

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

В.А. Вінніков,  
Н.О. Мазник,  
Т.С. Сипко,  
О.Е. Ірха

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

## Ознаки нестабільності геному в лімфоцитах крові онкологічних хворих через 1 рік після променевої терапії

The signs of genome instability in blood  
lymphocytes of cancer patients 1 year after  
radiation therapy

**Цель работы:** Оценить потенциал развития отдаленной нестабильности генома в лимфоцитах больных раком тела матки (РТМ) в период 1 года после лучевой терапии (ЛТ) путем анализа трансмитотической динамики цитогенетических показателей *ex vivo* в долгосрочной культуре лимфоцитов.

**Материалы и методы:** Цитогенетическим методом обследовано 12 больных РТМ через 1 год после стандартного курса ЛТ, в сопоставлении с данными до лечения. С использованием FPG-анализа оценивали пропорции клеток разных митозов и частоту цитогенетических повреждений в клетках последовательных митозов в 50-, 76- и 100-часовых культурах лимфоцитов периферической крови.

**Результаты:** Суммарная пропорция клеток 2-го ( $M_2$ ) и 3-го и последующих митозов ( $M_{3+}$ ) в 50-часовой культуре лимфоцитов у пациенток через 1 год после ЛТ составляла 30 %, что достоверно превышало показатель до лечения (20 %); ускоренное деление лимфоцитов через 1 год после ЛТ наблюдалось также в 76- и 100-часовых культурах. В лимфоцитах 1-го митоза ( $M_1$ ) через 1 год после ЛТ присутствовал 10-кратно повышенный уровень aberrаций хромосомного типа, в том числе дицентрики и колец с фрагментами со средней частотой 10 на 100 клеток, при сверхдисперсном распределении по клеткам. В ходе последовательных делений лимфоцитов *in vitro* происходила элиминация aberrаций хромосомного типа, их суммарная частота в  $M_{3+}$  снижалась до 30 % от начального уровня в  $M_1$ . Интенсивность эндогенной полиплоидизации через 1 год после ЛТ и до лечения не различалась; частота неабerrантных полиплоидов в  $M_{3+}$  составляла около 2 %. В последовательных митозах культуры лимфоцитов до лечения частота хроматидных aberrаций в 1,5 раза снижалась, а через 1 год после ЛТ — наоборот, в 1,5 раза возрастала от  $M_1$  к  $M_{3+}$ , достигая уровня, достоверно превышающего спонтанный (соответственно, 2,4 и 1,1 на 100 клеток;  $t = 4,22$ ;  $p < 0,001$ ).

**Выводы:** Повышенная частота aberrаций хромосомного типа в лимфоцитах крови пациенток через 1 год после ЛТ представляла остаточный эффект прямого радиационного поражения хромосомного аппарата. Сниженный, по сравнению с исходным, уровень хроматидных aberrаций отражал ослабление эндогенного мутагенеза в обновленной части популяции периферических лимфоцитов в послерадиационный период. В культуре лимфоцитов пациенток через 1 год после ЛТ отсутствовала задержанная репродуктивная гибель клеток в виде угнетения пролиферативной активности, а также факторы, вызывающие усиленную эндогенную полиплоидизацию, а спектр aberrантных клеток сокращался в ходе трансмитотической элиминации aberrаций хромосомного типа, без аномалий в виде повышения «комплексности» перестроек. Проявлением латентной нестабильности генома у пациенток через 1 год после ЛТ можно считать накопительную динамику aberrаций хроматидного типа в последовательных митозах долгосрочной культуры лимфоцитов. В случае пролиферативной активации таких лимфоцитов *in vivo* существует потенциальная возможность манифестации подобной хромосомной нестабильности в организме, что ассоциируется с опасностью вторичного канцерогенеза и развития отдаленных лучевых реакций в нормальных тканях.

**Ключевые слова:** нестабильность генома, aberrации хромосом, лимфоциты, лучевая терапия, рак тела матки.

**Ключові слова:** нестабільність геному, aberrації хромосом, лімфоцити, променева терапія, рак тіла матки.

**Objective:** To assess the potential of genome instability development in lymphocytes of the patients with uterine body cancer (UBC) 1 year after radiation therapy (RT) by means of analysis of trans-mitotic dynamics of cytogenetic parameters *ex vivo* in a long-term lymphocyte cultures.

**Material and Methods:** Cytogenetic method was used to investigate 12 patients with UBC 1 year after standard course of RT. The findings were compared with those before treatment. FPG-analysis was used to assess the proportions of the cells of different mitosis and frequency of cytogenetic lesions in the cells of consequent mitoses in 50-, 76-, 100-hour cultures of peripheral blood lymphocytes.

**Results:** Total proportion of the cells of the second ( $M_2$ ), third, and consequent mitoses ( $M_{3+}$ ) in 50-hour lymphocyte culture in patients 1 year after RT was 30 %, which significantly exceeded the findings before the treatment (20%). Accelerated lymphocyte division 1 year after RT was also observed in 76- and 100-hour cultures. Ten-fold increase of the level of chromosomal aberrations, including dicentrics and rings with fragments, was present in the lymphocytes of the first mitosis ( $M_1$ ) 1 year after RT with mean frequency 10 per 100 cells at superdisperse distribution in the cells. Elimination of chromosomal aberrations was observed during consequent *in vitro* lymphocyte division. Their total frequency in  $M_{3+}$  reduced to 30 % of the initial level in  $M_1$ . Intensity of endogenic polyploidization 1 year after RT and before the treatment did not differ. The frequency of non-aberrant polyploids in  $M_{3+}$  was about 2 %. In consequent mitoses of lymphocyte culture before the treatment the frequency of chromatide aberrations reduced 1.5 times. One year after RT it increased 1.5 times from  $M_1$  to  $M_{3+}$  reaching the level exceeding the spontaneous one (2.4 and 1.1 per 100 cells, respectively;  $t = 4.22$ ;  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Increased frequency of aberrations of chromosomal type in blood lymphocytes of the patients 1 year after RT was a residual effect of direct radiation damage to the chromosomal apparatus. Decreased, when compared with the initial one, level of chromatide aberrations reflected weakening of endogenic mutagenesis in the renewed portion of the peripheral lymphocyte population after irradiation. Delayed reproductive death of the cells in the form of inhibited proliferative activity as well as the factors causing increased endogenic polyploidization were absent in the lymphocyte culture of the patients one year after RT. The spectrum of aberrant cells reduced during trans-mitotic elimination of chromosomal aberrations without anomalies in the form of increased complexity of reconstructions. Accumulation dynamics of chromatide aberrations in the consequent mitoses of long-term lymphocyte cultures can be regarded a manifestation of latent genome instability 1 year after RT.

In case of proliferative activation of such lymphocytes *in vivo* there is a potential possibility of manifestation of similar chromosomal instability in the organism, which is associated with the danger of secondary carcinogenesis and development of long-term radiation reactions in the normal tissues.

**Key words:** genome instability, chromosome aberrations, lymphocytes, radiation therapy, uterine body cancer.

Протягом трьох останніх десятиріч інтенсивно накопичувалися фундаментальні дані в галузі клітинної й молекулярної біології раку, встановлювалися провідні закономірності відповіді пухлини на терапевтичний вплив, зокрема на радіаційне опромінення. Набуті знання впроваджувалися в клінічну практику, це додавалося до попереднього досвіду, і в результаті значно підвищило ефективність лікування онкопатології. Унаслідок цього в терапії певних форм і локалізацій раку вдалося досягти досить високого рівня контролю над пухлиною і відповідного зростання виживаності хворих до значень порядку десятків років. Саме для цієї категорії пацієнтів актуальними є профілактика і лікування системних та локальних віддалених реакцій нормальних тканин, а також урахування ризику рецидивування, метастазування і розвитку вторинних новоутворів.

Обидва класи ускладнень безпосередньо пов'язані із класто- і мутагенністю, на яких ґрунтується пропухлинна дія терапевтичних агентів, зокрема іонізуючої радіації. Це зумовлює життєву необхідність вивчення феноменології та механізмів розвитку віддалених радіаційних ефектів на клітинному й тканинному рівнях. Згідно із сучасними уявленнями, критичну роль у зазначених процесах може відігравати віддалена радіаційно-індукована нестабільність клітинного геному [1–5].

Феномен нестабільності геному (НГ) перебуває у центрі уваги радіобіологів протягом останніх двадцяти років. На фоні численних експериментальних праць із вивчення НГ на лабораторних тваринах, штучно виведених клітинних лініях і пухлинах, у світі існують лише лічені приклади її цілеспрямованих пошуків у клітинах нормальних тканин людини після опромінювання *in vivo* [6–11]. Разом із тим відомо, що в реальних умовах локального фракціонованого терапевтичного опромінювання в клітинах людини виникає такий спектр хромосомних ушкоджень, який неможливо змодельювати *in vitro* зі стовідсотковою адекватністю [12–15]. Отже, чи не єдиним шляхом вивчення радіотерапевтично-індуко-

ваної нестабільності геному залишається спостереження за картиною радіогенних ефектів безпосередньо у пацієнтів після променевої терапії (ПТ).

У ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМН України шляхом багаторічного індивідуалізованого моніторингу групи хворих на рак тіла матки (РТМ) здійснюється накопичення унікальних даних стосовно змін цитогенетичного статусу онкопацієнток під час та по закінченні променевого лікування. У наших попередніх публікаціях було надано цитогенетичну характеристику цим хворим наприкінці курсу ПТ, досліджено особливості трансмісії аберацій і долю аберантних клітин *in vitro* у довгостроковій культурі їх лімфоцитів і показано поступову елімінацію цитогенетичних ушкоджень *in vivo* з плином часу після опромінювання [12, 14–16].

Остання зі згаданих праць ґрунтувалася на даних, отриманих класичним хромосомним методом у стандартній короткочасній культурі лімфоцитів, яка забезпечувала концентрацію аналізу переважно на клітинах першого мітозу і завдяки цьому адекватно представляла поточний цитогенетичний статус обстежених осіб. Серед висновків [16] визначалася елімінація 80 % лімфоцитів із радіаційно-специфічними дицентриками і кільцями від безпосередньо закінчення курсу ПТ до 1–2 років по тому. Крім того, було показано зниження частоти маркерів радіаційно-неспецифічного мутагенезу — хроматидних аберацій — фактично до вихідного рівня, наявного у хворих до лікування. Зважаючи на все це, можна відзначити, таким чином, швидке і масштабне оновлення периферичного пулу лімфоцитів у пацієнток за рахунок нащадків неаберантних стовбурових клітин протягом перших 1–2 років після ПТ.

Утім, певні експериментальні дані вказують на те, що у разі ситуації, коли попередники начебто нормальних периферичних клітин були «сусідами» опромінених стовбурових лімфопоетичних клітин, у нащадках цих лімфоцитів за умови їх проліферації може відбуватися вторинна маніфестація НГ [17]. Такі переду-

мови для розвитку НГ за механізмом «затриманого ефекту свідка» при нерівномірному опроміненні вочевидь могли створитися після ПТ РТМ, оскільки периферичні лімфоцити людини є відомим резервом для лімфоцитопродуцентного пулу і можуть перенаселяти кістковий мозок [18]. Отже, існує певна ймовірність, що серед оновленого лімфоцитарного пулу пацієнток у віддалені терміни після ПТ присутні потенційні родоначальники клонів зі спонтанною активацією неспецифічного хромосомного мутагенезу.

Експериментальна перевірка цього припущення потребувала спеціальної методології дослідження. Мета даної роботи полягала в оцінці потенціалу розвитку віддаленої нестабільності геному в лімфоцитах пацієнток у термін 1 рік після ПТ шляхом аналізу трансмітотичних змін рівня цитогенетичних показників *ex vivo* у довготерміновій культурі лімфоцитів.

## Методика дослідження

Було обстежено 12 хворих на РТМ I–II стадій (8 осіб — T1b-cNxM0, 4 — T2NxM0). В усіх пацієнток діагноз РТМ був верифікований морфологічно. На момент початку лікування вік жінок становив 52–74 роки, в середньому — 60,3 року.

Усім хворим виконано оперативне втручання — екстирпація матки з придатками, біопсію або резекцію великого сальника. У програмі комбінованого лікування онкопатології всім 12 хворим через 10–14 днів після операції було проведено ПТ, — у 8 осіб — методом дистанційної гамма-терапії та у 4 — методом поєднаної ПТ. Дистанційну гамма-терапію виконували з використанням апарата РОКУС-АМ шляхом класичного дрібного фракціонування при поглинутій дозі 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, з досягненням сумарної поглинутої дози на точки А і В 40–46 Гр у кінці лікування. При поєднаній ПТ дистанційне опромінювання проводили за вищезазначеною стандартною методикою з досягненням такої ж сумарної поглинутої дози. Підключення внутріпорожнинної компоненти відбувалося після досягнення сумарної поглинутої дози 14–30 Гр від дистанційного опромінення. Внутріпорожнинну ПТ проводили на шланговому гамма-терапевтичному апараті АГАТ-В; поглинута доза за один сеанс на слизову піхви складала 3,5 Гр. Опромінювання виконували двічі–тричі на тиждень із заповненням добових інтервалів сеансами дистанційного опромінювання. Сумарна поглинута доза на слизову піхви від даного методу на момент закінчення курсу становила 21 Гр.

Цитогенетичне обстеження всіх пацієнток у даній роботі припадало на термін 12 місяців після закінчення курсу ПТ. Контролем для визначення змін величин ци-

тогенетичних показників виступили результати цитогенетичних досліджень у тих самих осіб, обстежених за 1–2 доби до початку ПТ.

Культивування лімфоцитів периферичної крові, отриманої стерильною венопункцією пацієнток, проводили за стандартною методикою [18] у власній модифікації. Аліквоти цільної гепаринізованої крові (0,5 мл) перенесли до скляних стерильних флаконів із культуральною сумішшю, яка складалася із 4 мл середовища RPMI 1640 (Sigma), бромдезоксигуанідину (Sigma) у масовій концентрації 0,5 мкг/мл, 1 мл сироватки крові великої рогатої худоби і фітогемаглютиніну (Gibco) в об'ємній концентрації 2 %. Культури витримували в термостаті при 37,5 °С. Культивування клітин здійснювали протягом 50, 76 і 100 год; на кожній точці часу фіксували по 2 культури. За 4 год до закінчення культивування додавали розчин колхіцину у масовій концентрації 0,1 мкг/мл. Після 15 хв гіпотонічної обробки розчином KCl фіксували клітини в суміші метанолу або абсолютного етанолу і крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Суспензію клітин наносили на предметне скло, висушували при кімнатній температурі та забарвлювали методом флуоресцентного плюс-Гімза (FPG) забарвлення [18].

Препарати аналізували під звітловими мікроскопами «Біолам-І» з масляною імерсією. Ідентифікацію номеру мітозу проводили за характером забарвлення хромосом [18]. При наявності у кожній хромосомі рівного забарвлення обох хроматид визначали перший мітоз ( $M_1$ ); при наявності в усіх хромосомах двокольорового забарвлення (одна з хроматид темна, друга — світла) — другий мітоз ( $M_2$ ); за змішаного забарвлення (деякі хромосоми — повністю темні, деякі — повністю світлі, деякі мають одну з хроматид темну, другу — світлу, деякі — одну з хроматид із проміжним варіантом забарвлення) визначали третій і подальші мітози ( $M_{3+}$ ).

Цитогенетичні порушення розпізнавали з використанням загальноприйнятих критеріїв [15, 18]. При аналізі реєстрували всі структурні аберації хромосом, розпізнані в нормоплоїдних аберантних клітинах при груповому каріотипуванні, а також геномні порушення — неаберантні та аберантні поліплоїди. За власним оптимізованим протоколом [15] всі аберації занотували диференційно у клітинах  $M_1$ ,  $M_2$  та  $M_{3+}$  з окремим відзначенням реплікованих хромосомних фрагментів.

При статистичному опрацюванні даних усі результати індивідуальних обстежень пацієнток були об'єднані залежно від терміну обстеження — до лікування або через 1 рік після опромінювання, а в межах певного терміну — залежно від порядкового номера мітозу лімфоцитів у культурі. При аналізі проліферативної активності лімфоцитів обчислювали відсоток метафаз певного мітозу серед усіх клітин на певному терміні фіксації культури — 50, 76 чи 100 год. При оцінках цитогенетичних параметрів визначали середню частоту (Y) поліплоїдів — у розрахунку на 100 всіх проаналізованих клітин, аберантних клітин та структурних перебудов хромосом у розрахунку на 100 нормоплоїдних клітин (2N) у межах конкретного мітозу. При цьому поліцентричні хромосомні обміни враховували як відповідне число дицентриків, а кожну репліковану аберацію — як одну перебудову. Стандартні похибки середніх рівнів цитогенетичних ушкоджень (SE) обчислювали, зважаючи на дисперсію поклітинних розподілів аберацій ( $\sigma^2$ ). Відповідність розподілу структурних аберацій хромосом за клітинами статистичі Пуассона оцінювали за відношенням дисперсії до середнього ( $\sigma^2/Y$ ) та *u*-тестом Папворта [18], а вірогідність різниці між середніми значеннями показників в об'єднаних вибірках метафаз — за *t*-критерієм Стьюдента для незв'язаних явищ [19].

## Результати та їх обговорення

При вивченні проліферативної активності лімфоцитів пацієнток в культурі було визначено, що і до ПТ, і через 1 рік після неї вибірки проаналізованих метафаз за будь-якої тривалості культивування становили суміш перших ( $M_1$ ), других ( $M_2$ ) та третіх і подальших мітозів ( $M_{3+}$ ). При збільшенні тривалості культивування з 50 до 100 годин відбувалася очікувана зміна структури клітинної популяції (рис. 1). На терміні фіксації 50 год кількісно переважали  $M_1$ , а у 76-годинних культурах більшість клітин уже перебувала у третьому і подальших мітотичних циклах, і до 100 годин пропорція метафаз  $M_{3+}$  набувала домінування. Внесок  $M_2$  виявився найбільшим (20–30 %) у 50-годинних культурах.

Порівняння проліферативної активності лімфоцитів у пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ показало, що у післярадіаційний період поділи лімфоцитів у культурі відбувалися швидше, ніж до ПТ. Сукупний відсоток клітин  $M_2$  і  $M_{3+}$  у 50-годинній культурі через 1 рік після ПТ становив ( $34,93 \pm 0,86$ ) % і був вірогідно вищим, ніж ( $24,46 \pm 0,93$ ) % до лікування ( $t = 8,13$ ;  $p < 0,001$ ). Ця тенденція тривала у 76- і 100-годинних культурах, де спостерігали більший внесок клітин  $M_{3+}$  після ПТ — відповідно, ( $84,39 \pm 0,44$ ) % і

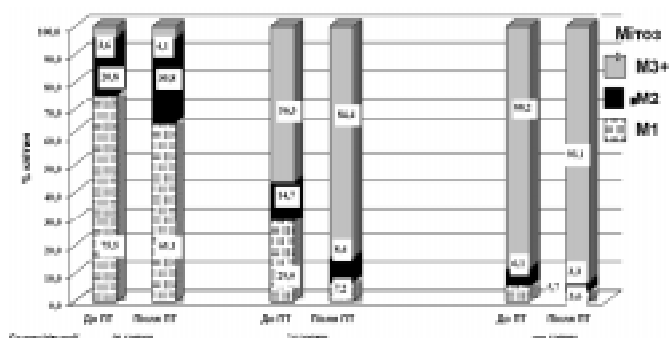


Рис. 1. Співвідношення пропорцій метафаз першого ( $M_1$ ), другого ( $M_2$ ) і третього та подальших мітозів ( $M_{3+}$ ) *in vitro* залежно від тривалості культивування лімфоцитів крові пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ: цифрами вказана пропорція клітин певного мітозу (%) серед загальної кількості проаналізованих метафаз

Fig. 1. Interrelation of the proportions of metaphases of the first ( $M_1$ ), second ( $M_2$ ) and third and consequent ( $M_{3+}$ ) mitoses *in vitro* depending on the duration of cultivation of lymphocytes before the treatment and 1 year after RT: the figures indicate the proportion of the cells of the definite mitosis (%) among the total number of analyzed metaphases

( $93,13 \pm 0,42$ ) %, ніж до лікування — відповідно, ( $56,32 \pm 0,75$ ) % і ( $88,24 \pm 0,48$ ) %; різниця вірогідна із  $t = 34,49$  і  $t = 7,48$  ( $p < 0,001$ ).

Причиною прискореної проліферації лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ могло бути те, що переважна більшість цих клітин, як буде обговорено нижче, були відносно «свіжими» нащадками лімфоцитопрекурсорів. Можливо, саме нетривале перебування лімфоцитів зрілими спричинило їх прискорену мітотичну відповідь на стимуляцію фітогемаглютиніном. Альтернативним механізмом могла бути дія сигнальних факторів (насамперед, інтерлейкінів), які виділялися лімфоцитами в культурі і виступали додатковими стимуляторами росту клітинної популяції. За нормальних умов ці регуляторно-сигнальні системи спрямовані на реалізацію механізмів імунної пам'яті. За умов ПТ в організмі пацієнток могла виникнути здатність до посиленого продукування ростових факторів як адаптивна реакція на опромінення, коли виникла потреба у компенсації лейкопенії та відновленні кісткового мозку [20, 21]. Збереження цієї функції у зрілих лімфоцитах вочевидь пояснюється їх роллю природного резерву для репопуляції кісткового мозку [18].

Величини цитогенетичних показників у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ, порівняно з відповідними значеннями у тих самих осіб до лікування, наведено в табл. 1. Як до, так і після ПТ спектр цитогенетичних ушкоджень у клітинах  $M_1$ ,  $M_2$  і  $M_{3+}$  містив неаберантні та аберантні поліплоїди (Ппл) і нормоплоїдні аберантні клітини (Аб Кл) зі структурними абераціями хромосомного і хроматидного типу (відповідно, А Хс і А Хт). А Хс включали дицентрики і кільцеві хромосоми із супутніми фрагментами (Диц + ЦК фр), вільні ацентричні фрагменти (Ац Фр), атипівні моноцентрики (Ат Мон) і трансмісовані аберації хромосомного типу (А Хс<sub>trans</sub>). Ат Мон представляли суму транслокацій, інверсій, інсерцій і делетованих хромосом, які можна було виявити груповим каріотипуванням. До А Хс<sub>trans</sub> входили ди-

Таблиця 1

Зіставлення середніх частот цитогенетичних ушкоджень у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ  
 Comparison of mean frequencies of cytogenetic damage in consequent mitoses of lymphocyte culture of the patients before the treatment and 1 year after RT

Обстеження	Мітоз	Кількість клітин	АБ Ппл	Неаб Ппл	Кількість клітин 2N	АБ Кл	Кл <sub>ак</sub>	АХс	Диц+ЦКфр	АцФр	АХс <sub>ак</sub>	АтМФн	Кл <sub>акт</sub>	АХт
До ПТ	M <sub>1</sub>	2116	0,05±0,05	0,05±0,05	2114	4,30±0,44	2,13±0,31	2,18±0,35	0,28±0,12	1,56±0,27	0,05±0,05	0,28±0,12	2,32±0,33	2,37±0,34
	M <sub>2</sub>	644	0,47±0,27	1,24±0,44	633	2,53±0,62	1,11±0,42	1,42±0,54	0,32±0,22	0,47±0,27	0,47±0,27	0,16±0,16	1,42±0,47	1,74±0,61
	M <sub>3+</sub>	3430	0,06±0,04	1,95±0,24	3361	2,50±0,27	1,55±0,21	1,73±0,23	0,09±0,05	1,04±0,27	0,42±0,11	0,18±0,07	1,01±0,17	1,10±0,19
Через 1 рік після ПТ	M <sub>1</sub>	1281	0,16±0,11	0,23±0,14	1276	11,91±0,91	10,74±0,87	19,04±2,05	10,27±1,42	5,88±0,66	1,25±0,33	1,65±0,36	1,57±0,34	1,65±0,37
	M <sub>2</sub>	865	1,27±0,38	1,85±0,46	838	8,47±0,96	6,68±0,86	8,95±1,35	1,55±0,43	1,31±0,43	4,18±0,92	1,91±0,47	1,91±0,47	1,91±0,47
	M <sub>3+</sub>	6716	0,52±0,09	1,74±0,16	6564	6,95±0,31	4,84±0,27	6,05±0,43	0,99±0,12	2,04±0,11	1,54±0,18	1,48±0,15	2,32±0,19	2,41±0,20

Примітка: дані представлені у формі середніх частот цитогенетичних ушкоджень в розрахунку на 100 клітин зі стандартними похибками, обчисленими за дисперсією показника в межах проаналізованої вибірки метафаз певного мітозу.

Таблиця 2

Зміни спектра клітин із дицентриками і кільцями та нестабільними абераціями хромосомного типу у послідовних мітозах культури лімфоцитів крові онкопацієнток через 1 рік після ПТ  
 The changes in the spectrum of the cell with dicentrics and rings and instable aberrations of chromosomal type in consequent mitoses of blood lymphocyte culture of cancer patients 1 year after RT

Показник	Мітоз	Кількість клітин із даною кількістю аберацій										Y ± SE
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	≥ 9	
Всі Диц + ЦК	M <sub>1</sub>	1191	52	18	9	2	2	1	0	1	0	11,52 ± 1,51
	M <sub>2</sub>	807	24	4	2	1	0	0	0	0	0	5,01 ± 1,01
	M <sub>3+</sub>	6429	127	5	1	0	0	2	0	0	0	2,32 ± 0,23
Нестабільні А Хс	M <sub>1</sub>	1153	75	26	12	3	2	1	2	1	1#	17,40 ± 1,96
	M <sub>2</sub>	795	33	5	4	1	0	0	0	0	0	7,04 ± 1,20
	M <sub>3+</sub>	6328	201	26	3	3	0	0	1	1	1#	4,57 ± 0,37

Примітка:

1. Y ± SE — середня частота аберацій та її стандартна похибка, обчислена за дисперсією розподілу аберацій за клітинами;
2. Y/C ± SE — середній вихід аберацій на аберантну клітину і його стандартна похибка, обчислена за дисперсією розподілу аберацій за клітинами в межах аберантної фракції клітин;
3.  $\sigma^2 / Y$  — відношення дисперсії поклітинного розподілу до середньої частоти аберацій;
4. u — значення u-тесту Палворта;
5. # — одна клітина з 11 абераціями в M<sub>1</sub> і 1 клітина з 9 абераціями в M<sub>3+</sub>.

центрики і кільцеві хромосоми із втраченим чи з реплікованим супутнім фрагментом (Диц + ЦК  $\pm$   $n^*$ [фр]) та репліковані вільні ацентричні фрагменти ( $n^*$ [Ац Фр]). А Хт були представлені обмінами (Хт Обм) і фрагментами (Хт Фр). Всі аберантні Ппл містили репліковані аберації, зазвичай  $n^*$ [Диц  $\pm$  фр].

Стосовно вихідної картини цитогенетичних ефектів у пацієнток слід зазначити, що середні частоти Аб Кл, А Хс і А Хт до лікування виявилися дещо підвищеними відносно рівня цитогенетичних ушкоджень у здорового населення, за даними літератури [22], і нашого лабораторного контролю, для даної статевовікової категорії (відповідно, 1,55, 0,98 і 0,62 на 100 клітин за даними [23]). Відмінності порівняно з популяційним контролем спостерігали не тільки у фрагментних абераціях, але й Диц + ЦК фр та Хт Обм, рівні яких у хворих на РТМ до лікування виявилися вдвічі вищими, ніж у референтній віковій групі здорових донорів (відповідно 0,14 і 0,07 на 100 клітин) [23].

Підвищений спонтанний рівень аберацій є відомою цитогенетичною характеристикою онкопацієнтів з пухлинами різної локалізації [24, 25]. Частково він міг бути індукованим радіодіагностичними процедурами, необхідними для встановлення діагнозу. Але це також могла бути схильність до інтенсифікованого ендогенного мутагенезу і хромосомної нестабільності, асоційованої з механізмами канцерогенезу [25, 26]. Незалежно від причини, підвищеність вихідного рівня аберацій хромосом у лімфоцитах крові онкохворих слід обов'язково врахувати при аналізі перебігу після радіаційних ефектів і детекції можливої віддаленої НГ.

Через 1 рік після ПТ середні рівні цитогенетичних ушкоджень у лімфоцитах пацієнток *in vivo* (тобто, в  $M_1$ ) перевищували вихідні значення: за Аб Кл — у 2,5 рази ( $t = 8,40$ ;  $\rho < 0,001$ ), за Кл<sub>АХс</sub> — у 5 ( $t = 10,97$ ;  $\rho < 0,001$ ), за А Хс — у 8,5 ( $t = 10,19$ ;  $\rho < 0,001$ ), за Диц + ЦК фр — у 37 ( $t = 8,97$ ;  $\rho < 0,001$ ), за Ац Фр — у 3,5 ( $t = 6,97$ ;  $\rho < 0,001$ ), за А Хс<sub>trans</sub> — у 25 ( $t = 4,54$ ;

$\rho < 0,001$ ), за Ат Мон — у 6 разів ( $t = 4,29$ ;  $\rho < 0,001$ ). Рівні неаберантних і аберантних Ппл були підвищеними, але без статистичної вірогідності (відповідно,  $t = 1,42$  і  $t = 1,03$ ;  $\rho > 0,05$ ). Частота А Хт у пацієнток через 1 рік після ПТ виявилася дещо зниженою відносно допроменевого контролю ( $t = 1,38$ ;  $\rho > 0,05$ ).

Сукупні поклітинні розподіли нестабільних А Хс та всіх Диц + ЦК (тобто, Диц + ЦК фр і Диц + ЦК  $\pm$   $n^*$ [фр]) у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ представлено в табл. 2. У метафазах  $M_1$  значна кількість клітин містили більш, ніж одну аберацію, і розподіли вірогідно відхилялися від статистики Пуассона в бік наддисперсності ( $\sigma^2/Y > 1$ ,  $u > 1,96$ ). Підвищений рівень А Хс і Диц + ЦК та їх наддисперсні розподіли у зрілих лімфоцитах пацієнток були прямим результатом колишнього локального терапевтичного опромінення. Механізми утворення радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів і кількісні закономірності їх перебігу за променевого лікування, зокрема при дистанційній гамма-терапії РТМ, були обговорені у наших попередніх публікаціях [12, 14, 16]. Поточний аналіз даних був сконцентрований на виявленні проявів латентної нестабільності геному в послідованих мітозах культури лімфоцитів, отриманих від пацієнток у віддалені терміни після ПТ.

На рис. 2 представлено динаміку *in vitro*

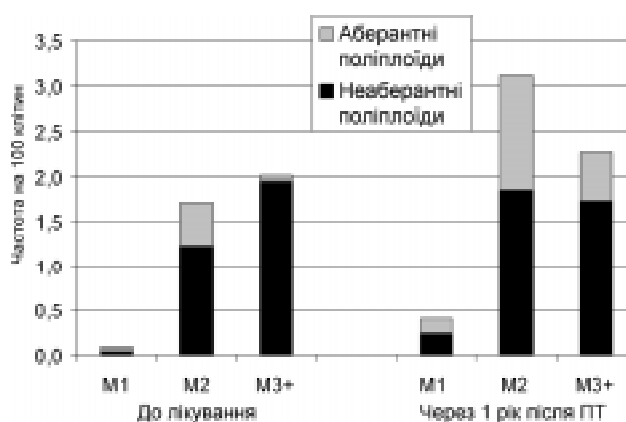


Рис. 2. Динаміка рівня поліплоїдів у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ

Fig. 2. The changes in the level of polyploids in consequent mitoses of lymphocyte culture before the treatment and 1 year after RT

середнього рівня Ппл. До лікування частота неаберантних Ппл поступово зростала від  $M_1$  до  $M_{3+}$ , тоді як аберантні Ппл накопичувалися в  $M_2$ , але елімувалися в  $M_{3+}$ . Через 1 рік після ПТ частота обох категорій Ппл значно зростала в  $M_2$  відносно  $M_1$ , проте підвищення над спонтанним рівнем було вираженішим у випадку аберантних Ппл. У  $M_{3+}$  частота неаберантних Ппл була стабільною відносно  $M_2$ , а аберантних Ппл — вірогідно знижувалася (перевищувала ( $t = 2,63$ ;  $p < 0,01$ )). Післярадіаційний рівень неаберантних Ппл в  $M_{3+}$  не відрізнявся від спонтанного, а за аберантними Ппл значуще його перевищував ( $t = 3,71$ ;  $p < 0,001$ ).

Причиною утворення аберантних Ппл, як відомо, є злиття дочірніх клітин після блокування мітозу аберантних нормоплоїдів [27], і внаслідок обмеженої *per se* мітотичної виживаності аберантних Ппл, їх трансмітотична динаміка майже на 100 % визначалася перебігом нормоплоїдних  $Kl_{AXc}$  (насамперед, з дицентриками), що розглянуто нижче. Щодо неаберантних Ппл, то за нашими даними можна зробити висновок про відсутність у культурі лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ будь-яких факторів, які б спричинили посилену ендогенну поліплоїдизацію порівняно з її інтенсивністю до лікування.

У культурі лімфоцитів хворих через 1 рік після ПТ рівні Аб Кл,  $Kl_{AXc}$ , А Хс, Диц + ЦК Фр та Ац Фр інтенсивно знижувалися від  $M_1$  до  $M_2$ : відповідно,  $t = 2,52$  ( $p < 0,05$ );  $t = 3,17$  ( $p < 0,01$ );  $t = 3,66$  ( $p < 0,001$ );  $t = 4,88$  ( $p < 0,001$ ) і  $t = 5,16$  ( $p < 0,001$ ). Для всіх зазначених показників спостерігали подальшу елімінацію в  $M_{3+}$ , де вірогідні відмінності відносно  $M_2$  виникали з частотою  $Kl_{AXc}$ , А Хс та Ац Фр (відповідно,  $t = 2,56$ , 2,24 і 2,12;  $p < 0,05$ ). У випадку А Хс  $_{trans}$  визначався дещо інший перебіг, а саме — значне накопичення в  $M_2$  відносно  $M_1$  ( $t = 3,45$ ;  $p < 0,001$ ), а потім — зниження в  $M_{3+}$  до рівня, який не відрізнявся від значення в  $M_1$ . Частота Ат Мон у культивованих лімфоцитах пацієнток через 1 рік після ПТ була взагалі стабільною від  $M_1$  до  $M_{3+}$ .

Під час проліферації лімфоцитів істотно змінювався спектр аберантних клітин (див. табл. 2). Пропорція метафаз із 1 нестабільною А Хс серед  $Kl_{AXc}$  поступово зростала з 60 у  $M_1$  до 76 у  $M_2$  і 85 % у  $M_{3+}$ . Внесок клітин із 1 Диц + ЦК серед  $Kl_{Диц+ЦК}$  в  $M_{3+}$  досягав 94 %. Унаслідок цього, при переході з  $M_1$  до  $M_2$  та з  $M_2$  до  $M_{3+}$  знижувався середній вихід Диц + ЦК на  $Kl_{Диц+ЦК}$  та нестабільних А Хс на  $Kl_{AXc}$ . Попри посилену негативну селекцію мультиаберантних клітин, у  $M_2$  та  $M_{3+}$  зберігався наддисперсний розподіл А Хс та Диц + ЦК за клітинами ( $u > 1,96$ ). Зважаючи на ключову роль нестабільних хромосомних обмінів у мітотичній виживаності клітин і великий внесок Диц + ЦК до спектра А Хс у наших даних, було проведено порівняння трансмітотичної елімінації клітин із різним числом Диц + ЦК ( $Kl_{Диц+ЦК}$ ). Це здійснювалося шляхом нормування їх частоти в  $M_2$  і  $M_{3+}$  відносно первинного рівня в  $M_1$ , причому з відрахунком спонтанних значень до лікування (рис. 3).

Елімінація  $Kl_{Диц+ЦК}$  відбувалася інтенсивніше між  $M_1$  і  $M_2$ , ніж від  $M_2$  до  $M_{3+}$ . Швидкість елімінації  $Kl_{Диц+ЦК}$  проявила пряму залежність від кількості Диц + ЦК, і відмінності у темпах зникнення були вираженішими між клітинами з 1 Диц + ЦК та  $>1$  Диц + ЦК, аніж між клітинами з 2–3 Диц +

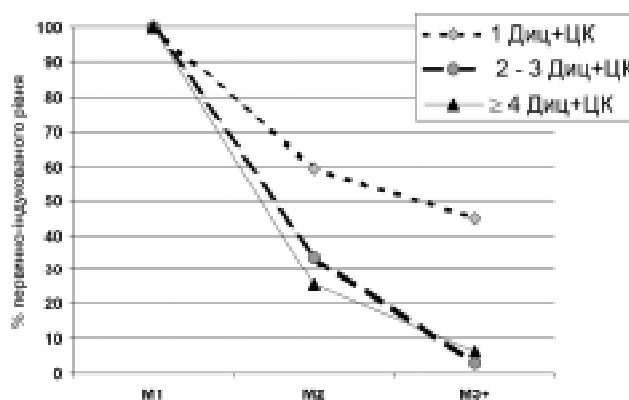


Рис. 3. Зміни надспонтанного рівня клітин із різним числом дицентриків і кілець у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ

Fig. 3. The changes in super-spontaneous level of the cells with different number of dicentric and rings in consequent mitoses of lymphocyte culture before the treatment and 1 year after RT



$\text{ЦК} \geq 4 \text{ Диц} + \text{ЦК}$ . В  $M_{3+}$  зберігалось 3–6 % від первинно-індукованого рівня клітин з  $> 1 \text{ Диц} + \text{ЦК}$ , а виживаність нащадків клітин з  $1 \text{ Диц} + \text{ЦК}$  була набагато успішнішою, оскільки в  $M_{3+}$  їх залишалося 45 % від первинного рівня в  $M_1$ . Зрозуміло, що тут діяли переважно стехіометричні причини, які надавали клітинам з  $1 \text{ Диц} + \text{ЦК}$  більше шансів вдалого мітотичного поділу порівняно з мультиаберантними клітинами.

Узагалі, дані табл. 2 і рис. 3 дозволяють констатувати зниження ступеня навантаженості клітин хромосомними ушкодженнями у послідовних мітотичних поділах, без будь-якої тенденції до розширення спектра аберантних клітин за ті межі, що існували в  $M_1$ . Такий висновок про відсутність прогресивного підвищення «комплексності» перебудов (принаймні, з утворенням багатьох нестабільних хромосомних обмінів в одній клітині) суперечить результатам дослідження [28] на клонуваних нащадках опромінених лімфоцитів, але повністю відповідає даним [29], отриманим на довготермінових культурах лімфоцитів після впливу  $\alpha$ -часток, цитогенетична дія яких за характером розподілу аберацій за клітинами є досить подібною до нерівномірного  $\gamma$ -опромінення.

У порівнянні із частотою аберацій в  $M_{3+}$  до лікування, у віддалених нащадках лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ визначалися підвищені рівні Аб Кл ( $t = 9,38$ ;  $p < 0,001$ ), Кл  $A_{Xc}$  ( $t = 8,10$ ;  $p < 0,001$ ), Диц + ЦК фр ( $t = 5,25$ ;  $p < 0,001$ ), Ац Фр ( $t = 4,05$ ;  $p < 0,001$ ), А Хс  $_{trans}$  ( $t = 4,25$ ;  $p < 0,001$ ) і Ат Мон ( $t = 6,03$ ;  $p < 0,001$ ). При розгляді надспонтанної частоти аберацій, утворених *de novo*, з'ясувалося, що в  $M_{3+}$  залишилося 9 % Диц + ЦК фр і 23 % Ац Фр від того, що було індуковано в  $M_1$ . Таке високе значення у випадку Ац Фр могло бути наслідком утворення цих аберацій шляхом реплікативної трансформації Хт Фр при передачі останніх у дочірні клітини. Обґрунтуванням такого припущення і кількісної значущості цього процесу є трансмітотична динаміка частоти Хт Фр у лімфоцитах пацієнток через 1 рік після ПТ (рис. 4).

Картина змін рівня А Хт в онкохворих до і після ПТ у зрілих лімфоцитах та їх культивованих нащадках вимагає особливої уваги. А Хт формуються тільки *de novo* у фазі  $G_2$  клітинного циклу і тому є дуже популярними кількісними маркерами в оцінці радіаційно-зумовленої віддаленої хромосомної нестабільності *in vitro* та *in vivo* [6–8, 30–35].

У культурах лімфоцитів пацієнток до лікування спостерігалось істотне зниження частоти А Хт від  $M_1$  до  $M_{3+}$  ( $t = 3,52$ ;  $p < 0,001$ ), тобто проявів НГ за цим параметром не було. Через 1 рік після ПТ частота А Хт у лімфоцитах  $M_1$  виявилася зниженою у 1,5 разу порівняно з вихідним рівнем. Єдиним раціональним поясненням цього факту є значне оновлення популяції периферичних лімфоцитів через 1 рік після ПТ відносно тієї, що існувала наприкінці курсу опромінення і, тим більше, до ПТ. Якщо судити з темпів зниження надспонтанного рівня Кл Диц + ЦК фр, порівнюючи його поточне значення із даними наприкінці ПТ у тих самих пацієнток [16], можна дійти висновку, що через 1 рік після опромінювання в периферичному пулі лімфоцитів залишилося тільки 15–20 % «старих» клітин, а 80–85 % були новими нащадками неаберантних лімфоцитопрекурсорів. Розведення «старої» фракції лімфоцитів у післярадіаційний період явно стосува-

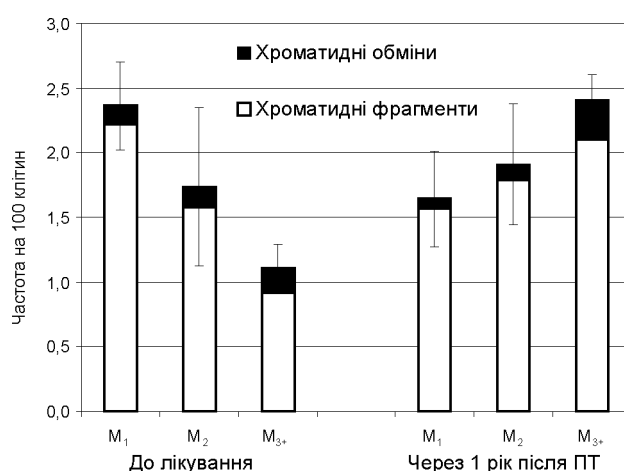


Рис. 4. Рівень аберацій хроматидного типу у послідовних мітозах культури лімфоцитів пацієнток до лікування і через 1 рік після ПТ: стандартні похибки обчислені для сумарної частоти обмінів та фрагментів

Fig. 4. The level of chromatide aberrations in consequent mitosis of lymphocyte cultures before the treatment and 1 year after RT: standard errors were calculated for total frequency of exchanges and fragments



лося і  $K_{\text{л}} A_{\text{Хт}}$ , оскільки наприкінці ПТ частота  $A_{\text{Хт}}$  була підвищеною відносно контролю, але з часом поступово знижувалася [16]. Падіння остаточного рівня  $A_{\text{Хт}}$  нижче вихідного значення свідчило про те, що інтенсивність індукування  $A_{\text{Хт}}$  в оновленій частині периферичних лімфоцитів була значно меншою, ніж до лікування. Зважаючи на сучасні уявлення про механізми утворення  $A_{\text{Хт}}$ , можна припустити щонайменше три причини такого ефекту:

знижена інтенсивність продукування та повноцінне перехоплення вільних радикалів, ефективно зупинення запальних реакцій та надмірної дії сигнальних факторів у зонах лімфопоезу й периферичної лімфо- і гемоциркуляції (можливо, позитивну роль відіграло видалення осередку пухлини — джерела перманентного впливу на імунну систему);

негативна селекція (ймовірно, через активне розпізнання та елімінацію) тих лімфоцит-прекурсорів і зрілих лімфоцитів, які експресували мутаторний фенотип чи персистентну НГ; відсутність НГ у стовбурових клітинах.

Саме на відсутності ознак розвитку віддаленої НГ у лімфоцитах крові у пацієнтів після ПТ наголошували у своїх висновках автори [7], які спеціально вивчали післярадіаційну динаміку частоти  $A_{\text{Хт}}$  у даної категорії опромінених осіб протягом тривалого часу. Слід зазначити, що хромосомний аналіз у роботі [7] був обмежений тільки зрілими лімфоцитами, і наші дані стосовно  $A_{\text{Хт}}$  в  $M_1$  повністю відповідають результатам цих авторів. Але у нашому дослідженні, на відміну від [7], використовувалася техніка тривалого культивування лімфоцитів, і це дозволило виявити потенційну НГ у пацієнток через 1 рік після ПТ у вигляді підвищеного хроматидного мутагенезу у віддалених нащадках лімфоцитів *in vitro* (див. рис. 4).

Всупереч картині до лікування, під час проліферації лімфоцитів через 1 рік після ПТ зростала частота  $A_{\text{Хт}}$  в  $M_2$  і далі в  $M_{3+}$  до рівня, який був у 1,5 разу вищим, ніж у  $M_1$ , і в 2,5 разу — ніж у  $M_{3+}$  до лікування (в останньому порівнянні  $t = 4,22$ ;  $p < 0,001$ ). При цьому пропорція  $X_{\text{т}} \text{ Обм}$  серед  $A_{\text{Хт}}$  через 1 рік після

ПТ становила 5 % у  $M_1$ , 6 % у  $M_2$  та 13 % — у  $M_{3+}$ , що було дуже близьким значенням до ПТ — відповідно, 6, 9 і 16 %. Схожі розміри внеску  $X_{\text{т}} \text{ Обм}$  до і після ПТ означають, що формування  $A_{\text{Хт}}$  у послідовних мітозах у післярадіаційний час відбувалося за участю тієї ж молекулярної машинерії і за тими ж механізмами, що й до лікування.

Процеси, які забезпечили підвищення частоти  $A_{\text{Хт}}$  у нащадках культивованих лімфоцитів онкохворих через 1 рік після ПТ, залишаються досі невідомими. Найімовірніше, вони пов'язані з гіперпродукуванням вільних радикалів, що призводило до утворення ушкоджень ДНК, частина яких була індукована у постсинтетичній фазі клітинного циклу і піддавалася помилковій репарації з формуванням аберацій. Альтернативою могла бути хибна робота контрольних точок клітинного циклу, які не спрацьовували належним чином і допускали репарацію розривів ДНК та вихід абераційної клітини в мітоз, замість того, щоб спрямувати її на шлях апоптозу.

Можна припустити, що подібні процеси можуть відбуватися у випадку проліферації таких лімфоцитів *in vivo*, що можливе при переселенні лімфоцитів у кістковий мозок і перетворенні їх на стовбурові клітини або при клітинних поділах, які супроводжують конвертацію ізоформ лімфоцитів під час реалізації механізмів імунної пам'яті, або при клоновій експансії у відповідь на потужну антигенну стимуляцію (наприклад, інфекцію). Наші дані свідчать, що протягом однорічного післярадіаційного періоду у пацієнток такі процеси, якщо і виникали *in vivo*, досить ефективно перекривалися вищезазначеною негативною селекцією лімфоцитів і прекурсорів з фенотипом хромосомної нестабільності. Проте, не можна відкидати потенційної небезпеки виснаження цих захисних механізмів чи перевищення їх функціональної ємкості у майбутньому.

Через безпосередню залученість до процесів канцерогенезу і затриманої репродуктивної загибелі клітин, маніфестація НГ *in vivo* може стати причиною розвитку таких негативних наслідків ПТ, як вторинні раки і віддалені про-

меневі реакції в нормальних тканинах [1–5]. Із цього випливає необхідність подовженого цитогенетичного моніторингу онкологічних хворих після ПТ з можливим перетворенням хромосомного аналізу на предиктивний тест.

## ВИСНОВКИ

1. У культурі лімфоцитів крові хворих на РТМ через 1 рік після курсу ПТ були відсутні ознаки «затриманої» репродуктивної загибелі клітин у вигляді пригнічення проліферативної відповіді на стимуляцію ФГА. Навпаки, проліферативна активність лімфоцитів у пацієнток через 1 рік після опромінювання виявилася вірогідно вищою, ніж до лікування.

2. Частота цитогенетичних ушкоджень у периферичних лімфоцитах *in vivo* у пацієнток через 1 рік після ПТ була підвищеною відносно вихідних значень до лікування, але тільки за рахунок аберацій хромосомного типу, що представляло остаточний рівень прямого променевого ураження хромосомного апарата. Вихід радіаційно-неспецифічних хроматидних аберацій виявився нижчим, ніж до опромінювання, що могло стати наслідком зменшеної інтенсивності ендogenous мутагенезу в оновленій частині популяції периферичних лімфоцитів у післяпроменевої період.

3. Із використанням техніки тривалого культивування клітин було встановлено, що в культурі лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ були відсутні фактори, які б спричиняли посилену ендogenous поліплоїдизацію, порівняно з її інтенсивністю до лікування.

4. Під час проліферації лімфоцитів *in vitro* відбувалося очікуване зниження частоти аберацій хромосом від першого мітозу до третіх і подальших поділів; ця елімінація включала посилену негативну селекцію клітин із двома і більше абераціями, але зі збереженням наддисперсного розподілу перебудов хромосомного типу у віддалених нащадках лімфоцитів. Проте у послідовних клітинних генераціях не спостерігалось будь-якої тенденції до прогресивного підвищення «комплексності», перебудов чи розширення спектра абераційних клітин за межі, що існували в лімфоцитах першого мітозу.

5. На відміну від картини до лікування, у послідовних мітозах лімфоцитів пацієнток через 1 рік після ПТ відбувалося зростання частоти аберацій хроматидного типу, що можна вважати проявом латентної нестабільності геному. У випадку проліферативної активації таких лімфоцитів *in vivo* існує потенційна можливість маніфестації подібної хромосомної нестабільності в організмі пацієнток, і це асоціюється із небезпекою вторинного канцерогенезу та розвитку віддалених променивих реакцій у нормальних тканинах.

## Література

1. Hendry J.H. // *Radiother. and Oncol.* – 2001. – Vol. 59, Issue 2. – P. 117–126.
2. Lefevre S.-H., Vogt N., Dutrillaux A.-M. et al. // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 8092–8099.
3. Goldberg Z. // *Ibid.* – 2003. – Vol. 22, № 45. – P. 7011–7017.
4. Sigurdson A.J., Jones I.M. // *Ibid.* – P. 7018–7027.
5. Morgan W.F. // *Radiat. Res.* – 2003. – Vol. 159, № 5. – P. 581–596.
6. Salomaa S., Holmberg K., Lindholm C. et al. // *Internat. J. of Radiat. Biol.* – 1998. – Vol. 74, № 6. – P. 771–779.
7. Tawn E. J., Whitehouse C. A., Martin F. A. // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 465. – P. 45–51.
8. Whitehouse C.A., Tawn E.J. // *Radiat. Res.* – 2001. – Vol. 156, № 5, Part 1. – P. 467–475.
9. Tawn E.J., Whitehouse C.A., Winther J.F. et al. // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 583. – P. 198–206.
10. Kodama Y., Ohtaki K., Nakano M. et al. // *Radiat. Res.* – 2005. – Vol. 164. – P. 618–626.
11. Мазник Н.А., Винников В.А. Выявление признаков отдаленной генетической нестабильности в ходе динамического изучения цитогенетических эффектов у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС // *Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля.* – 2005. – Вип. 3, ч. II. – С. 65–74.
12. Vinnikov V.A., Mikhaylovskiy A.A., Maznik N.A. // *Experiment. Oncol.* – 2003. – Vol. 25, № 4. – P. 279–284.
13. Senthamizchelvan S., Pant G.S., Rath G.K. et al. // *Radiat. Prot. Dosim.* – 2007. – Vol. 123, № 2. – P. 241–245.
14. Мазник Н.О., Винников В.А., Міхановський О.А. та ін. // *УРЖ.* – 2004. – Т. XII, вип. 3. – С. 266–276.
15. Винников В.А., Мазник В.С., Щегольков А.В., Ірха О.Е. // *УРЖ.* – 2004. – Т. XII, вип. 4. – С. 404–414.
16. Мазник Н.О., Винников В.А., Ірха О.Е. та ін. // *Там же.* – 2008. – Т. XVI, вип. 1. – С. 20–26.
17. Lorimore S.A., McIlrath J.M., Coates P.J., Wright E.G. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 5668–5673.
18. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. IAEA Techn. Report Series № 405.* – Vienna: IAEA, 2001. – 127 p.
19. Лакін Г.Ф. *Биометрия.* – М.: Высш. шк. 1973. – 344 с.
20. Brooks A.L. // *Radiat. Res.* – 2005. – Vol. 164. – P. 454–461.
21. Bastianutto C., Mian A., Symes J. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 10112–10116.
22. Чеботарев А.Н. // *Вестн. РАМН.* – 2001. – № 10. – С. 64–69.
23. Мазник Н.О. Цитогенетичні ефекти як біологічний індикатор дії іонізуювальної радіації в низьких дозах

- 
- у ранні та віддалені строки після опромінення у осіб чорнобильського контингенту: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: — К., 2005. — 46 с.
24. Venkatachalam P., Solomon F. D. P., Mohankumar M. N. et al. // *Mutat. Res.* — 1999. — Vol. 425. — P. 1–8.
  25. Norppa H., Bonassi S., Hansteen I.-L. et al. // *Ibid.* — 2006. — Vol. 600. — P. 37–45.
  26. Coleman W. B., Tsongalis G. J. // *Anticanc. Res.* — 1999. — Vol. 19. — P. 4645–4664.
  27. Carrano A. V. // *Mutat. Res.* — 1973. — Vol. 17. — P. 341–353.
  28. Lambert B., Holmberg K., Hackman P., Wennborg A. // *Ibid.* — 1998. — Vol. 405. — P. 161–170.
  29. Anderson R. M., Marsden S. J., Paice S. J. et al. // *Radiat. Res.* — 2003. — Vol. 159. — P. 40–48.
  30. Kadhim M. A., Lorimore S. A., Townsend K. M. S. et al. // *Internat. J. of Radiat. Biol.* — 1995. — Vol. 67, № 3. — P. 287–293.
  31. Kadhim M. A., Marsden S. J., Malcolmsen A. M. et al. // *Radiat. Res.* — 2001. — Vol. 155. — P. 122–126.
  32. Little J. B. Radiation-induced genomic instability // *Internat. J. of Radiat. Biol.* — 1998. — Vol. 74, № 6. — P. 663–671.
  33. Bortoletto E., Mognato M., Ferraro P. et al. // *Mutagen.* — 2001. — Vol. 16, № 6. — P. 529–537.
  34. Moore S. R., Marsden S., Macdonald D. et al. // *Radiat. Res.* — 2005. — Vol. 163. — P. 183–190.
  35. Hofman-Huther H., Peuckert H., Ritter S., Virsik-Kopp P. // *Ibid.* — 2006. — Vol. 166. — P. 858–869.

Надходження до редакції 10.06.2008.

Прийнято 23.06.2008.

Адреса для листування:  
Вінніков Володимир Анатолійович,  
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва  
АМН України,  
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна