

Н.О. Мазник,  
В.А. Вінніков,  
О.А. Міхановський,  
О.М. Сухіна,  
А.В. Щегольков,  
В.О. Тепла,  
О.Е. Ірха,  
В.С. Мазник,  
В.О. Павленко,  
Л.Д. Скрипник

## Динаміка in vitro цитогенетичних ушкоджень у лімфоцитах крові хворих на рак тіла матки після радіотерапії

Інститут медичної радіології  
ім. С.П. Григор'єва  
АМН України,  
м. Харків

In vitro dynamics of cytogenetic damage,  
in peripheral blood lymphocytes of patients with  
uterine cancer after radiation therapy

**Цель работы:** Изучить динамику in vitro цитогенетических эффектов, индуцированных терапевтическим облучением в лимфоцитах крови больных раком тела матки (РТМ).

**Материалы и методы:** Классический цитогенетический анализ 50-, 76- и 100-часовых культур лимфоцитов периферической крови 20 больных РТМ I–II стадий до и после дистанционной или сочетанной лучевой терапии (ЛТ); оценка репликативного индекса по соотношению числа разных митозов, выявляемых в препаратах с FPG-окрашиванием.

**Результаты:** При увеличении сроков культивирования лимфоцитов пациенток после ЛТ от 50 до 100 часов наблюдалась элиминация 83 % радиационно-индуцированных aberrаций хромосомного типа, в том числе 92 % дицентриков и колец с фрагментами, но в 76- и 100-часовых культурах сохранялось достоверное превышение спонтанного уровня по обоим показателям. Темпы исчезновения aberrантных клеток напрямую зависели от числа хромосомных повреждений в клетке, однако элиминация наиболее отягощенных aberrациями клеток ( $c \geq 7$  перестройками) замедлялась в интервале 76–100 ч. культивирования, что приводило к стабилизации процента клеток с высоким уровнем пораженности хромосомного аппарата. Репликативный индекс лимфоцитов у больных после облучения достоверно снижался в 50-часовых культурах и восстанавливался в 76- и 100-часовых культурах, однако при любом сроке культивирования пропорция клеток 2-го митоза оказалась меньшей в культурах лимфоцитов больных после лучевой терапии, чем до лечения.

**Выводы:** Динамика in vitro радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в лимфоцитах пациенток отражает сложную комбинацию процессов, происходящих в неравномерно облученной популяции делящихся клеток: элиминацию и репликацию aberrаций в дочерних клетках, индукцию и снятие радиационной задержки митоза в клетках, накапливающих дозу от нескольких сеансов терапевтического облучения. Использование такой тест-системы, как долгосрочная культура лимфоцитов, позволит в перспективе проводить дифференциальное моделирование действия этих факторов в лимфоцитопроцентном пуле человека после ЛТ.

**Ключевые слова:** aberrации хромосом, репликативный индекс, лимфоциты, долгосрочное культивирование, лучевая терапия, рак тела матки.

**Objective:** To investigate an in vitro dynamics of cytogenetic effects, induced by therapeutic irradiation in blood lymphocytes of patients with uterine cancer.

**Material and Methods:** Conventional cytogenetic analysis was carried out in 50-, 76- and 100-hrs cultures of peripheral blood lymphocytes sampled from 20 patients with uterine cancer (stages I-II) before and after external beam or combined radiation therapy. The replicative index was estimated from the ratio of different mitosis in FPG-stained preparations.

**Results:** The enlarging of lymphocyte culture time from 50 to 100 hours led to elimination of 83 % chromosome type aberrations, including 92 % dicentrics and centric rings accompanied with fragments, which were induced in patients' lymphocytes by therapeutic irradiation. However, in 76- and 100-hrs cultures both indices sufficiently exceeded the respective spontaneous levels. The aberrant cell disappearance rate was strictly depended on the number of chromosome rearrangements in cell, but for the most damaged cells (contained  $\geq 7$  aberrations) the elimination slowed between 76 and 100 hours of cultivation. This caused the stabilization of percentage of highly damaged metaphases within aberrant cell fraction. The lymphocyte replicative index in patients after irradiation was statistically decreased in 50-h cultures and restored in 76- and 100-h cultures. At any culture time a proportion of the 2-nd mitosis cells was lower in lymphocyte cultures from patients after radiation therapy, than that of before irradiation.

**Conclusion:** The in vitro dynamics of radiation-induced chromosome aberrations in patients' lymphocytes reflects a complex combination of processes, which take place in non-uniformly irradiated population of dividing cells and include an elimination and replication of aberrations transmitted to daughter cells, an induction and releasing of the radiation-induced mitotic delay in cells accumulated several therapeutic dose fractions. The perspective application of long-term lymphocyte culture as a test-system will allow to carry out the differential modeling these factors activity in human lymphocyte-producing pool after radiation therapy.

**Key words:** chromosome aberrations, replicative index, lymphocytes, long-term cultivation, radiation therapy, uterine cancer.

Серед актуальних завдань сучасної радіобіології провідне місце посідають розробка і вдосконалення радіобіологічних основ променевої терапії (ПТ) [1]. Одним з напрямків

досліджень у цій галузі є вивчення закономірностей реалізації і перебігу променевого ураження геному в клітинах нормальних тканин, що зазнають радіаційного впливу в реальних умо-

вах терапевтичного опромінювання. Первинні ушкодження ДНК та кінцеві продукти їхнього процесингу — структурні перебудови хромосом і геномні порушення — виступають головною причиною радіаційно-індукованої інтерфазної чи мітотичної загибелі клітин [2], наслідком чого є розвиток променевих реакцій, у тому числі з боку системи гемо- та лімфопоезу.

Відомо, що одним з механізмів компенсації лейкопенії є репопуляція кісткового мозку зрілими периферичними лімфоцитами [3, 4], а в механізмі підтримки «імунної пам'яті» присутні такі елементи, як активна проліферація окремих лімфоцитарних клонів і взаємна конвертація певних ізоформ Т-лімфоцитів, що супроводжується мітотичним поділом [5]. Отже, довготермінова культура лімфоцитів крові людини являє найадекватнішу модель для вивчення процесів, що відбуваються у лімфоцит-продуцентному пулі організму пацієнток після ПТ. Така тест-система дозволяє визначити частку аберацій хромосом у послідовних клітинних генераціях, оцінювати ефекти трансмісії та елімінації хромосомних перебудов у контексті змін інших біологічних параметрів (наприклад, проліферативної активності) опроміненої клітинної популяції, що зумовлює фундаментальну і прикладну цінність дослідження динаміки цитогенетичних ушкоджень *in vitro*.

В роботах різних авторів і в наших дослідженнях, було показано, що радіаційний вплив у терапевтичних дозах викликає в лімфоцитах крові людини значне зростання частоти аберацій хромосомного типу і появу клітин із широким спектром ушкодженості хромосомного апарату [6–11]. Проте, незважаючи на якісну ідентичність механізмів радіаційної індукції цитогенетичних ефектів при опроміненні лімфоцитів *in vivo* та *in vitro* й експериментальну з'ясованість загальних закономірностей перебігу хромосомних ушкоджень у послідовних мітозах [12–21], побудова теоретичної картини динаміки частоти абераційних клітин й окремих видів аберацій у клітинних генераціях після терапевтичного радіаційного впливу уявляється неможливою. Причина полягає в тому, що в умовах ПТ домінує локальний характер опромінення, тоді як переважна більшість експериментальних досліджень трансмісії абе-

рацій *in vitro* була здійснена на моделі загального рівномірного радіаційного впливу, а відомі нам винятки [14, 20] представляли симуляцію опромінення значної фракції клітин (50–90%), що не відповідає реальним обсягам експонованої зони тіла пацієнтів.

Таким чином, єдиним шляхом вивчення закономірностей персистенції цитогенетичних ефектів, викликаних терапевтичним радіаційним впливом *in vivo*, є аналіз цитогенетичних показників у довготермінових культурах лімфоцитів, отриманих безпосередньо від експонованих індивідів. Незважаючи на очевидні підстави для інтенсивних досліджень у даному напрямку, в досяжній літературі відсутні приклади вивчення перебігу хромосомних ушкоджень *in vitro* в лімфоцитах людини після терапевтичного опромінювання.

У представленій роботі було вперше досліджено динаміку *in vitro* цитогенетичних ефектів, індукованих локальним фракціонованим терапевтичним опромінюванням у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак тіла матки (РТМ). Дослідження було побудовано на аналізі змін найінформативніших показників, які відбивають ефекти радіаційного впливу на хромосомному і субклітинному рівнях, — частоти аберацій хромосомного типу, частоти дицентриків і кільцевих хромосом, параметрів розподілу аберацій по клітинах та реплікативного індексу, оцінюваного за співвідношенням кількості клітин різних мітозів у 50-, 76- і 100-годинній культурі лімфоцитів.

## Методика дослідження

Матеріалом для дослідження стали лімфоцити периферичної крові 20 хворих на РТМ I–II стадій. В усіх хворих діагноз був верифікований морфологічно. Вік пацієнток становив 47–73 р. (у половини осіб 50–60 р.); середній вік у групі дорівнював 58 років. Цитогенетичне обстеження пацієнток проводили до початку та після завершення курсу променевого лікування.

Серед обстежених 13 особам з 14-ї доби після операції проводили курс дистанційної променевої терапії на апараті РОКУС-АМ шляхом класичного дрібного фракціонування (доза за один сеанс 2 Гр), у статичному режимі з двох протилежних передньо-задніх ланок при розмірі ділянок 14 × 16 см або 16 × 18 см, залежно від конституції пацієнток, із досягненням сумарної осередкової дози (СОД) на точки А і В 40–45 Гр. Іншим 7 хворим провели променеве лікування методом поєднаної ПТ. При цьому дистанційну терапію проводили за вищезазначеною стандартною методикою із досягненням СОД 40–45 Гр. Підключення внутріпорожнинної компоненти відбувалося після досягнення СОД 30 Гр від ди-

станційного опромінювання. Внутріпорожнинну ПТ проводили на шланговому гамма-терапевтичному апараті АГАТ-В; осередкова доза за один сеанс на слизову піхви складала 3,5 Гр, СОД на слизову піхви від даної методу по закінченні курсу становила 21 Гр. Внутріпорожнинне опромінювання проводили тричі на тиждень, із заповненням добових інтервалів сеансами дистанційного опромінювання.

Культивування лімфоцитів периферичної крові проводили за стандартною методикою [22] у суміші сироватки RPMI 1640 (Sigma) і сироватки великої рогатої худоби (4:1), в присутності бромдезоксиридину (Sigma) у концентрації 0,5 мкг/мл та фітогемагглютиніну, концентрація якого визначалася фірмою-виробником (Gibco, Serva). Культури витримували в термостаті при 37,5 °С протягом 50, 76 і 100 годин; за 4 години до закінчення культивування вносили розчин колхіцину (0,1 мкг/мл). Клітини фіксували в суміші метанолу або абсолютного етанолу та крижаної оцтової кислоти (3 : 1). Суспензію клітин наносили на предметне скло і висушували на повітрі.

Класичний хромосомний аналіз проводили на препаратах, забарвлених за Гімза. Для оцінки співвідношення кількості послідовних мітозів у культурі частину препаратів забарвлювали із використанням флюоресцентної-плюс-Гімза (FPG) техніки [22]. Препарати, витримані у темряві протягом 2–14 діб, інкубували у розчині барвника Hoechst 33258 (Sigma) протягом 25 хв, після чого на них наносили 2–4 краплі того ж розчину Hoechst 33258, накривали покривним склом і витримували 40–45 хв під ультрафіолетовою лампою. Після цього препарати промивали водою, висушували на повітрі і забарвлювали за Гімза.

Аналіз препаратів проводили під світловими мікроскопами Біолам-1 та МБІ-6 із масляною імерсією. Для визначення рівня хромосомних перебудов враховували весь спектр аберацій хромосомного типу, які розпізнавалися у нормоплоїдних клітинах при груповому каріотипуванні: дицентричні, поліцентричні та кільцеві хромосоми із супутніми фрагментами, хромосомні обміни без супутніх фрагментів, атипів моноцентрики (транслокації та делетовані хромосоми), вільні хромосомні фрагменти. Ідентифікацію номера мітозу проводили за характером забарвлення хромосом у метафазі. В індивідуальних дослідженнях аналізували від 50 до 750 метафаз. Разом для вивчення аберацій хромосом було проаналізовано 20550 метафаз, для визначення реплікативного індексу — 16227.

Результати індивідуальних досліджень об'єднували залежно від етапу лікування (до чи після ПТ) і тривалості культивування лімфоцитів (50, 76 чи 100 годин). При статистичній обробці на кожній точці визначали середні рівні структурних перебудов хромосом на 100 клітин; стандартні похибки середніх обчислювали,

виходячи з дисперсії поклітинного розподілу аберацій. Відповідність параметрів поклітинного розподілу аберацій хромосом статистиці Пуассона визначали за відношенням дисперсії до середньої частоти та за  $\chi^2$ -тестом Папворта [23]. Для порівняння частот цитогенетичних ушкоджень на різних точках використовували  $t$  критерій Стьюдента для незв'язаних явищ, а для зіставлення дисперсій поклітинних розподілів аберацій —  $F$ -критерій Фішера. Реплікативний індекс лімфоцитів у культурі обчислювали за формулою

$$RI = (M_1 + 2M_2 + 3M_{3(+)}) / (M_1 + M_2 + M_{3(+)}) \quad (1)$$

де  $M_1$ ,  $M_2$  і  $M_{3(+)}$  — кількість клітин, відповідно, першого, другого і третього та подальших послідовних мітозів *in vitro* [19].

## Результати та їх обговорення

Частоту аберацій хромосомного типу і головних радіаційно-специфічних маркерів опромінювання — дицентриків і кільць із супутніми фрагментами — у 50-, 76- та 100-годинних культурах лімфоцитів хворих до і після променевого лікування представлено у табл. 1.

Подібно до результатів наших попередніх спостережень [10, 11], вихідний рівень хромосомних ушкоджень при стандартному терміні культивування лімфоцитів (50 год.) у хворих до ПТ виявився підвищеним відносно значень, які наводяться у літературі для пересічного населення і присутні у вибірці контрольних донорів, обстежених у нашій лабораторії: 0,5–1,0 на 100 клітин для частоти аберацій хромосомного типу, 0,05–0,2 на 100 клітин для частоти дицентриків і кільць [24, 25]. Наявність підвищеної частоти аберацій і збільшена пропорція хромосомних обмінів у лімфоцитах крові пацієнтів з онкопатологією до початку протипухлинного лікування відзначалася у публікаціях різних авторів [26, 27]. Імовірно, що така картина є індикатором загальної вихідної неста-

Таблиця 1. Частота аберацій хромосом у лімфоцитах крові онкологічних хворих до і після променевого лікування при різних термінах культивування клітин  
Table 1. Frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of cancer patients before and after radiation therapy at various terms of cell culture

Термін культивування, год.	До променевого лікування			Після променевого лікування		
	проаналізовано клітин	частота на 100 клітин (Y ± SE)		проаналізовано клітин	частота на 100 клітин (Y ± SE)	
		A Xc	Диц + Цк фр		A Xc	Диц + Цк фр
50	3319	1,60 ± 0,24	0,33 ± 0,10	1860	56,83 ± 3,03	33,17 ± 2,09
76	4250	1,41 ± 0,28	0,19 ± 0,07	3332	21,28 ± 1,27	8,16 ± 0,74
100	4900	1,92 ± 0,23	0,16 ± 0,06	2890	11,56 ± 0,98	2,91 ± 0,48

Примітка. Y ± SE — середня частота цитогенетичних ушкоджень та її стандартна похибка, обчислена з дисперсії розподілу цитогенетичних ушкоджень по клітинах; A Xc — аберації хромосомного типу; Диц + Цк фр — дицентрики і центричні кільця із супутніми фрагментами.

більності геному соматичних клітин в осіб даної категорії, отже, врахування первинної частоти аберацій та її змін в умовах довготермінового культивування клітин *in vitro* було обов'язковим у контексті даного дослідження.

При збільшенні тривалості культивування лімфоцитів пацієток до ПТ частота дицентриків і кілець із супутніми фрагментами проявила певний елімінаційний тренд, але сумарний рівень перебудов хромосомного типу залишався стабільним від 50-ї до 76-ї год., а при 100 год. культивування дещо зростав відносно вихідного значення (вірогідних відмінностей між різними термінами культивування не визначали за обома показниками).

Розподіл аберацій хромосомного типу по клітинах на точці 50 год. у цілому вкладався в межі Пуассонівського ( $\sigma^2/Y = 1,19$ ); метафази з декількома абераціями були представлені 2 клітинами з двома вільними фрагментами, 1 клітиною з дицентриком із фрагментом і вільним фрагментом та 1 клітиною із поєднанням дицентрика з фрагментом і двох вільних фрагментів. На терміні культивування 76 год. у спектрі абераційних клітин спостерігали 1 випадок поєднання дицентрика з фрагментом і вільного фрагмента, 1 випадок поєднання атипичного моноцентрика і вільного фрагмента, 2 випадки поєднання двох вільних фрагментів та 1 метафазу з наявністю 9 вільних хромосомних фрагментів; присутність якої викликала істотну наддисперсність поклітинного розподілу аберацій хромосомного типу на даній точці ( $\sigma^2/Y = 2,36$ ). У 100-годинних культурах було знайдено 3 клітини з двома фрагментами і 2 — з чотирма фрагментами; ступінь наддисперсності поклітинного розподілу аберацій відчутно знижувався ( $\sigma^2/Y = 1,35$ ).

При аналізі спектра аберацій з'ясувалося, що загальна стабільність сумарного рівня хромосомних перебудов у лімфоцитах пацієток до ПТ забезпечувалася переважно за рахунок вільних ацентричних фрагментів, пропорція яких у 50-, 76- і 100-годинних культурах дорівнювала відповідно 68, 77 і 73 % серед усіх аберацій хромосомного типу. Неелімінаційну динаміку рівня хромосомних фрагментів *in vitro* можна пояснити компенсацією їх втрати при мітотичному розподілі за рахунок виникнення

de novo внаслідок спонтанного мутагенезу і реплікативним подвоєнням тих ацентриків, які передавалися у дочірні клітини і проходили цикл реплікації ДНК, що зумовлювало появу клітин із двома і більше візуально ідентичними фрагментами. У 76- і 100-годинних культурах лімфоцитів хворих до променевого лікування саме клітини із реплікованими фрагментами виявилися головним джерелом наддисперсності поклітинного розподілу аберацій хромосомного типу, оскільки становили 80 % випадків поєднання кількох аберацій хромосомного типу в одній клітині (зокрема, у метафазі із 9 фрагментами, виявлених на точці 76 год., 8 ацентриків були візуально ідентичними). В цілому, незважаючи на відносно невисоку інтенсивність, рівень спонтанного хромосомного мутагенезу *in vitro* в лімфоцитах онкохворих виявився достатнім, щоб зумовити методичну некоректність нехтування цим процесом при дослідженні динаміки у послідовних клітинних генераціях *in vitro* тих ефектів, які були індуковані в лімфоцитах пацієток дією терапевтичного опромінювання.

У хворих після ПТ в 50-годинних культурах лімфоцитів відбувалося підвищення сумарного рівня аберацій хромосомного типу відносно значення до лікування у 35 разів ( $t = 24,11$ ;  $p < 0,001$ ), а частоти дицентриків і кілець із супутніми фрагментами — у 100 разів ( $t = 20,92$ ;  $p < 0,001$ ). Кількісна розмірність цього ефекту в поточному спостереженні збігається з результатами наших попередніх робіт і даними інших авторів щодо накопичення аберацій хромосом у пацієток з онкогінекологічними захворюваннями при лікуванні методами дистанційної чи поєднаної ПТ [6, 9–11].

Зростання частоти хромосомних ушкоджень у 50-годинній культурі лімфоцитів хворих після терапевтичного опромінювання супроводжувалося появою клітин із широким спектром кількості хромосомних перебудов — від 1 до 10 дицентриків і кілець та від 1 до 14 аберацій хромосомного типу, при значному відхиленні параметрів поклітинного розподілу аберацій від статистики Пуассона в бік наддисперсності ( $\sigma^2/Y > 1,00$ ), що підтверджувалося значеннями *u*-теста Папворта, які перевищували критичне значення  $u = 1,96$  (табл. 2). Зважаю-

чи на відомі механізми реалізації цитогенетичних ефектів у лімфоцитах крові людини при дії йонізуючих випромінень із низьким лінійним передаванням енергії [23], виникнення наддисперсного розподілу аберацій по клітинах у хворих після ПТ є закономірним наслідком негомogeneous променевого навантаження в організмі пацієнтів, через що вся популяція лімфоцитів набуває стану суперпозиції двох фракцій — неопроміненої та опроміненої. На наш погляд, при розгляді даного феномена в реальних умовах ПТ слід враховувати не тільки факт локальності опромінювання, як це робили автори [7–9], але й чинник циркуляції лімфоцитів між експонованою та неекспонованою зонами тіла, внаслідок якої фракція опромінених клітин сама по собі є комбінацією кількох субфракцій, опромінених у певних дозах, кратних кількості сеансів терапевтичного опромінювання.

На терміні культивування лімфоцитів 76 годин рівень аберацій хромосомного типу більше ніж удвічі знижувався відносно точки 50 год. ( $t = 12,56$ ;  $p < 0,001$ ), а рівень дицентриків і кілець із супутніми фрагментами падав у 4 рази ( $t = 13,53$ ;  $p < 0,001$ ). У 100-годинних культурах лімфоцитів частота дицентриків і кілець ставала зниженою в 11 разів ( $t = 17,00$ ;  $p < 0,001$ ), а частота аберацій хромосомного типу — в 5 ( $t = 16,64$ ;  $p < 0,001$ ), порівняно із терміном 50 год. Після відрахування спонтанного рівня цитогенетичних ушкоджень на відповідних точках часу культивування визна-

чили, що зниження індукованої частоти аберацій хромосомного типу відбувалося на 64 % від 50 до 76 год. і на 51 % від 76 до 100 годин культивування. Елімінаційна спрямованість змін була ще більш визначеною для дицентриків і кілець із супутніми фрагментами, надспонтанний рівень яких знижувався в зазначених інтервалах, відповідно на 76 і 65 %.

На якісному рівні така картина в цілому добре відповідає результатам експериментальних досліджень динаміки радіаційно-індукованих хромосомних перебудов у довготермінових культурах при опромінюванні лімфоцитів людини *in vitro* [12–21]. Поступове зниження первинно-індукованої надспонтанної частоти дицентриків і кілець із супутніми фрагментами у послідовних клітинних генераціях є відображенням обмеженої здатності даного виду аберацій до трансмісії в дочірні клітини в цілісному вигляді. Як відомо, механізм елімінації даного виду аберацій полягає у фізичному блокуванні каріокінезу при розташуванні дицентриків уздовж веретена поділу. У модельних експериментах було встановлено, що ймовірність «нормальної» орієнтації дицентрика, яка забезпечує його вільну трансмісію крізь мітоз, становить 50 %, і при цьому супутній фрагмент передається тільки до однієї з клітин-нащадків, а друга успадковує неповний хромосомний обмін [12, 13]. Крім того, частина ацентричних фрагментів не потрапляє до жодного з дочірніх ядер, а втрачається взагалі через викид під час мітозу у вигляді мікроядра із наступною резорб-

Таблиця 2. Розподіл дицентриків і центричних кілець із супутніми фрагментами та аберацій хромосомного типу в лімфоцитах крові онкологічних хворих після променевого лікування при різних термінах культивування клітин

Table 2. Distribution of dicentrics and centric rings with accompanying fragments as well as chromosome aberration in the lymphocytes of cancer patients after radiation therapy at various terms of cell culture

Термін культивування, год.	Показник	Кількість клітин із даною кількістю аберацій														Yab / Cab $\pm$ SE	$\sigma^2 / Y$	u	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14
50	Диц + Цк	1529	176	91	29	18	11	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1,86 $\pm$ 0,07	2,448	44,18
	A Xc	1375	231	120	55	40	15	10	5	2	2	2	1	1	0	1	2,18 $\pm$ 0,08	3,005	61,16
76	Диц + Цк	3161	117	26	18	6	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1,59 $\pm$ 0,08	2,264	51,68
	A Xc	2919	266	84	23	18	10	4	4	4	0	0	0	0	0	0	1,72 $\pm$ 0,07	2,528	62,40
100	Диц + Цк	2835	37	14	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,53 $\pm$ 0,15	2,257	48,06
	A Xc	2674	158	34	10	3	5	3	1	2	0	0	0	0	0	0	1,55 $\pm$ 0,08	2,405	53,48

Примітка. Диц + Цк — дицентрики і кільця з фрагментами; Yab / Cab  $\pm$  SE — вихід аберацій на аберантну клітину та його стандартна похибка;  $\sigma^2 / Y$  — відношення дисперсії розподілу до середнього рівня аберацій; u — значення тесту Папворта.

цією в інтерфазі. Шанс фрагмента потрапити до однієї з дочірніх клітин, за різними оцінками, дорівнює від 57 до 82 % [12, 13, 15–17], отже теоретична ймовірність передачі кожного дицентрика із супутнім фрагментом у наступний мітотичний цикл не перевищує 41 % [21]. Більш швидке зниження частоти нестабільних хромосомних обмінів із супутніми фрагментами в культурах лімфоцитів хворих після ПТ між точками часу 50 і 76 год., ніж в інтервалі 76–100 год. культивування, на нашу думку, є наслідком активної елімінації даного виду аберацій саме на початкових етапах проліферації аберантних клітин, на межі між першим і другим мітотичними циклами в культурі.

Незважаючи на достатньо інтенсивне зниження частоти дицентриків і кілець із супутніми фрагментами *in vitro*, їх рівень у довготермінових культурах істотно перевищував значення у хворих до опромінювання: на точці 76 год. — у 43, на точці 100 год. — у 18 разів (відповідно,  $t = 12,08$  і  $11,90$ ;  $p < 0,001$ ). Частково це пояснюється сатураційним ефектом, який виникає при трансмісії аберацій після радіаційного впливу у високих дозах [15–17, 20, 21] і має очікувано проявлятися в умовах нерівномірного опромінювання, при нерандомізованому розподілі аберацій по клітинах. У вихідному спектрі аберантних клітин у хворих після ПТ значна пропорція метафаз містила водночас кілька дицентриків і кілець із супутніми фрагментами чи поєднання хромосомних обмінів із вільними фрагментами (див. табл. 2). Під час поділу таких клітин, при незалежній мітотичній сегрегації обмінів та фрагментів, існувала висока ймовірність розходження супутніх фрагментів від різних обмінів чи супутніх і вільних фрагментів до різних дочірніх клітин, де ацентрики подвоювалися під час реплікації ДНК, унаслідок чого такі нащадки втрачувалися як клітини із «повними» хромосомними обмінами. Певна стабілізація частоти дицентриків із супутніми фрагментами при подовженому культивуванні лімфоцитів спостерігалася у роботі [20]: після ікс-опромінення у дозі 4 Гр *in vitro* в 72-годинних культурах даний показник дорівнював 72–85 %, а в 96-годинних — 72–80 % від вихідного значення у 48-годинній культурі; при симуляції

негомогенного (90 %) опромінювання такий ефект був ще більш вираженим: від 48 до 72 год. культивування рівень «повних» дицентриків зростав на 16 %, і тільки у 96-годинній культурі знижувався до 48 % від вихідного значення.

Навіть при наявності такого ефекту темпи зникнення дицентриків і кілець із супутніми фрагментами *in vitro* виявилися вищими, ніж для решти видів аберацій хромосомного типу: з терміном культивування 100 год. індукована частота повних нестабільних хромосомних обмінів становила 8 % від вихідної, а сукупний надспонтанний рівень усіх інших перебудов (вільних хромосомних фрагментів, атипових моноцентриків та дицентриків і кілець без фрагментів) досягав у фіналі 31 % від вихідного надспонтанного значення. Для кожного з цих видів аберацій достатня ефективність підтримки надспонтанного рівня у послідовних клітинних генераціях має власне пояснення. Дицентрики і кільця без фрагментів самі по собі є результатом трансмісії незбалансованих аберацій у дочірні клітини, отже їхній вихід може становити до 50 % усіх вдалих мітотичних сегрегацій вихідних нестабільних обмінів. У випадку ацентриків, як було зазначено вище, компенсація втрати при мітотичному розподілі забезпечується реплікативним подвоєнням тих фрагментів, які потрапляють у дочірні клітини. У випадку делетованих хромосом елімінація відбуватиметься, тільки якщо втрата фрагмента буде летальною для клітин-нащадків. У випадку транслокацій підлягає елімінації лише та частка перебудов, які виникли спільно із нестабільними обмінами та фрагментами в одній клітині, і процес їхнього зникнення асоційований із мітотичною загибеллю саме таких клітин [18–21].

При подовженні термінів культивування лімфоцитів хворих після ПТ до 76 і 100 год. скорочувався спектр аберантних клітин; максимальний рівень ушкодженості зменшувався до 7 дицентриків та кілець і 8 аберацій хромосомного типу в одній клітині, але за обома показниками зберігалася вірогідна наддисперсність розподілу клітинами ( $u > 1,96$ ). У межах фракції аберантних метафаз спостерігалася зростання пропорції клітин із однією аберацією від 48 % у 50-годинній культурі до

64 % у 76-годинній і 73 % у 100-годинній. В інтервалі термінів культивування 76–100 год. знижувався питомий внесок метафаз із 2–4 перебудовами (від 30 до 22 % від загальної кількості аберантних клітин), але пропорція метафаз із 5–8 аберациями залишалася незмінною (5 %). У спектрі клітин із дицентриками і кільцями відбувалося значне падіння внеску метафаз із двома і більше хромосомними обмінами: від 47 % на точці 50 год. до 32–33 % на точках 76 і 100 год., між якими знижувалася пропорція клітин із 3–4 хромосомними обмінами (від 14 до 3,5 %), але внесок більш обтяжених клітин при цьому зберігався константним.

Дисперсія розподілу абераций хромосомного типу по аберантних клітинах зменшувалася значніше між термінами 50 і 76 год. ( $F = 1,53 > F_{st} = 1,20$ ;  $p < 0,01$ ), ніж у інтервалі 76–100 год. ( $F = 1,47 > F_{st} = 1,35$ ;  $p < 0,05$ ). Дисперсія розподілу дицентриків і кільць клітинами із хромосомними обмінами вірогідно зменшувалася в інтервалі термінів культивування 50–76 год. ( $F = 1,49 > F_{st} = 1,35$ ;  $p < 0,01$ ) і далі не змінювалася до часу культивування 100 год. ( $F = 1,12 < F_{st} = 1,50$ ;  $p > 0,05$ ).

Узагальненим відображенням змін ступеня навантаженості аберантних клітин у послідовних клітинних генераціях стало зниження відносних цитогенетичних показників. Середній вихід абераций хромосомного типу на аберантну клітину значуще падав між термінами культивування 50 і 76 год. ( $t = 4,25$ ;  $p < 0,001$ ), а між точками 76 і 100 год. не мав вірогідних відмінностей ( $t = 1,51$ ;  $p > 0,05$ ). Так само середній вихід дицентриків і кільць на клітину із хромосомними обмінами значно знижувався від 50-ї до 76-ї години культивування ( $t = 2,39$ ;  $p < 0,05$ ) і залишався константним до 100-ї год.

Для порівняльної оцінки динаміки *in vitro* рівня аберантних клітин залежно від ступеня ураженості їхнього хромосомного апарату, надспонтанні частоти метафаз із різною кількістю абераций хромосомного типу, а також дицентриків і кільць у пацієнток після ПТ були нормовані на 100 % відносно значень, які спостерігали в 50-годинних культурах (рис 1).

Перебіг надспонтанної частоти клітин із аберациями хромосомного типу чітко відрізнявся між категоріями клітин з однією аберацией та двома і більше хромосомними перебудовами. У першому випадку хід елімінаційного процесу був фактично лінійним, і темпи зниження значно нижчими, ніж для частоти клітин із кількома аберациями, незважаючи на уповільнення елімінації останніх у інтервалі термінів культивування 76–100 год. В цілому швидкість зникнення клітин з аберациями хромосомного типу в клітинних генераціях *in vitro* мала позитивну залежність від числа хромосомних ушкоджень у клітині: у 100-годинних культурах значення частоти метафаз із однією перебудовою дорівнювало 35 %, із 2–3 аберациями — 16 %, із 4–6 — 10 % від вихідного, але для найбільш обтяжених хромосомними пошкодженнями клітин (із  $\geq 7$  аберациями) цей показник становив 14 %, що зумовлювалося найбільш значним зниженням темпів їх елімінації між точками 76 і 100 год. серед усіх категорій мультиаберантних клітин.

Виявилось, що значну частину клітин з однією аберацией представляли метафази тільки з однією транслокацією або делетованою хромосомою, чи тільки з одним незбалансованим хромосомним обміном без супутнього фрагмента. Низький темп зниження надспонтанного рівня атипичних моноцентриків у послідовних клітинних генераціях забезпечується їх вільним переходом у дочірні клітини при відсутності нестабільних обмінів у попереднику. Персистенція дицентриків і кільць без фрагментів у віддалених пострадіаційних мітозах, як відомо, може підтримуватися за механізмом ВВР («bridge — breakage — rejoining», «міст — розрив — воз'єднання»), який особливо ефективно діє у випадку наявності тільки одного нестабільного обміну у вихідній аберантній клітині [28].

Що стосується клітин із одним дицентриком чи кільцем із супутнім фрагментом, то при міотичній сегрегації фрагмент може успадковуватися дочірньою клітиною у вигляді мікроядра, хроматин якого не завжди підлягає реплікації синхронно із основним ядром, отже в наступному мітозі такий фрагмент не буде подвоєним, і клітина реєструватиметься як метафаза з од-



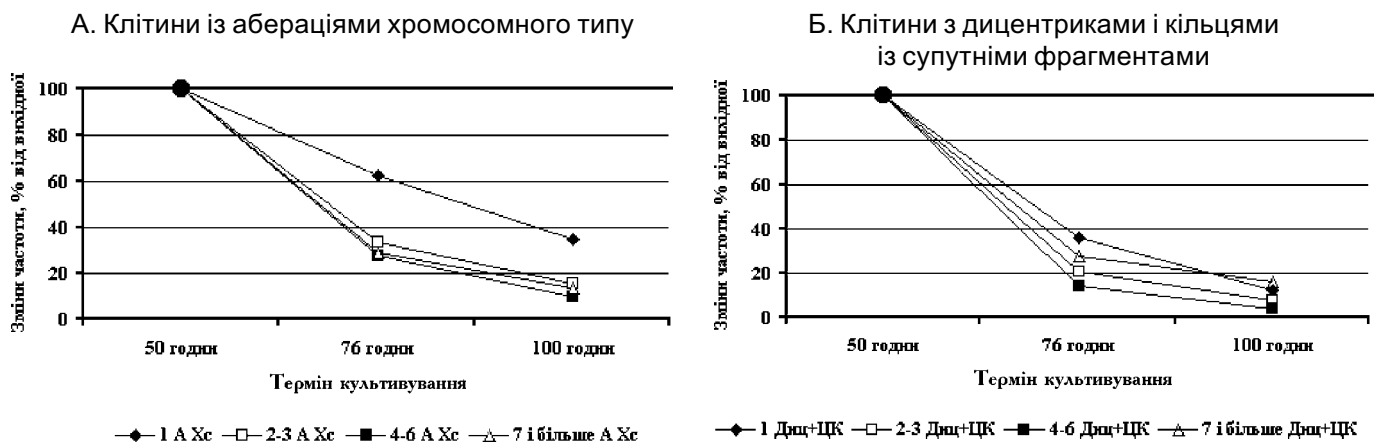


Рис. 1. Відносні зміни надспонтанної частоти клітин із різною кількістю хромосомних ушкоджень у довготермінових культурах лімфоцитів крові пацієнток після променевого лікування

Fig. 1. Relative changes of supraspontaneous frequency of cells with various number of chromosomal lesions in long-term cultures of lymphocytes after radiation therapy

нією аберацією — «повним» хромосомним обміном. Даний феномен відомий з експериментів [16, 21], де в клітинах другого пострадіаційного мітозу пропорція дицентриків із подвоєними фрагментами дорівнювала, відповідно, 74 і 10—37 % від усіх обмінів із супутніми фрагментами. У випадку клітин з одним вільним ацентриком може діяти аналогічний механізм (трансмсія без подвоєння), але крім того, на нашу думку, можлива додаткова індукція шляхом реплікативної трансформації хроматидних фрагментів, рівень яких слабо, але вірогідно зростає у хворих під час ПТ [10].

Зміни індукованої частоти клітин із дицентриками і кільцями, при будь-якій кількості хромосомних обмінів у клітині, характеризувалися зниженням швидкості елімінації в інтервалі термінів культивування 76—100 год., порівняно з інтервалом 50—76 год. Темпи зникнення клітин із дицентриками і кільцями чітко залежали від числа хромосомних обмінів у клітині в діапазоні значень від 1 до 4—6 дицентриків і кільць: при терміні культивування 100 год. надспонтанна частота клітин із 1 хромосомним обміном досягала 12, із 2—3 обмінами — 8, з 4—6 — 4 % від вихідної. Такий ефект є теоретично очікуваним, бо присутність у вихідній клітині кожного окремого обміну зменшує шанси нормального перебігу мітозу рівно вдвічі [13, 16, 17], а перехід супутнього ацентрика тільки до однієї з дочірніх клітин (навіть без урахування ймовірності його втрати) також результується у додаткове дворазове зниження ви-

хідної частоти дицентриків і кільць із супутніми фрагментами у кожному циклі подвоєння клітин [21].

Позитивна кореляція між темпом зниження частоти клітин із хромосомними обмінами та числом дицентриків і кільць у клітині порушувалася в разі метафаз із найбільшою кількістю обмінів. Зниження рівня метафаз із  $\geq 7$  дицентриками і кільцями в інтервалі термінів культивування 50—76 год. відбувалося повільніше, ніж при клітинах із 2—6 хромосомними обмінами, а в інтервалі 76—100 год. — навіть повільніше, ніж у випадку клітин із 1 хромосомним обміном; на точці 100 год. рівень метафаз із  $\geq 7$  дицентриками і кільцями дорівнював 16 % від значення у 50-годинній культурі.

Зважаючи на те, що наявність супутніх фрагментів при значній кількості хромосомних обмінів у клітині є чітким індикатором першого пострадіаційного мітозу в культурі, даний феномен, на нашу думку, можна пояснити поступовим зняттям радіаційно-індукованої затримки першого постпроменевого мітозу в лімфоцитах, які накопичили дозу від кількох сеансів терапевтичного опромінювання і мали високий ступінь ураженості хромосомного апарату. З експериментів *in vitro* відомо, що навіть при гострому рівномірному опроміненні тривалість мітотичної затримки для клітин із дицентриками більша, ніж для неаберантних, а клітини з кількома дицентриками підпадають під довшу затримку циклу, ніж клітини з одним



хромосомним обміном [14, 18, 29]. Отже, при наявності водночас кількох субфракцій лімфоцитів, кожна з яких накопичила дозу від різної кількості сеансів терапевтичного опромінювання, слід очікувати ще більш виражену і розтягнуту в часі затримку першого постпроменевого мітозу для клітин із високою кількістю хромосомних обмінів. Можливість виникнення такого ефекту вперше гіпотетично передбачено авторами експерименту [14], а в нашому дослідженні це було показано емпірично у вигляді уповільненої елімінації клітин із  $\geq 7$  хромосомними обмінами в інтервалі термінів культивування від 76 до 100 год., яка викликала стабілізацію внеску найбільш обтяжених абераціями метафаз у межах абераційної фракції клітин.

Те, що радіаційна затримка мітозу має місце в лімфоцитах крові пацієнток після терапевтичного опромінювання, підтвердилося результатами вивчення проліферативної активності клітин у культурі, яке проводили шляхом визначення у препаратах із FPG-зabarвленням пропорційних внесків метафаз першого, другого і подальших мітозів із обчисленням реплікативного індексу при різних термінах культивування (табл. 3, рис. 2). При терміні культивування лімфоцитів 50 год. переважна більшість метафаз була представлена клітинами M1, при цьому внесок метафаз M2 виявився меншим, а пропорція клітин першого мітозу — більшою після ПТ, ніж до лікування — відповідно 21 і 29 %. Внаслідок цього 50-годинні культури лімфоцитів пацієнток після лікування мали вірогідно знижений реплікативний індекс,

порівняно із вихідним значенням ( $t = 4,27$ ;  $\rho < 0,001$ ).

При терміні культивування лімфоцитів 76 год. у культурі починали кількісно переважати метафази M3(+), пропорція яких становила 58 % незалежно від етапу обстеження. Реплікативний індекс не мав відмінностей ( $t = 1,60$ ;  $\rho > 0,05$ ), проте певна різниця спостерігалася за внеском клітин M2 — 22 % у хворих до лікування і 18 % після ПТ.

У 100-годинних культурах лімфоцитів, як і на коротших термінах культивування, пропорція метафаз другого мітозу була нижчою після ПТ (5 %), ніж до лікування (9 %). Проте, у загальному розподілі домінували клітини M3(+), і за рахунок їхньої більшої частоти після ПТ (88 %), ніж до лікування (83 %), реплікативний індекс на даній точці вірогідно зростав у хворих після променевого лікування, порівняно із показником до опромінювання ( $t = 4,96$ ;  $\rho < 0,001$ ).

Така гіперкомпенсація реплікативного індексу може пояснюватися з двох позицій. По-перше, в умовах культивування *in vitro* можуть діяти ті ж самі молекулярно-біохемічні, сигнальні механізми, які забезпечують відновлення лімфопоезу (компенсацію лімфопенії) в умовах опромінювання *in vivo* і регулюються за принципом «зворотного зв'язку», тобто вмикаються при наявності надмірної інтерфазної та мітотичної загибелі клітин і вмикаються при відновленні кількості клітин у популяції. По-друге, в культурі лімфоцитів пацієнток після ПТ може працювати ефект прискорення проліферації клітин під дією кластогенних

Таблиця 3. Кількість клітин різних мітозів і значення реплікативного індексу при різних термінах культивування лімфоцитів крові онкохворих до і після променевого лікування  
Table 3. The number of mitoses and replication index at various terms of lymphocyte culture before and after radiation therapy

Термін культивування, год.	Група	Кількість клітин				Реплікативний індекс $\pm$ SE
		M1	M2	M3(+)	разом	
50	До лікування	1087	414	43	1544	1,324 $\pm$ 0,013
	Після лікування	1655	451	49	2155	1,255 $\pm$ 0,010
76	До лікування	607	672	1755	3034	2,378 $\pm$ 0,014
	Після лікування	875	678	2161	3714	2,346 $\pm$ 0,014
100	До лікування	272	274	2606	3152	2,740 $\pm$ 0,011
	Після лікування	175	135	2318	2628	2,815 $\pm$ 0,010

Примітка. M1 — клітини першого мітозу, M2 — клітини другого мітозу, M3(+) — клітини третього і подальших мітозів; SE — стандартна похибка значення реплікативного індексу.

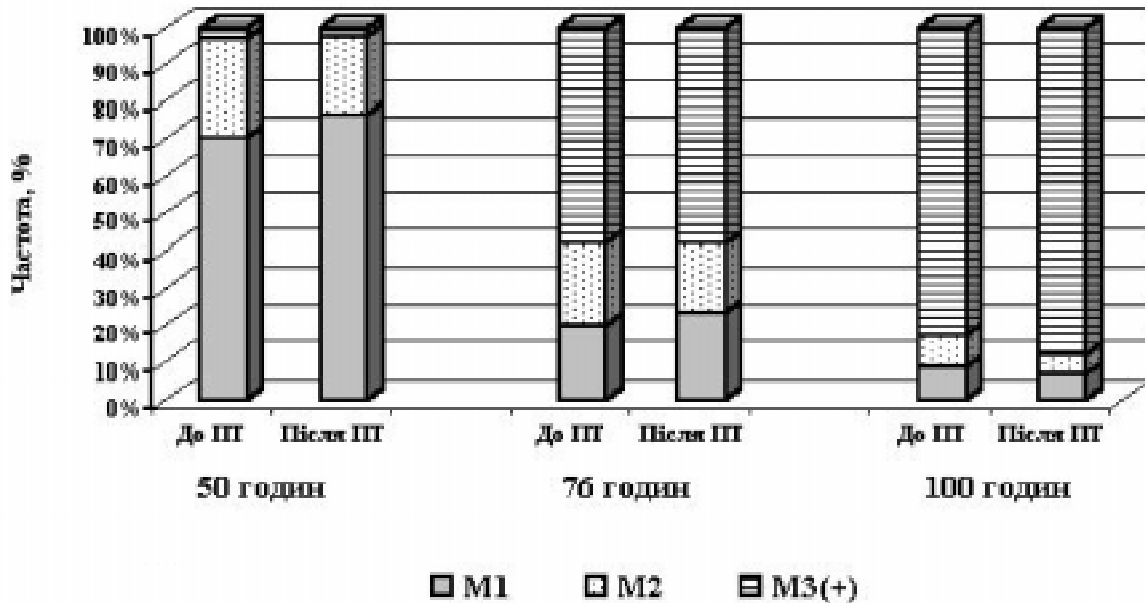


Рис. 2. Питомі внески клітин першого (M1), другого (M2) і третього та подальших (M3+) мітозів *in vitro* до сумарної кількості метафаз у культурах лімфоцитів крові пацієнток до і після ПТ

Fig.2. *In vitro* specific amount of cells of the first (M1), second (M2), third and further (M3+) mitoses up to total amount of metaphases in the lymphocyte cultures before and after RT

факторів, які утворюються в плазмі крові людини при опроміненні [30]. Цілком імовірно, що в умовах культивування клітин *in vitro* має місце сумісна дія обох механізмів, але при відомій здатності кластогенних факторів опроміненої плазми викликати прискорену проліферацію первинно-інтактних клітин, як ми вважаємо, саме цей процес має кількісну перевагу в індукції гіпервідбудови реплікативного індексу в умовах нерівномірного опромінювання, тим більше, що в 76- і 100-годинних культурах лімфоцитів пацієнток після ПТ зберігалася тенденція до зниженості частоти метафаз другого мітозу, порівняно зі значенням даного параметра до лікування, і цей ефект (тобто подовжена затримка мітозу), очевидно, виникав за рахунок опроміненої фракції клітин.

Таким чином, у картині динаміки цитогенетичних ушкоджень *in vitro* у довготермінових культурах лімфоцитів крові хворих після променевого лікування відіграють важливу роль не тільки елімінація аберацій та аберантних клітин унаслідок блокування мітозу або втрати хромосомного матеріалу, але й такі процеси, як реплікація фрагментних аберацій при їх трансмісії у дочірні клітини, дія кластогенних факторів опроміненої плазми крові, а також індукція і зняття радіаційної затримки мітозу в

лімфоцитах, які накопичили дозу від кількох сеансів терапевтичного опромінювання. Питання про диференційний вплив кожного з цих факторів, а також про ефективність реалізації зазначених радіобіологічних і цитогенетичних феноменів безпосередньо *in vivo* потребує подальшого вивчення.

## ВИСНОВКИ

1. У 50-годинних культурах лімфоцитів пацієнток після ПТ спостерігалася значне підвищення рівня аберацій хромосом відносно значень до лікування, що супроводжувалося значною наддисперсністю поклітинного розподілу аберацій відносно статистики Пуассона.

2. При подовженні термінів культивування лімфоцитів до 76 і 100 год. відбувалася поступова елімінація радіаційно-індукованих хромосомних перебудов, причому темпи зниження рівня дицентриків і кілець із супутніми фрагментами *in vitro* були вищими, ніж у випадку суми аберацій хромосомного типу, але вірогідне перевищення відповідних спонтанних значень у довготермінових культурах зберігалася за обома показниками.

3. Зміни спектра аберантних метафаз при збільшенні термінів культивування полягали в

поступовому зростанні пропорції клітин із однією перебудовою на фоні зменшення питомого внеску клітин із кількома аберациями. Темпи зникнення аберантних клітин у клітинних генераціях *in vitro* в цілому мали позитивну залежність від кількості хромосомних ушкоджень у клітині, але елімінація найбільш обтяжених аберациями клітин — із  $\geq 7$  дицентриками і кільцями та  $\geq 7$  перебудовами хромосомного типу — істотно уповільнювалася в інтервалі термінів культивування лімфоцитів 76–100 год., що призводило до стабілізації відносного внеску клітин із високим рівнем ураженості хромосомного апарату в межах аберантної фракції.

4. Проліферативна активність лімфоцитів крові пацієнток з онкопатологією, оцінювана за співвідношенням кількості метафаз першого, другого і подальших мітозів у 50-годинних культурах, була вірогідно зниженою після ПТ відносно значення до лікування. При продовженні термінів культивування клітин відбувалася відбудова реплікативного індексу, але пропорція метафаз другого мітозу *in vitro* в культурах лімфоцитів у пацієнток після ПТ була нижчою, ніж до лікування.

5. У цілому картина перебігу *in vitro* радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів в умовах тривалого культивування лімфоцитів крові хворих відбиває складність процесів, які можуть відбуватися у лімфоцитпродуцентному пулі людини після променевого лікування, що наголошує на необхідності подальших досліджень.

## Література

1. Steel G.G. // *Basic Clinical Radiobiology* / Ed. by Steel G. — London: Arnold-OUP, 1997. — P. 1–7.
2. Prosser J. S., Edwards A. A., Lloyd D. C. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1990. — Vol. 58, № 2. — P. 293–301.
3. Lloyd D. C., Edwards A. A., Moquet J. E., Guerrero-Carbajal Y. C. // *Appl. Radiat. Isot.* — 2000. — Vol. 52. — P. 1107–1112.
4. Bauchinger M. // *Stem Cells.* — 1995. — Vol. 13. — P. 182–190.
5. McLean A.R., Michie C.A. // *Immunol.* — 1995. — Vol. 92. — P. 3707–3711.
6. Brandan M. E., Perez-Pastenes M. A., Ostrosky-Wegman P. et al. // *Health Phys. Soc.* — 1994. — Vol. 67, № 4. — P. 326–329.
7. Fong L., Chen J., Ting L. et al. // *Radiat. Res.* — 1995. — Vol. 144. — P. 97–101.
8. Sreedevi B., Rao B.S., Nagaraj H., Pal N.K. // *Radiat. Protect. Dosim.* — 2001. — Vol. 94, № 4. — P. 317–322.
9. Venkatachalam P., Solomon F. D. P., Prabhu B. K. et al. // *Mutat. Res.* — 1999. — Vol. 429. — P. 1–12.
10. Мазник Н.О., Вінніков В.А., Міхановський О.А. та ін. // *УРЖ.* — 2002. — Т. X, вип. 1. — С. 32–36.
11. Vinnikov V.A., Mikhanovskiy A.A., Maznyk N.A. // *Exp. Oncol.* — 2003. — Vol. 25, № 4. — P. 279–284.
12. Sasaki M. S., Norman A. // *Nature.* — 1967. — Vol. 214. — P. 502–503.
13. Carrano A.V., Heddle J.A. // *J. Theor. Biol.* — 1973. — Vol. 38. — P. 289–304.
14. Lloyd D. C., Dolphin G. W., Purrott R. J., Tipper P. A. // *Mutat. Res.* — 1977. — Vol. 42. — P. 401–412.
15. Пяткин Е.К., Нугус В.Ю. // *Цитол.* — 1982. — Т. 24, № 11. — С. 1346–1351.
16. Яковенко К.Н., Сапачева В.А. // *Генетика.* — 1984. — Т. XX, №1. — С. 144–154.
17. Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H. // *Radiat. Environ. Biophys.* — 1986. — Vol. 25. — P. 253–260.
18. Boei J.J.W.A., Vermulen S., Natarajan A.T. // *Mutat. Res.* — 1996. — Vol. 349. — P. 127–135.
19. Hoffmann G. R., Sayer A. M., Joiner E. E. et al // *Environ. and Molec. Mutagen.* — 1999. — Vol. 33. — P. 94–110.
20. Guerrero-Carbajal Y.C., Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C. // *Radiat. Prot. Dos.* — 1998. — Vol. 76. — P. 159–168.
21. Pala F.S., Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C. // *Mutat. Res.* — 2001. — Vol. 474. — P. 139–146.
22. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. IAEA Techn. Report Series № 405.* — Vienna: IAEA, 2001. — 127 p.
23. Edwards A. A., Lloyd D. C., Purrott R. J. // *Radiat. Environ. Biophys.* — 1979. — Vol. 16. — P. 89–100.
24. Чеботарев А.Н. // *Вестн. ПАМН.* — 2001. — № 10. — С. 64–69.
25. Мазник Н.О. // *УРЖ.* — 2003. — Т. XI, вип. 1. — С. 106–118.
26. Venkatachalam P., Solomon F. D. P., Mohankumar M. N. et al. // *Mutat. Res.* — 1999. — Vol. 425. — P. 1–8.
27. Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U. et al. // *Cancer. Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 1619–1625.
28. Kaplan M. I., Limoli C. L., Morgan W. F. // *Radiat. Oncol. Invest.* — 1997. — Vol. 5. — P. 124–128.
29. Пяткин Е.К., Нугус В.Ю., Покровская В.Н. // *Радиобиол.* — 1980. — Т. XXIV, вып. 3. — С. 310–314.
30. Lloyd D. C., Moquet J. E. // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1985. — Vol. 47, № 4. — P. 433–444.

Надходження до редакції 26.02.2002.

Прийнято 19.05.2004.

Адреса для листування:

Мазник Наталія Олександрівна,  
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ, вул. Пушкінська, 82,  
Харків, 61024, Україна