

## **ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРОТОНАМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА ФАЗОТРОНА ОИЯИ**

*Е. М. Зайцева, Р. Д. Говорун, Г. В. Мицын, А. Г. Молоканов*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Проведена оценка эффективности воздействия протонами терапевтического пучка на клетки человека по критерию частоты образования хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека. Учитывали как физические характеристики излучения (ЛПЭ протонов на входе в объект и в области модифицированного пика Брэгга), так и роль биологического фактора — различий в радиочувствительности неделящихся и делящихся клеток, что соответствует облучению нормальных тканей по ходу пучка протонов и непосредственно тканей опухолей. Величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов равны  $\sim 1$  на входе пучка в объект и  $\sim 1,2$  в области пика Брэгга. С учетом более высокой радиочувствительности делящихся клеток в  $G_2$ -фазе клеточного цикла эффективность облучения увеличивается до  $\sim 1,4$ .

The effectiveness of therapeutic proton beam on human cells is evaluated against the criterion of formation of chromosome aberrations in human blood lymphocytes. Both physical characteristics of protons (LET at the place of entry and in the modified Bragg peak region) and the biological factor: differences in the radiosensitivity of non-dividing cells of normal tissues along the beam path and dividing cells of tumors were taken into account. Proton RBE is  $\sim 1$  at the beam entry into the object and  $\sim 1.2$  in the Bragg peak region. Allowing for a higher radiosensitivity of dividing cells in the  $G_2$  phase of the cell cycle, irradiation effectiveness is found to increase up to  $\sim 1.4$ .

PACS: 87.53.-j; 87.55.-x

### **ВВЕДЕНИЕ**

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения онкологических заболеваний. По данным Онкологического центра РАМН, она рекомендуется в 50–70 % случаев заболевания как самостоятельно, так и в комбинации с другими методами лечения (хирургия и химиотерапия). Важнейшей задачей при ее проведении является минимизация повреждения нормальных тканей с максимальным поражением тканей опухоли. Протонная лучевая терапия — одно из наиболее перспективных и быстроразвивающихся направлений в современной ядерной медицине. Протоны обладают рядом преимуществ по сравнению с обычно используемыми электромагнитными видами излучений. При прохождении через биологические ткани они формируют треки, в пределах которых расходуют энергию на ионизацию и возбуждение атомов и молекул. Процесс сопровождается замедлением движения и уменьшением остаточной энергии частиц, что

обуславливает возрастание плотности ионизации с максимумом на конечном участке пробега в области пика Брэгга. Такая особенность их энерговыделения с реализацией «брэгговского максимума» в конце пробега создает условия для оптимального формирования дозы в опухолевых тканях. Возможность формирования протонных пучков разных размеров позволяет узконаправленно воздействовать непосредственно на опухоль и максимально повреждать ее клетки при облучении в области пика Брэгга с минимальным повреждением окружающих тканей и тканей по ходу пучка частиц до места локализации опухоли.

Такой терапевтический протонный пучок впервые в России был создан в ОИЯИ на синхротроне Лаборатории ядерных проблем им. В. П. Джелепова еще в 1967 г. и в течение длительного периода используется для проведения лучевой терапии [1].

В настоящее время не вызывает сомнения ведущая роль структурных нарушений хромосом в развитии лучевых повреждений и постлучевой гибели клеток [2, 3]. В связи с этим представляется важным исследовать повреждения хромосомного аппарата клеток человека при облучении протонами терапевтического пучка. В качестве модели использована культура лимфоцитов периферической крови человека. Они являются удобным объектом исследования в первую очередь вследствие простоты и доступности получения исходного материала и достаточно высокой концентрации клеток (до нескольких миллионов в 1 мл крови). Кроме того, в периферической крови лимфоциты не делятся и находятся в состоянии покоя или пресинтеза ДНК ( $G_0$ - и  $G_1$ -фазы клеточного цикла). Таким образом, они представляют собой синхронизированные естественным образом популяции клеток. Однако при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) в условиях культивирования малые Т-лимфоциты способны к трансформации и последующему митотическому делению. При этом для них характерен низкий спонтанный уровень хромосомных аберраций (в среднем 0,01–0,02 на клетку).

Тест-система для цитогенетического анализа хромосом человека была разработана в начале 60-х гг. XX в. [4, 5]. Важным обстоятельством является то, что выход аберраций хромосом в лимфоцитах крови человека практически совпадает при воздействии ионизирующими излучениями *in vitro* и *in vivo* [6–8]. Кроме того, такие исследования позволяют избежать вынужденных экстраполяций и оговорок, неизбежно возникающих при интерпретации результатов, полученных на других объектах. Как известно, эта тест-система рекомендована Всемирной организацией здравоохранения для исследования влияния неблагоприятных факторов окружающей среды на клетки человека и на наследственность.

Целью проведенного нами исследования является оценка по цитогенетическим показателям эффективности облучения клеток человека протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование лимфоцитов.** В работе использована кровь 11 здоровых доноров (мужчин и женщин) в возрасте 25–45 лет. Для исследования повреждений хромосом, индуцированных протонами в лимфоцитах в  $G_0$ -фазе клеточного цикла, облученные образцы цельной крови (0,5 мл) переносили в пробирки с 4,5 мл питательной среды. Лим-

фоциты культивировали по общепринятой методике [4, 5] в полной питательной среде (ППС): 80 % RPMI-1640, 20 % фетальной сыворотки теленка, 1 % глутамина, антибиотика пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Для стимуляции лимфоцитов к делению в среду добавляли 15 мкг/мл ФГА. Клетки фиксировали через 48–50 ч после облучения. При изучении радиочувствительности лимфоцитов в разных фазах клеточного цикла их культивировали в ППС до облучения в течение 12–15 ч ( $G_1$ -фаза), 30–32 ч (S-фаза), 48 ч ( $G_2$ -фаза). Продолжительность культивирования  $G_1$ - и S-облученных лимфоцитов составляла 50–52 ч,  $G_2$ -облученных — 57–58 ч. Для выявления первых постлучевых митозов в питательную среду был добавлен раствор бромдезоксисуридина (BrdU) в концентрации 20 мкМ. Последующую обработку и приготовление препаратов клеток также проводили по общепринятой методике. За два часа до фиксации клеток в суспензию добавляли раствор колцемида по 0,8 мкг/мл. Препараты лимфоцитов готовили напылением их суспензии на влажные стекла, высушивали на воздухе. Окрашивание клеток проводили по ФПГ-методике (флюоресценция + гимза) [9]. Дополнительно исследовали хромосомные нарушения в  $G_2$ -облученных лимфоцитах методом РСС (преждевременной конденсации хромосом). Для этого в культуру лимфоцитов добавляли каликулин-А (50 нМ) за 1,5 ч до фиксации клеток [10, 11].

Анализ поврежденных хромосом в лимфоцитах проводили по общепринятой классификации [12, 13]. Учитывали все виды аберраций хромосом, выявляемых без кариотипирования: парные ацентрические фрагменты, интерстициальные делеции, дицентрики, полицентрики, кольца центрические и ацентрические, хроматидные фрагменты и обмены.

**Облучение лимфоцитов.** Облучение клеток проводили протонами терапевтического пучка, подготовленного для проведения лучевой терапии пациентов. Пучок протонов был сформирован в результате замедления генерируемых ускорителем протонов с энергией 660 МэВ в углеродных блоках до средней энергии 170 МэВ [14]. Поперечный размер пучка составляет  $7 \times 7$  см (по 90 %-й изодозе). Среднее значение ЛПЭ протонов равно 0,49–0,50 кэВ/мкм. Поскольку протяженность пика Брэгга исходного протонного пучка при прохождении через вещество не превосходит 8 мм эквивалента воды, то этого недостаточно для облучения реальных мишеней размером в несколько сантиметров. Поэтому было использовано специальное устройство — гребенчатый фильтр, который позволил расширить пик Брэгга (по 90 %-му уровню мощности дозы) до 2 см. Энергетическое распределение замедленных протонов в области такого модифицированного пика Брэгга является спектром от 0 до 30 МэВ. При этом спектр ЛПЭ частиц простирается до  $\sim 100$  кэВ/мкм.

Клетки облучали в двух точках глубинного дозного распределения. Пробы цельной крови помещали на входе пучка протонов в объект, что соответствует облучению окружающих нормальных тканей по ходу пучка до места локализации опухоли. Мощность дозы составляла около 0,7 Гр/мин. Культуры лимфоцитов в разных фазах клеточного цикла облучали протонами в области модифицированного пика Брэгга, что соответствует облучению непосредственно тканей опухолей. Образцы находились в пластиковых пробирках диаметром 1,5 см. Мощность дозы протонов в области модифицированного пика Брэгга составляла  $\sim 1,3$  Гр/мин. Для сравнения было также проведено  $\gamma$ -облучение  $^{60}\text{Co}$  лимфоцитов на аппарате для дистанционной лучевой терапии РОКУС-М с мощностью дозы 0,9 Гр/мин. Во всех экспериментах клетки облучали в диапазоне доз от 0,5–1 до 5 Гр.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было проведено исследование [15] хромосомных нарушений в лимфоцитах крови человека после облучения протонами терапевтического пучка с энергией 170 МэВ образцов цельной крови. В ней, как известно, лимфоциты находятся в неделящемся состоянии в  $G_0$ -фазе клеточного цикла, как и клетки нормальных тканей по ходу пучка частиц до места локализации опухоли. Оценка величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов по цитогенетическим тестам показала, что она близка к 1 в диапазоне терапевтически значимых доз (1–4 Гр). При облучении образцов крови протонами в области пика Брэгга, где непосредственно проводится облучение опухолей, величина ОБЭ повышалась до 1,2–1,25.

Однако опухоли в отличие от нормальных тканей характеризуются процессами деления клеток. Как известно, клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла, различаются по радиочувствительности: неделящиеся клетки в  $G_0$ -фазе являются наиболее резистентными к воздействию излучений, а делящиеся клетки в  $G_2$ -фазе клеточного цикла характеризуются наибольшей радиочувствительностью [16]. В силу асинхронности популяции опухолевых клеток некоторая их часть должна быть более радиочувствительной, чем клетки нормальных тканей и, соответственно, облученные нами лимфоциты, находящиеся в  $G_0$ -стадии клеточного цикла. Для выявления влияния не только физического, но и биологического фактора при проведении протонной терапии нами исследованы повреждения хромосом в лимфоцитах, облученных в сроки, соответствующие прохождению ими разных фаз клеточного цикла.

В ходе экспериментов по облучению культуры стимулированных к делению лимфоцитов было обнаружено, что при общепринятом 50-часовом сроке фиксации лимфоцитов, облученных в  $G_2$ -фазе клеточного цикла, на препаратах встречаются лишь единичные делящиеся клетки. Известно, что облучение клеток человека и млекопитающих приводит к задержке вступления их в деление и нарушению прохождения по клеточному циклу [17–20]. Задержка вступления в деление сказывается прежде всего на митотической активности клеток. Проведенный анализ выявил глубокую задержку деления лимфоцитов, облученных в  $G_2$ -стадии клеточного цикла. Для клеток, облученных в других фазах, она была не столь выражена, однако с увеличением дозы также отмечается снижение митотической активности. Оно наименее выражено у лимфоцитов, облученных в  $G_0$ -фазе клеточного цикла. Возникла необходимость определить оптимальный срок фиксации клеток для исследования аберраций хромосом в  $G_2$ -облученных лимфоцитах. В серии экспериментов клетки фиксировали в разные сроки после облучения. Значения митотического индекса повышались с увеличением продолжительности культивирования и становились практически равными значениям в контроле после 67-часового культивирования. Однако было отмечено появление клеток в последующих митозах, уровень которых повышался с увеличением продолжительности культивирования клеток. Поэтому был выбран 58-часовой срок фиксации  $G_2$ -облученных лимфоцитов (10 ч после облучения), когда основная их часть (~ 85 %) проходила первый постлучевой митоз. Аберрации хромосом учитывали в первых постлучевых митозах с однородно окрашенными хромосомами.

Цитогенетический анализ культивируемых лимфоцитов, облученных в разных фазах клеточного цикла протонами в области пика Брэгга, показал, что дозовая зависимость частоты образования клеток с хромосомными аберрациями, индуцированными в  $G_0$ - и  $G_1$ -фазах клеточного цикла, имеет линейный характер в диапазоне доз от 1 до 3 Гр

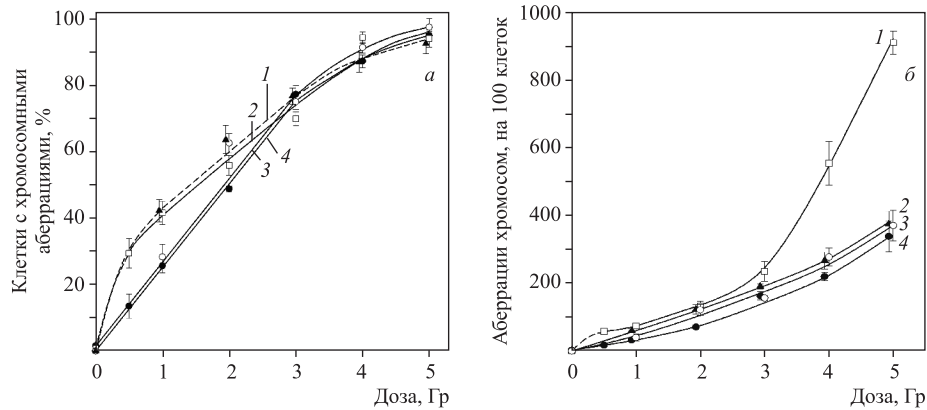


Рис. 1. Зависимость от дозы частоты образования лимфоцитов с хромосомными нарушениями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) после облучения в разных фазах клеточного цикла протонами терапевтического пучка в области пика Брэгга: □, 1 — G<sub>2</sub>-фаза; ▲, 2 — S-фаза; ○, 3 — G<sub>1</sub>-фаза; ●, 4 — G<sub>0</sub>-фаза

(рис. 1, а). На рисунке приведены средние значения данных, полученных при анализе образцов крови 5–8 доноров. При последующем увеличении дозы эффект снижался с насыщением на уровне 95–99% поврежденных клеток. После облучения клеток в G<sub>2</sub>- и S-фазах клеточного цикла эффект существенно повышался только при относительно невысоких дозах воздействия (до примерно 1,5 Гр) и в последующем быстро выходил на уровень насыщения в ~ 95% поврежденных клеток.

Что касается общего числа возникающих в лимфоцитах aberrаций хромосом, то оно характеризуется степенной зависимостью от дозы (рис. 1, б), приближающейся к линейно-квадратичной. Отмечается постепенное повышение уровней эффектов по мере прохождения лимфоцитами G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S-фаз клеточного цикла. Оно наиболее выражено при облучении лимфоцитов в G<sub>2</sub>-фаза, особенно при высоких дозах воздействия 4 и 5 Гр. Рядом авторов было показано [17–20], что облучение приводит к задержке вступления в деление клеток, особенно тяжело поврежденных высокими дозами излучений. При облучении лимфоцитов в G<sub>2</sub>-фаза клеточного цикла протонами в области пика Брэгга нами отмечено (рис. 2) существенное увеличение доли клеток со множественными aberrациями хромосом ( $\geq 3$ ) по сравнению с воздействием протонов исходного пучка на лимфоциты в G<sub>0</sub>-фаза. По данным ряда авторов [21–23], тяжело поврежденные клетки могут вообще не достигнуть митоза и, соответственно, не быть учтенными при анализе общепринятым метафазным методом. Это также подтверждают результаты дополнительно проведенного нами исследования цитогенетических эффектов методом РСС. Этот метод позволяет выявлять разрывы хромосом непосредственно после облучения. На рис. 3 видно, что частота возникающих при облучении разрывов хромосом может по крайней мере в несколько раз превышать уровень выявляемых метафазным методом разрывов хромосом, что особенно выражено при высоких дозах облучения. Отсюда можно заключить, что повреждающая способность протонов терапевтического пучка в области пика Брэгга при облучении пролиферирующих клеток опухоли может оказаться даже более высокой, чем при оценке общепринятым метафазным методом.

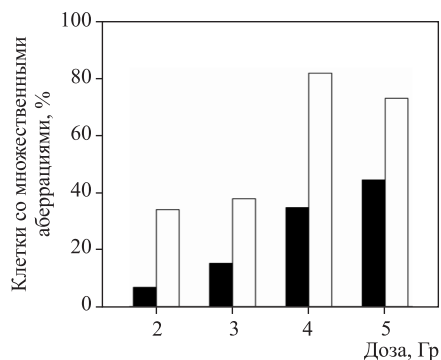


Рис. 2. Частота образования лимфоцитов со множественными абберациями хромосом ( $\geq 3$ ), индуцированными в  $G_0$ -фазе клеточного цикла протонами с энергией 170 МэВ (черные участки) и в  $G_2$ -фазе протонами в области пика Брэгга (белые участки)

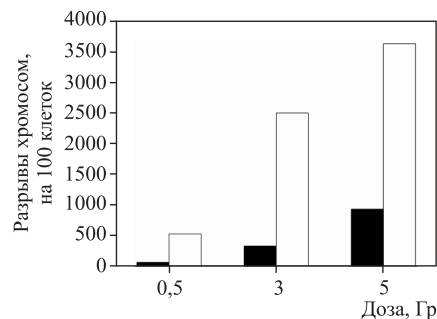


Рис. 3. Частота возникновения разрывов хромосом, выявляемых РСС (белые участки) и метафазным (черные участки) методами, в лимфоцитах, облученных в  $G_2$ -фазе клеточного цикла протонами в области пика Брэгга

Цитогенетический анализ лимфоцитов, облученных в  $G_0$ - и  $G_2$ -фазах клеточного цикла, свидетельствует о существенном изменении соотношений между разными видами образующихся хромосомных аббераций. Увеличение частоты их образования в  $G_2$ -облученных лимфоцитах определяется прежде всего повышением уровня аббераций хроматидного типа. На их долю приходится до 60% от общего числа аббераций хромосом, тогда как в  $G_0$ -облученных лимфоцитах их вклад не превышает 10%. При этом наблюдается выраженный фрагментоз хромосом в  $G_2$ -облученных лимфоцитах (до 65–80% от общего числа аббераций), который определяется главным образом высокой частотой образования хроматидных фрагментов. Выявлены существенные изменения в соотношении образования аббераций хромосом обменного типа (рис. 4). Для  $G_0$ -облученных лимфоцитов характерен высокий уровень дицентриков и колец центрических (до 50% от общего числа образующихся хромосомных аббераций) и встречаются лишь единичные хроматидные обмены. В  $G_2$ -облученных клетках отмечается существенное повышение уровня хроматидных обменных аббераций при снижении образования дицентриков и колец. При этом они практически не отличаются по частоте образования обменных аббераций обоих типов (10–12% от общего числа).

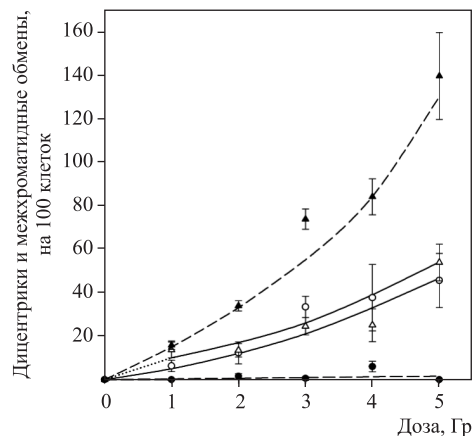


Рис. 4. Дозовая зависимость частоты образования дицентриков (▲, 1 и △, 2) и межхроматидных обменов (●, 3 и ○, 4) в лимфоцитах, облученных протонами в области пика Брэгга в  $G_0$ - и  $G_2$ -фазах клеточного цикла (штриховые и сплошные линии соответственно)

Таблица 1. Частота образования хромосомных нарушений в лимфоцитах крови человека, облученных в G<sub>0</sub>- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла протонами в области пика Брэгга

Фаза клеточного цикла	Доноры	Число клеток	Клетки с хромосомными аберрациями, %					Общее число аберраций хромосомом, на 100 клеток					
			1 Гр	2 Гр	3 Гр	4 Гр	5 Гр	1 Гр	2 Гр	3 Гр	4 Гр	5 Гр	
G <sub>0</sub>	1	600	25,0	52,0	86,0		98,0	31,0	82,5	196,0			470,0
	2	500	27,0	47,0	78,0			34,0	63,0	170,0			
	3	400	18,0	47,0	81,0			19,0	62,0	184,0			
	4	500	29,0	49,0	74,0	85,0	92,0	44,0	68,0	147,0	213,0		276,0
	5	500	23,5	48,0	81,0	91,0		285,0	68,0	192,0			
	6	500	36,0	51,0	64,0	90,0	96,0	42,0	76,0	103,0	193,0		297,0
	7	500	30,0	46,0	77,0	83,0	94,0	45,0	70,0	146,0	219,0		306,0
	Среднее (взвешенное)	3500	25,6±2,1	48,8±0,8	77,3±2,6	87,3±1,9	95±1,3	32,4±3,6	70,5±2,7	162,6±12,5	219,3±12,3		337,3±44,7
G <sub>2</sub>	4	550	37,0	55,4	76,4	91,0	90,0	81,0	164,6	347,9	682,0		945,0
	5	223	50,0	45,7	63,0			77,8	128,6	218,0			
	2	201	51,5	58,0				86,1	86,0				
	10	545	40,0	64,0	76,0	95,0	97,9	69,5	150,0	297,0	487,0		834,0
	11	392	34,0	57,0	74,0	97,0	97,6	46,0	127,0	311,0	490,0		921,4
	8	200			65,0					149,0			
	9	100			66,0					166,0			
	Среднее (взвешенное)	2317	41,6±3,5	55,9±2,9	69,9±2,1	94,3±1,7	94,1±2,5	73,3±7,0	133,1±13,3	234,5±29,4	553,0±64,5		908,3±33,8

Нами проведен расчет эффективности воздействия протонов терапевтического пучка в области модифицированного пика Брэгга с учетом вклада в эффект более радиочувствительных клеток. Так как для лимфоцитов, облученных в  $G_0$ -,  $G_1$ - и  $S$ -фазах клеточного цикла, не отмечалось существенных различий, то оценку вклада в эффект проводили только с учетом фракции наиболее радиочувствительных лимфоцитов, находившихся во время облучения в  $G_2$ -фазе клеточного цикла. Величина фракции радиочувствительных клеток нами была принята пропорциональной продолжительности  $G_2$ -фазы лимфоцитов в клеточном цикле. Как известно [24], продолжительность  $G_2$ -фазы составляет 6 ч в клеточном цикле лимфоцитов, равном 42 ч. Таким образом, ее доля 14,3%. При расчете эффективности воздействия протонов в области пика Брэгга к значениям частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями и общего числа aberrаций хромосом, индуцированных облучением в  $G_0$ -фазе клеточного цикла (табл. 1), добавлена 14,3%-я

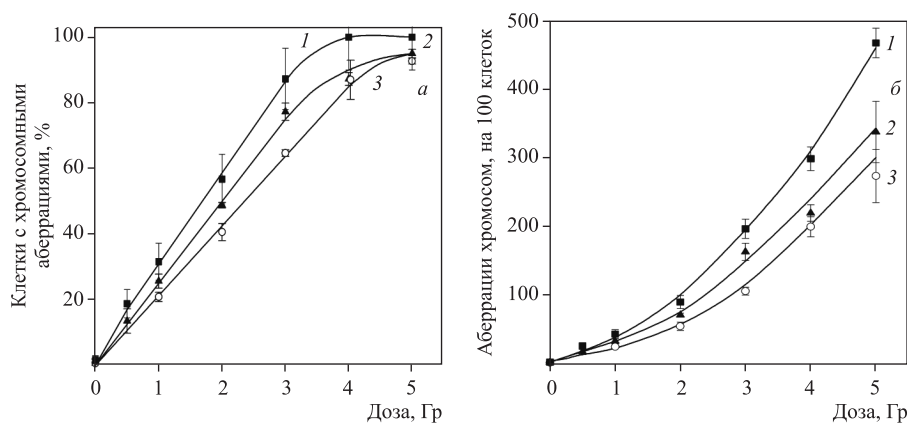


Рис. 5. Зависимость частоты образования лимфоцитов с хромосомными aberrациями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) от дозы облучения протонами терапевтического пучка: ■, 1 — расчетная кривая с учетом вклада в эффект доли радиочувствительной фракции  $G_2$ -лимфоцитов, облученных в области пика Брэгга; ▲, 2 — облучение  $G_0$ -лимфоцитов в области пика Брэгга; ○, 3 — облучение  $G_0$ -лимфоцитов протонами с энергией 170 МэВ

Таблица 2. Расчет коэффициентов эффективности облучения протонами в области пика Брэгга с учетом вклада в эффект доли  $G_2$ -облученных лимфоцитов

Клетки с хромосомными aberrациями			Общее число aberrаций хромосом		
Доза, Гр		Коэффициент эффективности	Доза, Гр		Коэффициент эффективности
Протоны с энергией 170 МэВ	Протоны в области пика Брэгга (расчетная кривая)		Протоны с энергией 170 МэВ	Протоны в области пика Брэгга (расчетная кривая)	
1,5	1,0	1,5	1,7	1,7	1,0
2,7	2,0	1,4	2,7	1,3	2,0
4,4	3,0	1,5	4,3	1,4	3,0
5,2	4,0	1,3	5,5	1,4	4,0
Среднее		1,4±0,1	Среднее		1,4±0,1



доля от соответствующих эффектов, полученных для  $G_2$ -облученных лимфоцитов. По этим данным построены расчетные кривые, приведенные на рис. 5, *а* и *б*. Для сравнения показаны соответствующие кривые для лимфоцитов после облучения в  $G_0$ -фазе клеточного цикла протонами с энергией 170 МэВ.

По аналогии с расчетом величины ОБЭ были получены коэффициенты эффективности облучения протонами в области пика Брэгга с учетом вклада в эффект более радиочувствительных  $G_2$ -лимфоцитов. Сравнение проведено с воздействием протонами с энергией 170 МэВ на неделящиеся клетки в  $G_0$ -фазе клеточного цикла, что соответствует облучению нормальных тканей на пути пучка до места локализации опухоли при протонной терапии. Для расчета коэффициентов эффективности использована программа САВАС [25]: по соотношению доз при равных уровнях эффектов (табл. 2) коэффициент эффективности облучения в области пика Брэгга повышается в среднем до  $\sim 1,4$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования могут способствовать пониманию процессов формирования хромосомных повреждений в клетках опухолей и нормальных тканей, приводящих к гибели клеток, при проведении лучевой терапии протонами высоких энергий. Вместе с тем появляется возможность уменьшения дозовой нагрузки на нормальные ткани без снижения качества лечения. Выявленные количественные и качественные закономерности образования повреждений хромосом в клетках человека могут быть полезными при решении таких вопросов, как расчет оптимальных доз, планирование курса лучевой терапии.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность профессору Е. А. Красавину за полезные обсуждения и поддержку работы и М. Деперас-Каминьской за помощь в проведении экспериментов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аганов А. В. и др.* Методика трехмерной конформной протонной лучевой терапии // Письма в ЭЧАЯ. 2005. Т. 2, № 6(129). С. 80–86.
2. *Buckton K.E. et al.* Chromosome Aberrations in Irradiated Ankylosing Spondylitis Patients // Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man / Ed. by H. Evans and D. Lloyd. Edinburgh Univ. Press, 1978. P. 142–150.
3. *Norman A. et al.* Elimination of Chromosome Aberrations from Human Lymphocytes // Blood. 1966. V. 27. P. 706–714.
4. *Moorhead P.S. et al.* Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Peripheral Blood // Exp. Cell Res. 1960. V. 20. P. 613–616.
5. *Hangerford D.A.* Leukocytes Cultured from Small Inocula of Whole Blood and the Preparation of Metaphase Chromosomes by Treatment with Hypotonic KCl // Stain Technol. 1965. V. 40. P. 333–338.

6. Bajerska A., Liniecki J. The Yield of Chromosomal Aberrations in Rabbit Leukocytes after Irradiation *in vitro* and *in vivo* // Mut. Res. 1975. V. 27. P. 271–281.
7. Brewen J. G., Gengozian N. Radiation-Induced Human Chromosome Aberrations. II. Human *in vitro* Irradiation Compared to *in vitro* and *in vivo* Irradiation of Marmoset Leukocytes // Mut. Res. 1971. V. 13. P. 383–391.
8. Buckton K. E. et al. Further Studies on Chromosome Aberrations: Production after Whole Body Irradiation in Man // Intern. J. Rad. Biol. 1971. V. 19. P. 369–378.
9. Perry P., Wolf S. New Giemsa Method for Differential Staining of Sister Chromatids // Nature. 1974. V. 251. P. 156–157.
10. Durante M., Furusawa Y., Gotoh E. A Simple Method for Simultaneous Interphase–Metaphase Chromosome Analysis in Biodosimetry // Intern. J. Rad. Biol. 1998. V. 8211. P. 462.
11. Bryant P. E., Mozdarani H. A Comparison of G<sub>2</sub> Phase Radiation-Induced Chromatid Break Kinetics Using Calyculin-PCC with Those Obtained Using Colcemid Block // Mutagenesis Sep. 2007. V. 22(5). P. 359–362.
12. Бочков В. П. Хромосомы человека и облучение. М.: Атомиздат, 1971. 168 с.
13. Savage R. J. Classification and Relationships of Induced Chromosomal Structural Changes // J. Med. Gen. 1976. V. 13(2). P. 103–122.
14. Молоканов А. Г. Формирование радиотерапевтического протонного пучка фазотрона ЛЯП ОИЯИ // Вопр. атомной науки и техники. 2008. № 5(50). С. 146–149.
15. Говорун Р. Д. и др. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований // Письма в ЭЧАЯ. 2006. Т. 3, № 1(130). С. 92–100.
16. Севаньяев А. В. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле. М.: Энергоатомиздат, 1987. 159 с.
17. Lloyd D. C. et al. The Effect of X-Ray Induced Mitotic Delay on Chromosome Aberration Yields in Human Lymphocytes // Mut. Res. 1977. V. 42. P. 401–412.
18. Geard C. R. Initial Changes in All Cycle Progression of Chinese Hamster V-79 Cells Induced by High-LET Charged Particles // Rad. Res. 1980. V. 83. P. 696–709.
19. Collin-d'Hooghe M. et al. Comparative Effects of <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Rays and Neon and Helium Ions on Cycle Duration and Division Probability of EMT-6 Cells. A Time-Lapse Cinematography Study // Intern. J. Rad. Biol. 1981. V. 39. P. 297–306.
20. Lucke-Huhle C., Hieber L., Wegner R.-D. Caffeine-Mediated Release of Alpha-Radiation-Induced G<sub>2</sub> Arrest Increases the Yield of Chromosome Aberration // Intern. J. Rad. Biol. 1983. V. 43. P. 123–132.
21. Говорун Р. Д. и др. Действие тяжелых ионов на клетки млекопитающих. Сообщение 1: Цитогенетические эффекты при облучении клеток китайского хомячка ускоренными ионами гелия, углерода и неона // Радиобиология. 1982. Т. 22, вып. 5. С. 648–653.
22. Ritter S. et al. Influence of Radiation Quality on the Expression of Chromosomal Damages // Intern. J. Rad. Biol. 1994. V. 66. P. 625–628.

1006 *Зайцева Е. М. и др.*

23. *Nasonova E., Ritter S.* Cytogenetic Effects of Densely Ionising Radiation in Human Lymphocytes: Impact of Cell Cycle Delays // *Cytogen. Genome Res.* 2004. V. 104(1–4). P. 216–220.
24. *Bender M. A., Prescott D. M.* DNA Synthesis and Mitosis in Cultures of Human Peripheral Leukocytes // *Exp. Cell Res.* 1962. V. 27, No. 1. P. 221–229.
25. *Deperas J. et al.* CABAS: a Freely Available PC Program for Fitting Calibration Curves in Chromosome Aberration Dosimetry // *Rad. Protection Dosimetry.* 2007. V. 124, No. 2. P. 115–123.

Получено 23 ноября 2010 г.