



DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.1.2021.89-118>
УДК: 57.033:576.08::57.085.23(615.061/615.849.12)

Предиктори променевих ускладнень у радіаційній онкології на основі тестів на виживаність клітин після *ex vivo* опромінення: огляд літератури

Вінніков В. А., ORCID: 0000-0003-0232-7050, e-mail: imr.nauka@ukr.net

Рубльова Т. В., ORCID: 0000-0002-8007-3220, e-mail: imr_ss@ukr.net

Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної Академії медичних наук України», м. Харків, Україна

Predictors of radiation-induced complications in radiation oncology based on cell survival tests after *ex vivo* exposure: literature review

Vinnikov V. A., ORCID: 0000-0003-0232-7050, e-mail: imr.nauka@ukr.net

Rubleva T. V., ORCID: 0000-0002-8007-3220, e-mail: imr_ss@ukr.net

State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Ключові слова:

індивідуальна радіочутливість, предиктори, променева терапія, променеві реакції в нормальних тканинах, клоногенна виживаність клітин, колонієутворення, апоптоз, контрольні точки клітинного циклу.

Для цитування:

Вінніков В. А., Рубльова Т. В. Предиктори променевих ускладнень у радіаційній онкології на основі тестів на виживаність клітин після *ex vivo* опромінення: огляд літератури. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2021. Т. XXIX. № 1. С. 89–118. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.1.2021.89-118>

Для кореспонденції:

Вінніков Володимир Анатолійович
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»;
вул. Пушкінська, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: imr.nauka@ukr.net

© Вінніков В. А., Рубльова Т. В., 2021

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Серед онкологічних хворих, які отримують променеву терапію, від 5 до 15 % осіб можуть мати побічні реакції та ускладнення в нормальних тканинах та органах, що обмежують лікування у повному, первинно запланованому режимі. Розробка прогностичних біомаркерів і методів, що дозволяють передбачити нормальну токсичність тканин у радіаційній онкології, потребує значних витрат і ресурсів, що зумовлює необхідність періодичного аналізу й переоцінки поточного стану та потенційних напрямків подальших досліджень у цій галузі.

Мета роботи – огляд присвячено методологічним підходам і розробкам у галузі функціональних лабораторних тестів на основі клітинної виживаності *ex vivo* для предикції індивідуальної клінічної радіочутливості.

Матеріали та методи. Було проаналізовано і систематизовано дані повнотекстових публікацій у закордонних (англомовних) наукових виданнях за період 1990–2020 рр., відібраних шляхом пошуку в інформаційній базі PubMed і за перехресними посиланнями за тематикою «функціональні клітинні тести на радіочутливість для предикції променевих реакцій і ускладнень у нормальних тканинах після променевої терапії».

Результати та їх обговорення. У теорії очікувалося, що найкращим індивідуальним предиктором радіаційної токсичності має виступати клоногенна виживаність опромінених клітин як інтегральний показник ураження клітин і зниження їх регенераційного потенціалу. Характерно, що фібробласти, як тест-система для таких досліджень, не показали істотних переваг над лімфоцитами ані щодо виявлення міжіндивідуальних варіацій клітинної радіочутливості, ані щодо предикції клінічної променевої токсичності, причому навіть у випадку променевих реакцій шкіри. Виявилось, що вимірювання клоногенної виживаності клітин потребує забагато часу, є технічно надто складним, а результати істотно непевні, недостатньо чутливі та специфічні й мають занижку відтворюваність, що робить його непридатним для скринінгу на аномальну індивідуальну радіочутливість. Проте цей тип досліджень можна застосовувати для радіобіологічної експертизи *post factum* в окремих випадках появи неочікуваних екстремальних променевих реакцій.

Оцінка радіаційно-індукованого апоптозу в лімфоцитах видається більш перспективним методом, але все ще вимагає як розробки фундаментального підґрунтя, так і додаткових валідаційних досліджень, щоб визначити оптимальні групи пацієнтів, схеми променевої терапії та види променевих ускладнень для його впевненого використання в клінічній практиці. Зміна регуляції контрольних точок (радіогенна затримка) клітинного циклу *ex vivo* може мати як позитивну, так й інвертовану асоційованість чи відсутність кореляції з клінічними променевими реакціями, що поки виключає цей параметр з переліку прикладних радіобіологічних тестів.

Висновки. На сьогодні в практиці клінічної радіобіології відсутні повністю валідовані та стандартизовані функціональні тести на основі виживаності клітин людини після опромінення *ex vivo*, які б уможлилювали достатньо точну предикцію променевих реакцій та ускладнень у нормальних тканинах пацієнтів. У цілому тести *ex vivo*, що ґрунтуються на оцінці тільки однієї форми клітинної загибелі в одному типі клітин, представляються недостатньо надійними через те, що різні шляхи загибелі клітин, ймовірно, відіграють різну роль і проявляють різну форму залежності «доза – ефект» у кінцевій відповіді тканини чи органа на опромінення. Такі тести мають стати складовими мультипараметричних предиктивних платформ.

Keywords: individual radiosensitivity, predictors, radiotherapy, normal tissue adverse effects, clonogenic cell survival, colony forming, apoptosis, cell cycle checkpoints.

For citation:

Vinnikov VA, Rubleva TV. Predictors of radiation-induced complications in radiation oncology based on cell survival tests after *ex vivo* exposure: literature review. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2021;29(1):89–118. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.1.2021.89-118>

For correspondence:

Vinnikov Volodymyr Anatoliyovych
State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»;
82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: imr.nauka@ukr.net

© Vinnikov V. A., Rubleva T. V., 2021

ABSTRACT

Background. Among cancer patients receiving radiotherapy about 5–15 % may have adverse reactions in normal tissues and organs that limit their treatment in a full, originally scheduled regimen. The development of biomarkers and assays for radiation oncology allowing the prediction of patients' normal tissue toxicity requires a lot of resources, therefore its current status and potential directions for future research have to be periodically analyzed and re-evaluated.

Purpose – this review summarizes the methodological approaches and developments in the area of functional laboratory assays based on *ex vivo* cell survival for the prediction of the individual clinical radiosensitivity.

Materials and methods. Data for the analysis and systematization were obtained from the full-text articles published in peer review international scientific journals (in English) in 1990–2020, which were selected by the extensive search in PubMed information database and cross references on the topic “Functional cellular tests for intrinsic radiosensitivity to predict adverse radiation effects and radiotherapy complications”.

Results. In theory, it might be expected that clonogenic cell survival after *ex vivo* irradiation can serve as the best individual predictor of radiation toxicity, as it is an integral indicator of cell damage and decline of their regenerative potential. Tendentially, fibroblasts, as a test system for such studies, did not show significant advantages over lymphocytes either in detecting inter-individual variations in the intrinsic cellular radiosensitivity or in predicting clinical radiation toxicity, even for that in skin. It was found that clonogenic cell survival assay, being very time consuming and technically demanding, also suffers from the lack of sensitivity and specificity, essential uncertainty and low reproducibility of the results, and thus is not suitable for the screening for the abnormal intrinsic radiosensitivity. However, this type of assays is applicable for the radiobiological expertise post factum in individual cases with unexpected, extreme radiation lesions. Radiation-induced lymphocyte apoptosis assay seems to be more promising however still requires further fundamental research for better understanding of its background and more validation studies in order to assess the optimum patient groups, radiotherapy regimens and adverse effects for its confident use in clinical practice. Changes in the regulation of cell cycle check-points (radiation-induced delay) *ex vivo* can have either positive or inverted association, or no correlation with clinical radiation responses in tissues, thus so far cannot be included in the toolbox of applied radiobiological tests.

Conclusions. To date, in the practice of clinical radiobiology, there are no fully validated and standardized functional tests based on the cell survival after *ex vivo* irradiation, which would allow a sufficiently accurate prediction of adverse radiation effects in normal tissues of radiotherapy patients. In general, *ex vivo* tests based on the evaluation of only one form of cell death in one cell type are not fully reliable as a “stand alone” assay, because different pathways of cell death probably play different roles and show different dose response within the overall reaction of the irradiated tissue or critical organ. Such tests should become a part of the multiparametric predictive platforms.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
18.12.2020

Отримано після рецензування
Received after review
14.01.2021

Прийнято до друку
Accepted for printing
28.01.2021

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Цей огляд є результатом аналітичної роботи, виконаної в межах науково-дослідної роботи Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор’єва Національної академії медичних наук України» «Визначення факторів прогнозу та індивідуалізація комплексного лікування пізніх променевиш ушкоджень» (номер державної реєстрації: 0118U001712, шифр теми: НАМН 03.19, прикладна, термін виконання: 2019–2021 рр., керівник – доктор медичних наук, професор Красносельський М. В.).

ВСТУП

Аналіз сучасних трендів у царині радіобіології показав актуальність та істотну практичну значущість такого напрямку, як пошук предикторів для передбачення індивідуальної реакції нормальних тканин і критичних органів пацієнтів на терапевтичне радіаційне опромінення [1–11]. У нашому нещодавньому огляді було розглянуто поточні уявлення щодо ролі й місця біомаркерів клінічної радіочутливості в радіаційній онкології та висвітлено стан питання щодо молекулярно-генетичних показників, придатних для передбачення радіаційної токсичності [12]. З’ясувалося, що протягом останніх 25 років значна частина наукових ресурсів була витрачена на спроби знайти такі предиктори у формі одонуклеотидного поліморфізму в «інтуїтивно» обраних генах, але цей підхід виявився хибним [13–15]. Найперспективнішою стратегією в галузі прикладної молекулярної радіобіології стало поєднання транскриптоміки та геноміки з емпіричним виявленням генів (генетичних варіантів і регуляторних послідовностей ДНК), чия експресія дійсно пов’язана з проявами клінічної радіочутливості.

Альтернативою молекулярно-генетичним предикторам є використання клітинних функціональних тестів із радіаційним опроміненням клітин хворих *ex vivo* [16–18]. Така стратегія позбавляє необхідності визначати вплив конкретних генетичних факторів чи оцінювати гіпотетичний ризик від їх наявності [3, 20]. Ідеологічним підґрунтям цього напрямку досліджень виступає гіпотеза про безпосередню задіяність радіаційно-індукованих клітинних ефектів у розвитку токсичної реакції у тканинах, звідки інтуїтивно

Connection with scientific programs, plans and topics

The review is the result of analytical activities performed within the scientific research project of State Organization “Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine” which is “Determination of the factors of prognosis and individualization of complex treatment of late radiation damages” (state registration No: 0118U001712, research project code: NAMS (Ukraine) 03.19, applied, period for performance: 2019–2021, led by Doctor of Medical Science, Professor Krasnoselskyi M. V.).

INTRODUCTION

The analysis of current trends in radiobiology has shown the relevance and essential practical significance of the search for biomarkers suitable for the prediction of patients’ individual response of normal tissues and critical organs to therapeutic radiation [1–11]. Our recent review has been addressing the overall role and place of biomarkers of clinical radiosensitivity in modern radiation oncology and highlighting the current state of the availability of molecular genetic indicators suitable for predicting radiation toxicity [12]. It turned out that over the past 25 years, a significant portion of scientific resources had been spent on attempts to find such predictors among various single nucleotide polymorphisms in “intuitively” selected genes, but this approach appeared to be unsuccessful [13–15]. A more promising strategy in applied molecular radiobiology is a combination of transcriptomics and genomics, that as the first step includes an empirical detection of genes (genetic variants and regulatory sequences of DNA), the expression of which is indeed associated with clinical radiosensitivity.

An alternative to molecular genetic predictors is the use of cellular-based functional tests with irradiation of patients’ cells *ex vivo* [16–19]. Such strategy eliminates the need to determine the influence of specific genetic factors or to assess the hypothetical risk of their presence [3, 20]. The ideological basis for this area of research is the hypothesis about direct involvement of radiation-induced cellular effects in the development of toxic reactions in tissues, where correlation between individual means of such biomarkers and the degree of radiation complications in the patient are intuitively expected.

очікується кореляція між індивідуальними значеннями таких біомаркерів і ступенем променевого ускладненя у пацієнта. По суті, це припущення є аналогом пошуку генетичних детермінант клінічної радіочутливості у кандидатних генах радіаційної відповіді, але у випадку клітинних тестів опромінення *ex vivo* дозволяє виявити не конституціональні, а функціональні особливості, які не проявляються у звичайних умовах без додаткового навантаження.

Як маркери радіаційної відповіді на клітинному рівні розглядалися первинні пошкодження ДНК та їх репарація, різноманітні біохімічні внутрішньоклітинні продукти, цитогенетичні пошкодження (аберації хромосом, хроматидні розриви, мікроядра), активація контрольних точок клітинного циклу, апоптоз, клітинна виживаність і здатність до колонієутворення. Очікувалося, що їх вимірювання в клітинах пацієнтів уможливить передбачення реакції з боку нормальних тканин ще до прийняття клінічного рішення про початок терапевтичного опромінення і, відштовхуючись від цього, дасть змогу індивідуалізувати променеве лікування [3, 9, 16, 20–31]. Метою цього аналітичного огляду є систематизація та порівняння методологічних підходів та розробок у галузі функціональних лабораторних тестів для предикції індивідуальної клінічної радіочутливості. Поточна частина огляду присвячена клітинній виживаності *ex vivo* та її зв'язку з розвитком реакцій і ускладненя в нормальних тканинах після променевої терапії.

Мета роботи – огляд присвячено методологічним підходам і розробкам у галузі функціональних лабораторних тестів на основі клітинної виживаності *ex vivo* для предикції індивідуальної клінічної радіочутливості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі виконано аналіз даних із повнотекстових версій англomовних статей (в окремих випадках – статей французькою мовою), відібраних за результатами інформаційного пошуку в базі PubMed за комбінаціями ключових слів *radiosensitivity* (також *cellular radiosensitivity*, *chromosomal radiosensitivity*, *in vitro radiosensitivity*) та *clinical radiation toxicity*, *adverse normal tissue effects*, *late radiotherapy effects*, а також за перехресними посиланнями у знайдених публікаціях. Глибина пошуку становила 30 років, тобто з 1990 до 2020 року включно.

Додатково було опрацьовано інформацію з вебсторінок міжнародних програм і проєктів EURATOM, MELODI/CONCERT, RadGenomics, Gene-PARE, GENEPI, RAPPER, REQUITE та інших сайтів у мережі Інтернет, на які були отримані посилання з пошукової системи Google за вищенаведеним переліком ключових слів.

При описі результатів аналізу використовували понятійну базу і терміносистему, що було детально розглянуто на попередньому етапі цієї НДР і представлено в нашому попередньому огляді [12]. Зокрема, це включає терміни «біомаркер», «предиктивні маркери», «радіочутливість», «клітинна радіочутливість», «клінічна радіочутливість».

Basically, this assumption is analogous to the search for genetic determinants of clinical radiosensitivity in candidate genes of the radiation response, but in case of cellular tests the *ex vivo* irradiation reveals not constitutional but functional features, which do not occur under normal conditions without additional load. The list of biomarkers of the radiation response at the cellular level includes primary DNA damage and its repair, activation of cell cycle checkpoints, various biochemical intracellular products, cytogenetic damage (chromosome aberrations, chromatid breaks, micronuclei), apoptosis, cell viability and colony forming ability (clonogenic potential). It was expected that their measurements *ex vivo* would make it possible to predict the response of normal tissues before making a clinical decision to start a radiotherapy (RT) course, and, based on this, would allow individualization of RT [3, 9, 16, 20–31]. The aim of the current analytical review is to systematize and compare methodological approaches and developments in this area. The first part of the review is devoted to *ex vivo* tests for cell survival.

Purpose – this review summarizes the methodological approaches and developments in the area of functional laboratory assays based on *ex vivo* cell survival for the prediction of the individual clinical radiosensitivity.

MATERIALS AND METHODS OF RESEARCH

For this review, the data were collected in full-text versions of scientific articles in peer reviewed journals, published in English (in few cases – in French), and selected by the information search in the PubMed database by keyword combinations “radiosensitivity” (as well, “cellular radiosensitivity”, “chromosomal radiosensitivity”, “in vitro radiosensitivity”) and “clinical radiation toxicity”, “adverse normal tissue effects”, “late radiotherapy effects”, as well as by cross-references in the publications found. The depth of the search was 30 years, i. e. from 1990 to 2020 inclusively.

Additionally, information from the following webpages of international programs and projects was processed: EURATOM, MELODI/CONCERT, RadGenomics, Gene-PARE, GENEPI, RAPPER, REQUITE, and other sites in the Internet that have been revealed by the Google search engine for the above set of keywords.

The current review inherited the conceptual framework and terminology, which were discussed in detail in our previous article [12]. In particular, this includes the terms “biomarker”, “predictive markers”, “radiosensitivity”, “cellular radiosensitivity” and “clinical radiosensitivity”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Радіаційно-індуковані клітинні ефекти у тестах *ex vivo*: загальна класифікація

В ієрархічній структурі радіобіологічних ефектів клітинного рівня є чотири групи явищ, що стали предметом науково-практичного опрацювання як потенційні біомаркери радіочутливості:

- первинні пошкодження ДНК та їх репарація;
- цитогенетичні пошкодження;
- інтерфазна загибель клітин;
- загальна виживаність і клоногенна активність клітин.

Зв'язок між першим і другим рівнем, так само як між другим і третім, забезпечують численні біохімічні зміни, що здебільшого уособлюють внутрішньо- і міжклітинний сигналінг, як-от машинерія контрольних точок клітинного циклу, TGF- β та інші медіатори байстендерних взаємодій. В останні 20 років перелік відомих молекулярних пострадіаційних процесів, задіяних у реалізації клітинної радіочутливості, стрімко розширювався, але далеко не всі показники виявилися придатними для використання на практиці. Причини цього полягали в надто короткому часі їх існування, технічній складності їх кількісного вимірювання чи незадовільній чутливості та специфічності для клінічних цілей. Співвідношення різних типів маркерів та еволюцію успіхів і невдач при їх активній розробці з метою створення клінічно значущих тестів іншого наведено в оглядових роботах [1, 2, 17–20].

За кожним класом ефектів стоїть історія їх ретельного вивчення в експериментах *in vitro* на культурах клітин та *in vivo* на мутантних тваринах. Спроби впровадження їх як показників для прикладних клінічно значущих тестів розпочалися разом із накопиченням достатнього обсягу верифікованих даних щодо кількісних закономірностей у термінах «доза – час – ефект» і тонких молекулярних механізмів їх розвитку. Короткий та ємкий історичний екскурс з проблеми клітинних механізмів радіочутливості можна знайти в огляді [32].

Виходячи з відомих механізмів радіаційної відповіді, найважливішу роль у реалізації радіочутливості відіграє система репарації ДНК. Незважаючи на її ешелонованість, досягнуту за мільярд років еволюції еукаріот, дефект будь-якого з її елементів призводить до зростання ураженості клітин за дії іонізуючої радіації [4, 33–39].

Підґрунтям для прикладних досліджень стали численні експерименти із використанням клітин (або вирощених із них клітинних ліній), отриманих у пацієнтів, які мали спадкові, генетично зумовлені синдроми, у першу чергу – мутації сімейства атаксії-телеангіектазії (АТ) із фенотипічними проявами аномально високої клінічної радіочутливості [40]. Як правило, в усіх експериментальних моделях і за всіма типами клітинних ефектів, чи то клоногенна виживаність, чи то рівень радіаційно-індукованих хромосомних пошкоджень, клітини таких хворих показували чіткі відмінності від клітин, що походили з немутантних осіб [32, 39–52]. У багатьох дослідженнях, спрямованих на пошук кореляції між клітинною і клінічною

RESULTS AND DISCUSSION

Radiation-induced cellular effects in *ex vivo* tests: General classification

In the hierarchical structure of radiobiological effects of the cellular level there are four groups of phenomena that have become the subject of scientific and practical evaluation as potential biomarkers of radiosensitivity:

- Primary DNA damage and their repair;
- Interphase cell death;
- Cytogenetic damage;
- Clonogenic activity/colony forming ability of cells.

The links between the first and the second / third groups, as well as between the second / third and the fourth groups, are maintained through numerous biochemical changes, mostly embodying intra- and intercellular signaling, such as cell cycle checkpoint machinery, TGF- β and other mediators of bystander interactions. In the last 20 years, the list of known molecular post-radiation processes involved in the implementation of cellular radiosensitivity has expanded rapidly, but not all indicators have proved suitable for practical use. The reasons for this were too short terms of existence of these effects, a technical complexity of their quantitative measurement or insufficient sensitivity and specificity for clinical purposes. The interrelationships between different types of biomarkers and the evolution of successes and failures during their development in trying to create clinically applicable tests are presented in reviews [1, 2, 17–20].

Behind each class of effects, we can find a history of their intensive studying *in vitro* through experiments on cell cultures and *in vivo* on mutant animals. Attempts to introduce them as end-points for applied, clinically meaningful tests began with the accumulation of a sufficient amount of verified data on quantitative patterns in terms of “dose – time – effect” and on subtle molecular mechanisms of their occurrence. A brief and comprehensive historical overview of the problem of cellular mechanisms of radiosensitivity can be found in the paper [32].

Considering all known mechanisms of the radiation response, it can be concluded that the DNA repair system is playing the most important role in the implementation of radiosensitivity. Despite its multi-layer organization achieved over a billion years of eukaryotes' evolution, the defect of any of its elements increases the vulnerability of cells to ionizing radiation [4, 33–39].

The basis for applied research in this area was formed by numerous experiments using cells or cell lines obtained from patients with hereditary, genetically determined syndromes, primarily mutations of the ataxia-telangiectasia (AT) family, with phenotypic manifestations of abnormally high clinical radiosensitivity [40]. As a rule, in all experimental models and for all types of cellular end-points, whether it was clonogenic survival or the yield of radiation-induced chromosomal damage, the cells of such patients showed clear differences from cells derived from non-mutant individuals [32, 39–52]. In many studies aimed at the search for possible correlation between cellular and clinical radiosensitivity in RT patients, the authors included cells from AT patients or heterozygous carriers of this mutation as a positive control.

However, patients with AT or other similar syndromes comprise a negligible proportion of all persons receiving

радіочутливістю у пацієнтів променевої терапії, автори включали клітини хворих на АТ чи гетерозиготних носіїв цієї мутації як позитивний контроль.

Проте хворі на АТ та інші подібні синдроми становлять мізерну частку всіх людей, які отримують променеву терапію, і діагностика АТ й подібних спадкових хвороб молекулярно-генетичними методами вже давно не є проблемою. Значно більший інтерес і набагато складніший виклик для клінічної радіобіології становлять саме пацієнти без відомих генетичних дефектів системи репарації ДНК, так звані пересічні овер-реактори.

Клітинні тест-системи

З практичних міркувань прикладні дослідження клітинних біомаркерів радіочутливості були зосереджені переважно на двох типах клітин – лімфоцитах крові та фібробластах шкіри, оскільки саме їх можна отримувати від пацієнта в достатньому обсязі для ініціації клітинної культури і кількісного вимірювання тих чи інших параметрів. Фібробласти є привабливим тест-об'єктом з огляду на їх пряму задіяність у розвитку променевих реакцій шкіри, що усуває проблему можливої міжтканинної гетерогенності щодо розвитку радіаційної токсичності. Натомість лімфоцити мають безсумнівну перевагу в аспекті меншої інвазивності процедури отримання, простіших умов культивування і природної синхронізованості всієї вихідної популяції у стадії G_0 клітинного циклу, що значно полегшує інтерпретацію показників радіаційної відповіді. У літературі можна знайти приклади вимірювання всіх показників клітинної радіочутливості, що будь-коли пропонувалися, – формування колоній, клітинної виживаності, апоптозу, контрольних точок клітинного циклу, аберацій хромосом, мікроядер, γ -H2AX фокусів та інших маркерів пошкодження і репарації ДНК саме на фібробластах шкіри і лімфоцитах крові у хворих із променевими реакціями.

Цікавим аспектом є порівняльна інформативність фібробластів і лімфоцитів як клітинної тест-системи для визначення радіочутливості серед пацієнтів із ранніми чи пізніми променевими ускладненнями. Результати такої оцінки значною мірою залежать від радіобіологічного показника, що вимірювався. В аналітичних оглядах [53, 54], що охоплювали ранні повідомлення з даної тематики, зазначалося, що на той час кореляцію клітинної радіочутливості з ранніми променевими реакціями шкіри чи слизових оболонок було виявлено в одній роботі на лімфоцитах та одній – на фібробластах; в одиничному повідомленні радіочутливість лімфоцитів корелювала з розвитком пізніх ускладнень, натомість майже в усіх дослідженнях значуща кореляція чи хоча б її тренд визначалися між радіочутливістю фібробластів і пізніми ускладненнями, але предиктивна спроможність цих тестів у всіх цих випадках виявилася низькою.

Серед відомих досліджень із використанням цитогенетичного тесту на фібробластах тенденція до вищої індукції хромосомних пошкоджень *ex vivo* у хворих із розвиненими променевими реакціями була встановлена в роботах [55–58], а в інших повідомленнях було зазначено відсутність будь-якої кореляції між

RT worldwide, and the diagnosis of AT or similar inherited diseases by molecular genetic methods has long been no problem. Patients without known genetic defects in the DNA repair system are of much greater interest and a much more complex challenge to clinical radiobiology.

Cellular test systems

For practical reasons, nearly all applied studies of cellular biomarkers of radiosensitivity had been focused mainly on two cell types – peripheral blood lymphocytes (PBL) or skin fibroblasts, because they can be obtained from the patient in sufficient quantities to initiate cell culture and to quantify certain end-points. Apparently, fibroblasts are rather attractive object due to their direct involvement in the development of radiation damage in skin that eliminates the problem of possible inter-tissue heterogeneity in the development of radiation toxicity. Instead, PBL have a clear advantage in terms of low invasiveness of their obtaining, easier culturing and natural synchronization of the entire original population in the G_0 stage of the cell cycle that greatly facilitates the interpretation of radiation effects. In the literature one can find the examples of measurements of all cellular radiosensitivity indicators ever proposed – colony formation, cell survival, apoptosis, cell cycle checkpoints, chromosome aberrations, micronuclei, γ -H2AX foci and other markers of DNA repair – in skin fibroblasts and PBL of patients with radiation toxic reactions.

An interesting aspect is the comparative informativeness of fibroblasts and PBL as cellular test systems for determining radiosensitivity in patients with early or late radiation complications. The results of such an assessment largely depend on the radiobiological indicator being measured. Analytical reviews [53, 54] covering early reports on this topic noted that at that time the correlation of cellular radiosensitivity with early radiation reactions in skin or mucosal tissues was found in one work on lymphocytes and one on fibroblasts; in a single report, lymphocyte radiosensitivity correlated with the development of late complications, whereas in almost all studies a significant correlation or at least its trend was determined between fibroblast radiosensitivity and late complications, but the predictive power of these tests in all these cases was low.

Among the known studies using a cytogenetic test on fibroblasts, the tendency to higher induction of chromosomal damage *ex vivo* in patients with adverse radiation reactions was observed in four studies [55–58], and three other reports noted the absence of any correlation between the degree of radiation complications and the frequency of micronuclei [59–61], and it was also absent in the analysis of residual double-stranded DNA breaks [62]. However, on lymphocytes, the association of cytogenetic and clinical radiosensitivity was found in a larger number of works that will be discussed in more detail in

ступенем променевих ускладнень і частотою мікроядер [59–61]. Так само її не було виявлено при аналізі залишкових дwonиткових розривів ДНК [62]. Проте на лімфоцитах асоційованість цитогенетичної і клінічної радіочутливості була знайдена у більшій кількості робіт, що буде детальніше розглянуто у нашій наступній оглядовій статті цього циклу. Крім того, лімфоцити (чи лейкоцити) крові вочевидь краще підходять для *ex vivo* вимірювань радіаційно-індукованого апоптозу [17–19]. Проте за тестом на клоногенну виживаність кореляція між клітинною радіочутливістю і променевими реакціями досить часто проявлялася на фібробластах [17, 18, 53, 54] і значно рідше спостерігалася в експериментах на лімфоцитах [63, 64]. Показники репарації ДНК, що базуються на вимірюванні γ -H2AX фокусів, частіше проявляли інформативність як предиктори клінічної радіочутливості в роботах на лімфоцитах, але визначення нуклеосатліну pATM із цією метою спрацювало саме на фібробластах [57].

Крім двох вищезазначених типів клітин, тести на радіочутливість *ex vivo* у хворих з променевими ускладненнями виконували на кератиноцитах [60, 65] і лімфобластоїдних лініях [47, 56, 66–70]. В обох випадках усі автори відмічали такі недоліки тест-системи, як потреба в довготривалому культивуванні і висока міжіндивідуальна гетерогенність вимірюваних радіобіологічних показників.

Існує кілька прикладів вимірювання радіаційних біомаркерів у різних типах клітин у межах однієї роботи. У групових дослідженнях із *ex vivo* опроміненням клітин здорових донорів та онкологічних хворих було встановлено той парадоксальний факт, що за тестом на клоногенну виживаність радіочутливість лімфоцитів і фібробластів не корелює між собою на індивідуальному рівні [41, 71–73]. Пізніше цей феномен було підтверджено для інших маркерів радіаційної відповіді у клітинах здорових донорів, наприклад для аберацій хромосом [74], а також у роботах із пошуку потенційних предикторів променевих реакцій.

У дослідженні на 27 хворих оцінка клоногенної виживаності клітин показала відсутність індивідуальних збігів радіочутливості лімфоцитів і фібробластів за параметрами кривих виживаності [75]. У малій за обсягом вибірці – 6 хворих на рак і 5 здорових донорів – не було знайдено кореляції між цитогенетичною радіочутливістю у лімфоцитах і фібробластах [59]. Так само серед семи пар лімфобластоїдних і фібробластних клітинних ліній від одних і тих самих пацієнтів із розвиненими променевими реакціями тільки в одному випадку обидві індивідуальні лінії показали високу радіочутливість за мікроядерним тестом [56]. У групі хворих на рак грудної залози до і після променевої терапії вимірювали *ex vivo* радіочутливість фібробластів і лімфоцитів методом «комет»; кореляція результатів між двома типами клітин у 25 осіб була на рівні $r = 0,65$, що автори вважали «гарною кореляцією», хоча це значення вочевидь не досягає рівня, що є достатнім для впевненого застосування на практиці [76].

our next review article. In addition, blood lymphocytes (or leukocytes) are clearly better suited for *ex vivo* measurements of radiation-induced apoptosis [17–19]. On the other hand, in the clonogenic survival tests, the correlation of cellular sensitivity with radiation responses was quite common in fibroblasts [17, 18, 53, 54], and was much less common in experiments on PBL [63, 64]. DNA repair kinetics, based on the measurement of γ -H2AX foci, was more informative as predictors of clinical radiosensitivity in studies using PBL, but the pATM protein nucleoshuttling test worked specifically on fibroblasts [57].

In addition to the above two cell types, *ex vivo* radiosensitivity tests in patients with radiation adverse effects were performed on keratinocytes [60, 65] or lymphoblastoid cell lines [47, 56, 66–70]. In both cases, the need for long-term culturing and high inter-individual heterogeneity of the measured radiobiological parameters were noted as a disadvantage of the test system.

There are several examples of measuring radiation biomarkers in different cell types within the same study. In group studies with *ex vivo* irradiation of cells from healthy donors and cancer patients, a surprising finding was made that the clonogenic survival of lymphocytes and fibroblasts does not correlate in the same individual [41, 71–73]. This phenomenon was later confirmed for other markers of radiation response in healthy donor cells, such as chromosome aberrations [74], as well as in studies of potential predictors of radiation adverse effects.

In the study on 27 patients, the assessment of clonogenic cell survival showed the absence of individual matches of radiosensitivity of PBL and fibroblasts for cell survival curve parameters [75]. In a small sample of 6 cancer patients and 5 healthy donors, no correlation was found between cytogenetic radiosensitivity in lymphocytes and fibroblasts [59]. Similarly, among seven pairs of lymphoblastoid and fibroblast cell lines from the same patients with adverse radiation response, there was only one individual, who's both cell lines showed high radiosensitivity by micronuclei assay [56].

In the group of breast cancer patients the radiosensitivity of fibroblasts and lymphocytes was measured *ex vivo* by “comet” assay before and after RT; the correlation of results between two cell types among 25 individuals was $r = 0.65$ that the authors considered as a “good correlation”, although this value is insufficient for any confident application in practice [76].

In two independent studies the authors evaluated *ex vivo* radiosensitivity simultaneously in fibroblasts and keratinocytes in representative groups of 35–40 patients [65, 77]. When cells were irradiated at sufficiently high doses – from 2 to 4 Gy – there was a significant correlation between individual yields of radiobiological markers – micronuclei [65] or 53BP1 foci [77] in different cell types, that pointed at the significant genetic determination of post-radiation processing of cell genome damage. In the report [77] endothelial cells and basal epidermal cells from the same biopsies were also examined in parallel to fibroblasts and keratinocytes, and the frequency of 53BP1 foci was significantly correlated at the individual level between all four skin cell types. Later, this British

У двох незалежних дослідженнях оцінювали радіочутливість *ex vivo* одночасно у фібробластах і кератиноцитах на репрезентативних вибірках пацієнтів – 35–40 осіб [65, 77]. При опроміненні клітин у достатньо високих дозах – від 2 до 4 Гр – проявлялася значуща кореляція між індивідуальними рівнями радіобіологічних маркерів – мікроядер [65] і фокусів 53BP1 [77] у різних типах клітин, що вказує на істотну генетичну детермінованість пострадіаційного процесингу пошкоджень клітинного генома. При цьому в роботі [77] на додаток до фібробластів і кератиноцитів паралельно досліджували ендотеліальні клітини і базальні епідермальні клітини з тих самих біоптатів, і частота фокусів 53BP1 істотно корелювала на індивідуальному рівні між усіма чотирма типами клітин шкіри. Пізніше ця британська дослідницька група розширила спектр тест-систем, додавши до зазначених клітин шкіри ще й лімфоцити крові [78].

У цьому випадку статистичний зв'язок між клінічними променевими реакціями у пацієнтів та індукованим *ex vivo* рівнем γ -H2AX фокусів визначався при вимірюванні показника саме у лімфоцитах і був відсутнім при використанні фібробластів, кератиноцитів, ендотеліальних чи епідермальних клітин.

Отже, у цілому фібробласти чи інші типи клітин шкіри не показали істотних переваг над лімфоцитами крові як тест-система для оцінки радіочутливості та валідації предикторних маркерів променевої токсичності в нормальних тканинах, у тому числі – реакцій шкіри. Вибір фібробластів для таких досліджень обґрунтовано їх гістологічною адекватністю, а лімфоцитів – меншою травматичністю процедури отримання та більшою зручністю водночас у технічному (лабораторному) і клінічному аспектах. Дискусії щодо вибору кращої клітинної тест-системи точаться з раннього етапу розвитку *ex vivo* тестів [17, 53, 76], а неясність у співвідношенні радіочутливості клітин крові та шкіри (фактично – відсутність індивідуальної збіжності) посилює загальну непевність не тільки методології, а й самої ідеології радіобіологічних предикторів.

Клітинна клоногенна виживаність, здатність до колонієутворення

Згідно з класичною парадигмою клітинної радіобіології кінцевий ефект – загальна клоногенна виживаність та утворення клітинних колоній – є добутком ефектів другого рівня (інтерфазної та мітотичної загибелі), кожен із яких, у свою чергу, є результатом процесингу ушкоджень ДНК. За пересічною логікою, оскільки механізм розвитку променевих реакцій у будь-яких нормальних тканинах у пацієнтів після ПТ обов'язково включає ураження клітин і виснаження регенераційного клітинного пулу, то найкращим індивідуальним предиктором радіаційної токсичності має виступати клоногенна виживаність клітин як інтегральний показник, що об'єднує в собі можливі варіації всіх проміжних ефектів і процесів.

Дослідження в цьому напрямку проводилися з моменту розробки ефективних і відтворюваних методів культивування клітин. Період найвищої активності наукового пошуку в даному напрямку охоплює

research group expanded the range of test systems by adding PBL to these skin cells [78].

In this case, the statistically significant linkage between clinical radiation responses in patients and *ex vivo* induced levels of γ -H2AX foci was determined on lymphocytes and was absent on fibroblasts, keratinocytes, endothelial or epidermal cells.

Thus, in general, fibroblasts or other skin cell types have not shown significant advantages over PBL as a test system for assessing radiosensitivity and validation of predictor markers of radiation toxicity in normal tissues, including skin reactions. The choice of fibroblasts for such studies is justified by their histological adequacy, whereas PBL have less traumatic procedure of their sampling and better suitability in both technical (bench-method) and clinical aspects. Discussions regarding the best choice among cellular systems have been going since the early stage of in the development of *ex vivo* tests [17, 53, 76]. The ambiguity in the relative radiosensitivity of blood and skin cells (in fact, the lack of individual conformity) brings a lot of uncertainty not just to the methodology, but also to the ideology of radiobiological predictors.

Cellular clonogenic survival, colony forming ability

According to the classical paradigm of cellular radiobiology, the final effect – an overall clonogenic survival and cell colony formation – is the product of the intermediate-level effects (interphase and mitotic death), each of which, in turn, is the result of DNA damage processing. By ordinary logic, since the mechanism of development of radiation reactions in any normal tissues in patients after RT necessarily includes cell damage and depletion of the regenerative cell pool, the best individual predictor of radiation toxicity should be clonogenic cell survival as an integral indicator, which include all possible variations of all intermediate effects and processes.

Research in this direction has been conducted since the development of effective and reproducible methods of cell culture. The period of the highest activity of scientific research in this direction covers two decades from the mid-1980s to the mid-2000s. The most commonly used technical methods for quantifying the number of cells in culture are colorimetric test using

двадцятиріччя з середини 1980 до середини 2000 років. Найуживанішими технічними способами кількісної оцінки чисельності клітин у культурі є колориметричний тест за допомогою 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум броміду (МТТ) [79, 80] і селективне за-барвлення загиблих клітин трипановим синім [81]. Клоногенну виживаність оцінюють класичним способом, а саме – шляхом підрахунку колоній у культурі, вирощеній протягом певного часу (зазвичай 14 діб) після її ініціації [82].

У численних експериментах *in vitro* були встановлені особливості пострадіаційної клоногенної виживаності клітин різного походження і доведено зв'язок кількісних параметрів кривих виживаності з різними молекулярними механізмами, переважно – різними компонентами системи репарації ДНК, задіяними в реалізації диференційної радіочутливості [39–41, 43, 45, 47, 51, 83–90]. При цьому з'ясувалося, що на результати таких оцінок істотно впливають технічні умови експерименту – склад культурального середовища, присутність живильних клітин, підготовка опромінених клітин до засіяння культури, методика підрахунку колоній тощо.

Для кількісного вираження клоногенної активності в дослідженнях на клітинах хворих із променевими ушкодженнями найчастіше використовували такі індекси, як D_0 (доза опромінення, при котрій залишаються живими приблизно 37 % клітин), $D_{0,01}$, $D_{0,1}$, $D_{0,5}$, $D_{0,9}$ (دوزи опромінення, при яких залишаються живими, відповідно, 1 %, 10 %, 50 % і 90 % клітин) та SF (фракція клітин, що вижили після опромінення в певній дозі; *англ.* survival fraction). Для SF найчастіше використовували дозу 2 Гр, тобто індекс позначався як SF2. Зрозуміло, що для обчислення індексів інактивуючої дози – D_0 чи $D_{0,01}$ – експоненційна залежність «доза – ефект» клітинної виживаності має містити щонайменше три експериментальні точки, що значно підвищує обсяг роботи і вартість тесту. У цьому аспекті підхід, що базується на визначенні SF, має значну економічну перевагу. Проте сформувався думка щодо недостатньої інформативності тестів, що ґрунтуються на дозі 2 Гр *ex vivo*, оскільки вона є недостатньо високою для виявлення відмінностей за виживаністю між радіочутливими і радіорезистентними клітинами [87]. У літературі зустрічаються публікації, у яких SF визначали за інших радіаційних доз, наприклад, 2,4 Гр [61], 3,5 Гр або 6 Гр [87].

На підґрунті результатів кількох незалежних пілотних досліджень на довготривалих культурах опромінених лімфоцитів (часто – лімфобластоїдних ліній) чи фібробластів, вирощених із біопсій шкіри пацієнтів, *ex vivo* тест на клоногенну активність почали вважати чи не найпоказовішим методом індивідуальної предикції променевих реакцій, надаючи йому статусу золотого стандарту [17, 21, 22, 47, 49, 54, 58, 63, 64, 75, 91–94].

Головним методичним недоліком таких досліджень була невелика кількість обстежених осіб та відсутність внутрішньоекспериментального контролю якості, у першу чергу – у вигляді систематичної перевірки відтворюваності результатів. Адже паралельно

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) [79, 80] and selective staining of dead cells with Trypan Blue [81]. Clonogenic survival is assessed in a classic way, namely by counting colonies in a culture grown for a certain period of time (usually 14 days) after its initiation [82].

Numerous *in vitro* experiments led to identification of the specific features of post-radiation clonogenic survival of cells of different origins and proved the relationship of quantitative parameters of survival curves with different molecular mechanisms, majorly different components of the DNA repair system involved in the implementation of differential radiosensitivity [39–41, 43, 45, 47, 51, 83–90]. It turned out that the results of such evaluations are significantly influenced by the technical conditions of the experiment – the composition of the culture medium, the presence of nutrient cells, preparation of irradiated cells for culture, the method of counting colonies and more.

The parameters, which were the most often used to quantify clonogenic activity in studies on cells of patients with radiation adverse effects, included the radiation dose at which approximately 37 % of cells remain alive (D_0), or radiation doses at which 1 %, 10 %, 50 % and 90 % of cells remain alive (respectively, $D_{0,01}$, $D_{0,1}$, $D_{0,5}$, $D_{0,9}$) and survival fraction (SF) of cells after irradiation at a certain dose. For SF, the dose of 2 Gy was most often used, thus the index was denoted as SF2. Obviously, to calculate the inactivation dose parameter – D_0 or $D_{0,01}$ – the exponential dependence of the “dose – effect” of cell survival must contain at least three experimental points that significantly increases the workload and cost of the assay. In this aspect, the approach based on the SF assessment has a significant economic advantage. However, it has been suggested that tests based on a dose of 2 Gy *ex vivo* are insufficiently informative, as it is not high enough to detect differences in survival between radiosensitive and radioresistant cells [87]. There are publications in the literature in which SF was determined at other radiation doses, for example, 2.4 Gy [61], 3.5 Gy or 6 Gy [87].

The results of several independent pilot studies on long-term cultures of irradiated lymphocytes (often lymphoblastoid lines) or fibroblasts grown from patients' skin biopsies led to the conclusion that the *ex vivo* test for clonogenic activity can be considered perhaps the most indicative method of individual predicting of radiation side effects, close to the “gold standard” status [17, 21, 22, 47, 49, 54, 58, 63, 64, 75, 91–94].

The main methodological weakness of such studies was the small number of surveyed persons and the lack of internal experimental quality control, that should be done primarily as the systematic verification of the reproducibility of results. After all, in a number of parallel research the expected direct correlation between the reduced colony forming ability and clinical radiation toxicity was not found, or such linkage was masked by essential interindividual heterogeneity of estimates of radiosensitivity [62, 66, 76, 95–98]. Sometimes the researchers observed even a paradoxically increased clonogenic activity and higher values of SF and $D_{0,01}$ in people with post-radiation complications compared to control patients [61, 99], as well as the lack of increased cellular radiosensitivity in patients with adverse radiation reactions on the background

в інших роботах не було знайдено очікуваної прямої кореляції між зниженою здатністю клітин до колонієутворення і клінічною променевою токсичністю, або такий зв'язок поглинався істотною міжіндивідуальною гетерогенністю оцінок радіочутливості [62, 66, 76, 95–98]. Інколи навіть мали місце парадоксально підвищена клоногенна активність і вищі значення SF та $D_{0,01}$ саме в осіб із постпроменевими ускладненнями, порівняно з контрольними пацієнтами [61, 99], а також відсутність підвищеної клітинної радіочутливості у хворих із розвиненими променевими реакціями на фоні спадкового синдрому з дефектом репаративних систем [100]. У роботі з оцінкою радіочутливості індивідуальних лімфобластоїдних ліній методом граничного розведення криві клітинної виживаності тільки у 2 з 19 хворих з розвиненими променевими реакціями значуще відхилялися від спектра кривих, побудованих на клітинах від хворих без променевих реакцій [70].

Додатковим чинником варіацій у результатах та висновках у цій сфері досліджень були відмінності експериментальної методології, застосованої різними групами вчених. Зокрема, частина робіт включала опромінення *ex vivo* з високою потужністю дози (high dose rate, HDR), частина – з низькою потужністю дози (low dose rate, LDR), частина – обидва режими, причому результати класифікації одних і тих самих індивідів за радіочутливістю зазвичай були різними у варіантах досліду HDR та LDR. Розмаїття методик також включало відмінності за такими елементами, як моментальний або затриманий старт клітинної культури після опромінення, наявність або відсутність позитивного контролю клітин хворих на АТ, а також присутність чи відсутність в експерименті внутрішнього лабораторного контролю з високим ступенем відтворюваності індивідуальних даних, за яким можна було б проводити нормалізацію результатів вимірювання.

Методичні помилки і труднощі в дослідженнях, спрямованих на пошук зв'язку між променевими ускладненнями і клітинною радіочутливістю *ex vivo* за тестом колонієутворення, були проаналізовані в роботі [101]. Критичним фактором виявилось низьке співвідношення між- та внутрішньоіндивідуальною варіабельністю значень показника, тобто розподільчої здатності та відтворюваності тесту. У цьому аспекті дуже показовим є дослідження колонієутворювальної здатності довготермінових культур опромінених лімфоцитів [102]: криві «доза – ефект» клітинної виживаності, збудовані шляхом однократного вимірювання на лімфоцитах 31 донора, сформували спектр, який фактично співпав зі спектром аналогічних кривих, отриманих при 28 послідовних експериментах на лімфоцитах одного й того ж донора, так само близькими в індивідуальній і груповій серіях виявилися значення індексів $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ і $D_{0,9}$. Пізніше цей висновок було підтверджено на вибірці, розширеній до 201 особи [103]. Знизити внутрішньоіндивідуальну (міжекспериментальну, міжсерійну) гетерогенність результатів можна шляхом нормалізації даних за допомогою внутрішньолабораторного стандарту клітинної радіочутливості, як це було зроблено в екстенсивному

of hereditary syndrome with a defect of DNA repair [100]. In a recent work the assessment of radiosensitivity of individual lymphoblastoid lines by the limiting dilution assay showed that only in 2 out of 19 patients with adverse radiation reactions, cell survival curves deviated significantly from the spectrum of curves constructed on cells from patients without radiation reactions [70].

An additional factor contributing to variations of the results and conclusions in this area of research was the differences in the experimental methodology used by different groups of scientists. In particular, part of studies included *ex vivo* irradiation using high dose rates (HDR), part – low dose rates (LDR), some – both modes, and the results of the classification of the same individuals by radiosensitivity usually were different in HDR and LDR series of the same experiment. The heterogeneity of techniques also included differences in such specific details of the experimental design, as immediate or delayed start of cell culture after irradiation, the presence or absence of positive control – cells of AT patients, as well as the presence or absence the internal control with a high degree of reproducibility of individual data, which would make possible a normalization of the measurement data.

Methodological errors and difficulties in studies aimed at the search for a link between radiation side effects and *ex vivo* cellular radiosensitivity measured by colony forming assay have been analyzed thoroughly in [101]. The critical factor appeared to be the low ratio of inter- to intra-individual variability of the values of the end-point, i. e. the resolution ability and reproducibility of the test. In this aspect, very indicative data were collected in the study of the colony-forming ability of long-term cultures of irradiated lymphocytes [102]: dose-effect curves of cell survival, constructed by a single measurement on the lymphocytes of 31 donors, formed a spectrum that actually overlapped with the spectrum of similar curves obtained in 28 consecutive experiments on lymphocytes of the same donor; and the values of the parameters $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ and $D_{0,9}$ were equally close in individual- and group-study series. This conclusion was later confirmed in a cohort expanded to 201 individuals [103]. Apparently, intra-individual (inter-experimental, inter-serial) heterogeneity of results can be reduced by normalizing the data using an intra-laboratory standard of cellular radiosensitivity, as it was done in the extensive study of the colony-forming ability of irradiated lymphocytes in healthy individuals [104].

Fibroblasts typically showed a slightly lower level of intra- and inter-individual variability in clonogenic survival than that in PBL [73], but the divergence of data in replicates was still very large? And that combined with insufficient accuracy and low reproducibility of individual meaning of the endpoint deprived the *ex vivo* clonogenic survival of fibroblasts of the status of “gold standard” among predictive tests for radiosensitivity [18, 22].

Thus, due to questionable informativeness, high demands for labor intensity and time consumption, the *ex vivo* tests for clonogenic survival or colony-forming ability have not found truly wide application in clinical practice. This stimulated the search for other, more informative indicators, and the development of easier and faster methods of measuring radiation response at cellular level.

дослідженні здатності до колонієутворення опромієних лімфоцитів здорових осіб [104].

Фібробласти зазвичай демонстрували дещо нижчий рівень співвідношення внутрішньо- та міжіндивідуальної варіабельності щодо клоногенної виживаності, ніж лімфоцити [73], але розкид результатів у повторностях був все ж таки дуже великим, що у поєднанні з незадовільною точністю і заниженою відтворюваністю індивідуальних показників позбавило клоногенну виживаність фібробластів *ex vivo* статусу золотого стандарту серед предиктивних тестів на радіочутливість [18, 22].

Отже, внаслідок сумнівної інформативності, високої працездатності та значних витрат часу тести *ex vivo* на клоногенну виживаність чи здатність до колонієутворення опромієних клітин у цілому не знайшли реального застосування у клінічній практиці. Це стимулювало пошук інших, інформативніших показників та розробку простіших і більш швидких методів їх вимірювання. Тому в останнє десятиріччя науково-практичні проекти цього напрямку було зосереджено на альтернативних параметрах радіочутливості.

Апоптоз

Розвиток променевої ураженні у тканинах істотно залежить від інтенсивності спустошення популяції клітин внаслідок їх загибелі. Однією з форм клітинної смерті є апоптоз – програмована клітинна загибель, яка відіграє важливу роль: знищення «зайвих» клітин у тканині та рятування тканини від небажаної проліферації мутантних, потенційно злоякісних клонів. Дозозалежне зростання частоти апоптотичних клітин є добре відомим наслідком пошкодження ДНК іонізуючою радіацією, зокрема у лімфоцитах і лімфобластоподібних лініях. У цих типах клітин механізм апоптозу вивчено досить детально, включаючи як процес порушення цілісності і бар'єрності поверхневої клітинної мембрани, так і внутрішньоклітинну машинерію: сенсинг (розпізнання) сигналів, регуляторні каскади та ефекторні молекули [105, 106].

Кількісний вихід апоптозу підлягає оцінці різними методами, що базуються на реєстрації характерних клітинних змін [107, 108]. Цей перелік включає морфологічне розпізнання у цитологічних препаратах світловою чи електронною мікроскопією, аналіз фрагментованої ДНК шляхом електрофорезу, проточною цитометрією або «тунельним» методом (terminal transferase nick-end labeling, TUNEL assay), виявлення активованих каспаз та інших внутрішньоклітинних біохімічних маркерів вестерн-блотингом або імуногістохімічним чи імуноферментним аналізом, визначення деполаризації мітохондріальної мембрани флюоресцентною мікроскопією чи проточною цитометрією. Одним із найуживаніших методів вимірювання апоптозу в лімфоцитах і лімфобластах стала детекція експозиції фосфатидилсерину і фосфатидилетаноламіну на поверхні клітинної мембрани із флуорохромним міченням (метод Annexin V) з одночасною оцінкою проникності мембрани для барвників, що зв'язуються з ДНК (наприклад, пропідій йодид). Такий спосіб, особливо у варіанті проточної цитометрії, є дуже продуктивним, оскільки вможливує

Therefore, in the last decade, scientific and practical projects in this area have focused on alternative parameters of radiosensitivity.

Apoptosis

The development of radiation lesions in tissues depends essentially on the intensity of devastation of the cell population due to cell death. One particular form of cell death, apoptosis, is a programmed cell death that plays an important role: an elimination of “unnecessary” cells in the tissue and rescuing the tissue from unwanted proliferation of mutant, potentially malignant clones. The dose-dependent increase in the frequency of apoptotic cells is a well-known consequence of DNA damage by ionizing radiation, particularly in PBL and lymphoblastoid lines. In these cell types, the mechanism of apoptosis has been studied in considerable details, including the process of disrupting the integrity and barrier of the surface cell membrane and intracellular machinery: signal sensing, regulatory cascades and effector molecules [105, 106].

The quantitative yield of apoptosis can be measured by various methods based on the registration of these specific cellular changes [107, 108]. The list of methods includes morphological recognition of apoptotic cells in cytological preparations by light or electron microscopy, analysis of fragmented DNA by electrophoresis, flow cytometry or “tunnel” method (terminal transferase nick-end labeling, TUNEL assay), detection of activated caspases and other intracellular biochemical markers by Western blotting, or immunohistochemical techniques, or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), determination of mitochondrial membrane depolarization by fluorescence microscopy or flow cytometry. One of the most commonly used methods for measuring apoptosis in PBL and lymphoblasts has been the detection of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine exposure on the cell membrane surface with fluorochromic labeling (Annexin V method) and the simultaneous evaluation of membrane permeability for stains, which specifically bind to DNA (e. g., propidium iodide). This method, especially in the version using flow cytometry, is very productive, because it allows quantitative measurement of the apoptotic

кількісне вимірювання апоптотичної фракції (причому окремо раннього і пізнього апоптозу та некрозу) у певній субпопуляції клітин, ідентифікованій за специфічними поверхневими маркерами.

Спроби застосувати оцінку радіаційно-індукованого апоптозу лімфоцитів (radiation-induced lymphocyte apoptosis, RILA) у тестах *ex vivo* для предикції променевої токсичності були досить численними за останні 20 років. Після розробки методу [109, 110] перші ж результати на пацієнтах показали його перспективність [111, 112], а завдяки значній концентрації наукових ресурсів на цьому напрямку методологія RILA-тесту поступово набувала все більшої визначеності.

У сучасному варіанті тест RILA виконують на лімфоцитах CD4⁺ або CD8⁺ з опроміненням *ex vivo* в дозі 4–8 Гр; кореляція зі ймовірністю розвитку променевих реакцій є зворотною, тобто чим нижчим є рівень RILA, тим вищою є клінічна радіочутливість. Цей ефект зберігався при розширенні вибірок обстежених пацієнтів і підтверджувався у незалежних лабораторіях на групах хворих із різними локалізаціями пухлин: найчастіше – при раку грудної залози [113–119], але також при раку шийки матки [120], пухлинах голови та шиї [121, 122], раку простати [123, 124] та у змішаних вибірках хворих на рак грудної залози, простати чи легенів [125–128]. Інвертований зв'язок процесів, що регулюють RILA, із розвитком променевих ушкоджень знайшов пряме підтвердження на молекулярному рівні: у хворих на рак простати в лімфоцитах, опроміненіх *ex vivo*, радіаційно-індуковані зміни експресії генів апоптотичної відповіді були значно виразнішими саме в осіб без проявів променевої токсичності, аніж у пацієнтів із тяжкими пізніми променевими ускладненнями [129].

На сьогодні відомо вісім завершених проспективних мультицентрових досліджень із валідації тесту RILA щодо предикції розвитку променевого фіброзу у хворих на рак грудної залози; їх мета-аналіз подано в огляді [130]. Серед висновків було зокрема показано, що використання субпопуляції лімфоцитів CD8⁺ дає цьому тесту вищу чутливість і специфічність, порівняно з лімфоцитами CD4⁺.

На підґрунті цих результатів компанія NovaGray (Monpellier, France) запропонувала на ринку медичних послуг комерційний тест на основі *ex vivo* RILA для предикції променевих реакцій у хворих на рак грудної залози, які підлягають променевому лікуванню (<http://www.nova-gray.com/en/home>). Компанія заявляє, що їх тест відповідає вимогам Директиви Ради Європи щодо медичних приладів / способів для *in vitro* діагностики (Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices; <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1998/79/oj>). Нині компанія розробляє аналогічні тести для хворих на рак простати і рак легенів.

Водночас низка незалежних дослідницьких груп звітувала про відсутність кореляції між результатами тесту RILA і променевими реакціями, зокрема у хворих на рак грудної залози [131–134]. В одному з досліджень клітинна радіочутливість не була інформативною для передбачення пізніх фіброзів, але виявилася придатною для предикції гострого дерматиту,

fraction (and separately – early or late apoptosis or necrosis) in a certain subpopulation of cells identified by specific surface markers.

During the last 20 years there were numerous attempts to assess radiation-induced lymphocyte apoptosis (RILA) in *ex vivo* tests to predict radiation toxicity. After the development of the method [109, 110], the first results in patients showed its sufficient prospects [111, 112]. Due to the considerable concentration of scientific resources in this area, the RILA methodology gradually became more defined.

The modern versions of RILA assay are performed on CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes irradiated *ex vivo* to doses 4–8 Gy; the correlation with the probability of the development of radiation adverse effects is inverse, i. e., the lower the level of RILA, the higher the clinical radiosensitivity. This effect was maintained in the expanded cohorts of studied patients and was confirmed in independent laboratories in groups of patients with different localizations of tumors: most often – for breast cancer [113–119], but also for cervical cancer [120], head and neck tumors [121, 122], prostate cancer [123, 124], and in mixed groups of breast, prostate or lung cancer patients [125–128]. The inverse relationship between the processes that regulate RILA and the development of clinical radiation damage has been confirmed at the molecular level: In prostate cancer patients, the lymphocytes irradiated *ex vivo* showed modulations on the expression of apoptotic response genes, and these changes were significantly more pronounced in individuals without radiation toxicity than in patients with severe late radiation complications [129].

To date, eight prospective multicenter studies on the validation of the RILA assay for the prediction of the occurrence of radiation fibrosis in patients with breast cancer have been completed; their meta-analysis is presented in the review [130]. Among the conclusions, in particular it was stated that the use of a subpopulation of CD8⁺-lymphocytes gives this test a higher sensitivity and specificity compared to CD4⁺-lymphocytes.

Based on these results, biomedical company NovaGray (Monpellier, France) has proposed a commercial test based on *ex vivo* RILA for the medical services market to predict radiation reactions in patients with breast cancer undergoing RT (<http://www.nova-gray.com/en/home>). The company declares that their test meets the requirements of the Council of Europe Directive on medical devices for *in vitro* diagnostic (Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices; <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1998/79/oj>). The company is currently developing similar tests for patients with prostate cancer and lung cancer.

At the same time, a number of independent research groups have reported no correlation between RILA assay results and radiation responses, particularly in breast cancer patients [131–134]. In one study, cellular radiosensitivity was not suitable for the prediction of late fibrosis, but was found to predict acute dermatitis, albeit in an unusual way: cells were irradiated at a dose of 2 Gy, and apoptosis levels were directly correlated with clinical effects [135]. However, this issue has very heterogeneous opinions coming from different research groups, as previously no differences was reported between head and neck cancer patients

хоча й у «незвичайний» спосіб: клітини опромінювали в дозі 2 Гр, і рівень апоптозу мав пряму кореляцію з клінічними ефектами [135]. Проте з цього питання існують розбіжності в результатах різних груп, оскільки ще раніше повідомлялося про відсутність відмінностей між хворими на пухлини голови та шиї з гострими променевими реакціями різного ступеня за *ex vivo* рівнем RILA при його морфологічній оцінці після опромінення в дозах 2 і 4 Гр [136]. В іншій роботі параметр SF2 для *ex vivo* виживаності лімфоцитів, оцінюваної методом забарвлення трипановим синім через 24 год після опромінення, що явно уособлювало ранній апоптоз, не проявив асоційованості зі ступенем гострих променевих реакцій, хоча на точці часу 4 год після опромінення спостерігалася тенденція до зниження середньої клітинної виживаності (підвищення радіочутливості) зі зростанням променевої токсичності [137]. Не додають ясності з цього питання й результати дослідження *in vivo*: у хворих на рак грудної залози під час променевої терапії спостерігали позитивну кореляцію рівня апоптозу в лімфоцитах зі ступенем ранньої токсичності у нормальних тканинах [138].

Ex vivo тест на апоптоз був неінформативним для предикції променевих ускладнень у роботах, у яких використовували лімфобластоїдні лінії, вирощені з клітин онкохворих із різною клінічною радіочутливістю [69, 139, 140]. Характерно, що в цих дослідженнях було паралельно проведено тест на лімфоцитах крові у варіанті TUNEL assay [139] та Annexin V [69, 140], який так само не дав можливості чітко ідентифікувати радіочутливих осіб.

Також *ex vivo* рівень RILA не показав зв'язку з розвитком тяжких променевих ушкоджень, що виникли внаслідок радіотерапевтичної аварії – помилкового переопромінення хворих на рак простати у шпиталі Епіналь, Франція [141]. У цих умовах автори припускали, що перевищення дози було надто великим, і викликані ним ураження виходили за межі ймовірного «робочого діапазону» працездатності будь-яких біологічних предикторів променевої токсичності, у тому числі клітинних маркерів індивідуальної радіочутливості.

Слід зазначити, що механізми зв'язку RILA із променевими реакціями та ускладненнями поки що остаточно не визначені, і результати тестів залишаються без чіткого наукового обґрунтування. Ситуація ускладнюється тим, що радіочутливість за цим показником при опроміненні клітин у різних дозах може вказувати як пряму, так і зворотну кореляцію з клінічними ефектами. До того ж цей тест не підтвердився *in vivo* і не спрацював у цільовій критичній групі – у хворих із помилковим переопроміненням. Цілком ймовірно, що радіаційно-індукований апоптоз у лімфоцитах має фізіологічне відношення тільки до певних типів тканинних реакцій і покриває тільки певний діапазон клінічної радіочутливості [17]. Отже, попри активні намагання впровадити RILA-тест у практику радіаційної онкології, у тому числі на комерційній основі, його слід сприймати з обережністю і не вважати «золотим стандартом», оскільки стадія валідаційних досліджень на світовому рівні в його випадку ще не закінчилася, і багато важливих методичних аспектів цього тесту все ще потребують удосконалення.

with varying degrees of acute radiation reactions regarding their *ex vivo* level of RILA in its morphological evaluation after irradiation to doses of 2 and 4 Gy [134]. In another study the SF2 parameter for *ex vivo* survival of lymphocytes, assessed by trypan blue staining 24 h after irradiation that clearly represented early apoptosis, did not show an association with the degree of acute radiation reactions, although at the time point 4 h post-irradiation, there was a tendency to decreased cell survival (increased radiosensitivity) with increasing radiation toxicity [137]. The results of the *in vivo* study also do not clarify this issue: In breast cancer patients during RT the researchers found a positive correlation of the apoptosis level with the severity of early adverse effects in normal tissues [138].

The *ex vivo* apoptosis assay was uninformative for the prediction of radiation responses in studies using lymphoblastoid lines grown from cells of cancer patients, who had different clinical radiosensitivity [69, 139, 140]. Interestingly, in these studies also TUNEL assay [139] and Annexin V assay [69, 140] were performed on PBL, but again did not allow a clear identification of the radiosensitive individuals.

Also, the *ex vivo* level of RILA has not demonstrated an association with the development of severe radiation damage resulting from a RT accident – mistaken overexposure of prostate cancer patients at Epinal Hospital, France [141]. In such conditions, the authors assumed that the excessive overdose was too high, and the damage they caused went beyond the probable “operational range” of performance of any biological predictors of radiation toxicity, including cellular markers of individual radiosensitivity.

It should be noted that the mechanisms of RILA's association with radiation reactions and complications have not yet been definitively determined, and the results of this assay still remain without a clear scientific basis. The situation is complicated by the fact that the radiosensitivity assessed by this end-point may show a direct or inverse correlation with clinical effects when cells are *ex vivo* irradiated to different doses. In addition, this assay did not work in the largest target critical group – in patients with proven excessive overexposure. Therefore, despite active efforts to implement the RILA test in the practice of radiation oncology, including that on a commercial basis, it should be taken with caution and not considered as a “gold standard”, as the validation stage for this assay is still not completed yet, and many important methodological aspects of this test still need to be improved.

Контрольні точки клітинного циклу

Одним із елементів у пусковому механізмі програми апоптозу є зміни в роботі контрольних точок клітинного циклу. Радіаційно-індукована зупинка клітинного циклу на межі G_1/S або G_2/M забезпечує клітині час для відновлення пошкодженої ДНК перед входом у наступну фазу циклу. Якщо пошкоджені ДНК забагато і їх неможливо повноцінно відновити, у клітині включається програма апоптозу. Вимірювання затримки клітинного циклу можна здійснювати за допомогою проточної цитометрії або цитометрії на препаратах з культури мітогенстимульованих лімфоцитів крові за співвідношенням фракцій клітин у фазах S та G_2 на певних точках часу після опромінення. У літературі існують повідомлення про спроби застосувати цей показник у лімфоцитах крові онкохворих як біомаркер клінічної відповіді пухлини на радіотерапію [142] і сприйнятливості (схильності) до пухлинних захворювань [143–145]. Значущість цього тесту для індивідуального прогнозування в радіаційній онкології була обмеженою через значну гетерогенність даних та істотне перекриття результатів вимірювань між порівнюваними групами пацієнтів [142]. Натомість цей вид досліджень виявився цілком інформативним предиктором у галузі онкоепідеміології, зокрема для ідентифікації людських субпопуляцій із підвищеними ризиком розвитку ракових захворювань [143–145].

Повідомлення про оцінку затримки клітинного циклу *ex vivo* як показника індивідуальної радіочутливості з метою встановлення її зв'язку з променевими ускладненнями є нечисленними. Так, за співвідношенням стимульованих Т-лімфоцитів у фазах S і G_2 клітинного циклу не було виявлено відмінностей між хворими на рак грудної залози з ускладненнями у легенях після променевої терапії та відповідними контрольними пацієнтами без ускладнень [146]. В іншій роботі аналізували затримку G_2/M після опромінення *in vitro* у дозах 2 і 5 Гр у низці лімфобластоїдних клітинних ліній і довготривалих культурах лімфоцитів, серед яких були ті, що представляли клітини онкохворих із підвищеною клінічною радіочутливістю [147]. У цьому дослідженні клітини пересічних онкохворих і клітини здорових донорів не відрізнялися за вимірюваним показником, а в культурах лімфоцитів клінічно радіочутливих хворих спостерігали істотно знижену частку клітин у G_2/M після опромінення. На думку авторів, аналіз G_2/M може стати в нагоді для предикції радіочутливості, але не тотально серед усіх пацієнтів променевої терапії, а як додатковий тест, придатний для верифікації певної підгрупи радіочутливих осіб.

У нещодавній роботі [122] наведено дані порівняння груп хворих на Меркелівську карциному за розподілом клітин за фазами циклу у культивованих мітогенстимульованих лімфоцитах, опромінених *ex vivo* у дозах 2 і 10 Гр. Нижчий рівень RFLA у пацієнтів з інтенсивними проявами променевої токсичності визначався водночас із певним підвищенням затримки G_2/M у їхніх клітинах, порівняно з контрольними хворими без значних променевих ускладнень. Причому цю тенденцію до збільшеної фракції клітин, затриманих у фазі G_2/M , у хворих із вищою клінічною

Cell cycle checkpoints

One of the important elements in the mechanism triggering the apoptosis program is changes in the control points of the cell cycle. Radiation-induced cell cycle arrest at the G_1/S or G_2/M boundary provides the cell with time to repair damaged DNA before entering the next phase of the cycle. If there is too much DNA damage which cannot be fully repaired, the cell activates an apoptosis program. Measurements of cell cycle delay can be performed by flow cytometry or cytometry on preparations from culture of mitogen-stimulated PBL by the ratio of cell fractions in phases S and G_2 at certain time points after irradiation. There have been reports in the literature of attempts to use this indicator in PBL of cancer patients as a biomarker of the tumor clinical response to RT [142] or susceptibility to cancers [143–145]. The significance of this test for individual prognosis in radiation oncology was limited due to the large heterogeneity of the data and the essential overlap of measurement results between the compared groups of patients [142]. Instead, this type of research has proved to be a very informative predictor in the area of cancer epidemiology, in particular for the identification of human subpopulations with an increased risk of cancer [143–145].

There have been few reports on the linking *ex vivo* cell cycle delay as an indicator of individual radiosensitivity to RT complications. Thus, the ratio of stimulated T lymphocytes in the S and G_2 phases of the cell cycle showed no differences between patients with breast cancer with complications in lungs after RT and the corresponding control patients without complications [146]. Another study analyzed G_2/M delay after *in vitro* irradiation to 2 and 5 Gy in a number of lymphoblastoid cell lines and long-term lymphocyte cultures, including those representing cells of cancer patients with increased clinical radiosensitivity [147]. In this study, cells from 'usual' cancer patients and healthy donors did not differ in the measured value, while irradiated PBL cultures of clinically radiosensitive patients contained a significantly reduced proportion of cells in G_2/M . In authors' opinion, G_2/M assay may be useful for the prediction of radiosensitivity, but not totally among all RT patients, but as a supplementary test suitable for a specific subgroup of radiosensitive individuals.

Thus, today there is a gross uncertainty regarding the relationship between the *ex vivo* induced cell cycle delay in G_2/M and clinical radiation response in patients, as positive association, no correlation and inverted dependence have been reported. The authors [147] emphasized that other factors may have contributed to the G_2/M delay variations, such as the G_1/S delay, which obviously distorts the assessment of cellular radiosensitivity by this method. Considering this, an approach based on the analysis of cycle delay in the G_1 phase could be quite useful addition in such a research. G_1 arrest is one of the leading causes of radiation-induced death of mitotically inactive resting cells, in particular after irradiation to doses above 4 Gy. An indicative marker of this process is the expression of cyclin-dependent kinase CDKN1A/p21. *In vitro* studies have shown an association between p21 production and post-radiation clonogenic cell survival [148]. Also, in a study on twins a significant effect of hereditary

радіочутливістю спостерігали навіть при аналізі неопромінених зразків.

Отже, сьогодні існує абсолютна невизначеність характеру зв'язку між таким радіобіологічним параметром, як індукована *ex vivo* радіаційна затримка клітинного циклу G_2/M , і клінічними променевими реакціями, оскільки сповіщалося про відсутність кореляції, позитивну асоційованість та інвертовану залежність.

Автори [147] наголошували, що до варіацій затримки G_2/M вочевидь могли робити внесок інші фактори, наприклад, затримка на точці G_1/S , що викривляє оцінку клітинної радіочутливості у цей спосіб. З огляду на це, досить корисним додатком у таких дослідженнях був би аналіз затримки циклу у фазі G_1 . Цей ефект є однією з провідних причин радіаційно-індукованої загибелі мітотично неактивних клітин спокою, зокрема при опроміненні в дозах понад 4 Гр. Показовим маркером цього процесу є експресія циклінзалежної кінази CDKN1A/p21. У дослідженнях *in vitro* було доведено наявність зв'язку між продукуванням p21 і пострадіаційною клоногенною виживаністю клітин [148]. До того ж, у дослідженні на близнюках було встановлено значний вплив спадкового фактора в пострадіаційній експресії CDKN1A/p21 [149], що підкреслює потенційну придатність цього показника для індивідуальної предикції радіочутливості. У роботі на лімфоцитах крові хворих на рак грудної залози було встановлено, що пострадіаційна експресія гена CDKN1A/p21 була в середньому істотно знижена у 11 клінічно радіочутливих пацієнтів порівняно з 11 хворими без променевих реакцій [150].

Перекривання інтервалів індивідуальних значень у порівнюваних групах було невеликим, і за критерієм радіаційно-індукованого зростання експресії гена CDKN1A/p21 в 7 разів як граничного значення правильна ідентифікація підвищеної клінічної радіочутливості спрацювала у 10 з 11 таких пацієнтів у цьому дослідженні. Детальний аналіз цієї роботи було подано у попередньому огляді серед інших статей про використання транскриптомних маркерів [12].

Всупереч високоїмовірній перспективності та клінічній цінності циклінзалежної кінази CDKN1A/p21 як маркера радіочутливості, у досягній літературі не знайдено повідомлень про порівняльні валідаційні дослідження з прямим вимірюванням саме продукту означеного гена після опромінення *ex vivo* у клітинах хворих із різним ступенем променевої токсичності.

ВИСНОВКИ

Таким чином, проведений аналіз літератури за питанням клітинних тестів *ex vivo* для предикції клінічної променевої токсичності показав, що, незважаючи на комплексність і багатокомпонентність патогенезу променевих ускладнень, існують вагомні докази наявності кореляції на індивідуальному рівні між кількісними параметрами клоногенної виживаності чи здатності до колонієутворення або апоптотичної загибелі нормальних клітин і виникненням ускладнень від променевої терапії. Найчастіше такий зв'язок спостерігали в роботах з оцінкою клоногенної виживаності фібробластів та апоптозу в лімфоцитах, причому в обох випадках – стосовно пізніх променевих

factors in the post-radiation expression of CDKN1A/p21 was observed [149]. In the lymphocytes of breast cancer patients, it was found that post-radiation expression of the CDKN1A/p21 gene was on average significantly reduced in 11 clinically radiosensitive patients compared to 11 patients without radiation reactions [150]. The overlap of the intervals of individual values in the compared groups was small, and by the cut-off value of 7-fold radiation-induced increase in CDKN1A/p21 gene expression, the correct identification of increased clinical radiosensitivity was made for 10 out of 11 such patients in this study. A detailed analysis of this work was presented in the previous part of our review together with other publications on the use of transcriptome markers [12]. Despite a highly probable applicability of cyclin-dependent kinase CDKN1A/p21 as a radiosensitivity marker for clinical purposes, no comparative validating studies have been reported in the available literature with direct measurement of the product of this particular gene after *ex vivo* irradiation in cells of patients with different grades of radiation toxicity.

CONCLUSIONS

Thus, the analysis of the literature on *ex vivo* cell-based assays to predict clinical radiation toxicity showed that despite the complexity and multicomponent pathogenesis of radiation-induced complications, there is a tendency for a probable individual correlation between quantitative parameters of clonogenic survival / colony forming ability or apoptotic death of normal cells and RT-caused complications. Most often, such a relationship was observed in studies assessing clonogenic survival of fibroblasts and apoptosis in lymphocytes, and in both cases – in regard to the late radiation damage. However, the accuracy and reproducibility of such tests cannot be considered adequate for daily clinical practice. Both

ускладнень. Проте точність і відтворюваність таких тестів поки що не можна визнати адекватною для щоденної клінічної практики. Як для мітотичної, так і для інтерфазної загибелі клітин *ex vivo* характерна значна гетерогенність результатів вимірювань, а перший вид тестів до того ж характеризується довгою тривалістю і високими технічними трудозатратами.

Дослідження, що ґрунтуються на оцінці тільки однієї форми клітинної загибелі в одному типі клітин, не є достатньо надійними, ймовірно, внаслідок того, що різні шляхи загибелі клітин роблять якісно різний внесок (і з різною залежністю від радіаційної дози) у кінцеву відповідь тканини чи органа на опромінення. Існує обґрунтована думка, що тести на клітинну загибель чи клонотенну виживаність можуть покривати тільки певні категорії проявів і тільки певний діапазон ступенів клінічної радіочутливості. Вочевидь, існує необхідність подальших досліджень, спрямованих на розкриття механізмів, що визначають дійсну роль змін клітинного циклу, апоптозу і здатності до колонієутворення клітин у пацієнтів із надмірними променевими реакціями, а також на з'ясування ролі чинників віку, статі, локалізації пухлин і особливостей проти-пухлинного лікування для кращого і точнішого окреслення умов впевненого застосування таких тестів.

Внесок генетичних факторів є очевидним з боку машинерії репарації розривів ДНК: синдроми зі спадковими дефектами цієї системи є систематично радіочутливими як за клітинними тестами, так і за клінічними наслідками терапевтичного опромінення. Проте зворотна теза є хибною, оскільки далеко не всі випадки підвищеної клінічної радіочутливості пов'язані з порушеннями репарації ДНК. Тому в сучасній клінічній радіобіології залишається актуальним пошук працездатних тестів для предикції підвищеної радіочутливості саме «проміжного рівня» – категорії, що міститься між відсутністю променевих реакцій у 80 % пацієнтів та їх екстремальним розвитком у 1,5–2 %, які є носіями ATM і подібних мутацій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Foray N., Colin C., Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology*. 2012. Vol. 264(3). P. 627–631.
2. Foray N., Bourguignon M., Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res.* 2016. Vol. 770(Pt B). P. 369–386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.001>
3. Habash M., Bohorquez L. C., Kyriakou E., Kron T., Martin O. A., Blyth B. J. Clinical and functional assays of radiosensitivity and radiation-induced second cancer. *Cancers (Basel)*. 2017. Vol. 9(11). pii: E147. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers9110147>
4. Domina E. A., Philchenkov A., Dubrovskaya A. Individual Response to Ionizing Radiation and Personalized Radiotherapy. *Crit. Rev. Oncog.* 2018. Vol. 23(1–2). P. 69–92. DOI: <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018026308>
5. Burnet N. G., Barnett G. C., Summersgill H. R., Dunning A. M., West C. M. L. RAPPER — A success

mitotic and interphase cell death *ex vivo* is characterized by significant heterogeneity of measurement results, and the former assay type also suffers from long duration and high labor intensity required for the test.

Studies based on the evaluation of only one form of cell death in one cell type are not reliable enough, probably due to the fact that different pathways of cell death make different contributions (and with different dependence on radiation dose) to the final tissue or organ response to irradiation. There is a reasonable opinion that cell death- or clonogenic survival-based assays are able to cover not all, but only certain types of adverse effects and only a certain range of degrees of clinical radiosensitivity. Obviously, there is a need for further research to reveal the mechanisms, which determine the true role of cell cycle changes, apoptosis and colony forming ability in patients with excessive radiation response in normal tissues; as well, the role of age, sex, tumor location and details of antitumor treatment must be elucidated for better, more accurate delineation of the conditions for the confident use of such assays.

The contribution of genetic factors is evident from the side of the DNA repair machinery: syndromes with hereditary defects of this system are systematically radiosensitive both by cellular tests and by the clinical consequences of therapeutic irradiation. However, the opposite thesis is incorrect, because not all cases of increased clinical radiosensitivity are associated with disorders of DNA repair. Therefore, in modern clinical radiobiology it remains relevant to find workable functional tests to predict the increased radiosensitivity of the “intermediate level” – a category fallen in between the absence of radiation reactions (as in 80 % of patients) and their extreme development in those 1.5–2 %, who are carriers of ATM or similar mutations.

REFERENCES

1. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology*. 2012;264(3):627–31. (In English).
2. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res.* 2016;770(Pt B):369–86. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.001>
3. Habash M, Bohorquez LC, Kyriakou E, Kron T, Martin OA, Blyth BJ. Clinical and functional assays of radiosensitivity and radiation-induced second cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(11):E147. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers9110147>
4. Domina EA, Philchenkov A, Dubrovskaya A. Individual Response to Ionizing Radiation and Personalized Radiotherapy. *Crit. Rev. Oncog.* 2018;23(1–2):69–92. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018026308>
5. Burnet NG, Barnett GC, Summersgill HR, Dunning AM, West CML. RAPPER — A success story

- story for collaborative translational radiotherapy research. *Clinical Oncology*. 2019. Vol. 31. P. 416–419.
6. Bergom C., West C. M., Higginson D. S., Abazeed M. E., Arun B., Bentzen S. M. et al. The Implications of Genetic Testing on Radiation Therapy Decisions: A Guide for Radiation Oncologists. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2019. Vol. 105(4). P. 698–712. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.07.026>
 7. Vinnikov V., Belyakov O. Clinical applications of biomarker of radiation exposure: limitations and possible solutions through coordinated research. *Radiation Protection Dosimetry*. 2019. Vol. 186(1). P. 3–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncz038>
 8. Vinnikov V., Belyakov O. Radiation exposure biomarkers in the practice of medical radiology: Cooperative research and the role of the International Atomic Energy Agency (IAEA) Biodosimetry/Radiobiology Laboratory. *Health Physics*. 2020. Vol. 119, № 1. P. 83–94. DOI: <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001266>
 9. Gomolka M., Blyth B., Bourguignon M., Badie C., Schmitz A., Talbot C., Hoeschen C., Salomaa S. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020. Vol. 96 № 3. P. 280–296. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
 10. Seibold P., Auvinen A., Averbek D., Bourguignon M., Hartikainen J. M. et al. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020. Vol. 96 (3). P. 324–339. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665209>
 11. Meehan J., Gray M., Martínez-Pérez C., Kay C., Pang L. Y. et al. Precision Medicine and the Role of Biomarkers of Radiotherapy Response in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 2020. Vol. 24(10). 628 p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00628>
 12. Вінніков В. А. Молекулярно-генетичні предиктори індивідуальної радіочутливості в радіаційній онкології. *Укр. радіол. журн.* 2019. Т. XXVII, вип. 4. С. 256–268.
 13. Andreassen C. N. The future has begun in radiogenomics! *Radiother Oncol.* 2014. Vol. 111(2). P. 165–167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.04.006>
 14. Andreassen C. N., Schack L. M. H., Laursen L. V., Alsner J. Radiogenomics – current status, challenges and future directions. *Cancer Letters*. 2016. Vol. 382(1). P. 127–136.
 15. Sørensen B. S., Andreassen C. N., Alsner J. Molecular biomarkers in radiation oncology. In: F. Wenz (Ed.), *Radiation Oncology: Springer Nature Switzerland AG*. 2019. 18 p. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-52619-5_103-1
 16. Fernet M., Hall J. Predictive markers for normal tissue reactions: fantasy or reality? *Cancer Radiother.* 2008. Vol. 12(6–7). P. 614–618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2008.07.013>
 17. Massart C., Joubert A., Granzotto A., Viau M., Seghier F., Balosso J., Foray N. Prediction of the human radiosensitivity: What is the most relevant endpoint? Gene expressions, mutations or functions? Chapter XI. In: Kocsis A., Molna H. (Eds.), *Genotoxicity: for collaborative translational radiotherapy research. Clinical Oncology*. 2019;31:416–9. (In English).
 6. Bergom C, West CM, Higginson DS, Abazeed ME, Arun B, Bentzen SM. et al. The Implications of Genetic Testing on Radiation Therapy Decisions: A Guide for Radiation Oncologists. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2019;105(4):698–712. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.07.026>
 7. Vinnikov V, Belyakov O. Clinical applications of biomarker of radiation exposure: limitations and possible solutions through coordinated research. *Radiation Protection Dosimetry*. 2019;186(1):3–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncz038>
 8. Vinnikov V, Belyakov O. Radiation exposure biomarkers in the practice of medical radiology: Cooperative research and the role of the International Atomic Energy Agency (IAEA) Biodosimetry/Radiobiology Laboratory. *Health Physics*. 2020;119(1):83–94. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001266>
 9. Gomolka M, Blyth B, Bourguignon M, Badie C, Schmitz A, Talbot C, Hoeschen C, Salomaa S. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020;96(3):280–96. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
 10. Seibold P, Auvinen A, Averbek D, Bourguignon M, Hartikainen JM et al. Clinical and epidemiological observations on individual radiation sensitivity and susceptibility. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020;96(3):324–39. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665209>
 11. Meehan J, Gray M, Martínez-Pérez C, Kay C, Pang LY et al. Precision Medicine and the Role of Biomarkers of Radiotherapy Response in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 2020;24(10):628. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00628>
 12. Vinnikov VA Molecular genetic predictors of individual radiosensitivity in radiation oncology. *Ukr. Radiol. Journal*. 2019;XXVII(4):256–68. (In Ukrainian).
 13. Andreassen CN. The future has begun in radiogenomics! *Radiother Oncol.* 2014;111(2):165–7. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.04.006>
 14. Andreassen CN, Schack LMH, Laursen LV, Alsner J. Radiogenomics – current status, challenges and future directions. *Cancer Letters*. 2016;382(1):127–36. (In English).
 15. Sørensen BS, Andreassen CN, Alsner J. Molecular biomarkers in radiation oncology. In: F. Wenz (Ed.), *Radiation Oncology: Springer Nature Switzerland AG*. 2019;18. (In English). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-52619-5_103-1
 16. Fernet M, Hall J. Predictive markers for normal tissue reactions: fantasy or reality? *Cancer Radiother.* 2008;12(6–7):614–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2008.07.013>
 17. Massart C, Joubert A, Granzotto A, Viau M, Seghier F, Balosso J, Foray N. Prediction of the human radiosensitivity: What is the most relevant endpoint? Gene expressions, mutations or functions? Chapter XI. In: Kocsis A., Molna H. (Eds.), *Genotoxicity:*

- Gene expressions, mutations or functions? Chapter XI. In: Kocsis A., Molna H. (Eds.), *Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction*. Nova Science Publishers, Inc. 2009. P. 275–291. ISBN: 978-1-60741-714-9
18. Lacombe J., Riou O., Solassol J., Mangé A., Bourcier C. et al. Intrinsic radiosensitivity: predictive assays that will change daily practice. *Cancer Radiother.* 2013. Vol. 17(5–6). P. 337–343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.07.137>
 19. Ferlazzo M. L., Bourguignon M., Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: A critical review. *Semin. Radiat. Oncol.* 2017. Vol. 27(4). P. 310–315.
 20. Granzotto A., Joubert A., Viau M., Devic C., Maalouf M. et al. Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose? *C. R. Biol.* 2011. Vol. 334(2). P. 140–157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.018>
 21. Burnet N. G., Nyman J., Turesson I., Wurm R., Yarnold J. R., Peacock J. H. The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother. Oncol.* 1994. Vol. 33(3). P. 228–238.
 22. Peters L. J. Radiation therapy tolerance limits. For one or for all? *Janeway Lecture. Cancer.* 1996. Vol. 77(11). P. 2379–2385.
 23. Tucker S. L., Geara F. B., Peters L. J., Brock W. A. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? *Radiother. Oncol.* 1996. Vol. 38(2). P. 103–113.
 24. Bentzen S. M. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother. Oncol.* 1997. Vol. 43(2). P. 121–131.
 25. Burnet N. G., Johansen J., Turesson I., Nyman J., Peacock J. H. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int. J. Cancer.* 1998. Vol. 79(6). P. 606–613.
 26. Mackay R. I., Hendry J. H. The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability. *Radiother Oncol.* 1999. Vol. 50(1). P. 67–75.
 27. Sanchez-Nieto B., Nahum A. E., Dearnaley D. P. Individualization of dose prescription based on normal-tissue dose-volume and radiosensitivity data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001. Vol. 49(2). P. 487–499.
 28. Mothersill C., Seymour C. B. Targeted radiotherapy: is the "Holy Grail" in sight? *J. Nucl. Med.* 2006. Vol. 47(6). P. 899–900.
 29. Torres-Roca J. F., Stevens C. W. Predicting response to clinical radiotherapy: past, present, and future directions. *Cancer. Control.* 2008. Vol. 15(2). P. 151–156.
 30. Evaluation, Testing and Prediction. *Nova Science Publishers, Inc.* 2009;275–91. (In English). ISBN: 978-1-60741-714-9
 18. Lacombe J., Riou O., Solassol J., Mangé A., Bourcier C. et al. Intrinsic radiosensitivity: predictive assays that will change daily practice. *Cancer Radiother.* 2013;17(5–6):337–43. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.07.137>
 19. Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: A critical review. *Semin. Radiat. Oncol.* 2017;27(4):310–5. (In English).
 20. Granzotto A, Joubert A, Viau M, Devic C, Maalouf M et al. Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose? *C.R. Biol.* 2011;334(2):140–57. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.018>
 21. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother. Oncol.* 1994; 33(3):228–38. (In English).
 22. Peters LJ. Radiation therapy tolerance limits. For one or for all? *Janeway Lecture. Cancer.* 1996;77(11):2379–85. (In English).
 23. Tucker SL, Geara FB, Peters LJ, Brock WA. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? *Radiother. Oncol.* 1996;38(2):103–13. (In English).
 24. Bentzen SM. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother. Oncol.* 1997;43(2):121–31. (In English).
 25. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int. J. Cancer.* 1998;79(6):606–13. (In English).
 26. Mackay RI, Hendry JH. The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability. *Radiother Oncol.* 1999;50(1):67–75. (In English).
 27. Sanchez-Nieto B, Nahum AE, Dearnaley DP. Individualization of dose prescription based on normal-tissue dose-volume and radiosensitivity data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001;49(2):487–99. (In English).
 28. Mothersill C, Seymour CB. Targeted radiotherapy: is the "Holy Grail" in sight? *J. Nucl. Med.* 2006;47(6):899–900. (In English).
 29. Torres-Roca JF, Stevens CW. Predicting response to clinical radiotherapy: past, present, and future directions. *Cancer. Control.* 2008;15(2):151–6. (In English).
 30. Chua ML, Rothkamm K. Biomarkers of radiation exposure: can they predict normal tissue radiosensitivity? *Clin. Oncol.* 2013;25(10):610–6. (In English).
 31. Azria D, Brengues M, Gourgou S, Bourcier C. Personalizing Breast Cancer Irradiation Using Biology:

30. Chua M. L., Rothkamm K. Biomarkers of radiation exposure: can they predict normal tissue radiosensitivity? *Clin. Oncol.* 2013. Vol. 25(10). P. 610–616.
31. Azria D., Brengues M., Gourgou S., Bourcier C. Personalizing Breast Cancer Irradiation Using Biology: From Bench to the Accelerator. *Front. Oncol.* 2018. Vol. 8. 83 p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00083>
32. Jeggo P., Lavin M. F. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int. J. Radiat Biol.* 2009. Vol. 85(12):1061–81. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3109/09553000903261263>
33. Rosen E. M., Fan S., Goldberg I. D., Rockwell S. Biological basis of radiation sensitivity. Part 2: Cellular and molecular determinants of radiosensitivity. *Oncology (Williston Park)*. 2000. Vol. 14(5). P. 741–757.
34. Benotmane M. A. Molecular aspects of individual radiosensitivity. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2004. Vol. 18(3–4). P. 357–362.
35. Bourguignon M. H., Gisone P. A., Perez M. R., Michelin S., Dubner D., Giorgio M. D., Carosella E. D. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity. Part II: implications for clinical practice and radiation protection. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005. Vol. 32(3). P. 351–368.
36. Sakata K., Someya M., Matsumoto Y., Hareyama M. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity. *Radiat. Med.* 2007. Vol. 25(9). P. 433–438.
37. Bodgi L., Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92(3). P. 117–131. DOI: <https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1135260>
38. Shibata A., Jeggo P. A historical reflection on our understanding of radiation-induced DNA double strand break repair in somatic mammalian cells; interfacing the past with the present. *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. Vol. 95(7). P. 945–956. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1564083>
39. Berthel E., Ferlazzo M. L., Devic C., Bourguignon M., Foray N. What Does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?—A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20(21):5339. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215339>
40. Pollard J. M., Gatti R. A. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. Vol. 74(5). P. 1323–1331. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.057>
41. Cole J., Arlett C. F., Green M. H., Harcourt S. A., Priestley A. et al. Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1988. Vol. 54(6). P. 929–943. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553008814552331>
42. Schwartz J. L. Alterations in chromosome structure and variations in the inherent radiation sensitivity of human cells. *Radiat. Res.* 1998. Vol. 149(4). P. 319–324.
43. Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ, West CM. Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters. *Br. J. Cancer.* 2018;8:83. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00083>
44. Jeggo P, Lavin MF. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int. J. Radiat Biol.* 2009;85(12):1061–81. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3109/09553000903261263>
45. Rosen EM, Fan S, Goldberg ID, Rockwell S. Biological basis of radiation sensitivity. Part 2: Cellular and molecular determinants of radiosensitivity. *Oncology (Williston Park)*. 2000;14(5):741–57. (In English).
46. Benotmane MA. Molecular aspects of individual radiosensitivity. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2004;18(3–4):357–62. (In English).
47. Bourguignon MH, Gisone PA, Perez MR, Michelin S, Dubner D, Giorgio MD, Carosella ED. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity. Part II: implications for clinical practice and radiation protection. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005;32(3):351–68. (In English).
48. Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Hareyama M. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity. *Radiat. Med.* 2007;25(9):433–8. (In English).
49. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016;92(3):117–31. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1135260>
50. Shibata A, Jeggo P. A historical reflection on our understanding of radiation-induced DNA double strand break repair in somatic mammalian cells; interfacing the past with the present. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(7):945–56. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1564083>
51. Berthel E, Ferlazzo ML, Devic C, Bourguignon M, Foray N. What Does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?—A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(21):5339. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215339>
52. Pollard JM, Gatti RA. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009;74(5):1323–31. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.057>
53. Cole J, Arlett CF, Green MH, Harcourt SA, Priestley A et al. Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1988;54(6):929–43. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553008814552331>
54. Schwartz JL. Alterations in chromosome structure and variations in the inherent radiation sensitivity of human cells. *Radiat. Res.* 1998;149(4):319–24. (In English).
55. Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ, West CM. Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters. *Br. J. Cancer.*

43. Eastham A. M., Marples B., Kiltie A. E., Orton C. J., West C. M. Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters. *Br. J. Cancer*. 1999. Vol. 79(9–10). P. 1366–1371. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690219>
44. Rosen E. M., Fan S., Rockwell S., Goldberg I. D. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest*. 1999. Vol. 17(1). P. 56–72.
45. Brammer I., Zoller M., Dikomey E. Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol*. 2001. Vol. 77(9). P. 929–938. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000110064222>
46. Djuzenova C., Flentje M., Plowman P. N. Radiation response in vitro of fibroblasts from a fanconi anemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Strahlenther Onkol*. 2004. Vol. 180(12). P. 789–797. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-004-1250-1>
47. Angèle S., Romestaing P., Moullan N., Vuillaume M., Chapot B. et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res*. 2003;63(24):8717–25. (In English).
48. Gutiérrez-Enríquez S., Fernet M., Dörk T., Bremer M., Lauge A. et al. Functional consequences of ATM sequence variants for chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004. Vol. 40(2). P. 109–119. DOI: <https://doi.org/10.1002/gcc.20025>
49. Löbrich M., Rief N., Kuhne M., Heckmann M., Fleckenstein J., Rube C. et al. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:8984–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501895102>
50. Bürger S., Schindler D., Fehn M., Mühl B., Mahrhofer H., Flentje M. et al. Radiation-induced DNA damage and repair in peripheral blood mononuclear cells from Nijmegen breakage syndrome patients and carriers assessed by the Comet assay. *Environ. Mol. Mutagen*. 2006. Vol. 47(4). P. 260–270. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.20202>
51. Chistiakov D. A., Voronova N. V., Chistiakov P. A. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta. Oncol*. 2008. Vol. 47(5). P. 809–824. DOI: <https://doi.org/10.1080/02841860801885969>
52. Joubert A., Zimmerman K. M., Bencokova Z., Gastaldo J., Chavaudra N. et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol*. 2008. Vol. 84(2). P. 107–125. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000701797039>
53. West C. M. Invited review: intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br. J. Radiol*. 1995. Vol. 68(812). P. 827–837.
- 1999;79(9–10):1366–71. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690219>
44. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest*. 1999;17(1):56–72. (In English).
45. Brammer I, Zoller M, Dikomey E. Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol*. 2001;77(9):929–38. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000110064222>
46. Djuzenova C, Flentje M, Plowman PN. Radiation response in vitro of fibroblasts from a fanconi anemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Strahlenther Onkol*. 2004;180(12):789–97. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-004-1250-1>
47. Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res*. 2003;63(24):8717–25. (In English).
48. Gutiérrez-Enríquez S, Fernet M, Dörk T, Bremer M, Lauge A et al. Functional consequences of ATM sequence variants for chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40(2):109–19. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/gcc.20025>
49. Löbrich M, Rief N, Kuhne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C et al. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:8984–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501895102>
50. Bürger S, Schindler D, Fehn M, Mühl B, Mahrhofer H, Flentje M et al. Radiation-induced DNA damage and repair in peripheral blood mononuclear cells from Nijmegen breakage syndrome patients and carriers assessed by the Comet assay. *Environ. Mol. Mutagen*. 2006;47(4):260–70. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/em.20202>
51. Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta. Oncol*. 2008;47(5):809–24. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/02841860801885969>
52. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol*. 2008;84(2):107–25. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000701797039>
53. West CM. Invited review: intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br. J. Radiol*. 1995;68(812):827–37. (In English).
54. Budach W, Classen J, Belka C, Bamberg M. Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity. *Strahlenther Onkol*. 1998;174(3):20–4. (In English).

54. Budach W., Classen J., Belka C., Bamberg M. Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity. *Strahlenther. Onkol.* 1998. Vol. 174(3). P. 20–24.
55. Nachtrab U., Oppitz U., Flentje M., Stopper H. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. Vol. 73(3). P. 279–287. DOI: <https://doi.org/10.1080/095530098142374>
56. Sprung C. N., Chao M., Leong T., McKay J. Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin. Cancer. Res.* 2005. Vol. 11. P. 6352–6358. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1931>
57. Granzotto A., Benadjaoud M. A., Vogin G., Devic C., Ferlazzo M. L., Bodgi L., Pereira S. et al. Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: Toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. Vol. 94(3). P. 450–460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013>
58. Fahrig A., Koch T., Lenhart M., Rieckmann P., Fietkau R., Distel L., Schuster B. Lethal outcome after pelvic salvage radiotherapy in a patient with prostate cancer due to increased radiosensitivity: Case report and literature review. *Strahlenther. Onkol.* 2018. Vol. 194(1). P. 60–66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-017-1207-9>
59. Slonina D., Klimek M., Szpytma T., Gasinska A. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000. Vol. 76(9). P. 1255–1264.
60. Slonina D., Biesaga B., Urbanski K., Kojcs Z. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008. Vol. 84(5). P. 421–428. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000802029910>
61. Akudugu J. M., Bell R. S., Catton C., Davis A. M., O'Sullivan B., Waldron J., Wunder J. S., Hill R. P. Clonogenic survival and cytokinesis-blocked binucleation of skin fibroblasts and normal tissue complications in soft tissue sarcoma patients treated with preoperative radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2004. Vol. 72(1). P. 103–112.
62. El-Awady R. A., Mahmoud M., Saleh E. M., El-Baky H. A., Lotayef M., Dahm-Daphi J., Dikomey E. No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. Vol. 81(7). P. 501–508.
63. West C. M., Davidson S. E., Elyan S. A., Swindell R., Roberts S. A. et al. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. Vol. 73(4). P. 409–413.
64. West C. M., Davidson S. E., Elyan S. A., Valentine H., Roberts S. A., Swindell R., Hunter R. D. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for
55. Nachtrab U., Oppitz U., Flentje M., Stopper H. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998;73(3):279–87. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/095530098142374>
56. Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay J. Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin. Cancer. Res.* 2005;11:6352–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1931>
57. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S et al. Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: Toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016;94(3):450–60. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013>
58. Fahrig A, Koch T, Lenhart M, Rieckmann P, Fietkau R, Distel L, Schuster B. Lethal outcome after pelvic salvage radiotherapy in a patient with prostate cancer due to increased radiosensitivity: Case report and literature review. *Strahlenther. Onkol.* 2018;194(1):60–6. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-017-1207-9>
59. Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasinska A. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000;76(9):1255–64. (In English).
60. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojcs Z. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84(5):421–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000802029910>
61. Akudugu JM, Bell RS, Catton C, Davis AM, O'Sullivan B, Waldron J, Wunder JS, Hill RP. Clonogenic survival and cytokinesis-blocked binucleation of skin fibroblasts and normal tissue complications in soft tissue sarcoma patients treated with preoperative radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2004;72(1):103–12. (In English).
62. El-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM, El-Baky HA, Lotayef M, Dahm-Daphi J, Dikomey E. No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005;81(7):501–8. (In English).
63. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Swindell R, Roberts SA et al. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998;73(4):409–13. (In English).
64. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, Hunter RD. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001;51(1):10–5. (In English).
65. Slonina D, Biesaga B, Urbanski K, Kojcs Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. *Radiat. Res.*

- morbidity in carcinoma of the cervix. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001. Vol. 51(1). P. 10–15.
65. Słonina D., Biesaga B., Urbański K., Kojs Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. *Radiat. Res.* 2007. Vol. 167(3). P. 251–259. DOI: <https://doi.org/10.1667/rr0649>
66. Ramsay J., Birrell G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995. Vol. 31. P. 339–344. DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00478-4](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00478-4)
67. Sprung C. N., Davey D. S., Withana N. P., Distel L. V., McKay M. J. Telomere length in lymphoblast cell lines derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Cancer. Biol. Ther.* 2008. P. 638–644.
68. Perez A., Grabenbauer G. G., Sprung C. N., Sauer R., Distel L. V. Potential for the G2/M arrest assay to predict patient susceptibility to severe reactions following radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 2007. Vol. 183(2). P. 99–106.
69. Greve B., Bölling T., Amler S., Rössler U., Gomolka M., Mayer C., Popanda O. et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison – lessons for future studies. *PLoS. One.* 2012. Vol. 7(10). e47185. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047185>
70. McKay M. J., Maneerat J., McKay T. M., McKay J. N., Masoud-Rahbari R. *In vitro* prediction of breast cancer therapy toxicity. *Ann. Transl. Med.* 2017. Vol. 5(5). 94 p. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.02.27>
71. Kushiro J., Nakamura N., Kyoizumi S., Nishiki M., Dohi K., Akiyama M. Absence of correlations between radiosensitivities of human T-lymphocytes in G₀ and skin fibroblasts in log phase. *Radiat. Res.* 1990. Vol. 122(3). P. 326–332.
72. Green M. H. L., Arlett C. F., Cole J. et al, Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int. J. Radiat. Oncol.* 1991. Vol. 59. P. 749–765.
73. Geara F. B., Peters L. J., Ang K. K., Wike J. L., Sivon S. S. et al. Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer. Res.* 1992. Vol. 52(22). P. 6348–6352.
74. Virsik-Peuckert P., Rave-Fränk M., Langebrake U., Schmidberger H. Differences in the yields of dicentric and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals. *Radiat. Res.* 1997. Vol. 148(3). P. 209–215.
75. Geara F. B., Peters L. J., Ang K. K., Wike J. L., Brock W. A. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993. Vol. 27(5). P. 1173–1179.
76. Oppitz U., Schulte S., Stopper H., Baier K., Müller M., Wulf J., Schakowski R., Flentje M. In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: 2007;167(3):251–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1667/rr0649>
66. Ramsay J., Birrell G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995;31:339–44. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00478-4](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00478-4)
67. Sprung CN, Davey DS, Withana NP, Distel LV, McKay MJ. Telomere length in lymphoblast cell lines derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Cancer. Biol. Ther.* 2008; 638–44. (In English).
68. Perez A, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R, Distel LV. Potential for the G2/M arrest assay to predict patient susceptibility to severe reactions following radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 2007;183(2):99–106. (In English).
69. Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M, Mayer C, Popanda O et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison – lessons for future studies. *PLoS. One.* 2012;7(10):e47185. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047185>
70. McKay MJ, Maneerat J, McKay TM, McKay JN, Masoud-Rahbari R. *In vitro* prediction of breast cancer therapy toxicity. *Ann. Transl. Med.* 2017;5(5):94. (In English). DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.02.27>
71. Kushiro J, Nakamura N, Kyoizumi S, Nishiki M, Dohi K, Akiyama M. Absence of correlations between radiosensitivities of human T-lymphocytes in G₀ and skin fibroblasts in log phase. *Radiat. Res.* 1990;122(3):326–32. (In English).
72. Green MHL, Arlett CF, Cole J et al, Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int. J. Radiat. Oncol.* 1991;59:749–65. (In English).
73. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Sivon SS et al. Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer. Res.* 1992;52(22):6348–52. (In English).
74. Virsik-Peuckert P, Rave-Fränk M, Langebrake U, Schmidberger H. Differences in the yields of dicentrics and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals. *Radiat. Res.* 1997;148(3):209–15. (In English).
75. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993;27(5):1173–9. (In English).
76. Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Müller M, Wulf J, Schakowski R, Flentje M. In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 2002;78(7):611–6. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000210126466>

- comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 2002. Vol. 78(7). P. 611–616. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000210126466>
77. Chua M. L., Somaiah N., Bourne S., Daley F., A'hern R., Nuta O. et al. Inter-individual and inter-cell type variation in residual DNA damage after in vivo irradiation of human skin. *Radiother Oncol.* 2011. Vol. 99(2). P. 225–230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.04.009>
78. Somaiah N., Chua M. L., Bourne S., Daley F., A'Hern R., Nuta O. et al. Correlation between DNA damage responses of skin to a test dose of radiation and late adverse effects of earlier breast radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2016. Vol. 119(2). P. 244–249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.04.012>
79. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983;65(1–2):55–63. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
80. Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica.* 2018. Vol. 120 (3). P. 159–167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
81. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015. Vol. 111. P. A3.B.1–A3.B.3. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
82. Franken N. A. P., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J. Van Bree Ch. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols.* 2006. Vol. 1 (5). P. 2315–2319. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
83. Wurm R., Burnet N. G., Duggal N., Yarnold J. R., Peacock J. H. Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994;30(3):625–33. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90949-i](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)90949-i)
84. Deschavanne PJ, Fertil BA review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996;34(1):251–66. (In English).
85. Kiltie AE, Orton CJ, Ryan AJ, Roberts SA, Marples B et al. A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997;39(5):1137–44. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(97\)00545-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(97)00545-2)
86. Sarkaria JN, Bush C, Eady JJ, Peacock JH, Steel GG, Yarnold JR. Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiat. Res.* 1998;150(1):17–22. (In English).
87. Wilkins RC, Ng CE, Raaphorst GP. Comparison of high dose rate, low dose rate, and high dose rate fractionated radiation for optimizing differences in radiosensitivities in vitro. *Radiat. Oncol. Investig.* 1998;6(5):209–15. (In English).
88. Fertil B, Deschavanne PJ. Relationships between colony forming efficiency and parameters of intrinsic radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999;75(10):1275–82. (In English).
89. Rave-Fränk M, Virsik-Köpp P, Pradier O, Nitsche M, Grünefeld S, Schmidberger H. In vitro response of

- intrinsic radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999. Vol. 75(10). P. 1275–1282.
89. Rave-Fränk M., Virsik-Köpp P., Pradier O., Nitsche M., Grünefeld S., Schmidberger H. In vitro response of human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001. Vol. 77(12). P. 1163–1174.
90. Williams J. R., Zhang Y., Zhou H., Russell J., Gridley D. S., Koch C. J., Little J. B. Genotype-dependent radiosensitivity: clonogenic survival, apoptosis and cell-cycle redistribution. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008. Vol. 84(2). P. 151–164. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000701797021>
91. Johansen J., Bentzen S. M., Overgaard J., Overgaard M. Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994. Vol. 66(4). P. 407–412. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553009414551361>
92. Johansen J., Bentzen S. M., Overgaard J., Overgaard M. Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 1996. Vol. 40(2). P. 101–109. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(96\)01777-x](https://doi.org/10.1016/0167-8140(96)01777-x)
93. Brock W. A., Tucker S. L., Geara F. B., Turesson I., Wike J., Nyman J., Peters L. J. Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995. Vol. 32(5). P. 1371–1379. DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00068-A](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00068-A)
94. Raaphorst G. P., Malone S., Alsbeih G., Souhani L., Szumacher E., Girard A. Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM radiosurgery. *Radiother. Oncol.* 2002. Vol. 64(2). P. 153–156. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(02\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00076-2)
95. Begg A. C., Russel N. S., Knaken H., Lebesque J. V. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity *in vitro* with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. Vol. 64. P. 393–405.
96. Russell N. S., Grummels A., Hart A. A., Smolders I. J., Borger J., Bartelink H., Begg A. C. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998. Vol. 73(6). P. 661–670. DOI: <https://doi.org/10.1080/095530098141915>
97. Peacock J., Ashton A., Bliss J., Bush C., Eady J., Jackson C., Owen R., Regan J., Yarnold J. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2000. Vol. 55(2). P. 173–178. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(00\)00173-0](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(00)00173-0)
98. Borgmann K., Röper B., El-Awady R., Brackrock S., Bigalke M., Dörk T., Alberti W., Dikomey E., Dahm-Daphi J. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001;77(12):1163–74. (In English).
90. Williams JR, Zhang Y, Zhou H, Russell J, Gridley DS, Koch CJ, Little JB. Genotype-dependent radiosensitivity: clonogenic survival, apoptosis and cell-cycle redistribution. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84(2):151–64. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000701797021>
91. Johansen J, Bentzen S. M, Overgaard J, Overgaard M. Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994;66(4):407–12. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553009414551361>
92. Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 1996;40(2):101–9. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(96\)01777-x](https://doi.org/10.1016/0167-8140(96)01777-x)
93. Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, Peters LJ. Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995;32(5):1371–9. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00068-A](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00068-A)
94. Raaphorst GP, Malone S, Alsbeih G, Souhani L, Szumacher E, Girard A. Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM radiosurgery. *Radiother. Oncol.* 2002;64(2):153–6. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(02\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00076-2)
95. Begg AC, Russel NS, Knaken H, Lebesque JV. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity *in vitro* with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993;64:393–405. (In English).
96. Russell NS, Grummels A, Hart AA, Smolders IJ, Borger J, Bartelink H, Begg AC. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998;73(6):661–70. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/095530098141915>
97. Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2000;55(2):173–8. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(00\)00173-0](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(00)00173-0)
98. Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother. Oncol.* 2002;64(2):141–52. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(02\)00167-6](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00167-6)

- lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother. Oncol.* 2002. Vol. 64(2). P. 141–152. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(02\)00167-6](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00167-6)
99. Akudugu J. M., Bell R. S., Catton C., Davis A. M., Griffin A. M. et al. Wound healing morbidity in STS patients treated with preoperative radiotherapy in relation to in vitro skin fibroblast radiosensitivity, proliferative capacity and TGF-beta activity. *Radiother. Oncol.* 2006. Vol. 78(1). P. 17–26.
100. Marcou Y., D'Andrea A., Jeggo P. A., Plowman P. N. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother. Oncol.* 2001;60(1):75–9. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00370-x](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00370-x). PMID: 11410307
101. Dikomey E., Borgmann K., Peacock J., Jung H. Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003. Vol. 56(4). P. 1194–1200.
102. Nakamura N., Sposto R., Kushiro J., Akiyama M. Is interindividual variation of cellular radiosensitivity real or artifactual? *Radiat. Res.* 1991. Vol. 125(3). P. 326–330.
103. Nakamura N., Sposto R., Akiyama M. Dose survival of G₀ lymphocytes irradiated in vitro: a test for a possible population bias in the cohort of atomic bomb survivors exposed to high doses. *Radiat. Res.* 1993. Vol. 134(3). P. 316–322.
104. Elyan S. A., West C. M., Roberts S. A., Hunter R. D. Use of an internal standard in comparative measurements of the intrinsic radiosensitivities of human T-lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. Vol. 64(4). P. 385–391.
105. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007. Vol. 35(4). P. 495–516. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
106. D'Arcy M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* 2019;43(6):582–92. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
107. Sergeeva T. F., Shirmanova M. V., Zagaynova E. V., Lukyanov K. A. Modern Research Techniques of Apoptotic Cell Death (Review). *Modern Technologies in Medicine.* 2015. Vol. 7(3). P. 172–182. DOI: <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.3.21>
108. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis.* 2017. Vol. 22(2). P. 306–323. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1333-3>
109. Crompton N. E., Ozsahin M. A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity. *Radiat Res.* 1997;147(1):55–60. (In English).
110. Ozsahin M., Ozsahin H., Shi Y., Larsson B., Würzler F. E., Crompton N. E. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997;38(2):429–40. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(97\)00038-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(97)00038-2)
111. Crompton NE, Miralbell R, Rutz HP, Ersoy F, Sanal O, Wellmann D et al. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999;45(3):707–14.

111. Crompton N. E., Miralbell R., Rutz H. P., Ersoy F., Sanal O., Wellmann D. et al. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999. Vol. 45(3). P. 707–714. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(99\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(99)00256-4)
112. Crompton N. E., Shi Y. Q., Emery G. C., Wisser L., Blattmann H., Maier A. et al. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001;49(2):547–54. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)01477-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01477-2)
113. Ozsahin M., Crompton N. E., Gourgou S., Kramar A., Li L., Shi Y. et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(20):7426–33. (In English).
114. Henríquez-Hernández L. A., Carmona-Vigo R., Pinar B., Bordón E., Lloret M., Núñez M. I. et al. Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to long-term toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy. *Radiat. Oncol.* 2011;6:60. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-60>
115. Azria D., Riou O., Castan F., Nguyen T. D., Peignaux K., Lemanski C. et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine.* 2015;2(12):1965–73. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>
116. Fuentes-Raspall M. J., Caragol I., Alonso C., Ramón y Cajal T., Fisas D. et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Apoptosis.* 2015;20(3):371–82. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1056-2>
117. Vandevoorde C., Depuydt J., Veldeman L., De Neve W., Sebastià N., Wieme G. et al. In vitro cellular radiosensitivity in relationship to late normal tissue reactions in breast cancer patients: a multi-endpoint case-control study. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92(12). P. 823–836.
118. Bourgier C., Castan F., Riou O., Nguyen T. D., Peignaux K., Lemanski C. et al. Impact of adjuvant hormone therapy on radiation-induced breast fibrosis according to the individual radiosensitivity: results of a multicenter prospective French trial. *Oncotarget.* 2018. Vol. 9(21). P. 15757–15765. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24606>
119. Veldwijk M. R., Seibold P., Botma A., Helmbold I., Sperk E., Giordano F. A. et al. Association of CD4⁺ Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis with Fibrosis and Telangiectasia after Radiotherapy in 272 Breast Cancer Patients with >10-Year Follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25(2). P. 562–572. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0777>
120. Bordón E., Henríquez Hernández L. A., Lara P. C., Pinar B., Fontes F., Rodríguez Gallego C., Lloret M. Prediction of clinical toxicity in localized (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(99\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(99)00256-4)
112. Crompton NE, Shi YQ, Emery GC, Wisser L, Blattmann H, Maier A et al. Sources of variation in patient response to radiation treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001;49(2):547–54. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)01477-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01477-2)
113. Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(20):7426–33. (In English).
114. Henríquez-Hernández LA, Carmona-Vigo R, Pinar B, Bordón E, Lloret M, Núñez MI et al. Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to long-term toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy. *Radiat. Oncol.* 2011;6:60. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-60>
115. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine.* 2015;2(12):1965–73. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>
116. Fuentes-Raspall MJ, Caragol I, Alonso C, Ramón y Cajal T, Fisas D et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Apoptosis.* 2015;20(3):371–82. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1056-2>
117. Vandevoorde C, Depuydt J, Veldeman L, De Neve W, Sebastià N, Wieme G et al. In vitro cellular radiosensitivity in relationship to late normal tissue reactions in breast cancer patients: a multi-endpoint case-control study. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016;92(12):823–36. (In English).
118. Bourgier C, Castan F, Riou O, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C et al. Impact of adjuvant hormone therapy on radiation-induced breast fibrosis according to the individual radiosensitivity: results of a multicenter prospective French trial. *Oncotarget.* 2018;9(21):15757–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24606>
119. Veldwijk MR, Seibold P, Botma A, Helmbold I, Sperk E, Giordano FA et al. Association of CD4⁺ Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis with Fibrosis and Telangiectasia after Radiotherapy in 272 Breast Cancer Patients with >10-Year Follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2019;25(2):562–72. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0777>
120. Bordón E, Henríquez Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Fontes F, Rodríguez Gallego C, Lloret M. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol.* 2009;4:58. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58>

- cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol.* 2009. Vol. 4. 58 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58>
121. Bordón E., Henríquez-Hernández L. A., Lara P. C., Ruíz A., Pinar B., Rodríguez-Gallego C., Lloret M. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol.* 2010;5:4. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-4>
122. Chaouni S., Lecomte D. D., Stefan D., Leduc A., Barraux V., Leconte A., Grellard J. M. et al. The possibility of using genotoxicity, oxidative stress and inflammation blood biomarkers to predict the occurrence of late cutaneous side effects after radiotherapy. *Antioxidants (Basel)*. 2020. Vol. 9(3). 220 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9030220>
123. Schnarr K., Boreham D., Sathya J., Julian J., Dayes I. S. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. Vol. 74(5). P. 1424–1430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039>
124. Foro P., Algara M., Lozano J., Rodriguez N., Sanz X., Torres E., Carles J. et al. Relationship between radiation-induced apoptosis of T lymphocytes and chronic toxicity in patients with prostate cancer treated by radiation therapy: a prospective study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. Vol. 88(5). P. 1057–1063. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.002>
125. Azria D., Ozsahin M., Kramar A., Peters S., Atencio D. P., Crompton N. E. et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14(19). P. 6284–6288. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0700>
126. Cozzarini C. Radiation induced lymphocyte apoptosis: An effective way of “tailoring” radiotherapy to the right patients only? *EBioMedicine*. 2015. Vol. 2(12). P. 1852–1853. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.014>
127. Seibold P., Webb A., Aguado-Barrera M. E., Azria D., Bourcier C., Brengues M., Briers E. et al. REQUITE consortium. REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. *Radiother. Oncol.* 2019. Vol. 138. P. 59–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.034>
128. Talbot C. J., Veldwijk M. R., Azria D., Batini C., Bierbaum M., Brengues M. et al. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 2019. Vol. 18. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>
129. Svensson J. P., Stalpers L. J., Esveldt-van Lange R. E., Franken N. A., Haveman J. et al. Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med.* 2006. Vol. 3(10). e422 p.
121. Bordón E., Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Ruíz A, Pinar B, Rodríguez-Gallego C, Lloret M. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol.* 2010;5:4. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-4>
122. Chaouni S, Lecomte DD, Stefan D, Leduc A, Barraux V, Leconte A, Grellard JM et al. The possibility of using genotoxicity, oxidative stress and inflammation blood biomarkers to predict the occurrence of late cutaneous side effects after radiotherapy. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3):220. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9030220>
123. Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009;74(5):1424–30. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039>
124. Foro P, Algara M, Lozano J, Rodriguez N, Sanz X, Torres E, Carles J et al. Relationship between radiation-induced apoptosis of T lymphocytes and chronic toxicity in patients with prostate cancer treated by radiation therapy: a prospective study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014;88(5):1057–63. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.002>
125. Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(19):6284–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0700>
126. Cozzarini C. Radiation induced lymphocyte apoptosis: An effective way of “tailoring” radiotherapy to the right patients only? *EBioMedicine*. 2015;2(12):1852–3. D(In English). OI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.014>
127. Seibold P, Webb A, Aguado-Barrera ME, Azria D, Bourcier C, Brengues M, Briers E et al. REQUITE consortium. REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. *Radiother. Oncol.* 2019;138:59–67. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.034>
128. Talbot CJ, Veldwijk MR, Azria D, Batini C, Bierbaum M, Brengues M et al. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 2019;18:1–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>
129. Svensson JP, Stalpers LJ, Esveldt-van Lange RE, Franken NA, Haveman J et al. Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med.* 2006;3(10):e422. (In English).
130. Fhoghlú MN, Barrett S. A review of radiation-induced lymphocyte apoptosis as a predictor of late toxicity after breast radiotherapy. *J. Med. Imaging. Radiat. Sci.* 2019;50(2):337–44. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2019.02.004>

130. Fhoghlú M. N., Barrett S. A review of radiation-induced lymphocyte apoptosis as a predictor of late toxicity after breast radiotherapy. *J. Med. Imaging. Radiat. Sci.* 2019. Vol. 50(2). P. 337–344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2019.02.004>
131. Barber J. B., West C. M., Kiltie A. E., Roberts S. A., Scott D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.* 2000;153(5Pt1):570–8. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0570:doidir\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0570:doidir]2.0.co;2)
132. Finnon P., Kabacik S., MacKay A., Raffy C., A'Hern R., Owen R., Badie C., Yarnold J., Bouffler S. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* 2012. Vol. 105(3). P. 329–336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.10.007>
133. Chua M. L., Horn S., Somaiah N., Davies S., Gothard L., A'Hern R., Yarnold J., Rothkamm K. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiat. Environ. Biophys.* 2014. Vol. 53(2). P. 355–364. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0531-z>
134. Batar B., Mutlu T., Bostanci M., Akin M., Tuncdemir M., Bese N., Guven M. DNA repair and apoptosis: Roles in radiotherapy-related acute reactions in breast cancer patients. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2018. Vol. 64(4). P. 64–70. DOI: <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.4.11>
135. Baijer J., Déchamps N., Perdry H., Morales P., Kerns S., Vasilescu A. et al. TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 21416–21427
136. Rzeszowska-Wolny J., Palyvoda O., Polanska J., Wygoda A., Hancock R. Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008. Vol. 84(8). P. 635–642. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000802087041>
137. Pouliliou S. E., Lialiaris T. S., Dimitriou T., Giatromanolaki A., Papazoglou D. et al. Survival fraction at 2 Gy and γ H2AX expression kinetics in peripheral blood lymphocytes from cancer patients: relationship with acute radiation-induced toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015;92(3):667–74. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.02.023>
138. Marková E., Somsedíková A., Vasilyev S., Pobijaková M., Lacková A., Lukačko P., Belyaev I. DNA repair foci and late apoptosis/necrosis in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 91(12). P. 934–945.
131. Barber JB, West CM, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.* 2000;153(5Pt1):570–8. (In English). DOI: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0570:doidir\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0570:doidir]2.0.co;2)
132. Finnon P, Kabacik S, MacKay A, Raffy C, A'Hern R, Owen R, Badie C, Yarnold J, Bouffler S. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiother. Oncol.* 2012;105(3):329–36. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.10.007>
133. Chua ML, Horn S, Somaiah N, Davies S, Gothard L, A'Hern R, Yarnold J, Rothkamm K. DNA double-strand break repair and induction of apoptosis in ex vivo irradiated blood lymphocytes in relation to late normal tissue reactions following breast radiotherapy. *Radiat. Environ. Biophys.* 2014;53(2):355–64. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0531-z>
134. Batar B, Mutlu T, Bostanci M, Akin M, Tuncdemir M, Bese N, Guven M. DNA repair and apoptosis: Roles in radiotherapy-related acute reactions in breast cancer patients. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2018;64(4):64–70. (In English). DOI: <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.4.11>
135. Baijer J, Déchamps N, Perdry H, Morales P, Kerns S, Vasilescu A et al. TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. *Oncotarget*. 2016;7:21416–27. (In English).
136. Rzeszowska-Wolny J, Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Hancock R. Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84(8):635–42. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000802087041>
137. Pouliliou SE, Lialiaris TS, Dimitriou T, Giatromanolaki A, Papazoglou D et al. Survival fraction at 2 Gy and γ H2AX expression kinetics in peripheral blood lymphocytes from cancer patients: relationship with acute radiation-induced toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2015;92(3):667–74. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.02.023>
138. Marková E, Somsedíková A, Vasilyev S, Pobijaková M, Lacková A, Lukačko P, Belyaev I. DNA repair foci and late apoptosis/necrosis in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients undergoing radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015;91(12):934–45. (In English).
139. Wistop A, Keller U, Sprung CN, Grabenbauer GG, Sauer R, Distel LV. Individual radiosensitivity does not correlate with radiation-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines or CD3+ lymphocytes. *Strahlenther. Onkol.* 2005;181(5):326335.

139. Wistop A., Keller U., Sprung C. N., Grabenbauer G. G., Sauer R., Distel L. V. Individual radiosensitivity does not correlate with radiation-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines or CD3+ lymphocytes. *Strahlenther. Onkol.* 2005. Vol. 181(5). P. 326–335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-005-1372-0>
140. Greve B., Dreffke K., Rickinger A., Koenemann S., Fritz E., Eckardt-Schupp F. et al. Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. *Apoptosis.* 2009. Vol. 14. P. 226–235. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0294-6>
141. Vogin G., Merlin J. L., Rousseau A., Peiffert D., Harlé A., Husson M. et al. Absence of correlation between radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis and sequelae in patients with prostate cancer accidentally overexposed to radiation. *Oncotarget.* 2018. Vol. 9(66). P. 32680–32689. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26001>
142. Tell R., Heiden T., Granath F., Borg A. L., Skog S., Lewensohn R. Comparison between radiation-induced cell cycle delay in lymphocytes and radiotherapy response in head and neck cancer. *Br. J. Cancer.* 1998. Vol. 77(4). P. 643–649. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.103>
143. Xing J., Spitz M. R., Lu C., Zhao H., Yang H., Wang W. et al. Deficient G2-M and S checkpoints are associated with increased lung cancer risk: a case-control analysis. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2007;16(7):1517–22. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0111>
144. Hill J. W., Tansavatdi K., Lockett K. L., Allen G. O., Takita C., Pollack A., Hu J. J. Validation of the cell cycle G(2) delay assay in assessing ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Cancer. Manag. Res.* 2009. Vol. 1. P. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.2147/cmar.s4548>
145. Zheng Y. L., Kosti O., Loffredo C. A., Bowman E., Mechanic L. et al. Elevated lung cancer risk is associated with deficiencies in cell cycle checkpoints: genotype and phenotype analyses from a case-control study. *Int. J. Cancer.* 2010. Vol. 126(9). P. 2199–2210. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.24771>
146. Tell R., Edgren M. R., Sverrisdottir A., Castro J., Fornander T., Hansson L. O., Skog S., Lewensohn R. Radiation-induced cell cycle response in lymphocytes is not related to clinical side-effects in breast cancer patients. *Anticancer. Res.* 2003. Vol. 23(3C). P. 3077–3083.
147. Perez A., Grabenbauer G. G., Sprung C. N., Sauer R., Distel L. V. Potential for the G₂/M arrest assay to predict patient susceptibility to severe reactions following radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 2007. Vol. 183(2). P. 99–106.
148. Alsbeih G., Torres M., Al-Harbi N., Al-Buhairi M. Evidence that individual variations in TP53 and CDKN1A protein responsiveness are related to inherent radiation sensitivity. *Radiat. Res.* 2007;167(1):58–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1667/RR0669.1>
149. Zyla J., Kabacik S., O'Brien G., Wakil S., Al-Harbi N., Kaprio J., Badie C., Polanska J., Alsbeih G. Combining CDKN1A gene expression and genome-wide SNPs in a twin cohort to gain insight into the heritability of individual radiosensitivity. *Funct. Integr.* (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-005-1372-0>
140. Greve B., Dreffke K., Rickinger A., Koenemann S., Fritz E., Eckardt-Schupp F. et al. Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. *Apoptosis.* 2009;14:226–35. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0294-6>
141. Vogin G., Merlin J. L., Rousseau A., Peiffert D., Harlé A., Husson M. et al. Absence of correlation between radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis and sequelae in patients with prostate cancer accidentally overexposed to radiation. *Oncotarget.* 2018;9(66):32680–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26001>
142. Tell R., Heiden T., Granath F., Borg AL, Skog S, Lewensohn R. Comparison between radiation-induced cell cycle delay in lymphocytes and radiotherapy response in head and neck cancer. *Br. J. Cancer.* 1998;77(4):643–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.103>
143. Xing J, Spitz MR, Lu C, Zhao H, Yang H, Wang W et al. Deficient G2-M and S checkpoints are associated with increased lung cancer risk: a case-control analysis. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2007;16(7):1517–22. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0111>
144. Hill JW, Tansavatdi K, Lockett KL, Allen GO, Takita C, Pollack A, Hu JJ. Validation of the cell cycle G(2) delay assay in assessing ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Cancer. Manag. Res.* 2009;1:39–48. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2147/cmar.s4548>
145. Zheng YL, Kosti O, Loffredo CA, Bowman E, Mechanic L et al. Elevated lung cancer risk is associated with deficiencies in cell cycle checkpoints: genotype and phenotype analyses from a case-control study. *Int. J. Cancer.* 2010;126(9):2199–210. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.24771>
146. Tell R, Edgren MR, Sverrisdottir A, Castro J, Fornander T, Hansson LO, Skog S, Lewensohn R. Radiation-induced cell cycle response in lymphocytes is not related to clinical side-effects in breast cancer patients. *Anticancer. Res.* 2003;23(3C):3077–83. (In English).
147. Perez A, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R, Distel LV. Potential for the G₂/M arrest assay to predict patient susceptibility to severe reactions following radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 2007;183(2):99–106. (In English).
148. Alsbeih G, Torres M, Al-Harbi N, Al-Buhairi M. Evidence that individual variations in TP53 and CDKN1A protein responsiveness are related to inherent radiation sensitivity. *Radiat. Res.* 2007;167(1):58–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1667/RR0669.1>
149. Zyla J, Kabacik S, O'Brien G, Wakil S, Al-Harbi N, Kaprio J, Badie C, Polanska J, Alsbeih G. Combining CDKN1A gene expression and genome-wide SNPs in a twin cohort to gain insight into the heritability of individual radiosensitivity. *Funct. Integr.*

149. Zyla J., Kabacik S., O'Brien G., Wakil S., Al-Harbi N., Kaprio J., Badie C., Polanska J., Alsbeih G. Combining CDKN1A gene expression and genome-wide SNPs in a twin cohort to gain insight into the heritability of individual radiosensitivity. *Funct. Integr. Genomics*. 2019. Vol. 19(4). P. 575–585. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00658-3>
150. Badie C., Dziwura S., Raffy C., Tsigani T., Alsbeih G., Moody J. et al. Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br. J. Cancer*. 2008. Vol. 98(11). P. 1845–1851. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604381>
150. Badie C., Dziwura S., Raffy C., Tsigani T., Alsbeih G., Moody J. et al. Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br. J. Cancer*. 2008;98(11):1845–51. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604381>

Перспективи подальших досліджень

У найближчій перспективі *ex vivo* тести на клітинну виживаність, ймовірно, будуть використовуватися у межах мультипараметричного підходу, де виступатимуть як не провідний, а додатковий, допоміжний дискримінант у класифікації індивідуальної радіочутливості. Можливо, такі дослідження будуть включати як основний метод оцінку відповіді на дію радіації на рівні систем репарації ДНК, хромосомного апарату чи вироблення певних біохімічних продуктів. Аналіз цього питання стане темою нашого наступного аналітичного огляду.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Інформація про фінансування

Робота фінансується видатками Державного бюджету України.

Prospects for further research

In the near future, *ex vivo* cell survival assays probably will be used within a multiparametric approach, where they will act not as leading but as additional, secondary discriminants in the classification of individual radiosensitivity. It is possible that such studies will include, as a primary method, the assessment of the response to radiation in the form of DNA repair, chromosomal damage or the production of certain biochemical markers. The analysis of this question is the topic of our next analytical review.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Funding information

Financed by the state budget of Ukraine.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Вінніков Володимир Анатолійович – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: imr.nauka@ukr.net

тел.: +38 (057) 725-50-13.

Внесок автора: написання та оформлення статті.

Рубльова Тетяна Валеріївна – кандидат біологічних наук, вчений секретар Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: imr_ss@ukr.net

тел.: +38 (057) 725-50-14.

Внесок автора: написання та оформлення статті.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Vinnikov Volodymyr Anatoliyovych – Candidate of Biological Science, Senior Researcher, State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; 82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;

e-mail: imr.nauka@ukr.net

tel.: +38 (057) 725-50-13.

Author's contribution: made an equal contribution to the writing and preparing this review article.

Runlyova Tatiana Valerievna – Candidate of Biological Science, Scientific Secretary, State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; 82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;

e-mail: imr_ss@ukr.net

tel.: +38 (057) 725-50-14.

Author's contribution: made an equal contribution to the writing and preparing this review article.