

# PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ OSOBNICZA – CZY MOŻLIWE JEST JEJ PRECYZYJNE OKREŚLENIE?

## *Individual radiosensitivity – is it possible to precisely determine it?*

Anna Matyjanka, Krzysztof W. Fornalski

**Streszczenie:** Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej (ICRP) powołała do życia Grupę Roboczą (Task Group) nr 128 poświęconą możliwości indywidualizacji ochrony radiologicznej („*Individualisation and Stratification in Radiological Protection: Implications and Areas of Application*”). Przyczyną takiego działania jest między innymi fakt, iż wiele najnowszych badań naukowych potwierdziło, że każdy organizm w różny sposób reaguje na takie same dawki promieniowania jonizującego. Najwięcej danych na ten temat pochodzi od pacjentów onkologicznych, u których przed zastosowaniem radioterapii wykonywane są badania radiobiologiczne, mające na celu oszacowanie czy reakcja organizmu na promieniowanie nie będzie zbyt nasiloną (tzw. promieniowrażliwość). W niniejszej pracy zaproponowano przykładową możliwość zindywidualizowania podejścia do ochrony radiologicznej, która z zasady nie uwzględnia takich czynników wpływających na odpowiedź na działanie promieniowania jonizującego, jak właśnie promieniowrażliwość. W artykule dokonano przeglądu metod radiobiologicznych, których potencjalne wykorzystanie do szacowania promieniowrażliwości zostało przetestowane w kilku wybranych pracach naukowych. Na tej podstawie zaproponowano własny uproszczony dwuparametryczny schemat badań, którego celem jest wyznaczenie poziomu promieniowrażliwości, mogący mieć potencjalne zastosowanie w ochronie radiologicznej pracowników narażonych na działanie promieniowania jonizującego.

**Abstract:** International Commission on Radiological Protection (ICRP) created a Task Group no. 128 on the possibility of individualization of radiation protection („*Individualisation and Stratification in Radiological Protection: Implications and Areas of Application*”). The reason for that is the fact, that many recent scientific studies showed, that each organism responses in different way for the same doses of ionizing radiation. Most of existing studies describe oncological patients which are radiobiologically tested before the radiotherapy, to assess their individual radiosensitivity (to prevent overreaction to radiation). In the presented paper we proposed exemplary approach to individualization of radiation protection, because today radiation protection does not implement the radiosensitivity phenomenon. This article contains the review of radiobiological methods from selected scientific studies which can be potentially used for radiosensitivity assessment. Based on that we proposed a simplified two parametric radiosensitivity test which can be potentially able to adapt for individual radiation protection of workers.

**Słowa kluczowe:** ochrona radiologiczna, promieniowanie jonizujące, promieniowrażliwość, promieniopodatność, metody radiobiologiczne

**Keywords:** radiation protection, ionizing radiation, radiosensitivity, radiosusceptibility, radiobiological methods

### Wstęp

W wyniku działania promieniowania jonizującego możliwe jest wystąpienie dwóch rodzajów skutków dla całego organizmu: stochastycznych i deterministycznych. Efekty deterministyczne to efekty wczesne i wynikają ze śmierci komórek lub ich nieprawidłowego funkcjonowania. Przykłady efektów deterministycznych to zapalenie skóry i zapalenie błon śluzowych. Pojawiają się zazwyczaj po przekroczeniu pewnej dawki progowej i nasilają się wraz z jej wzrostem. Występują w niewielkim czasie po ekspozycji na promieniowanie. Zwiększone ryzyko wystąpienia skutków deterministycznych w zdrowych tkankach po napromieniowaniu określane jest jako promieniowrażliwość/radiowrażliwość (ang. radiosensitivity). Z kolei efekty stochastyczne to efekty późne i pochodzą głównie z namnażania komórek, które uległy mutacji (a więc stabilnym niele-

talnym uszkodzeniom DNA). W ochronie radiologicznej postuluje się, iż wraz ze zwiększeniem dawki wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia tych efektów (model LNT), ale nie ich nasilenia. Powszechnie jest przyjęte, że występowanie efektów stochastycznych nie wiąże się z wartością progową, aczkolwiek bardzo wiele badań temu przeczy, co stanowi obszerny temat analiz wpływu niskich dawek promieniowania na ryzyko radiacyjne (celowo nie będziemy wchodzić głębiej w ten temat). Efekty stochastyczne dotyczą więc nowotworów indukowanych promieniowaniem jonizującym, a które pojawiają się nawet do kilkunastu lat po narażeniu. Zwiększone ryzyko pojawienia się skutków stochastycznych definiowane jest jako promieniopodatność (ang. radiosusceptibility) [4]. Nadal jednak trwają dyskusje nad takim podziałem, jak i związanym z tym nazewnictwem. Powoduje to, że dla obu przypadków (stochastycznych i deterministycznych) nadal

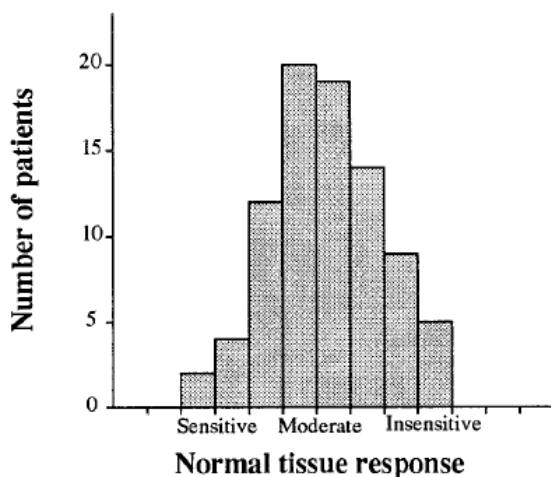
potocznie jest używane jedno wspólne określenie – radiowrażliwość (lub promieniowrażliwość). Takiego też określenia będziemy używać w dalszej części artykułu.

### 1. Promieniowrażliwość

Szacuje się, iż od 5% do 15% populacji ludzkiej może być promieniowrażliwa. Liczby te pochodzą z obserwacji niepożądanych efektów ubocznych występujących u pacjentów leczonych za pomocą promieniowania jonizującego, jednakże nie jest to grupa reprezentatywna dla populacji. Szczęśliwie jest coraz więcej badań dotyczy także badania promieniowrażliwości wśród osób zdrowych. Dzięki temu jest szansa, aby zagadnienie promieniowrażliwości zostało w przyszłości uwzględnione w zasadach ochrony radiologicznej, by móc precyzyjniej i bardziej indywidualnie chronić osoby zawodowo narażone na promieniowanie jonizujące [5]. Obecnie określone w ustawie – Prawo atomowe [6] dawki graniczne dla pracowników narażonych na działanie promieniowania jonizującego (6 mSv, 20 mSv lub 100 mSv w ciągu 5 lat) zostały ustalone na podstawie rekomendacji Międzynarodowej Komisji Ochrony Radiologicznej ICRP (ang. International Commission on Radiological Protection). Określono je bazując na ówczesnej wiedzy o skutkach zdrowotnych wywołanych działaniem promieniowania jonizującego u osób poddanych radioterapii oraz w dużej mierze u osób, które przeżyły atak bombowy na Hiroszimę i Nagasaki lub też były narażone na większy poziom promieniowania, na przykład podczas wypadków radiacyjnych. W konsekwencji tego powszechnie w ochronie radiologicznej przyjmowany

jest wspomniany już model liniowy bezprogowy (LNT – Linear-non-threshold) dla efektów stochastycznych, który zakłada, że każda dawka wywołuje negatywne skutki i wymagana jest ochrona nawet przed najmniejszym działaniem promieniowania jonizującego. Mimo wielu badań dowodzących, że skutki wywoływane oddziaływaniem promieniowania są różne w zależności od wielu czynników, między innymi indywidualnej promieniowrażliwości, nie zmieniło to zaleceń ICRP odnośnie dawek granicznych. Dlatego też nadal obowiązujące w Polsce i na świecie przepisy dotyczące ochrony radiologicznej nie uwzględniają indywidualnej promieniowrażliwości. Przyjęcie ściśle określonych dawek granicznych, jednakowych dla każdego człowieka, jest łatwe i tanie we wprowadzeniu i używaniu, jednakże istnieje silna potrzeba indywidualizacji dawek w wielu sytuacjach. Przykładem jest leczenie radioterapeutyczne lub, w przyszłości, dalekie podróże kosmiczne. Uproszczenia przyjęte przez ICRP wynikają z obawy, że system ochrony radiologicznej stałby się zbyt skomplikowany w stosowaniu. Dodatkowo nie używanie indywidualnych parametrów, jak płeć, pozwala uniknąć problemów prawnych oraz etycznych [7].

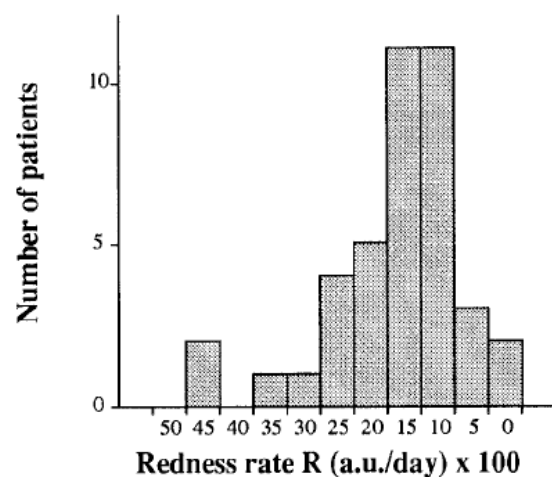
Obecnie radiowrażliwość jest testowana klinicznie jedynie przy planowaniu leczenia onkologicznego, w kilku przypadkach: gdy pacjent cierpi na rzadkie choroby genetyczne, na przykład zespół ataksja-teleangiektazja (mutacje w genie ATM) lub zespół LIG4 (mutacja w genie LIG4) [4]. Pacjenci z taką zdiagnozowaną chorobą cierpią na mutacje genów, które są niezbędne do prawidłowej naprawy DNA [7]. Podobnie w przypadku kilku częstszych chorób jak choroby neurode-



**Rys. 1.** Rozkład zmienności występowania poważnych skutków ubocznych po przebytej radioterapii w grupie 85 pacjentów, dla tkanki zdrowej. Rozkład Gaussa sugeruje, że radiowrażliwość jest cechą populacyjną

Number of patients – liczba pacjentów; Normal tissue response – normalna odpowiedź tkanek; Sensitive – wrażliwa; Moderate – umiarkowana; Insensitive – niewrażliwa [3]

**Fig. 1.** Distribution of variability in the occurrence of serious side effects after radiotherapy in a group of 85 patients, for healthy tissue. The Gaussian distribution suggests that radiosensitivity is a population trait [3]



**Rys. 2.** Rozkład zmienności występowania poważnych skutków ubocznych (wyrażony, jako poziom zaczerwienienia, który został zmierzony za pomocą spektrofotometru) po przebytej radioterapii u 38 pacjentów z nowotworem piersi, dla tkanki zdrowej. Niesymetryczny rozkład Gaussa może wskazywać na hiperpromieniowrażliwość osób z ogona rozkładu. Number of patients – liczba pacjentów; Redness rate – poziom zaczerwienienia [3]

**Fig. 1.** Distribution of variability in the occurrence of serious side effects after radiotherapy in a group of 85 patients, for healthy tissue. The Gaussian distribution suggests that radiosensitivity is a population trait [3]

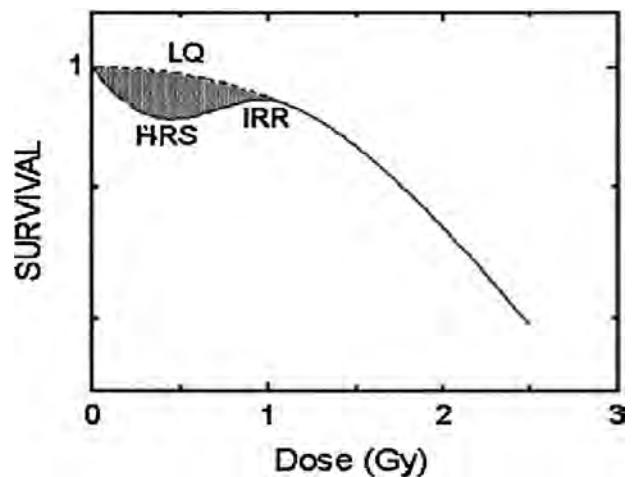
generacyjne, twardzina układowa lub cukrzyca, które również są związane z pewnym stopniem wrażliwości na promieniowanie. Ponadto, gdy w rodzinie pacjentów występowały choroby nowotworowe, oraz gdy pacjentem jest dziecko [4]. Ilustrację zróżnicowanej odpowiedzi tkankowej pacjentów onkologicznych przedstawiono na rys. 1. Wykres ten jest w przybliżeniu gaussowski i obrazuje jak naturalnie zróżnicowane mogą być reakcje organizmów na działanie promieniowania jonizującego, co sugeruje klasyczny rozkład radiowrażliwości wśród ludzi jako cechy populacji.

Występowanie rzadkich chorób genetycznych, których jednym z objawów jest bardzo silna promieniowrażliwość, świadczy o tym, że jest to cecha uwarunkowana genetycznie. Jednakże te schorzenia dotyczą bardzo małego odsetka populacji, dlatego prawdopodobnie promieniowrażliwość obserwowana u osób niecierpiących na żadną chorobę genetyczną, wynika ze współdziałania większej liczby genów. Oznacza to, że promieniowrażliwość jest złożoną i indywidualną cechą, na którą wpływ ma wiele czynników. Zaliczamy do nich między innymi wiek, płeć oraz styl życia (na przykład palenie tytoniu, aktywność fizyczna, dieta) [7]. Wszystkie te czynniki powodują, że przepisy ochrony radiologicznej powinny uwzględniać promieniowrażliwość i należałoby stosować indywidualne podejście do każdego człowieka podczas kwalifikowania go do pracy przy narażeniu na promieniowanie jonizujące [15]. Dodatkowo, poza promieniowrażliwością, na odpowiedź organizmu na działanie promieniowania jonizującego wpływ ma również stochastyczna natura zdarzeń wewnątrzkomórkowych wywołanych promieniowaniem. Wszystkie te czynniki sprawiają, że bardzo trudno jest przewidzieć indywidualne reakcje organizmu na promieniowanie [7].

## 2. Hiper-promieniowrażliwość

Obniżona przeżywalność komórek w stosunku do oczekiwanej, wynikającej z popularnego biofizycznego modelu liniowo-kwadratowego, występująca dla dawek poniżej 0,3 Gy nazywana jest hiper-promieniowrażliwością, HRS (ang. hiper-radiosensitivity), na małe dawki promieniowania. Z efektem tym jest związane zjawisko występujące dla dawek w przedziale 0,3–0,6 Gy, określonego jako zwiększona radiooporność, IRR (ang. increased radioresistance), dla której następuje wzrost przeżywalności [8]. Efekt HRS/IRR dla krzywej przeżywalności zaprezentowano na rys. 3. Poziomą dawkę, poniżej której występuje zjawisko hiper-promieniowrażliwości może być różny w zależności od rodzaju komórek [9].

Nadal nie są w pełni poznane mechanizmy odpowiedzialne za występowanie zjawiska HRS. Możliwe jest powiązanie zjawiska hiper-promieniowrażliwości z wadliwym systemem naprawy DNA oraz regulacją cy-



**Rys. 3.** Typowa krzywa przeżywania komórek z dowodami na hiper-promieniowrażliwość (HRS) oraz radiooporność (IRR). Linia przerywana przedstawia ekstrapolację niskiej dawki z liniowego modelu kwadratowego (LQ) zastosowanego do danych dla wysokiej dawki. Dose – dawka (pochłonięta), Survival – przeżywalność [8]

**Fig. 3.** Typical cell survival curve with evidence of hyper-radiosensitivity (HRS) and radioresistance (IRR). The dashed line represents the low dose extrapolation from the linear quadratic (LQ) model applied to the high dose data [8]

klu komórkowego. Jedną z hipotez zakłada, że zjawisko HRS jest wynikiem omińnięcia przez komórkę punktu kontrolnego G2/M i wystąpienie procesu apoptozy [8].

## 3. Metody szacowania promieniowrażliwości

Znalezienie metody umożliwiającej określenie promieniowrażliwości osobniczej jest bardzo istotne dla ochrony radiologicznej pracowników zawodowo narażonych na działanie promieniowania jonizującego. Podobnie jak ważne jest obecnie przy planowaniu radioterapii. Ze względu na mnogość czynników wpływających na radiowrażliwość określenie jej jest bardzo złożonym zagadnieniem. Większość obecnie wykorzystywanych metod jest opartych na różnych procesach komórkowych takich jak przeżywalność komórkowa, zdolność do naprawy uszkodzeń, tworzenie aberracji chromosomowych lub apoptoza (programowana śmierć komórki). Te parametry są elementem różnicującym w testach szacujących promieniowrażliwość [10]. Idealna metoda powinna spełniać następujące założenia: nieinwazyjność, duża czułość i swoistość, krótki czas trwania umożliwiający stosowanie kliniczne oraz możliwość automatyzacji [11].

Aktualnie prowadzone są badania w kierunku określania indywidualnej promieniowrażliwości na bazie testów jednoparametrycznych (oszacowanie jednego parametru określającego promieniowrażliwość) oraz wieloparametrycznych (znacznie dokładniejszych, ale też droższych i pracochłonnnych). Poniżej pokrótce omówiono najważniejsze z nich, które mogą zostać wykorzystane do oszacowania promieniowrażliwości.

- **Analiza aberracji chromosomowych**

Aberracje chromosomowe to wszystkie nieprawidłowości w budowie fizycznej chromosomów. Wy różniamy aberracje liczbowe, czyli zmiany w liczbie chromosomów, oraz aberracje strukturalne – zmiany w morfologii chromosomów [12]. Do ich analizy zazwyczaj wykorzystuje się limfocyty krwi obwodowej, ponieważ krew jest łatwo dostępną tkanką i obiega cały organizm, więc może być odzwierciedleniem procesów fizyko-chemicznych całego organizmu. Jednymi z częściej wykorzystywanych aberracji do oceny promieniowrażliwości są chromosomy dicentryczne, chromosomy pierścieniowe, translokacje oraz złamania chromatydowe. W celu ich analizy limfocyty krwi są stymulowane do podziału komórkowego, ponieważ większość z nich znajduje się w spoczynkowej fazie G0 cyklu komórkowego. Następnie są zatrzymywane w początkowym etapie mitozy (metafazie), co umożliwia ich obserwację i analizę pod mikroskopem. Jednym z częściej stosowanych testów, który wykorzystuje analizę aberracji chromosomowych, jest G2-test. W tym badaniu limfocyty krwi obwodowej PBL (ang. peripheral blood lymphocytes) są naświetlane w fazie G2 cyklu komórkowego i następnie analizowane po ich zatrzymaniu w metafazie. Liczba zaobserwowanych aberracji, które nie zostały naprawione w punkcie kontrolnym G2/M, służy do szacowania poziomu promieniowrażliwości [13].

Innymi badanymi uszkodzeniami są translokacje. Powstają one na skutek złamań chromosomów i wymiany tych fragmentów między chromosomami. Jedną z częściej wykorzystywanych metod do analizy translokacji jest technika FISH (ang. fluorescence in situ hybridization). Polega ona na zastosowaniu sond molekularnych, które wiążą się z określonymi odcinkami DNA. Metoda FISH wykorzystuje metody fluorescencyjne do detekcji tych sond [12].

- **Test ognisk histonu  $\gamma$ -H2AX**

W miejscach, w których pojawiają się podwójnoniciowe pęknięcia DNA – DSB (ang. double strand break), następuje fosforylacja H2AX (białka tworzącego chromatynę) i powstanie histonu  $\gamma$ -H2AX. Fosforylowana forma H2AX ułatwia pojawienie innych czynników naprawy DNA i utrzymuje uszkodzone fragmenty w bliskiej odległości od uszkodzonego chromosomu. W wyniku zgromadzenia w jednym miejscu czynników naprawy DNA powstaje tak zwane ognisko, które jest możliwe do zwizualizowania w mikroskopie z użyciem barwienia fluorescencyjnego. Test histonu  $\gamma$ -H2AX jest bardzo czułą metodą wykrywania uszkodzeń DNA, którą można używać nawet dla tak niskich dawek jak 2 mGy. Zastosowanie tej metody jako pomiaru zdolności naprawy DNA – DRC (ang. DNA repair capacity), może być wykorzystane do oceny promieniowrażliwości [14].

Jednakże nie wszystkie syndromy radiowrażliwości (jednostki chorobowe, których jednym z objawów jest wysoka radiowrażliwość) są związane z wadami naprawy DSB, dlatego test ognisk histonu  $\gamma$ -H2AX nie może samodzielnie prawidłowo rozpoznać wszystkich osób promieniowrażliwych [15].

- **Test mikrojądrowy**

Mikrojądra, MN (ang. micronuclei), to owalnych kształtów twory powstałe z chromosomów lub ich fragmentów, które po nieprawidłowym podziale jądra komórkowego pozostały w cytoplazmie. Oznacza to, że powstawanie mikrojąder jest związane z aberracjami chromosomowymi liczbowymi lub strukturalnymi, utratą chromosomów lub ich fragmentów. MN są łatwe do zwizualizowania za pomocą mikroskopu, co umożliwia ich zliczenie zarówno w sposób manualny jak i przy użyciu systemów analizy obrazu. Z powodu zaniku liczby mikrojąder wraz z dalszym podziałem komórki, do ich badania najczęściej stosuje się cytochłazynę B, która blokuje podział cytoplazmy. Technika CBMN (ang. cytokinesis-blocked micronucleus) umożliwia zliczanie mikrojąder w komórkach dwujądrzastych [16].

- **Test przedwczesnej kondensacji chromosomów PCC**

Technika PCC (ang. Premature chromosome condensation) polega na wywoływaniu kondensacji chromosomów, które są jeszcze w fazie spoczynku. Badane komórki są pobudzane do kondensacji za pomocą łączenia z komórkami mitotycznymi lub poddawania działaniu inhibitorów fosfataz. Dzięki temu możliwa jest ocena aberracji chromosomowych w fazach G1 i G2, co umożliwia przeprowadzenie analiz również na komórkach, które nie są zdolne do podziału (wejścia w metafazę). Metoda ta jest szczególnie odpowiednia dla analizy złamań chromatydowych w fazie G2, ponieważ jest to najbardziej promieniowrażliwa faza cyklu komórkowego [14].

- **Analiza polimorfizmu pojedynczego nukleotydu SNP**

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism), to zmienność kolejności nukleotydów w DNA między przedstawicielami danego gatunku lub między parami chromosomów jednego osobnika [17]. Każdy organizm różni się między sobą zdolnością do reperacji uszkodzeń DNA, co może być związane z polimorfizmem genów ich naprawy. Badania SNP genów związanych z mechanizmem naprawy poprzez scalanie niehomologicznych końców DNA, NHEJ (ang. non-homologous end joining), wykazały ich powiązanie ze zwiększoną promieniowrażliwością [18].

liwością i występowaniem nowotworów. Wiadomo także, że błędy w procesach naprawy DNA zwiększają radiowrażliwość w przypadku niektórych chorób oraz nowotworów. Jedną z metod analizy SNP jest PCR-RFLP (ang. polymerase chain reaction amplified restriction fragment length polymorphism) [18]. Polega ona na powieleniu fragmentów DNA za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), a następnie przy użyciu enzymów restrykcyjnych pocięciu ich na fragmenty o różnej długości. Wielkości tych fragmentów mogą być następnie porównywane między osobami badanymi.

#### • Test przeżywalności SF2

Test przeżywalności SF2 (ang. surviving fraction at 2 Gy) to badanie polegające na ocenie zdolności komórek do podziału (tworzenia kolonii) [19]. Pobrane komórki są naświetlane dawką 2 Gy, następnie zliczone i hodowane przez następne 1-3 tygodnie, zależnie od rodzaju komórek. Równocześnie hodowane są również komórki nienaświetlone (kontrolne), w celu określenia wydajności hodowli PE (ang. plating efficiency) [20]. Obliczona po tym czasie frakcja przeżywalności SF2, z równania 1, wykorzystywana jest do szacowania poziomu promieniowrażliwości. Największą wadą tej metody jest długi czas jej trwania, który może wynosić nawet do 4 tygodni (dla fibroblastów) [19].

$$SF2 = \frac{\text{liczba komórek (po hodowli)}}{\text{liczba komórek (przed hodowlą)} \cdot \frac{PE}{100}} \quad (1)$$

#### • Test kometowy

Test kometowy (ang. comet assay), nazywany również elektroforezą (ruch cząstek pod wpływem działania pola elektrycznego) pojedynczych komórek, SCGE (ang. single cell gel electrophoresis), służy do wykrywania uszkodzeń DNA. Gdy test jest wykonywany w warunkach neutralnych (obojętne pH) pozwala na identyfikację DSB. Metoda tego badania polega na umieszczeniu i unieruchomieniu napromieniowanych komórek w żelu agarazowym, następnie za pomocą buforu lizującego przerwania ciągłości błony komórkowej i wykonaniu elektroforezy na komórkach umieszczonych w buforze do elektroforezy. Próbkę poddanej takiej procedurze są barwione i w kolejnym kroku analizowane za pomocą metod komputerowych. Otrzymane do analizy obrazy przypominają kształtem kometę, której głowę tworzy materiał DNA pozostały w jądrze komórkowym, natomiast ogon zawiera uszkodzone fragmenty DNA przemieszczone pod wpływem pola elektrycznego. Parametrem oceniającym uszkodzenia DNA w teście kometowym jest najczęściej tzw. moment ogonowy, który jest równy iloczynowi długości komety i procentowej zawartości materiału genetycznego w ogonie [21].

#### • Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym PFGE

Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (ang. Pulse Field Gel Electrophoresis) jest metodą podobną do wyżej opisanej SCGE. W tym teście jednak próbki zawierające uszkodzone DNA (pod wpływem promieniowania jonizującego), są poddawane działaniu zmiennego pola elektrycznego. Dzięki temu możliwe jest rozdzielenie materiału genetycznego pod względem ich rozmiarów, ponieważ w zależności od wielkości fragmentu DNA porusza się on z różną prędkością w żelu agarazowym, w polu elektrycznym [22]. Wyniki testu PFGE, w przypadku badań określających promieniowrażliwość, określają procent uwolnionego DNA %FAR (ang. fraction of activity released) [23].

#### 4. Opis analizowanych prac

Bazując na różnych testach radiobiologicznych opisanych powyżej, dokonano analizy dostępnych w literaturze międzynarodowej danych dotyczących zróżnicowania promieniowrażliwości oraz promieniodatności w populacji ludzkiej. Kryterium wyboru prac było poddanie testom predykcyjnym promieniowrażliwości osób zdrowych, przynajmniej jako części kohorty uczestników danego badania. Odrzucone zostały prace, w których testowano wyłącznie osoby chore. Drugim kryterium było wyznaczenie progu promieniowrażliwości, który rozdzielał osoby badane na grupę o prawidłowym poziomie promieniowrażliwości oraz o podwyższonym poziomie. W nielicznych badaniach został również wyznaczony próg na promieniooporność. Na tej podstawie wybrano osiem badań, w których zostały przetestowane limfocyty krwi obwodowej (PBL). Uzyskanie tych próbek do testów jest proste i mało inwazyjne, gdyż wymaga jedynie pobrania kilku mililitrów krwi w zgięciu łokciowym. Komórki limfocytów krążą po całym organizmie co pozwala przyjąć, że mogą wiarygodnie odzwierciedlać reakcje całego organizmu na działanie promieniowania jonizującego.

Ponadto opisano trzy publikacje, które opisują metody wieloparametryczne. Są to gotowe algorytmy różnicujące badaną populację ludzką pod kątem indywidualnej promieniowrażliwości. W tych pracach do badań wykorzystano komórki fibroblastów (pobierane ze skóry).

W tabeli nr 1 zebrano podsumowanie informacji zawartych w ośmiu analizowanych badaniach promieniowrażliwości na komórkach limfocytów PBL, uszeregowanych według daty publikacji (rozpoczynając od najstarszego wybranego badania). Znajdziemy w niej informacje o przebadanych osobach (ich liczbie i stanie zdrowia), parametrach (biomarkerach) mierzonych w danych testach wraz z krótkim opisem tych testów, oraz wartości biomarkerów, dla których przekroczone

**Tabela 1.** Wybrane publikacje dotyczące klasyfikowania poziomu promieniowrażliwości wśród ludzi z wykorzystanymi testami na limfocytach  
**Table 1.** Selected publications regarding the classification of the level of radiosensitivity among people using tests on lymphocytes

Źródło	Osoby badane	Biomarker	Rodzaj testu	Opis testu	Próg – promieniowrażliwość	Próg – promieniooporność
Baria, K. et al., 2001. British Journal Of Cancer [1]	230 (66 - zdrowe, 164 - chore (różne jednostki chorobowe))	Aberracje (głównie złamania chromatydowe)	G2-test	Po 72 h inkubacji, połowa komórek napromieniona dawką 0,5 Gy promieniowania X; druga połowa nie została napromieniona; 90 minut po napromieniowaniu wszystkie komórki zatrzymano w metafazie i przygotowywano do analizy	G2 test: $\geq 100$ [aberracji/100 komórek]	-
Vral, A. et al., 2004. Toxicology Letters [24]	57 (zdrowe)	Aberracje (złamania chromatydowe), mikrojądra	G2-test; test mikrojądrowy (MN), MN-test w 2 wariantach: HDR i LDR	G2-test: po 72 h inkubacji połowa komórek od każdego dawcy naświetlana w fazie G2, w temp. 37°C, dawką 0,4 Gy promieniowania gamma; druga połowa nie została napromieniona; po 60 min. wszystkie komórki zatrzymane w metafazie i przygotowywane do analizy; MN-test: komórki naświetlone dawką 3,5 Gy promieniowania gamma w 2 wariantach: HDR – 1 Gy/min, LDR – 4 mGy/min; po 24 h dodana cytochlazyna B; po 70 h komórki przygotowane do analizy	G2-test: $>1,29$ [złamań chromatydowych/ komórkę]; MN-test: HDR: $>876$ [mikrojąder/ 1000 komórek dwujądźrzastych] LDR: $>429$ [mikrojąder/ 1000 komórek dwujądźrzastych]	-
Vorobyova, N.Y., Osipova, A.N. & Pelevina, I.I., 2007. Bulletin Of Experimental Biology And Medicine [25]	66 (17 zdrowe, 41 piloci, 8 astronauta)	Poziom uszkodzeń DNA	Test kometowy	Wyizolowane limfocyty połączone z roztworem agarozym, aby uzyskać żel agarozowy; następnie naświetlono próbki promieniowaniem gamma o mocy dawki 0,35 cGy/min, dawką 1 Gy; przygotowane próbki przeniesiono do buforu lizującego i inkubowano przez 2h; po dokonanej lizie preparaty inkubowano przez 20 minut w buforze TBE i przeprowadzono elektroforezę; wysuszone i utrwalone preparaty przygotowane do analizy mikroskopowej	Początkowy moment ogonowy: $>12,7$ Moment ogonowy po dawce 1 Gy: $>38$	-
Terzoudi, G.I. et al., 2009. International Journal Of Oncology [26]	52 (zdrowe)	Aberracje (złamania chromatydowe)	G2-test, G2-test z obecnością kofeiny	Po 72 h inkubacji, komórki naświetlono w fazie G2, w temperaturze pokojowej, dawką 1 Gy promieniowania gamma, moc dawki 1 Gy/min; po naświetlaniu połowa komórek inkubowana przez 30 minut bez dodatku kofeiny, a połowa z kofeiną; 90 minut po napromieniowaniu wszystkie komórki zatrzymane w metafazie do analizy cytogenetycznej	G2-test: $>3,7$ [złamań chromatydowych/ komórkę]; G2-test z kofeiną: $3,1 \leq \text{IRP} < 3,9$ ; wysocce promieniowrażliwi: $\text{IRP} < 3,1$	G2-test z kofeiną: $(5,5) < \text{IRP} \leq (6,3)$ , wysocce promieniooporni: $\text{IRP} > (6,3)$

Pantelias, G.E. & Terzoudi, G.I., 2011 Radiotherapy And Oncology [13]	162 (78-zdrowe, 78-chore nowotworowo, 6 - chore (AT))	Aberracje (złamania chromatydowe)	G2-test, G2-test z obecnością kofeiny	Po 72 h inkubacji komórki naświetlane w fazie G2, w temperaturze pokojowej, dawką 1 Gy promieniowania gamma, mocą dawki 0,6 Gy/min; po naświetlaniu połowa komórek inkubowana przez 20 minut bez dodatku kofeiny, a połowa z kofeiną; 90 minut po napromieniowaniu wszystkie komórki zatrzymane w metafazie do analizy cytogenetycznej	G2-test z kofeiną: IRS<30 [%]	G2-test z kofeiną: 50≤ IRS≤ 70 [%] Wysoce promieniowrażliwi: IRS>70 [%]
Brzowska, K. et al., 2012. International Journal Of Radiation Biology [2]	73 (50 - chore nowotworowo, 23 - zdrowe)	Aberracje (złamania chromatydowe)	G2-test	Po inkubacji przez 69h, połowa komórek napromieniona dawką 0,5 Gy promieniowania gamma, o mocy dawki 0,74 Gy/min; druga połowa nie została napromieniona; wszystkie komórki zatrzymane w metafazie i przygotowywano do analizy po 72 h od pobrania od badanej osoby;	Próbki nienapromienione: >2 [aberracji/100 komórek] Próbki napromienione: >57 [aberracji/100 komórek]	
Mumbreak, K.D. et al., 2016. DNA Repair [27]	100 (zdrowe)	DSB	Test ognisk histonu γ-H2AX	Część wyizolowanych limfocytów naświetlono promieniowaniem X dawką 2 Gy, mocą dawki 1 Gy/min; odpowiednio przygotowane próbki limfocytów napromienionych oraz nienapromienionych inkubowano w temperaturze 37°C przez 6, 3 i 0,25 h; wykonano immunobarwienie wszystkich próbek i ręcznie zliczono ogniska γ-H2AX w 40 komórkach, dla każdego odstępów czasowego.	Test ognisk histonu γ-H2AX: <8,34 [liczba ognisk/ komórke]	Test ognisk histonu γ-H2AX: >12,63 [liczba ognisk/ komórke]
Vozilova, A.V. & Akhmadullina, Y.R., 2019. Russian Journal Of Genetics [28]	533 (CA), 633 (MN) - zdrowe	Aberracje chromosomowe (dicentryki, pierścienie, acentryki), mikrojądra	Analiza aberracji chro- mosomowych w metafazie (CA), test mikrojądrowy (MN)	Analiza aberracji: komórki po pobraniu podzielono na kilka próbek, 1 nie została napromieniona, pozostałe napromieniono promieniowaniem gamma o mocy 0,014 Gy/s, w dawkach 2, 1 i 0,5 Gy; następnie wszystkie próbki hodowano przez 54 h i przygotowano do analiz w metafazie. Test mikrojądrowy: dwie próbki przygotowane z pobranej krwi od każdego dawcy; po 29 h druga próbkę naświetlono promieniowaniem gamma, dawką 1 Gy; po 48 h dodana cytochlazyna B; po 72 h próbki przygotowano do analizy.	Analiza aberracji: próbki nienapromienione >1; 0,5 Gy >1,05; 1 Gy >18; 2 Gy >61,2 [aberracji/100 komórek] Test mikrojądrowy: Kobiety: próbki nienapromienione>30; 1 Gy >206,5 [%] Mężczyźni: próbki nienapromienione >26,3; 1 Gy >183,4 [%]	-

poziomy kwalifikują osobę badaną jako promienio-wrażliwą lub promieniooporną (próg promieniowrażli-wości i promieniopodatności).

Same analizowane publikacje opisano bardziej szczegółowo w kolejnej części artykułu.

#### 4.1. Testy wykorzystujące limfocyty

Poniżej opisano szczegółowo publikacje zaprezen-towane w tabeli 1, wraz ze skróconym opisem badanej grupy oraz użytej metody.

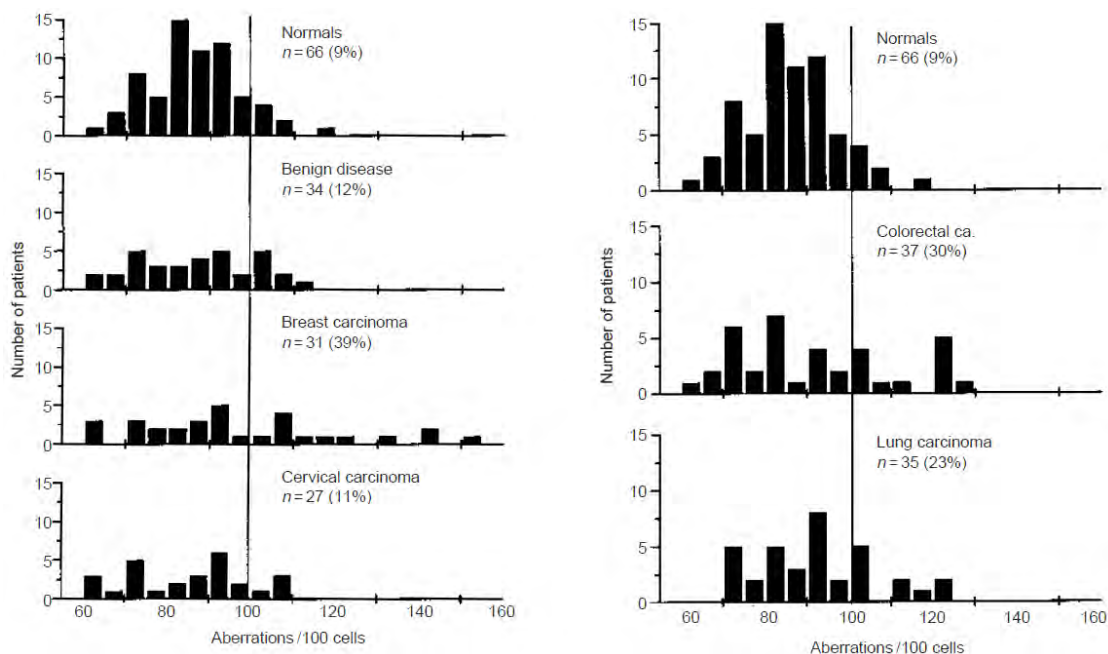
##### • Baria, K. et al., 2001. *British Journal Of Cancer* [1]

Do badania zakwalifikowano 66 zdrowych osób, 34 z łagodnymi chorobami przewlekłymi, 31 z nowotworami piersi, 27 z nowotworem szyjki macicy, 37 z nowotworem jelita grubego i 35 z nowotworem płuc. Krew do badań została pobrana przed przebytą radio- lub chemioterapią, w przypadku testowanych pacjentów onkologicznych. Wartość progowa (100 aberracji/100 komórek), dzieląca osoby badane na wrażliwe i normalnie reagujące na działanie promieniowania, została wyznaczona na 90百分yl z rozkładu liczby aberracji na 100 komórek, dla osób zdrowych. Liczba aberracji jest różnicą między aberracjami po naświetlaniu i przed. W badaniu założono, że dla każdej pobranej próbki zostanie przeanalizowanych po 50 metafaz, dla obu części (przed i po napromieniowaniu). Dodatkowo

25 z 66 zdrowych osób zostało poddanych badaniu wielokrotnie (2-6 powtórzeń), umożliwiając określenie zmienności wewnątrzsobniczej. Obliczono wartość współczynnika zmienności CV (ang. coefficient of variation), którego wartość wyniosła 10,3%. Porównując ten wynik z wartością CV=15,1%, obliczoną dla zmienności międzysobniczej, uzyskano istotną statystycznie różnicę. Nie stwierdzono natomiast wpływu wieku oraz płci na wyniki testów, dla wszystkich grup. Statystycznie istotny odsetek osób, których wyniki przekroczyły wyznaczoną wartość progową, otrzymano dla grupy chorych na nowotwory piersi 39% (31 osób) oraz nowotwory jelita grubego 30% (37 osób). Rezultaty te są potwierdzeniem postawionej hipotezy, że zwiększona promieniowrażliwość chromosomalna jest znacznikiem genetycznej predyspozycji do powszechnych nowotworów [1], patrz rys. 4.

##### • Vral, A. et al., 2004. *Toxicology Letters* [24]

Próg odcięcia na promieniowrażliwość w pracy Vral, A. et al., został wyznaczony na poziomie 90 percentyla rozkładu wyników dla każdego badania (MN i G2). Wszystkie zliczenia zostały wykonane przez dwóch badaczy, dla G2-testu każdy z nich analizował po 25 metafaz od wszystkich dawców, w przypadku MN-testu obie osoby analizowały po 500 komórek dwujędrzastych. Wariant LDR (ang. low dose rate) testu mikrojądrowego był wykonany dla 51 z 57 osób. Wartości końcowe



**Rys. 4.** Wykresy przedstawiające zależność liczby pacjentów (numer of patients) od liczby aberracji na 100 komórek (aberrations/ 100 cells) dla osób: zdrowych (normals), z łagodnymi chorobami przewlekłymi (benign disease), nowotworami piersi (breast carcinoma), nowotworami szyjki macicy (cervical cacinoma), nowotworami jelita grubego (colorectal carcinoma) i nowotworami płuc (lung carcinoma). Pionowa linia wskazuje wyznaczony próg promieniowrażliwości. Litera n oznacza liczbę osób, która przekroczyła wartość progową [1]

**Fig. 4.** Graphs showing the relationship between the number of patients and the number of aberrations per 100 cells for people: healthy (normals), with mild chronic diseases (benign disease), breast cancer, cervical cancer (cervical cacinoma), colorectal cancer and lung cancer. The vertical line indicates the designated radiosensitivity threshold. The letter n denotes the number of people who exceeded the threshold value [1]

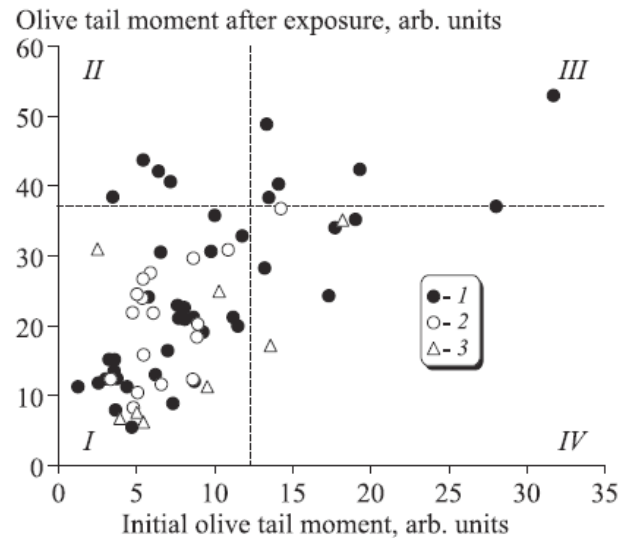


mikrojąder oraz złamań chromatydowych uzyskano przez odjęcie ich liczby powstałej spontanicznie (w nie-naświetlonych próbkach) od liczby w próbkach, które zostały napromieniowane. Dla wszystkich badań wykonany test chi-kwadrat potwierdził wysoce istotną zmienność między dawkami. Sprawdzana była również zmienność wewnątrzosobnicza. Dokonano tego na podstawie powtarzanych w różnej liczbie (od 2 do 15) badań, na przestrzeni kilku lat, na 14 ochotnikach. W tym przypadku wykonany test chi-kwadrat pozwolił na potwierdzenie istotnej zmienności wewnątrzosobniczej, ale jedynie dla MN-testów. Powodem tego może być dużo większa liczba mikrojąder niż złamań chromatydowych. Do analizy zmienności wewnątrzosobniczej wykorzystano wyniki osób, u których wykonano co najmniej 4 badania. Dodatkowo wykonano również F-test, w którym porównano współczynniki zmienności obliczone dla zmienności wewnątrz- i międzyosobniczej. Zarówno dla G2 i MN-testu otrzymane rezultaty wskazują na brak istotnej różnicy. Może to świadczyć o konieczności wykonywania wielokrotnie tego samego badania u jednej osoby w celu określenia jej promieniowrażliwości [24].

- **Vorobyova, N.Y., Osipova, A.N. & Pelevina, I.I., 2007. Bulletin Of Experimental Biology and Medicine [25]**

W badaniu Vorobyova, N.Y., Osipova, A.N. & Pelevina, I.I. tylko osoby zdrowe i niepalące w wieku 30-50 lat, zostały zakwalifikowane do udziału w badaniu. Wszystkie osoby biorące udział w badaniu zostały podzielone na 4 grupy. Granicą określającą przynależność do danej grupy była wartość 95% przedziału ufności wyznaczona dla momentów ogonowych komety osób zdrowych z grupy kontrolnej, w wariantach przed i po napromieniowaniu. Uzyskano następujący podział na grupy: I – norma; II – przekroczony poziom po napromienieniu; III – przekroczony poziom przed i po napromienieniu; IV – przekroczony poziom przed napromienieniem (patrz rys. 5). Piloci zakwalifikowani do badania uczestniczyli w lotach cywilnych, na różnych wysokościach (6000-17 000 m) oraz z różnym czasem trwania lotu (390-4520 h). Zbadana grupa pilotów miała znacząco większe rozproszenie rozkładu uszkodzeń DNA na podstawie przeprowadzonego testu Fishera, w porównaniu do grupy kontrolnej. Wynik taki uzyskano dla próbek analizowanych przed i po napromieniowaniu. Astronauci byli badani 10-20 lat po odbytych misjach, które trwały od 11 do 679 dni (suma wszystkich misji). Analiza wykazała te same zależności, jak dla pilotów i osób z grupy kontrolnej, jednak z mniej znaczącą różnicą. Może być to wynikiem mniejszej liczności grupy astronautów. Została uzyskana statystycznie istotna korelacja między początkowym poziomem uszkodzeń DNA, a tym po naświetlaniu dawką 1 Gy w przypadku

pilotów i grupy kontrolnej. Poddanie działaniu ludzi na promieniowanie jonizujące powoduje wzrost zróżnicowania poziomu uszkodzeń oraz złamań DNA. Brak korelacji między ciężkością tych efektów i czasem narażenia może oznaczać, że wpływ na skutki uboczne ma indywidualna reakcja organizmu [25].



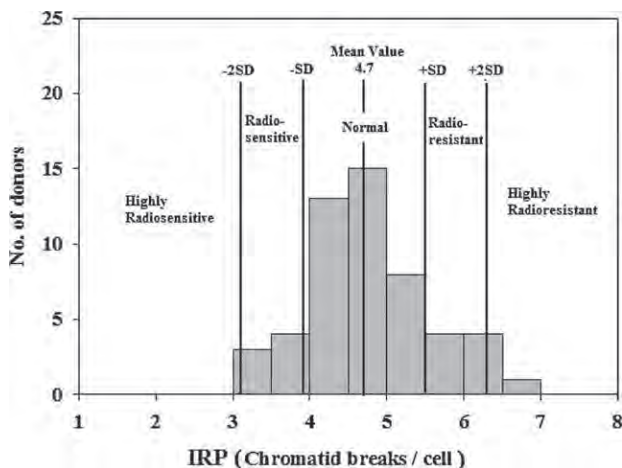
**Rys. 5.** Rozkład momentów ogonowych komety przed napromieniowaniem (ang. initial olive tail moment) oraz po napromieniowaniu dawką 1 Gy (ang. olive tail moment after exposure) dla pilotów (1), grupy kontrolnej (2), astronautów (3). Przerywane linie wyznaczają granice grup I-IV [25]

**Fig. 5.** Distribution of the comet's tail moments before irradiation (initial olive tail moment) and after irradiation with a dose of 1 Gy (olive tail moment after exposure) for pilots (1), control group (2), astronauts (3). The dashed lines mark the boundaries of groups I-IV [25]

- **Terzoudi, G.I. et al., 2009. International Journal Of Oncology [26]**

W badaniu Terzoudi, G.I. et al., limfocyty krwi obwodowej zostały poddane badaniu za pomocą G2-testu w dwóch wariantach: klasycznym oraz z zastosowaniem kofeiny. Kofeina została użyta, aby uniknąć punktu kontrolnego na granicy faz G2/M cyklu komórkowego. Umożliwiło to zliczenie wszystkich złamań chromatydowych, które powstały na skutek działania promieniowania jonizującego. Na podstawie liczby uszkodzeń, otrzymanej dla obu wariantów testu, wyznaczony został parametr indywidualnej promieniowrażliwości, IRP (ang. individual radiosensitivity parameter), będący różnicą złamań chromatydowych w badaniu bez i z kofeiną. Parametr IRP odzwierciedla efektywność naprawy uszkodzeń DNA w punkcie kontrolnym G2/M, co oznacza, że im większa wartość tego parametru tym skuteczniejsza naprawa aberracji i niższy poziom promieniowrażliwości (rys. 6). W obu wariantach około 50 komórek, od każdego dawcy, zostało wykorzystanych do obliczeń uszkodzeń chromosomów. Dla zwykłego G2-testu wyznaczono próg na promieniowrażliwość dla 90 percentyla rozkładu liczby aberracji, co dało wartość 3,7 złamań chroma-

tydowych na komórkę. Dla badania z użyciem kofeiny wyznaczony parametr IRP umożliwił określenie progę na promieniowrażliwość na poziomie 3,9. Wartość ta jest różnicą wartości średniej MV (ang. mean value) i odchylenia standardowego SD (ang. standard deviation). Dodatkowo jako próg wysokiej promieniowrażliwości przyjęto wartość poniżej 3,1 (MV-2SD). Wyznaczono również próg na promieniooporność dla IRP w zakresie 5,5-6,3, oraz na wysoką promieniooporność – wartość IRP powyżej 6,3. W celu określenia, który wariant G2-testu jest lepszym wyznacznikiem poziomu promieniowrażliwości, zbadano komórki 5 osób chorych na nowotwory, u których zdiagnozowano skutki uboczne radioterapii. Klasyfikacja określiła 3 z 5 przebadanych osób jako promieniowrażliwe, natomiast badanie z wykorzystaniem kofeiny przyporządkowało wszystkie 5 osób do grupy promieniowrażliwej. Wykonano również badania na komórkach osób chorych na zespół ataksja-teleangiektazja, lepsze rezultaty uzyskano także dla badania z użyciem kofeiny [26].

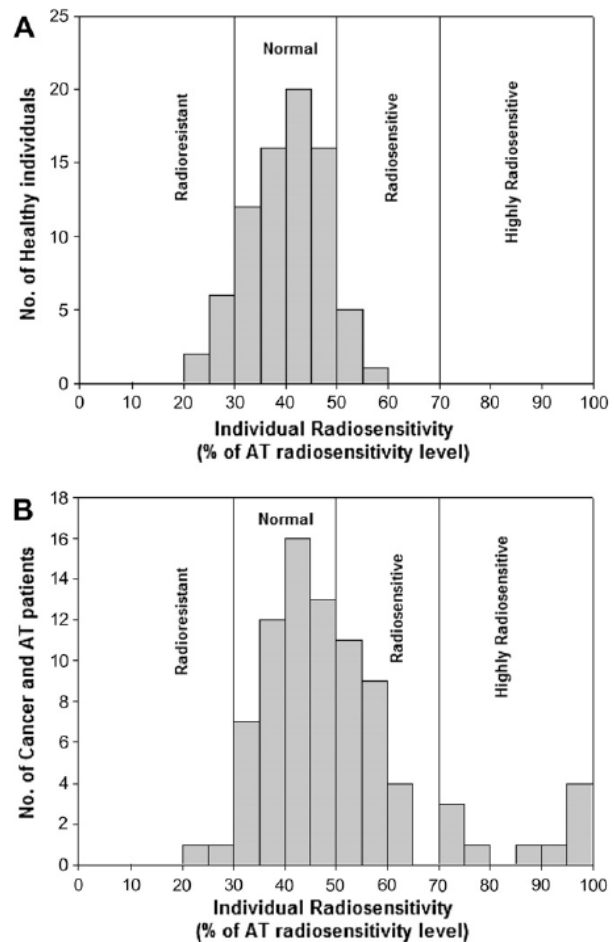


**Rys. 6.** Rozkład liczby przebadanych osób (ang. No. of donors) w zależności od wyznaczonej wartości IRP (individual radiosensitivity parameter), określającej różnicę złamań chromatydowych w badaniu z kofeiną i bez, na komórkę (chromatid breaks/ cell). IRP jest więc odwrotnie proporcjonalne do promieniowrażliwości; Highly radiosensitive – wysoce promieniowrażliwi, radiosensitive – promieniowrażliwi, normal – w normie, radioresistant – promieniooporni, highly radioresistant – wysoce promieniooporni [26]

**Fig. 6.** Distribution of the number of tested people (No. of donors) depending on the determined IRP value (individual radiosensitivity parameter), determining the difference in chromatid breaks in the study with and without caffeine, per cell (chromatid breaks/cell). IRP is therefore inversely related to radiosensitivity; Highly radiosensitive, radiosensitive, normal, radioresistant, highly radioresistant [26]

• **Pantelias, G.E. & Terzoudi, G.I., 2011 Radiotherapy And Oncology [13]**

Badania opisane w pracy Pantelias, G.E. & Terzoudi, G.I., zostały wykonane analogicznie do wyżej omówionej pracy Terzoudi, G.I. et al.. Jednakże dla liczby złamań chromatydowych w komórkach niepoddanych działaniu kofeiny, nie został wyznaczony próg na promieniowrażliwość. Natomiast w metodzie z użyciem kofeiny wartość



**Rys. 7.** Wykresy przedstawiające rozkłady liczby osób zdrowych (wykres A) i osób chorych na nowotwór lub AT (wykres B) w zależności od indywidualnej promieniowrażliwości. No. of healthy individuals – liczba zdrowych osób, Individual Radiosensitivity – indywidualna promieniowrażliwość, Radioresistant – promieniooporni, normal – w normie, Radiosensitive – promieniowrażliwi, Highly Radiosensitive – wysoce promieniowrażliwi, No. of cancer and AT patients – liczba pacjentów z nowotworami lub AT, % of AT radiosensitivity level – poziom procentowy promieniowrażliwości chorych na AT [13]

**Fig. 7.** Graphs showing the distribution of the number of healthy people (graph A) and people suffering from cancer or AT (graph B) depending on individual radiosensitivity.

Yeah. of healthy individuals – the number of healthy people, Individual Radiosensitivity – individual radiosensitivity, Radioresistant – radioresistant, normal – within the norm, Radiosensitive – radiosensitive, Highly Radiosensitive – highly radiosensitive, No. of cancer and AT patients – number of patients with cancer or AT, % of AT radiosensitivity level – percentage level of radiosensitivity of AT patients [13]

parametru określającego radiowrażliwość IRS (ang. individual radiosensitivity), był obliczany z równania 2:

$$IRS = \frac{G2}{G2caf} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

G2 – liczba złamań chromatydowych na komórkę, po napromieniowaniu bez użycia kofeiny,  
G2caf – liczba złamań chromatydowych na komórkę, po napromieniowaniu z użyciem kofeiny.

Parametr IRS jest określany jako procent wysokiego poziomu promieniowrażliwości, który jest uzyskiwany przez pacjentów chorych na zespół ataksja-te-leangiektazja (AT). Założono, że wartość G2caf u osób zdrowych odzwierciedla poziom G2 u pacjentów z AT. Potwierdziły to wyniki otrzymane dla 6 pacjentów AT, którzy zostali sklasyfikowani jako osoby wysoce promieniowrażliwe. Rozkład promieniowrażliwości osób zdrowych dopasowano do rozkładu normalnego i otrzymano wartości:  $MV=40,1\%$  oraz  $SD=\pm 9,8\%$ . Na tej podstawie wyznaczono progi klasyfikujące osoby badane jako: promieniowrażliwe ( $MV+SD$ ), promieniooporne ( $MV-SD$ ) oraz wysoce promieniowrażliwa ( $MV+3SD$ ) [13] (rys. 7).

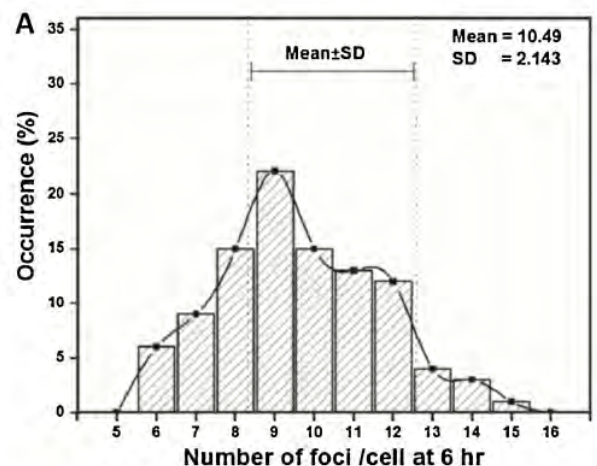
• **Brzozowska, K. et al., 2012. International Journal Of Radiation Biology [2]**

W pracy Brzozowska, K. et al. oprócz wykonanych G2-testów, przeprowadzono również testy ognisk histonu  $\gamma$ -H2AX oraz testy identyfikujące apoptozę. Jednakże dla dwóch ostatnich badań nie wyznaczono progów klasyfikujących badanych jako osoby promieniowrażliwe. Testy przeprowadzono na materiale pobranym od 50 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty, którzy byli poddani radioterapii. Połowa pacjentów została określona jako osoby, które doświadczyły poważnych skutków ubocznych po przebytych leczeniu, na podstawie kwestionariusza EPIC (ang. Expanded Prostate Cancer Index Composite). Ankiety zostały przeprowadzone ostatniego dnia leczenia oraz 2 i 16 miesięcy po jego zakończeniu. Badanie pacjentów z poważnymi skutkami ubocznymi oraz bez umożliwiło sprawdzenie, czy wykonane testy prawidłowo klasyfikują pacjenta jako osobę promieniowrażliwą. Testy wykonano również na materiale pobranym od 23 zdrowych mężczyzn, dobranych pod względem wieku do pacjentów onkologicznych. Grupy osób badanych porównywano na podstawie różnicy liczby aberracji po i przed napromienianiem. Do analizy zostały wykorzystane tylko wyniki osób, których częstość występowania aberracji znajdowała się między 25 a 75 procentem. Uzyskano istotnie statystycznie różnice między pacjentami ze skutkami ubocznymi i osobami zdrowymi, a także między pacjentami bez skutków ubocznych i osobami zdrowymi. Może to świadczyć o wpływie obecności guza nowotworowego na zwiększenie poziomu promieniowrażliwości. Wartość 90 percentyla, z rozkładu aberracji osób zdrowych, została określona jako próg powyżej którego osoby są uważane za promieniowrażliwe. Próg obliczono dla wyników uzyskanych przed i po napromienianiu. 22 pacjentów zostało uznanych za promieniowrażliwych, w przypadku wyników po naświetlaniu, z czego 50% to pacjenci ze stwierdzonymi skutkami ubocznymi radioterapii. Otrzymane rezultaty poddają wątpliwość skutecznego przewidy-

wania wystąpienia poważnych negatywnych skutków radioterapii przy zastosowaniu jedynie G2-testu. [2]

• **Mumbreakar, K.D. et al., 2016. DNA Repair [27]**

Badanie przeprowadzono na 100 zdrowych osobach, z tej samej grupy etnicznej i społeczno-kulturowej, które nie były narażone diagnostycznie i zawodowo na działanie promieniowania jonizującego. Wśród uczestników było 54 mężczyzn i 46 kobiet. Próbkę krwi pobrana od każdego dawcy została częściowo wykorzystana do wyizolowania materiału DNA, a częściowo do wyizolowania limfocytów krwi obwodowej. Uzyskany materiał genetyczny wykorzystano do analizy dziesięciu wybranych SNP w dziewięciu różnych genach. Do przeprowadzenia genotypowania została użyta metoda PCR-RFLP. Limfocyty krwi obwodowej poddano testowi ognisk histonu  $\gamma$ -H2AX. Końcowe wartości liczby ognisk na komórkę są różnicą liczby ognisk po i przed napromienieniem. Stwierdzono znaczący wzrost złamań podwójnoniciowych w próbkach przebadanych po upływie 0,25 h od działania promieniowania jonizującego u kobiet, w porównaniu do mężczyzn. Uzyskane wyniki testu wykonanego po 6 h pozwoliły na podział uczestników badania na trzy grupy: „normalni” ( $MV\pm SD$ ), „wrażliwi” ( $>MV+SD$ ), „odporni” ( $<MV-SD$ ). Zbadano również związek między testowanymi SNP, a DSB i ich naprawą. W tym celu porównano liczbę ognisk  $\gamma$ -H2AX, w badanych odstępach czasowych, dla różnych genotypów. Dla wyników próbek analizowa-



**Rys. 8.** Rozkład liczby osób (wyrażona w procentach) od liczby ognisk na komórkę po 6h po naświetlaniu dawką 2 Gy promieniowania X. Occurrence – występowanie, numer of foci/cel at 6 hr – liczba ognisk/komórkę po 6 godzinach, mean – średnia, SD (standard deviation) – odchylenie standardowe [27]

**Fig. 8.** Distribution of the number of people (expressed as a percentage) from the number of foci per cell 6 hours after exposure to a dose of 2 Gy of X-rays. Occurrence – occurrence, number of foci/cel at 6 hr – number of foci/cell after 6 hours, mean – average, SD (standard deviation) – standard deviation [27]

nych po 3 i 6 h nie stwierdzono wpływu polimorfizmu na poziomy DSB. Jednakże dla rezultatów otrzymanych po czasie 0,25 h wykryto wpływ polimorfizmu w genie XRCC6. Dla tego genu osoby z genotypem CC+CG wykazały istotnie mniejszą indukcję podwójnoniciowych pęknięć w porównaniu z genotypem GG. Wśród osób zdrowych odnotowano wpływ polimorfizmu pojedynczego nukleotydu SNP o numerze rs2267437 na indukcję DSB. Natomiast rs1805388 był związany ze zwiększoną radioopornością [27], rys. 8.

- **Vozilova, A.V. & Akhmadullina, Y.R., 2019. Russian Journal Of Genetics [28]**

Do badania przeprowadzonego przez Vozilova, A.V. & Akhmadullina, Y.R., zostały wybrane osoby z miejscowości położonych nad rzeką Tecza (w Rosji), które były narażone na chroniczną ekspozycję spowodowaną zanieczyszczeniem wody przez odpady promieniotwórcze z zakładu atomowego Majak w latach 1948-1956. Badania przeprowadzono na osobach obu płci, urodzonych przed 1960 r., u których nie występowały choroby autoimmunologiczne, nowotworowe lub przewlekłe zapalne, nie przyjmowały antybiotyków i cytostatyków oraz nie były poddane działaniu promieniowania jonizującego w ciągu 6 miesięcy przed pobraniem krwi. W toku przeprowadzonych badań cytogenetycznych dwiema metodami, stwierdzono wzrost wskaźników cytogenetycznych u około 10% badanych. Nie stwierdzono wpływu skumulowanej dawki w czerwonym szpiku kostnym RBM (ang. red bone marrow) po przewlekłej ekspozycji na promieniowanie na radiowrażliwość limfocytów T, ponieważ nadmierne uszkodzenie DNA w limfocytach obserwowano u dawców zarówno przy niskich, jak i wysokich dawkach RBM (od 0,007 do 2,78 Gy). Wartości skumulowanej dawki zostały wcześniej wyznaczone w laboratorium biofizycznym, przy użyciu systemu dozymetrycznego TRDS-2016. Wysoki poziom aberracji chromosomowych był częściej wykrywany u kobiet, jednakże test mikrojądrowy nie wykazał wpływu różnicy płci. Nie wykryto również wpływu wieku na radiowrażliwość limfocytów T u osób w badanym przedziale wiekowym (48–89 lat). Grupy osób, u których były wykonywane analizy aberracji, nie były równoliczne. Próbkę nienapromienioną zbadano dla wszystkich 533 osób, napromienioną dawkami 2, 1 i 0,5 Gy dla odpowiednio 33, 33 i 108 osób. Grupy 1 i 2 Gy zawierały tych samych dawców. Liczba aberracji tylko u jednej kobiety przewyższała próg wyznaczonej promieniowrażliwości zarówno dla próbek nienapromienionych i napromienionych dawką 0,5 Gy. W grupach dla dawek 1 i 2 Gy różne osoby przekroczyły wyznaczony próg promieniowrażliwości, żadna z nich nie przekroczyła tego progu w przypadku próbek nienapromienionych. W przypadku testu mikrojądrowego powtarzalność dla obu próbek wykryto u 3 kobiet i 7

mężczyzn. Próbkę nienapromienioną i napromienioną dawką 1 Gy dla testu mikrojądrowego również nie były równoliczne. Badania wykonano dla 388 i 294 próbek od kobiet oraz 245 i 203 od mężczyzn. Otrzymane dane świadczą o tym, że nie jest możliwe określenie promieniowrażliwości całego organizmu zaproponowanymi badaniami cytogenetycznymi [28].

#### 4.2. Testy wykorzystujące fibroblasty

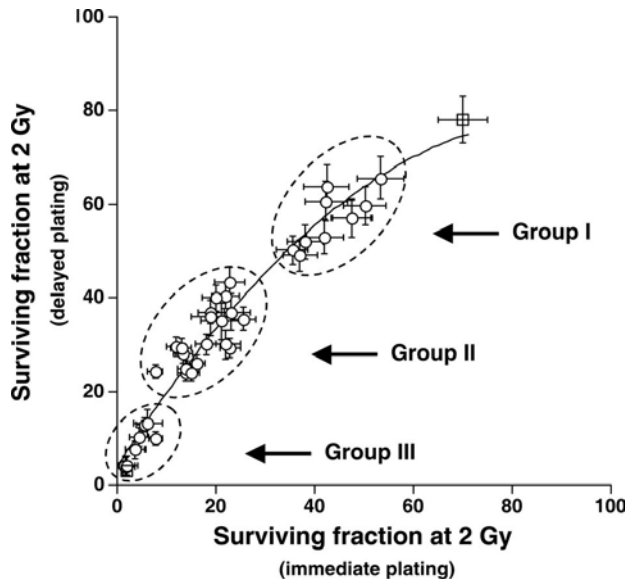
Jak pokazano w powyższym przeglądzie prac, badania dotyczące promieniowrażliwości całego organizmu w odniesieniu do limfocytów krwi obwodowej nie zawsze są wiarygodne i cechują się dużą zmiennością. W szczególności nie zawsze odpowiedź limfocytów jest tożsama z odpowiedzią innych tkanek, chociaż olbrzymią zaletą badań na limfocytach jest ich praktycznie nieinwazyjne pobieranie od osoby badanej.

Innym możliwym typem komórek są fibroblasty pobierane ze skóry. Metoda ta jest jednak nieco bardziej inwazyjna, niemniej jednak wiele prac badawczych poszło w tym kierunku, a wyniki są obiecujące. Najważniejsze z nich zostały streszczone w przeglądzie poniżej.

- **Joubert et al. Int. J. Radiat. Biol. vol. 84, 2008 [23]**

W przypadku badań Joubert et al. do testów wykorzystano 40 nietransformowanych (tj. nienowotworowych) ludzkich fibroblastów, pochodzących od osób zdrowych oraz cierpiących na 8 różnych syndromów chorobowych. Cechą wspólną tych chorób jest ostra reakcja komórkowa na działanie promieniowania jonizującego. Przykładami takich syndromów są: zespół ataksja-teleangiektazja, zespół Nijmegen NBS (ang. Nijmegen breakage syndrome) lub skóra pergaminowata barwnikowa XP (Xeroderma pigmentosum). W badaniu założono, że komórki pochodzące od osób cierpiących na wymienione choroby, dokonują naprawy złamań chromatydowych (CB) oraz podwójnoniciowych pęknięć DNA (DSB) w sposób nieprawidłowy. Z tego powodu poddano sprawdzeniu zależność między promieniowrażliwością komórkową i naprawą tych uszkodzeń. Komórki poddane testom w 95-99% znajdowały się w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, w celu uniknięcia wpływu faz cyklu komórkowego na otrzymane wyniki [23].

Jako pierwszy został wykonany test przeżywalności SF2. Do analiz wybrano wyniki z wariantu SF2dp (ang. delayed plating), w którym komórki hodowano po upływie 24 h od naświetlania dawką 2 Gy. Na podstawie testu SF2dp badane komórki podzielono na trzy grupy pod względem poziomu promieniowrażliwości: grupa I wyniki powyżej 45% (radiooporność), grupa II osoby o umiarkowanej promieniowrażliwości (7-45%), grupa III wyniki poniżej 7% (wysoka promieniowrażliwość) [23], rys. 9.



**Rys. 9.** Zestawienie wyników testów przeżywalności dla badanych linii komórkowych, w dwóch wariantach: hodowla natychmiast po naświetlaniu (oś pozioma) i opóźniona hodowla (po 24 h, oś pionowa). Każdy zilustrowany wynik (zaznaczony okręgiem) został otrzymany przez obliczenie średniej z minimum trzech powtórzonych eksperymentów, z zaznaczonymi wartościami odchylenia standardowego. Surviving fraction at 2 Gy – frakcja przeżywalności po dawce 2 Gy, delayed plating – opóźniona hodowla, immediate plating – natychmiastowa hodowla, group – grupa [23]

**Fig. 9.** Summary of the results of survival tests for the tested cell lines, in two variants: culture immediately after irradiation (horizontal axis) and delayed culture (after 24 h, vertical axis). Each result illustrated (circled) was obtained by calculating the average of a minimum of three replicate experiments, with standard deviation values indicated. Surviving fraction at 2 Gy – survival fraction after a dose of 2 Gy, delayed plating – delayed culture, immediate plating – immediate culture, group – group [23]

Następnie komórki z wyznaczonych grup promieniowrażliwości poddano testom: PCC, immunofluorescencyjnym z użyciem różnych markerów (anty-pH2AX, anty-MDC1, anty-pDNA-PK, anty-MRE11), PFGE i plazmidowym. Testy te umożliwiają oszacowanie nienaprawionych CB i DSB. Dla zdefiniowanych wcześniej grup I, II i III obliczono procent nienaprawionych złamań chromatydowych, przy użyciu techniki PCC i uzyskano odpowiednio wartości: 9-11%, 12-20%, 20-42%. Otrzymane rezultaty testów SF2dp i PCC, sugerują, że przeżywalność komórkowa jest odwrotnie proporcjonalna do nienaprawionych złamań chromatydowych. Analogiczna zależność została stwierdzona również pomiędzy przeżywalnością komórkową i liczbą DSB na podstawie wyników testu PFGE (%FAR – wartość określająca procent uwolnionego DNA) oraz immunofluorescencji pH2AX (ilość ognisk na komórkę).

Przeprowadzone testy związane z DSB umożliwiły dopasowanie cech komórkowych do wcześniej określonych grup oraz ich dokładniejszy podział:

- Grupa I – wyniki dla PFGE (%FAR<4, pomiar 24h po napromieniowaniu) i immunofluorescencji (<4 ognisk H2AX na komórkę, pomiar 24h po napromieniowaniu),

- Grupa II – wyniki dla PFGE (%FAR<10, pomiar 24h po napromieniowaniu) i immunofluorescencji (<4 ognisk H2AX na komórkę, pomiar 24h po napromieniowaniu),
- Grupa IIIa – wysoki poziom nienaprawionych DSB w wynikach testów PFGE (%FAR po 6h w zakresie 6-20) i immunofluorescencyjnych (6-20 ognisk H2AX na komórkę po 24h),
- Grupa IIIb – wysoki poziom nienaprawionych DSB w wynikach testów PFGE (%FAR po 6 h >60, po 24h >30) i immunofluorescencyjnych (>30 ognisk H2AX na komórkę po 24h) [23].

- **Bodgi et al. Journal of Theoretical Biology, 333, 2013 [29]**

W tej pracy autorzy zaproponowali formułę, nazwaną funkcją Bodgi'ego (równanie 3), która opisuje kinetykę pojawiania i zanikania ognisk jądrowych związanych z naprawą i sygnalizacją uszkodzeń DSB, powstałych w wyniku oddziaływania na komórkę różnych czynników stresowych, na przykład promieniowania jonizującego. Pełna postać funkcji Bodgi'ego to:

$$N(t) = I \cdot D \cdot \left(1 - \left(\frac{1}{1 + b_{rec}}\right)^{a_{rec}}\right) \cdot \left(\frac{1}{1 + b_{rep} \cdot (t - t_0)}\right)^{a_{rep}} \quad (3)$$

gdzie:

$N(t)$  – liczba indukowanych DSB,

$I$  – indukowana liczba ognisk na dawkę 1 Gy,

$D$  – dawka,

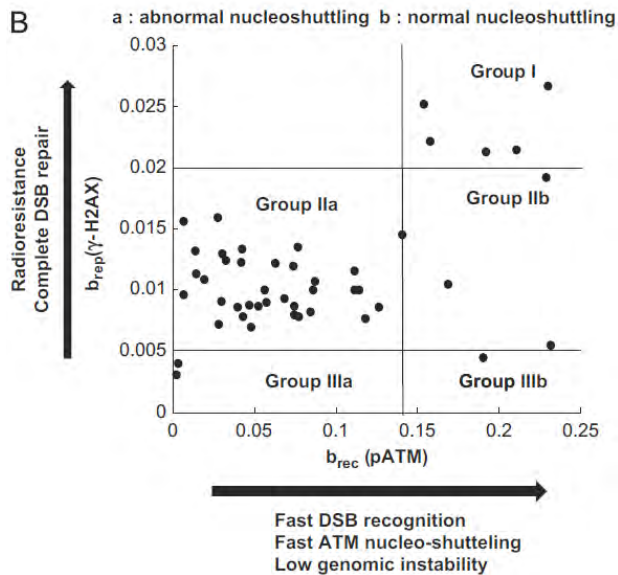
$a_{rec}, b_{rec}$  – parametry szybkości rozpoznawania ognisk,

$a_{rep}, b_{rep}$  – parametry szybkości naprawy uszkodzeń DNA,

$t_0$  – opóźnienie między rozpoznaniem ogniska i naprawą uszkodzenia.

Detekcja ognisk jądrowych danego białka uczestniczącego w rozpoznaniu i naprawie uszkodzeń DNA jest możliwa z wykorzystaniem testów immunofluorescencyjnych. Wykonano takie badania na 45 komórkach fibroblastów pobranych od osób, które były leczone za pomocą radioterapii. Zliczono fosforylowane formy białek pH2AX i pATM. Następnie dopasowano wyniki do funkcji Bodgi'ego i dokonano podziału na poziomy promieniowrażliwości. Ponieważ ogniska pATM pojawiają się przed pH2AX, mogą zostać uznane za wskaźnik czasu rozpoznania uszkodzenia DNA. Natomiast pojawienie pH2AX może odzwierciedlać moment rozpoczęcia naprawy tych uszkodzeń. Zestawienie parametrów  $b_{rec}$  (pATM) z  $b_{rep}$  (pH2AX) umożliwiło najlepsze rozróżnienie linii komórkowych (rys. 9), w porównaniu z innymi wyznaczonymi parametrami. Z tych powodów dokonano następującego podziału: pod względem parametru  $b_{rep}$  (pH2AX) grupa I (>0.02 [1/min]), II (0.005, 0.02), III (<0.005), pod względem parametru  $b_{rec}$  (pATM) podgrupa a (<0.14) i podgrupa b (>0.14). Grupa I, II, III

to odpowiednio osoby radiooporne, o umiarkowanej promieniowrażliwości i wysoce promieniowrażliwe (rys. 10). Natomiast podgrupy *a* oraz *b* dokonują rozróżnienia na nieprawidłowe i prawidłowe przemieszczanie cząstek w komórce (nucleo-shuttling) [29].



**Rys. 10.** Podział na grupy pod względem poziomu promieniowrażliwości na podstawie parametrów funkcji Bodgi'ego  $b_{rec}(pATM)$  i  $b_{rep}(pH2AX)$ .

Radioreistance - radiooporność, Complete DSB repair - całkowita naprawa DSB, Fast DSB recognition - szybkie rozpoznanie DSB, Fast ATM nucleo-shuttling - szybkie przemieszczanie cząstek ATM w komórce, Low genomic instability - niska niestabilność genetyczna, abnormal nucleoshuttling - nieprawidłowe przemieszczanie cząstek, normal nucleoshuttling - prawidłowe przemieszczanie cząstek [29]

**Fig. 10.** Division into groups according to the level of radiosensitivity based on the Bodgi function parameters  $b_{rec}(pATM)$  and  $b_{rep}(pH2AX)$ . Radioreistance, Complete DSB repair, Fast DSB recognition, Fast ATM nucleo-shuttling - rapid movement of ATM particles in the cell, Low genomic instability - low genetic instability, abnormal nucleoshuttling - abnormal movement of particles, normal nucleoshuttling - proper movement of particles [29]

• **Bodgi and Foray. Int. Journal of Radiation Biology, vol. 92, 2016 [30]**

Autorzy pracy postawili hipotezę, że pod wpływem działania promieniowania jonizującego dochodzi do monomeryzacji kinaz ATM, proporcjonalnej do dawki. Następnie powstałe w cytoplazmie monomery ATM przenikają do jądra komórkowego i tam uczestniczą w procesie rozpoznania i naprawy podwójnoniciowych uszkodzeń DNA. Hipoteza ta doprowadziła do interpretacji modelu liniowo-kwadratowego zakładającej, że parametr  $\alpha$  odnosi się do rozpoznanych, ale nienaprawionych DSB. Natomiast parametr  $\beta$  dotyczy uszkodzeń, które nie zostały zlokalizowane. W celu weryfikacji poprawności zaproponowanego modelu przebadano 42 nietransformowanych (nienowotworowych) ludzkich fibroblastów i 18 linii komórkowych pochodzących od guzów nowotworowych. Wyniki uzyskano z wykonanych testów immunofluorescencyjnych z uży-

ciem przeciwciał  $\gamma$ H2AX i pATM oraz testów przeżywalności SF2. Na ich podstawie dokonano podziału na grupy w zależności od poziomu promieniowrażliwości: grupa I - radiooporna, niskie ryzyko wystąpienia nowotworu, pełne i prawidłowe rozpoznanie i naprawa DSB; grupa II - umiarkowana promieniowrażliwość, wysokie ryzyko wystąpienia nowotworu, niepełne rozpoznanie uszkodzeń z opóźnieniem w zakresie od 10 minut do 1 h, niepełna i podatna na błędy naprawa DSB; grupa III - hiperpromieniowrażliwość i wysokie ryzyko wystąpienia nowotworu, niepełna i podatna na błędy naprawa DSB [30].

## 5. Czy możliwe jest obiektywne i pewne określenie indywidualnej promieniowrażliwości?

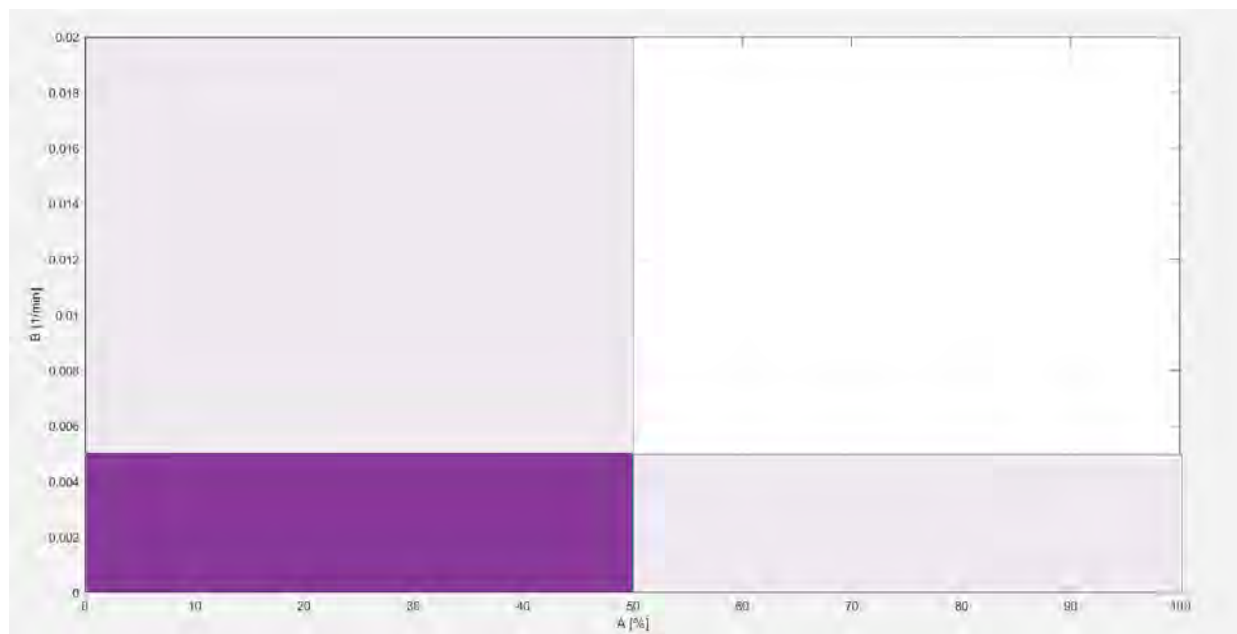
Na chwilę obecną nigdzie w literaturze naukowej nie istnieje uniwersalny test, który w sposób jednoznaczny wyznaczyłby indywidualną promieniowrażliwość człowieka. Można jednakże pokusić się o coraz to lepsze przybliżenia rzeczywistości, na przykład stosując testy wieloparametryczne. Jednym z takich podejść może być zaproponowanie testu opartego jednocześnie na limfocytach i fibroblastach przez połączenie najlepszych cech obu tych metod.

Proponowane przez nas podejście do wyznaczania poziomu promieniowrażliwości jest podejściem hybrydowym poprzez wykonanie dwóch testów, dla dwóch różnych typów komórek (limfocytów i fibroblastów). W przypadku przekroczenia wartości progowych dla obu testów osoba może być klasyfikowana jako promieniowrażliwa.

Proponowany schemat składa się więc z dwóch testów, które zostały opisane we wcześniej zaprezentowanym przeglądzie:

- Test G2 z obecnością kofeiny (Pantelias, G.E. & Terzuoli, G.I., 2011 Radiotherapy and Oncology [13]): 50 ≤ IRS [%],
- Test immunofluorescencyjny dla pH2AX (Bodgi et al. Journal of Theoretical Biology, 333, 2013[29]):  $b_{rep} < 0,005$  [1/min].

Wykorzystanie dwóch silnych testów sprawdzających skuteczność naprawy uszkodzeń DNA dla dwóch różnych ludzkich typów komórek, wydaje się lepszym i bardziej uniwersalnym sposobem na przewidywanie odpowiedzi organizmu na działanie promieniowania jonizującego niż badania tylko jednego typu komórek. Test G2 z obecnością kofeiny został wybrany między innymi, dlatego że został sprawdzony dla łącznej grupy 177 osób. Dodatkowo jest on zmodyfikowanym testem G2, który dzięki zastosowaniu kofeiny sprawdza mechanizm rozpoznawania i naprawy punktu kontrolnego G2/M. Test dla przeciwciał H2AX również opiera wyznaczenie poziomu promieniowrażliwości na sprawdzeniu mechanizmu naprawy uszkodzeń DNA. Jednakże w przypadku tego testu komórki są napromieniowane



**Rys. 11.** Schemat pozwalający na sklasyfikowanie osoby badanej jako osoby promieniowrażliwej. Oznaczenia osi A oraz B odpowiadają opisanym powyżej testom (dla limfocytów i fibroblastów). Ciemnofioletowy obszar wyznacza wyniki badań, których uzyskanie oznacza uznanie osoby za promieniowrażliwą. Kolor jasnofioletowy pokrywa obszary, dla których tylko jeden z dwóch przeprowadzonych testów spełniał postawione kryterium promieniowrażliwości

**Fig. 11.** Diagram allowing for the classification of the examined person as a radiosensitive person. The A and B axis designations correspond to the tests described above (for lymphocytes and fibroblasts). The dark purple area marks the test results that mean a person is considered radiosensitive. The light purple color covers areas for which only one of the two tests performed met the radiosensitivity criterion

w fazie G0/G1, co uruchamia inne mechanizmy naprawy. Z tych powodów wybrany test immunofluorescencyjny wydaje się być dobrym testem w parze z G2-testem z kofeiną. Spośród testów na fibroblastach, test immunofluorescencyjny dla pH2AX uzyskuje rezultaty znacznie szybciej niż testy klonogenne (godziny vs tygodnie) i określa mechanizm naprawy DSB DNA, który jest najczęściej występującym mechanizmem naprawy pęknięć dwuniciowych DNA.

Przedstawiony schemat jest jedynie luźną autorską propozycją i nie został oparty o dedykowane badania radiobiologiczne. Niemniej jednak w sposób prosty i precyzyjny określa dwa niezależne parametry, których przekroczenie definiuje nam osobę promieniowrażliwą, co schematycznie zobrazowano ciemnym kolorem na rys. 11. Jest to z pewnością kolejny krok w kierunku zindywidualizowania ochrony radiologicznej – przynajmniej w perspektywie zidentyfikowania osób promieniowrażliwych, aby móc chronić ich życie i zdrowie.

### Podsumowanie

Kwestia wyznaczenia indywidualnej promieniowrażliwości jest problemem niezwykle złożonym i stworzenie jednego spójnego i całkowicie uniwersalnego testu medycznego może być wręcz niewykonalne. Promieniowrażliwość osobnicza może się zmieniać wraz z wiekiem i przebytymi chorobami, w szczegól-

ności osoby z chorobami nowotworowymi charakteryzują się zazwyczaj większą promieniowrażliwością. Istotne jest również poznanie ewentualnych cech dziedzicznych, które w sposób istotny mogą wpływać na zdolności naprawy DNA po uszkodzeniach popromiennych (taką cechą jest m.in. mutacja w genach BRCA1 i BRCA2). Nie w pełni poznane zagadnienie promieniowrażliwości wymaga dalszych badań, gdyż jest wysoce prawdopodobne, iż ochrona przed promieniowaniem jonizującym w przyszłości będzie oparta w większej mierze o cechy indywidualne, niż jest to obecnie praktykowane. Z tego też powodu Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej (ICRP) powołała dedykowaną grupę roboczą, aby móc ocenić szanse i możliwości wprowadzenia w przyszłości zindywidualizowanej ochrony radiologicznej.

Anna Matyjanka,  
dr hab. inż. Krzysztof W. Fornalski,  
Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska

### Literatura:

- [1] BARIA, K., et al. Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers?. *British Journal of Cancer*, 2001, 84.7: 892-896.
- [2] BRZozowska, Kinga, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side

- effects after radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, 88.5: 405-413.
- [3] BURNET, Neil G., et al. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *International Journal of Cancer*, 1998, 79.6: 606-613.
- [4] SEIBOLD, Petra, et al. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility. *International Journal of Radiation Biology*, 2020, 96.3: 324-339.
- [5] BOURGUIGNON, Michel, et al. Individual radiosensitivity: a key issue in radiation protection. *International Journal of Low Radiation*, 2013, 9.1: 52-58.
- [6] Ustawa z dnia 29 listopada 2000 r. Prawo atomowe, Dz.U. 2021 poz. 1941.
- [7] APPLGATE, K. E., et al. Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2020, 59: 185-209.
- [8] MARTIN, Lynn M., et al. Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences. *Cancer Letters*, 2014, 349.1: 98-106.
- [9] RESZCZYŃSKA Joanna; Modelowanie odpowiedzi komórkowej na małe dawki promieniowania jonizującego. NCBJ; 2019; Rozprawa doktorska.
- [10] BOURGUIGNON, Michel H., et al. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity: Part II: Implications for Clinical Practice and Radiation Protection. *European Journal of nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2005, 32.3: 351-368.
- [11] HABASH, Mohammad, et al. Clinical and functional assays of radiosensitivity and radiation-induced second cancer. *Cancers*, 2017, 9.11: 147.
- [12] BAL, J. Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. *Sprinter PWN, Warszawa*, 1998.
- [13] PANTELIAS, Gabriel E.; TERZOUDI, Georgia I. A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity. *Radiotherapy and Oncology*, 2011, 101.1: 28-34.
- [14] QUINTENS, Roel; BAATOUT, Sarah; MOREELS, Marjan. Assessment of radiosensitivity and biomonitoring of exposure to space radiation. *Stress Challenges and Immunity in Space: From Mechanisms to Monitoring and Preventive Strategies*, 2020, 519-533.
- [15] FERLAZZO, Mélanie L.; BOURGUIGNON, Michel; FORAY, Nicolas. Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review. In: *Seminars in Radiation Oncology*. WB Saunders, 2017. p. 310-315.
- [16] PERNOT, Eileen, et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2012, 751.2: 258-286.
- [17] [https://pl.wikipedia.org/wiki/Polimorfizm\\_pojedynczego\\_nukleotydu](https://pl.wikipedia.org/wiki/Polimorfizm_pojedynczego_nukleotydu), dostęp: 17.09.2021
- [18] SHELKE, Shridevi; DAS, Birajalaxmi. Radio-adaptive response and correlation of non-homologous end joining repair gene polymorphisms [XRCC5 (3R/2R/1R/0R), XRCC6 (C/G) and XRCC7 (G/T)] in human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Genes and Environment*, 2021, 43.1: 1-16.
- [19] SŁONINA, Dorota. Testy predykcyjne promieniowrażliwości tkanek prawidłowych – stan obecny i perspektywy. *Nowotwory. Journal of Oncology*, 2007, 57.6: 702-702.
- [20] SUCHORSKA, Wiktoria M. Radiobiologia: podstawowe modele matematyczne opisujące przeżywalność komórek. *Letters in Oncology Science*, 2018, 15.2: 59-65.
- [21] WOJEWODZKA, M.; GRADZKA, I.; BURACZEWSKA, I, TEST KOMETOWY W pH OBOJĘTNYM, RAPORTY IChTJ, SERIA B nr 2/2000.
- [22] [https://en.wikipedia.org/wiki/Pulsed-field\\_gel\\_electrophoresis](https://en.wikipedia.org/wiki/Pulsed-field_gel_electrophoresis), dostęp: 29.01.2023.
- [23] JOUBERT, Aurélie, et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?. *International Journal of Radiation Biology*, 2008, 84.2: 107-125.
- [24] VRAL, Anne, et al. Chromosomal aberrations and in vitro radiosensitivity: intra-individual versus inter-individual variability. *Toxicology Letters*, 2004, 149.1-3: 345-352.
- [25] VOROBYOVA, N. Yu; OSIPOVA, A. N.; PELEVINA, I. I. Sensitivity of peripheral blood lymphocytes of pilots and astronauts to  $\gamma$ -radiation: Induction of double-stranded DNA breaks. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, 144: 523-526.
- [26] TERZOUDI, Georgia I., et al. G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *International Journal of Oncology*, 2009, 35.5: 1223-1230.
- [27] MUMBREKAR, Kamallesh Dattaram, et al. Polymorphisms in double strand break repair related genes influence radiosensitivity phenotype in lymphocytes from healthy individuals. *DNA Repair*, 2016, 40: 27-34.
- [28] VOZILOVA, A. V.; AKHMADULLINA, Yu R. Study of the individual radiosensitivity in humans based on the assessment of the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood T lymphocytes. *Russian Journal of Genetics*, 2019, 55: 1234-1241.
- [29] BODGI, Larry, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *Journal of Theoretical Biology*, 2013, 333: 135-145.
- [30] BODGI, Larry; FORAY, Nicolas. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *International Journal of Radiation Biology*, 2016, 92.3: 117-131.