with age, which may be additional evidence of radiation-dependent cellular aging of the immune cells.

The study of the expression of regulator genes of telomeric-telomerase complex *TERT*, *TERF1*, *TERF2* in PB leukocytes of clean-up workers and control group subjects was conducted. Positive correlation dependence ($r = 0.21$; $p < 0.05$) of the relative level of RTL of PB lymphocytes and expression of the *TERT* gene, which regulates the activity of telomerase, was established. The revealed pattern indicates that in the PB lymphocytes at a late period after exposure the general mechanisms of gene regulation of telomeric telomerase complex are switched, and the process of reproduction of telomeric regions depends on telomerase activity. An investigation of the relative level of expression of the *TERT* gene in PB leukocytes showed a significant increase ($p < 0.01$) of the mean value of the RQ index of this gene in the lymphocytes of the clean-up workers (Fig. 7).

TERF1, *TERF2* genes and the proteins that they encode are the major negative telomeric telomerase inhibitors. In the remote period, after irradiation in a wide range of doses, a statistically significant decrease

Таблиця 6

Відносна довжина теломер у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення в залежності від дози опромінення в умовних одиницях, (M ± SD)

Table 6

RTL in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers at a late period after radiation exposure in a wide range of doses in conventional units, (M ± SD)

Показник Index	Групи обстеження / Groups		
	Контроль Control (n = 21)	Учасники ЛНА на ЧАЕС / Chernobyl accident clean-up workers	
		0,63 < D ≤ 500 мЗв/мSv (n = 39)	D ≥ 500 мЗв/мSv (n = 12)
RTL	17,22 ± 1,70	15,57 ± 3,63	15,47 ± 2,02*

Примітка. * $p \leq 0,01$.
Note. * $p < 0.01$.

лено статистично достовірне зниження експресії генів *TERF1*, *TERF2* у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у порівнянні з контрольною групою (рис. 7).

in the expression of *TERF1*, *TERF2* in the PB leukocytes of clean-up workers was found to be statistically significant compared to the control group (Fig. 7).

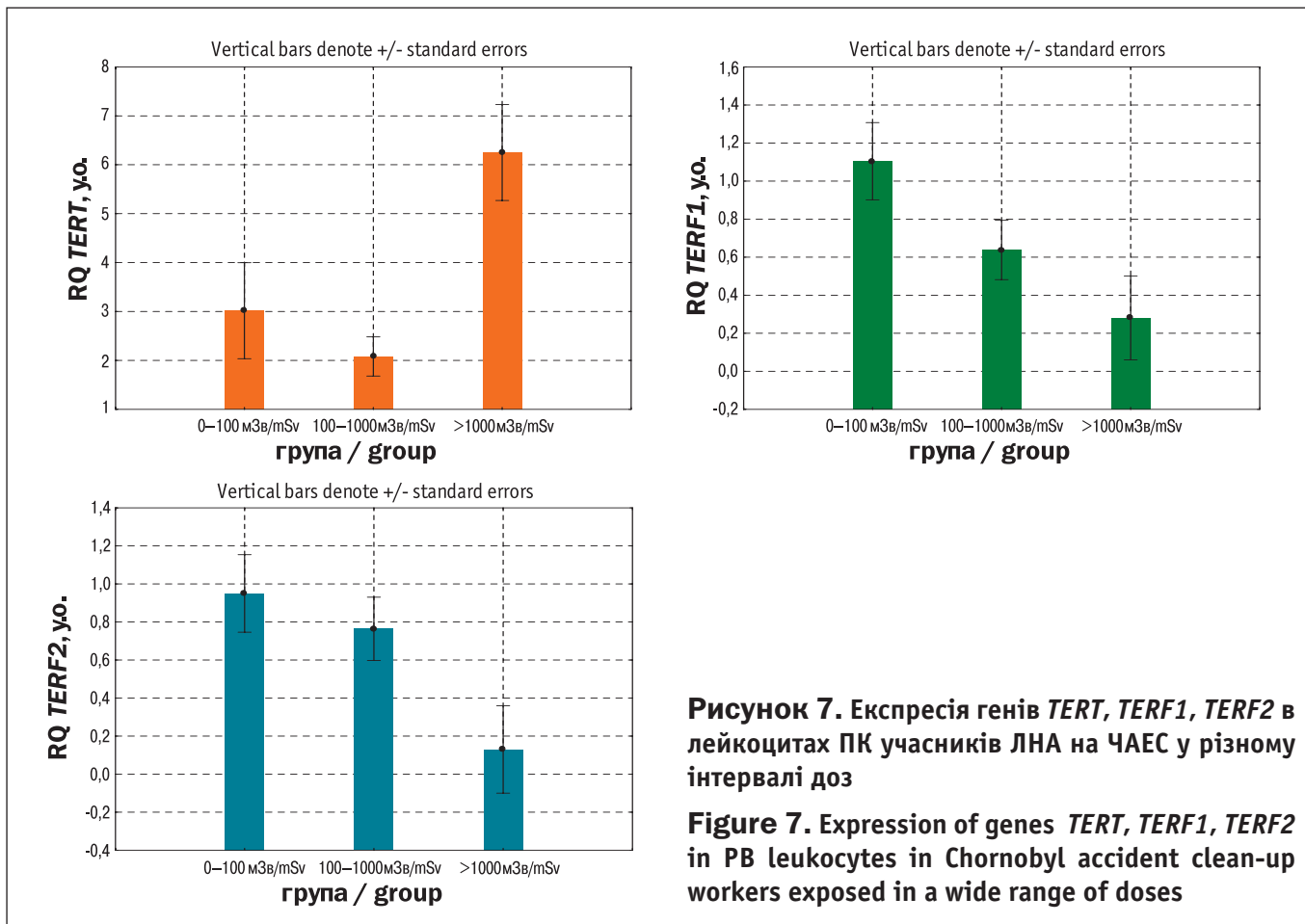


Рисунок 7. Експресія генів *TERT*, *TERF1*, *TERF2* в лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС у різному інтервалі доз

Figure 7. Expression of genes *TERT*, *TERF1*, *TERF2* in PB leukocytes in Chernobyl accident clean-up workers exposed in a wide range of doses

Підвищення експресії гена *TERT*, який кодує теломеразу зворотню транскриптазу, на фоні зниження відносного рівня довжини теломер у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС може бути проявом компенсаторних механізмів, направлених на відновлення теломерних ділянок. Проте радіаційно-індуковане пригнічення експресії генів-інгібіторів теломерази *TERF1*, *TERF2* в лейкоцитах ПК, що виявляється у віддаленому періоді після опромінення може ініціювати активацію механізмів передчасного реплікативного старіння лейкоцитів, а за умов гіперекспресії гена *TERT* створювати умови запуску канцерогенних процесів.

An increase in the expression of the *TERT* gene encoding telomerase reverse transcriptase, with the decrease in the RTL in PB leukocytes of clean-up workers could be a manifestation of compensatory mechanisms aimed to a recovery of telomeric sites. However, a radiation induced inhibition of the expression of *TERF1*, *TERF2* could also represent an activation of mechanisms of premature replicative aging of leukocytes, and, under conditions of hyper-expression of the *TERT* gene, create conditions for the launch of carcinogenic processes.

ВИСНОВКИ

В результаті дослідження продемонстровані закономірності експресії генів, що залучаються до регуляції апоптозу, імунного запалення та адгезії в групах учасників ЛНА на ЧАЕС, які зазнали опромінення в широкому діапазоні доз:

1. Визначено статистично значуще і додозалежне зниження експресії генів *BCL2*, *SERPINB9*, *CDKN2A*,

CONCLUSIONS

As a result of this study, patterns in expression of genes involved in regulation of apoptosis, immune inflammation and adhesion in the groups of clean-up workers exposed to a wide range of doses were demonstrated:

1. A statistically significant and dose-dependent decrease in expression of the *BCL2* gene, as well as of

STAT3; підвищення експресії гена *MCF2L* (позитивного регулятора апоптозу) та гіперекспресія гена *TP53* (при дозах до 100 мЗв) у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених в інтервалі доз від 0 до 100 мЗв.

2. Найвищу активацію гена імунного запалення *IL1B* виявлено у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених в інтервалі доз від 0 до 100 мЗв, а також визначено негативну кореляцію між експресією *IL1B* та кількістю $CD19^{+3^{-}}$ і $CD3^{-}HLA-DR^{+}$ В-лімфоцитів, $CD4^{+8^{-}}$ клітин та співвідношенням $CD4^{+}/CD8^{+}$;

3. Визначено гіперекспресію гена *TNF* у дозах від 100 мЗв до 1000 мЗв, а в більш високих дозах опромінення виявлено комбінацію супресії *TNF* з підвищенням експресії гена *IFNG* та кореляцією з кількістю лімфоцитів $CD3^{+16^{+}56^{+}}$ та $CD25^{+}$. Активація генів імунного запалення супроводжувалася гальмуванням експресії гена *CLSTN2*, включеного в регуляцію адгезії клітин.

4. Визначена тенденція до збільшення рівня фосфорильованої форми гістона H2AX вказує на збереження або вторинну індукцію пошкодження ДНК.

5. Визначена підвищена спонтанна експресія Cyclin D1 може відображати зміни регуляції проліферації та індукувати блок клітинного циклу у контрольній точці G_1/S , ініціювати клітинне старіння та апоптоз у пошкоджених клітинах;

6. Визначено зниження відносної довжини теломер, що може бути індуковано комбінованим впливом віку та дози опромінення з істотним модифікуючим ефектом супутньої патології.

Аналіз зв'язку між показниками клітинного імунітету, експресії генів, довжини теломер, цитоплазматичних регуляторних білків та дозою опромінення демонструє перспективи використання їх, як біологічних маркерів у пізній період після опромінення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Biomarkers of ionizing radiation exposure: a multiparametric approach / D. Zeegers, S. Venkatesan, Shu Wen Koh, Grace Kah Mun Low, P. Srivastava, N. Sundaram et al. *Genome Integr.* 2017. Vol. 8. P. 6. doi: 10.4103/2041-9414.198911.
2. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna : International Atomic Energy Agency, 2011.
3. Balajee A. S., Bertucci A., Taveras M., Brenner D. J. Multicolour FISH analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 2014. Vol. 29. P. 447–455. doi: 10.1093/mutage/geu041.
4. In vitro RABIT measurement of dose rate effects on radiation induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes / A. Bertucci, L. B.

the *SERPINB9*, *CDKN2A*, and *STAT3* genes in different subgroups of clean-up workers in parallel to a dose-dependent overexpression of the gene of the positive regulator of apoptosis *MCF2L* and upregulation of *TP53* (in dose range from 0 to 100 mSv);

2. The activation of immune inflammation genes (*IL1B*) was the highest in the subgroup of workers irradiated in the dose interval from 0 to 100 mSv, and a negative correlation between at *IL1B* expression and the number of $CD19^{+3^{-}}$ and $CD3^{-}HLADR^{+}$ B-lymphocytes, $CD4^{+8^{-}}$ cells and $CD4^{+}/CD8^{+}$ ratio;

3. Hyper-expression of *TNF* gene in doses above 100 mSv to 1 000 mSv, and in higher doses a combination of *TNF* downregulation with increase in *IFNG* gene expression and its correlation with numbers of $CD3^{+16^{+}56^{+}}$ and $CD25^{+}$ lymphocytes. The activation of the immune inflammation genes was accompanied by inhibition of expression *CLSTN2* gene involved in cell adhesion;

4. A tendency to increase the expression the phosphorylated form of H2AX indicating the persistence or secondary induction of DNA damage;

5. Increased spontaneous expression of Cyclin D1 protein, that may reflect changes in the regulation of proliferation and induce a block of cell cycle at G_1/S checkpoint, initiate cellular aging and apoptosis in damaged cells;

6. Telomere shortening induced by a combined influence of age and radiation dose as well as a modifying effect of concomittant pathology.

Analysis of a connection between the cellular immunity, gene expression, telomere length, intracellular regulatory proteins parameters and radiation dose demonstrates perspectives of use as biological markers at a late period after radiation exposure.

REFERENCES

1. Zeegers D, Venkatesan S, Koh SW, Low GK, Srivastava P, Sundaram N, et al. Biomarkers of ionizing radiation exposure: a multiparametric approach. *Genome Integr.* 2017;8:6. doi: 10.4103/2041-9414.198911.
2. IAEA. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2011.
3. Balajee AS, Bertucci A, Taveras M, Brenner DJ. Multicolour FISH analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 2014;29:447-55. doi: 10.1093/mutage/geu041.
4. Bertucci A, Smilenov LB, Turner HC, Amundson SA, Brenner DJ. In vitro RABIT measurement of dose rate effects on radiation

- Smilenov, H. C. Turner, S. A. Amundson, D. J. Brenner. *Radiat. Environ. Biophys.* 2016. Vol. 55. P. 53–59. doi: 10.1007/s00411-015-0628-z.
5. Lue S. W., Repin M., Mahnke R., Brenner D. J. Development of a high-throughput and miniaturized cytokinesis-block micronucleus assay for use as a biological dosimetry population triage tool. *Radiat. Res.* 2015. Vol. 184. P. 134–142.
6. Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome / M. P. Hande, T. V. Azizova, C. R. Geard, Burak L. E., Mitchell C. R., Khokhryakov V. F., et al. *Am. J. Hum. Genet.* 2003. Vol. 72. P. 1162–1170.
7. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEb / S. Barnard, E. A. Ainsbury, J. Al-hafidh, V. Hadjidekova, R. Hristova, C. Lindholm et al. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2015. Vol. 164. P. 265–270. doi: 10.1093/rpd/ncu259.
8. Comparison of established and emerging biodosimetry assays / K. Rothkamm, C. Beinke, H. Romm, C. Badie, Y. Balagurunathan, S. Barnard et al. *Radiat. Res.* 2013. Vol. 180. P. 111–119. doi: 10.1667/RR3231.1.
9. Identification of gene expression biomarkers for predicting radiation exposure / T. P. Lu, Y. Y. Hsu, L. C. Lai, M. H. Tsai, E. Y. Chuang. *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 6293. doi: 10.1038/srep06293.
10. Van Houdt I. S., Oudejans J. J., Van den Eertwegh A. J. Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 6400–6407.
11. Bishop D. T. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J. Natl Cancer Inst.* 2002. Vol. 94. P. 894–903.
12. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma / A. Subramaniam, M. K. Shanmugam, E. Perumal, F. Li, A. Nachiyappan, X. Dai et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1835, iss. 1. C. 46–60. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.10.002.
13. STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress / F. M. Uckun, S. Qazi, H. Ma, L. Tuel-Ahlgren, Z. Ozer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, iss. 7. C. 2902–2907. doi: 10.1073/pnas.0909086107.
14. Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. H2AX Phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *J. Nucleic Acids.* 2010. Vol. 2010. Pii: 920161. doi: 10.4061/2010/920161.
15. Kuo L. J., Yang L. X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008. Vol. 22. P. 305–309.
16. Firsanov D. V., Solovjeva L. V., Svetlova M. P. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clin. Epigenetics.* 2011. Vol. 2. P. 283–297. doi: 10.1007/s13148-011-0044-4.
17. 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. doi: 10.4161/cc.28139.
- induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat Environ Biophys.* 2016;55:53-9. doi: 10.1007/s00411-015-0628-z.
5. Lue SW, Repin M, Mahnke R, Brenner DJ. Development of a high-throughput and miniaturized cytokinesis-block micronucleus assay for use as a biological dosimetry population triage tool. *Radiat Res.* 2015;184:134-42.
6. Hande MP, Azizova TV, Geard CR, Burak LE, Mitchell CR, Khokhryakov VF, et al. Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1162-70.
7. Barnard S, Ainsbury EA, Al-hafidh J, Hadjidekova V, Hristova R, Lindholm C, et al. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEb. *Radiat Prot Dosimetry.* 2015;164:265-70. doi: 10.1093/rpd/ncu259.
8. Rothkamm K, Beinke C, Romm H, Badie C, Balagurunathan Y, Barnard S, et al. Comparison of established and emerging biodosimetry assays. *Radiat Res.* 2013;180:111-9. doi: 10.1667/RR3231.1.
9. Lu TP, Hsu YY, Lai LC, Tsai MH, Chuang EY. Identification of gene expression biomarkers for predicting radiation exposure. *Sci Rep.* 2014;4:6293. doi: 10.1038/srep06293.
10. Van Houdt IS, Oudejans JJ, Van den Eertwegh AJ. Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6400-7.
11. Bishop DT. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:894-903.
12. Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, Li F, Nachiyappan A, Dai X, et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(1):46-60. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.10.002.
13. Uckun FM, Qazi S, Ma H, Tuel-Ahlgren L, Ozer Z. STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(7):2902-7. doi: 10.1073/pnas.0909086107.
14. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *J Nucleic Acids.* 2010;2010. pii: 920161. doi: 10.4061/2010/920161.
15. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22:305-9.
16. Firsanov DV, Solovjeva LV, Svetlova MP. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clin Epigenetics.* 2011;2:283-97.
17. 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;13(8):1248-55. doi: 10.4161/cc.28139.

18. Atadja P., Wong H., Veillete C. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1995. Vol. 217. P. 205–216.
19. Fukami -Kobayashi J., Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp. Cell Res.* 1999. Vol. 246, No. 2. P. 338–347.
20. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts / F. Berardinelli, A. Antocchia, R. Buonsante, S. Gerardi, R. Cherubini, V. De Nadal et al. *Environ. Mol. Mutagen.* 2013. Vol. 54, No. 3. P.172–179. doi: 10.1002/em.21761.
21. Reste J., Kurjane N., Zvagule T. Mortality analysis in Chernobyl clean-up workers from Latvia. In : *14th International Congress of Radiation Research* (Aug 28 - Sept 1. 2011, Warszawa). Poland, 2011. P. 120–121.
18. Atadja P, Wong H, Veillete C. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1995;217:205-16.
19. Fukami-Kobayashi J, Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res.* 1999;246(2):338-47.
20. Berardinelli F, Antocchia A, Buonsante R, Gerardi S, Cherubini R, De Nadal V, et al. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts. *Environ Mol Mutagen.* 2013;54(3):172-9. doi: 10.1002/em.21761.
21. Reste J, Kurjane N, Zvagule T. Mortality analysis in Chernobyl clean-up workers from Latvia. In: *14th International Congress of Radiation Research* (Aug 28 - Sept 1. 2011, Warszawa, Poland). Warszawa; 2011. p. 120-1.

Стаття надійшла до редакції 19.07.2018

Received: 19.07.2018