

УДК 577.346 + 575.224.23

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ С  
РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ  
НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

*Е. А. Красавин, Р. Д. Говорун, Н. Л. Шмакова,  
И. В. Кошлань, Е. А. Насонова, М. В. Репин*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

ВВЕДЕНИЕ	1484
МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	1485
ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛО- ВЕКА	
ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ	1497
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕ- НИЯ	1501
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	1508

УДК 577.346 + 575.224.23

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Е. А. Красавин, Р. Д. Говорун, Н. Л. Шмакова,  
И. В. Кошлань, Е. А. Насонова, М. В. Репин*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Исследована индукция HPRT-мутаций и выживаемость клеток китайского хомячка при облучении ускоренными ионами  $^4\text{He}$  и  $^{12}\text{C}$  (ЛПЭ 20–360 кэВ/мкм) и  $\gamma$ -квантами. Выявлена степенная зависимость частоты возникновения мутаций от дозы излучений с ЛПЭ до 50 кэВ/мкм, которая модифицируется в линейную при более высоких ЛПЭ. ОБЭ тяжелых заряженных частиц увеличивается с ростом ЛПЭ ионов и достигает максимальных значений при 80–100 кэВ/мкм. Коэффициенты ОБЭ по индукции мутаций и хромосомных aberrаций составляют 4,8–5,0 и двукратно превышают значения по критерию выживаемости клеток (2,3–2,9). Отмечена высокая гетерогенность и хромосомная нестабильность по анеуплоидии и уровням хромосомных aberrаций у спонтанных мутантов и индуцированных протонами (ЛПЭ  $\sim 0,218$  кэВ/мкм), ионами  $^{14}\text{N}$  (ЛПЭ  $\sim 77$  кэВ/мкм) и  $\gamma$ -квантами. Хромосомная нестабильность была наибольшей у спонтанных мутантов и уменьшалась с увеличением ЛПЭ излучений. Обсуждается «метаболическая гипотеза» хромосомной нестабильности. Изучены закономерности образования нестабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека после облучения протонами, ионами  $^{12}\text{C}$ ,  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{14}\text{N}$  (ЛПЭ  $\sim 0,218$ ;  $\sim 12$ ; 42,7 и  $\sim 77$  кэВ/мкм соответственно) и  $\gamma$ -квантами. Частота aberrаций возросла с увеличением дозы и ЛПЭ излучений. Коэффициенты ОБЭ тяжелых заряженных частиц составили 1,0; 1,2–1,3; 1,4–1,7 и 2,0–2,2 соответственно. FISH-анализ стабильных aberrаций хромосом (транслокаций) выявил высокую эффективность ионов  $^{14}\text{N}$  (ОБЭ  $\sim 3,0$ ). По всем цитогенетическим тестам не отмечено существенных отличий по эффективности между протонами и  $\gamma$ -квантами. Изучена зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями от дозы  $\gamma$ -облучения лимфоцитов человека, клеток китайского хомячка и меланомы человека и их способность к адаптивному ответу в диапазоне доз 0,01–1 Гр. Для всех типов клеток выявлен нелинейный характер зависимости частоты образования клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения, характеризующийся гиперчувствительностью клеток при дозах 0,01–0,2 Гр и индуцированной радиорезистентностью при дозах выше 0,5 Гр. Обсуждаются возможные механизмы явлений.

The induction of HPRT-mutations and the survival of Chinese hamster cells were studied after exposure to accelerated  $^4\text{He}$  and  $^{12}\text{C}$  ions with various LET (20–360 keV/ $\mu\text{m}$ ) and to  $\gamma$  rays. The linear-quadratic dose-effect curves were observed after exposure to radiation with LET up to  $\sim 50$  keV/ $\mu\text{m}$ . They were modified to linear relationship with growing of LET. The RBE (LET) dependences have a local maximum at 80–100 keV/ $\mu\text{m}$ . The RBE values for the induction of mutations and chromosome aberrations were 4.8–5.0. These values are  $\sim 2$  times larger than for the cell survival (2.3–2.9). The high heterogeneity and the chromosome instability in aneuploidy and chromosome aberration levels were observed in both spontaneous HPRT-mutants and induced ones by protons (LET  $\sim 0.218$  keV/ $\mu\text{m}$ ),  $^{14}\text{N}$  ions (LET  $\sim 77$  keV/ $\mu\text{m}$ ) and  $\gamma$  rays. The chromosomal instability was highest among spontaneous mutants and decreased with increasing of

LET. The «metabolic hypothesis» for chromosome instability is discussed. The regularities of unstable chromosome aberration formation in human lymphocytes were studied after exposure to  $\gamma$  rays, protons and  $^{12}\text{C}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ , and  $^{14}\text{N}$  ions (LET  $\sim 0.218$ ;  $\sim 12$ ; 42.7 and  $\sim 77$  keV/ $\mu\text{m}$ , respectively). The frequency of chromosome aberrations increases with growing of the doses and radiation LET. The RBE values were 1.0 for protons; 1.2–1.3 for  $^{12}\text{C}$ ; 1.4–1.7 for  $^{24}\text{Mg}$ , and 2.0–2.2 for  $^{14}\text{N}$  ions. The dose–effect dependences for chromosome aberrations and adaptive response have been investigated in human lymphocytes, Chinese hamster cells and human melanome cells after  $\gamma$  irradiation at the doses of 0.01–1 Gy. Nonlinear dose–effect dependence for cells with aberrations was revealed for all types of cells. The hypersensitivity at the doses of 0.01–0.2 Gy and inducible radioresistance at the doses above 0.5 Gy were observed. The possible mechanisms that were involved in this phenomenon are discussed.

## ВВЕДЕНИЕ

Нормирование индивидуального облучения персонала, работающего в смешанных полях ионизирующих излучений, обеспечение радиационной безопасности длительных космических полетов, решение многих других практических вопросов в значительной мере связано с проблемой стохастических радиационно-индуцированных эффектов в организме, в том числе обусловленных изменениями генетических структур. К ним прежде всего относят генные и хромосомные мутации, и в этой связи исследование закономерностей и механизмов радиационно-индуцированных мутаций является крайне важной задачей, поскольку некоторые из них инициируют злокачественную трансформацию клеток и ведут к развитию опухолевых заболеваний.

Ядерно-физические установки, генерирующие излучения с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ), представляют собой весьма удобный инструмент для решения вопросов индуцированного мутагенеза и, в общем виде, проблемы стохастических радиационно-индуцированных эффектов. Мутагенное действие плотноионизирующих излучений, в особенности разных видов ускоренных тяжелых ионов, остается наименее изученным. Прежде всего это касается механизмов возникновения мутаций в клетках млекопитающих и человека. Проведение такого рода исследований требует соответствующей ускорительной техники для получения моноэнергетических пучков тяжелых заряженных частиц. Ядерно-физические установки Объединенного института ядерных исследований предоставляют широкие возможности для изучения генетического действия излучений с разными физическими характеристиками. В представленной работе изложены результаты, полученные в последние годы на различных ускорителях тяжелых ионов ОИЯИ.

Центральной среди этих задач остается проблема генетического действия малых доз облучения. Проведение оценок воздействия излучений разного качества на клетки живых организмов является чрезвычайно важным для прогнозирования канцерогенного риска облучения. Такого рода прогнозирование, осуществляемое в настоящее время путем экстраполяции эффек-

тов, индуцируемых высокими дозами, в область низких доз, как известно, зависит от модели, в рамках которой проводится экстраполяция. Полученные в последние годы экспериментальные данные вступают в противоречие с общепринятой линейной концепцией. Представленные в настоящей работе результаты исследований цитогенетических эффектов малых доз облучения в клетках млекопитающих и человека, индуцированных  $\gamma$ -квантами, также свидетельствуют о нелинейном характере зависимости доза–эффект. Важную информацию о механизмах, обуславливающих это обстоятельство, могут дать эксперименты с ускоренными тяжелыми ионами в широком диапазоне значений ЛПЭ. Такую возможность предоставляет нуклотрон ОИЯИ, на котором и планируются в настоящее время эксперименты, нацеленные на выяснение механизмов биологического действия малых доз облучения.

## **1. МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Мутагенное действие ионизирующих излучений на клетки млекопитающих и человека представляет собой одну из важнейших, но все еще слабо изученных проблем радиобиологии и радиационной генетики. Прежде всего это относится к воздействию излучений разного качества, и в особенности тяжелых ионов. Задача изучения мутагенного действия ионизирующих излучений на клетки млекопитающих и человека весьма сложна и требует создания новых методов и использования различных подходов для ее решения. В последние десятилетия разработан ряд методов (ПЦР, блот-анализ, FISH) и тест-систем для оценки мутагенных эффектов излучений и ДНК-тропных химических агентов.

Физические характеристики использованных в исследовании видов излучения приведены в табл. 1. Как видно, величины ЛПЭ излучений охватывают несколько порядков.

**1.1. Летальное и мутагенное действие излучений с разной величиной ЛПЭ.** Целью настоящих исследований являлось изучение закономерностей индукции мутаций в HPRT-гене клеток млекопитающих при действии излучений широкого диапазона значений ЛПЭ и цитогенетических характеристик HPRT-мутантных субклонов, выращенных из одиночных клеток, сохраняющих возникшие в них HPRT-мутации в последующих поколениях. В работе использованы культуры клеток китайского хомячка линий V-79 и FAF28 (клон 431). Клетки культивировали при температуре 37 °C в стандартной среде (среда Игла или смесь сред 199 и Игла (1:1)) с добавлением фетальной сыворотки теленка (10%), глутамина (1%) и антибиотиков пенициллина и стрептомицина. После облучения клетки высевали на стандартную питательную среду на «период экспрессии» мутаций (4 сут), затем пересевали на се-

Таблица 1. Физические характеристики излучений

Вид излучения	Источник излучения	Энергия частиц	ЛПЭ, кэВ/мкм	Доза, Гр
$\gamma$ -кванты $^{60}\text{Co}$	Установка «Рокус»	1,1–1,3 МэВ	~ 0,3	1–10
Протоны	Синхрофазотрон	1 ГэВ	0,218	1–3,6
$^4\text{He}$	Ускоритель У-200	8,35 МэВ/нуклон	20	1–4
$^4\text{He}$	»	2,8 »	50	1–4
$^4\text{He}$	»	1,58 »	78	1–4
$^{12}\text{C}$	»	7,0 »	214	1–4
$^{12}\text{C}$	»	3,3 »	367	1–4
$^{14}\text{N}$	Ускоритель У-400М	50 »	~ 77	1–3
$^{12}\text{C}$	Нуклотрон	473 »	~ 12	1,35–5,3
$^{24}\text{Mg}$	»	500 »	42,7	0,36–3,6

лективную среду с 6-тиогуанином (6-ТГ, 1 мкг/мл). Выявление клеток с мутацией гена HPRT (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы) позволяет осуществлять тест-система, основанная на резистентности мутантных клеток к токсичному для нормальных клеток пуриновому аналогу 6-ТГ [1]. Ген HPRT расположен в X-хромосоме, составляет 35–45 kb геномной ДНК в клетках млекопитающих и содержит 9 экзонов. В клетках китайского хомячка на их долю приходится около 2,5 kb геномной ДНК [2–5]. Ген кодирует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу (hprt), который катализирует конденсацию 5'-фосфорибозил-1-пирофосфата и пуриновых оснований гипоксантина и гуанина с образованием соответствующих мононуклеотидов, утилизируемых клетками при синтезе ДНК. В селективной среде с 6-ТГ выживают и образуют колонии только клетки с мутациями этого гена, приводящими к нарушению его активности или полному ингибированию и, соответственно, к нарушению синтеза фермента. Клетки прекращают утилизировать 6-ТГ, выживают и образуют колонии, что позволяет определить частоту мутаций. Кроме того, после выделения одиночных колоний и размножения их клеток были получены субклоновые культуры и приготовлены препараты их клеток, что позволило провести цитогенетический анализ мутантных субклонов метафазным методом по общепринятой методике.

Облучение клеток тяжелыми ионами и  $\gamma$ -квантами выявило высокое мутагенное действие этих видов излучения на клетки млекопитающих. Полученные данные по выживаемости клеток китайского хомячка линии FAF28 (клон 431) и частоте мутаций, индуцированных  $\gamma$ -квантами и ускоренными ионами  $^4\text{He}$  и  $^{12}\text{C}$  с разной величиной ЛПЭ, свидетельствуют о неоднозначном характере зависимостей индукции мутаций от дозы и ЛПЭ излучений (рис. 1). Как видно, при  $\gamma$ -облучении кривая доза–эффект по критерию индукции мутаций имеет ярко выраженный нелинейный (степенной) характер.

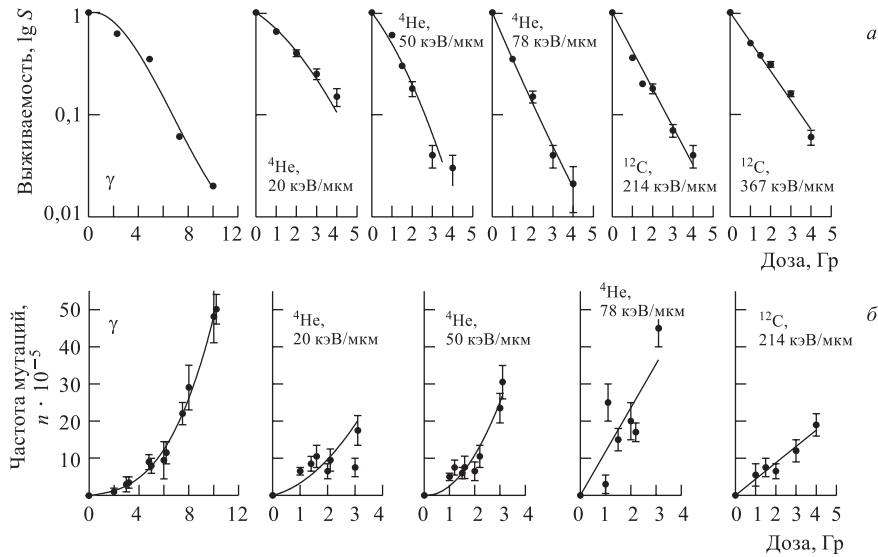


Рис. 1. Зависимость выживаемости (а) и частоты образования мутаций (б) от дозы облучения клеток китайского хомячка  $\gamma$ -квантами  ${}^{60}\text{Co}$  и ускоренными ионами  ${}^4\text{He}$  и  ${}^{12}\text{C}$  с разной величиной ЛПЭ

Нелинейность кривых наблюдается также при воздействии тяжелых ионов с ЛПЭ 20 и 50 кэВ/мкм. При более высоких значениях ЛПЭ излучений кривые индукции мутаций в зависимости от дозы модифицируются в линейные. Соответственно, кривые выживаемости являются сигмоидными и модифицируются в экспоненциальные.

Отсюда следует, что величина относительной биологической эффективности (ОБЭ) для исследованных тяжелых ионов по отношению к  $\gamma$ -квантам по этим тестам зависит от дозы. При использовании общепринятого способа оценки ОБЭ излучений по индукции мутаций на уровне начального наклона кривой доза-эффект ( $5-10 \cdot 10^{-5}$ ), а по выживаемости по величине  $D_0$  или по соотношению доз, соответствующих 10%-му уровню выживаемости клеток, полученные зависимости ОБЭ от ЛПЭ по этим тестам описываются кривыми с максимумом при  $\sim 80-100$  кэВ/мкм (см. рис. 2). Там же приведена полученная ранее кривая зависимости ОБЭ от ЛПЭ по индукции общего числа хромосомных aberrаций [6]. Как видно, величины ОБЭ по индукции мутаций и хромосомных aberrаций примерно в 2 раза выше, чем по выживаемости клеток. Эти данные коррелируют с результатами других авторов, проводивших исследования в близком диапазоне значений ЛПЭ излучений (ионы гелия, бора и азота) на клетках китайского хомячка [7] и фибробла-

стах человека [8]. Их оценки ОБЭ тяжелых ионов по мутагенному эффекту также более чем в 2 раза превышают ОБЭ по выживаемости клеток.

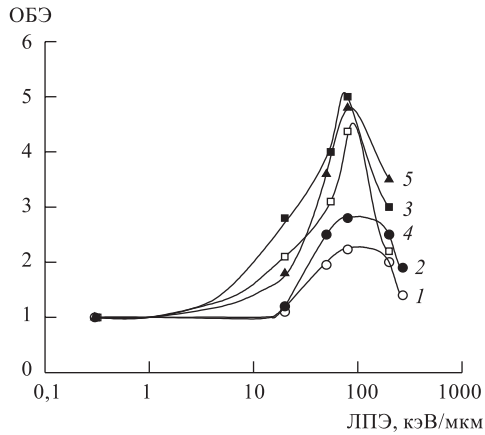


Рис. 2. Зависимость ОБЭ тяжелых ионов от ЛПЭ по выживаемости клеток китайского хомячка (1 — по  $D_0$ ; 2 — по 10%-му уровню выживаемости); по индукции мутаций (3 — по частоте мутаций  $5 \cdot 10^{-5}$ ; 4 — по частоте мутаций  $10 \cdot 10^{-5}$ ); по индукции хромосомных aberrаций [6] (5)

и леталей: мутации у бактерий являются в подавляющем большинстве точковыми и связаны главным образом с повреждениями оснований [11], летальный же эффект определяется индукцией двухнитевых разрывов (ДР) ДНК [12]. Полученный в нашем исследовании аналогичный характер зависимостей ОБЭ от ЛПЭ излучений по тестам индукции мутаций, хромосомных aberrаций и инактивации клеток может указывать на то, что в основе повреждений, приводящих к таким эффектам в клетках млекопитающих, лежат одни и те же события — ДР ДНК. Мы можем предполагать, что отмечаемый нами некоторый сдвиг кривой зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений в области значений ЛПЭ  $\sim 20$  кэВ/мкм по индукции мутаций в клетках млекопитающих по сравнению с летальным эффектом определяется повышением вклада точковых мутаций, а при более высоких ЛПЭ излучений превалируют мутации генов, связанные с возникновением разных типов делеций. Аналогичный характер кривых зависимостей ОБЭ от ЛПЭ по этим трем тестам может служить свидетельством того, что в основе этих эффектов в клетках млекопитающих лежат одни и те же повреждения, а именно ДР ДНК. Ими обуславливается возникновение в клетках хромосомных aberrаций и таких мутаций, как макро- и микроделеции генов.

Однако в области ЛПЭ излучений около 20 кэВ/мкм наблюдается некоторый сдвиг кривой по выходу мутаций к несколько повышенным значениям ОБЭ по сравнению с тестами инактивации клеток и образования хромосомных aberrаций. Как было показано ранее в исследованиях на бактериях [9, 10], максимум зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений по мутагенному эффекту был существенно сдвинут в область меньших значений ЛПЭ и соответствовал  $\sim 20$  кэВ/мкм, в то время как максимальные значения ОБЭ тяжелых ионов по летальному действию наблюдались при 80–90 кэВ/мкм. Это определялось разным характером молекулярных повреждений, лежащих в основе индуцируемых мутаций

О роли структурных повреждений ДНК в индукции мутаций генов в клетках млекопитающих и человека свидетельствуют накапливающиеся в литературе данные. Было показано [13–19], что наличие признака резистентности к 6-ТГ может обуславливаться разными типами мутаций, в том числе структурными, вплоть до полной делеции гена. При изучении молекулярной природы изменений гена HPRT при действии редкоизионизирующих излучений было показано, что большая часть мутантов имеет крупные делеции в этом локусе: 70–90 % мутантов клеток китайского хомячка [20], 50–85 % мутантов лимфоидных клеток ТК6 человека [21], 50–75 % мутантов Т-лимфоцитов человека [22, 23]. При исследовании расположения в хромосоме генных локусов, в которых были изучены радиационно-индуцированные делеции, показано, что они являются интерстициальными и, следовательно, индуцируются при возникновении по крайней мере двух ДР ДНК. Отмечено также появление хромосомных aberrаций в клетках мутантных субклонов [8, 24].

Данные анализа небольшого числа HPRT-мутантных клонов клеток китайского хомячка линии V-79, полученные рядом авторов при действии радиации разного качества [25, 26], свидетельствуют о том, что пропорция крупных делеций в локусе HPRT увеличивается при высоких ЛПЭ излучений (160–1600 кэВ/мкм). При более низких ЛПЭ (10–50 кэВ/мкм) возникновение мутаций обусловлено в основном изменением оснований или мелкими делециями. Полученный нами аналогичный характер зависимостей ОБЭ от ЛПЭ по индукции мутаций и хромосомных aberrаций с максимумом эффекта при ЛПЭ около 80 кэВ/мкм может свидетельствовать о том, что при действии излучений с высокой ЛПЭ большая часть радиационно-индуцированных мутаций обусловлена возникновением структурных нарушений в этом локусе.

**1.2. Цитогенетические характеристики спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов.** Полагая, что мутационный процесс в клетках млекопитающих может сопровождаться нарушением структурной целостности хромосомного аппарата и проявляться в хромосомной нестабильности клеток, мы выделили одиночные мутантные колонии, вырастили субклоны и провели их цитогенетический анализ. Проанализированы мутантные субклоны клеток китайского хомячка линии V-79, индуцированные разными дозами  $\gamma$ -квантов, протонов с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ  $\sim 0,218$  кэВ/мкм) и ионов  $^{14}\text{N}$  с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ  $\sim 77$  кэВ/мкм). Проведен также анализ спонтанных мутантов клеток линий V-79 и FAF28 (клон 431). В качестве контроля служили образцы из интактных монослойных культур и интактных субклонов, выращенные из одиночных колоний. Не выявлено отличий между ними, и полученные результаты использованы в качестве объединенного контроля. При цитогенетическом анализе наблюдалась гетерогенность спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов по исследованным цитогенетическим показателям (митотической активности, анеуплоидии, уровню хромосомных aberrаций). Как показали



**Таблица 2. Продолжительность роста спонтанных и радиационно-индуцированных одиночных мутантных колоний (общая продолжительность роста субклонов)**

Контроль интактный	Спонтанные мутанты		Мутанты, индуцированные $\gamma$ -квантами						Мутанты, индуцированные протонами						Мутанты, индуцированные ионами <sup>14</sup> N					
	Сутки	Доля, %	2 Гр	3 Гр	5 Гр	7 Гр	1 Гр	2 Гр	3,5 Гр	1 Гр	2 Гр	3 Гр	1 Гр	2 Гр	3 Гр	1 Гр	2 Гр	3 Гр		
10-11 (17-27)	11	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
14 (24-29)	14	32	13 (19)	13-14 (21-26)	14 (24)	14 (24)	14 (21-33)	14 (22-32)	33	39	—	—	—	—	—	—	—	—		
—	15-22 (21-31)	63	15 (27)	15-20 (23-48)	15-17 (22-31)	15-20 (25-48)	17-20 (25-33)	20 (27-38)	67	61	17-27 (28-33)	100	16-17 (21-23)	16 (21-27)	17-22 (22-34)	100	100	100		
12 образцов	22 мутанта	7 мутантов	23 мутанта	13 мутантов	12 мутантов	9 мутантов	18 мутантов	5 мутантов	6 мутантов	13 мутантов	15 мутантов	13 мутантов	15 мутантов	13 мутантов	5 мутантов	6 мутантов	5 мутантов	13 мутантов		

наши исследования, последствия мутационных событий проявились в возникновении геномной (по числу хромосом в клетках) и хромосомной (по уровню аберраций хромосом) нестабильности в популяциях потомков мутантных клеток.

*1.2.1. Замедление роста мутантных субклонов.* При выявлении и селекции мутантных субклонов было отмечено появление мутантов с замедленным ростом по сравнению с интактным контролем (см. табл. 2). При спонтанном мутагенезе их доля доходила до 60%. Она увеличивалась до 80–100% при высоких индуцирующих дозах  $\gamma$ -лучей (5–7 Гр) и в диапазоне использованных доз ионов  $^{14}\text{N}$  (1–3 Гр). Индивидуальные колонии таких мутантов можно было выделить через 15–27 дней культивирования, а образцы клеток для цитогенетического анализа приготовить нередко только через 1–1,5 месяца. Явной корреляции с другими цитогенетическими показателями не выявлено, но 15–30% таких мутантов имели сниженную митотическую активность (митотический индекс от 0,5 до 3%). Замедление роста многих мутантных субклонов в среде с 6-ТГ (в 1,5–2 раза по сравнению с контролем) могло определяться возникновением мутаций гена, приводящих к снижению активности фермента или синтезу меньшего количества нативного фермента. В этих случаях жизнеспособность мутантной популяции могла обеспечиваться только за счет клеток, не успевающих в течение клеточного цикла утилизировать пуриновый аналог. Другие авторы также отмечали появление мутантов с замедленным ростом: как спонтанных, выделенных из культуры лимфоидных клеток человека линии ТК6 [27], так и радиационно-индуцированных мутантов (X-лучи), выделенных из культуры клеток китайского хомячка линии СНО [28].

*1.2.2. Геномная нестабильность мутантных субклонов.* Критериями оценки мутантных субклонов по числу хромосом в клетках являлись модальное число хромосом и процентное содержание клеток с такой модой. Анализ спектров хромосом выявил выраженную анеуплоидию вплоть до полной полиидии (табл. 3). Среди субклонов преобладали образцы с модальным числом, равным 21 или 22 хромосомам. Доля диплоидных мутантов с модальным числом хромосом составляла, как правило, 70% и более, доходя до 100%. Доля клеток с такой модой в образцах существенно варьировала. Для спонтанных мутантов она находилась в пределах 50–80% и практически не отличалась от контроля. Радиационно-индуцированные мутанты были особенно гетерогенными по спектрам хромосом. Среди них встречались субклоны с узкими спектрами хромосом, когда доля клеток модального класса составляла 70–85%. У большинства была существенно выражена анеуплоидия в околодиплоидной области. У многих доля клеток модального класса оказывалась сниженной и составляла в ряде случаев 25–30%. Все типы диплоидных мутантов содержали некоторое число полиплоидных клеток, в основном тетраплоидных. Среди полученных мутантных субклонов выявлено от 8 до 20% полиплоидных мутантов с модальным числом хромосом от 39 до 44. Все они харак-

Таблица 3. Распределение интактных и HPRT-мутантных субклонов по числу хромосом в клетках

Тип субклонов	Доза, Гр	Число субклонов	Модальное число хромосом	Доля субклонов с данной модой, %	Доля клеток с данной модой, %
Контроль интактный	—	13	21	72	40–80
		1	22	5	60
		3	40	18	15–33
		1	42	5	11
Спонтанные мутанты	—	11	21	52	50–80
		7	22	33	50–60
		1	39	5	11
		1	42	5	24
		1	Не выражено	5	Максимум 6–8
Мутанты, индуцированные $\gamma$ -квантами	2	6	21	86	30–75
		1	40	14	40
	3	16	21	70	30–70
		2	22	9	30–75
		3	40	13	20–30
		1	41	4	27
	5	1	Не выражено	4	Максимум 6–7
		13	21	100	25–85
	7	1	20	8	39
		10	21	84	40–85
1	1	39 и 40	8	по 36	
	1	1	21	25	62
Мутанты, индуцированные протонами	2	3	22	75	53–78
		8	22	100	32–54
Мутанты, индуцированные ионами $^{14}\text{N}$	1	3	22	100	69–85
		1	21	7	67
	2	13	22	86	32–80
		1	22 и 44	7	47 и 26
	3	4	21	50	47–72
		2	22	26	51–60
		1	21 и 42	12	30 и 29
1	1	42 и 44	12	20 и 21	

теризовались широкими спектрами хромосом в околотетраплоидной области и сниженной долей клеток модального класса (до 20–30 %, а в ряде случаев до 10 %). Кроме того, выявлены единичные образцы, у которых модальный класс хромосом вообще не выражен. Они имели широкие спектры хромосом от диплоидной до тетраплоидной области, а доля клеток с каким-либо числом хромосом не превышала 6–8 % в максимуме.

Генотипическая нестабильность мутантов была обусловлена в основном анеуплоидией и частично полиплоидией клеток. В обзоре [29] показано, что любые отклонения условий существования клеток от оптимума приводят к

повышению уровня такого типа изменчивости. Поскольку в результате возникновения разных типов мутаций в клетках нарушается генный баланс и упорядоченность внутриклеточных процессов, то правомочно предположить, что мутантные клетки также будут обладать повышенной генотипической изменчивостью. Как известно, возникновение анеуплоидных клеток определяется неравномерным расхождением удвоившихся хромосом и отставанием хромосом в анафазе. Гипердиплоидные клетки могут возникать также вследствие селективной редупликации хромосом, экстракопирования отдельных хромосом в S-фазе цикла [30, 31]. Механизмы, приводящие к анеуплоидии, по-видимому, одинаковы для мутантных и интактных клеток, что находит отражение в отсутствии существенных отличий между ними по этому показателю. В нашем исследовании обращает на себя внимание лишь более выраженная анеуплоидия с колебанием числа хромосом в околодиплоидной области у радиационных мутантов. В работах [32, 33] рассматривается возможность иного механизма защиты клеточных популяций от сильных повреждающих воздействий, в основе которого лежит процесс клеточной кооперации и полиплоидизации за счет слияния клеток и нарушения нормального деления. Предполагается даже, что в популяциях всегда существует небольшая доля клеток (до 15–20%), способных в экстремальных условиях быстро переключаться с одного механизма размножения (митоз) на путь немитотического деления для более быстрого восстановления численности клеток. Он осуществляется через кооперацию, полиплоидизацию и слияние, амитоз, фрагментацию ядер и др. Возможно, такого рода процессы могли определить появление в наших опытах единичных мутантов, у которых не выражен модальный класс хромосом. При полиплоидии, как известно, повышается вероятность неравномерного расхождения генетического материала при делении клеток (вплоть до «хаотичного») и появления неполноценных клеток.

*1.2.3. Хромосомная нестабильность мутантных субклонов.* При цитогенетическом анализе были выявлены мутанты с повышенным уровнем хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем (рис. 3). Их доля

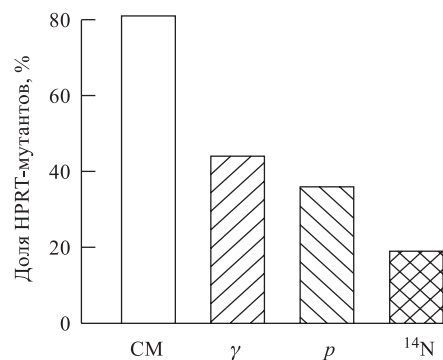


Рис. 3. Частота образования HPRT-мутантов с повышенным по сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций: спонтанных (СМ); индуцированных  $\gamma$ -квантами ( $\gamma$ ), протонами ( $p$ ) и ионами азота ( $^{14}\text{N}$ )

составила среди спонтанных и  $\gamma$ -индуцированных мутантов 81 и 44 %, а среди индуцированных протонами и ионами  $^{14}\text{N}$  36 и 19 % соответственно. Хромосомная нестабильность оказалась наиболее высокой у спонтанных мутантов. Она снижалась с увеличением ЛПЭ излучений.

Нами не отмечено появления какого-либо определенного типа хромосомных aberrаций при возникновении мутаций в локусе HPRT. Однако у 2 из 12 проанализированных мутантов, индуцированных  $\gamma$ -квантами в дозе 7 Гр, почти в 90 % клеток обнаружена обычно редко выявляемая при стандартном метафазном анализе стабильная хромосомная перестройка типа межхромосомного симметричного обмена.

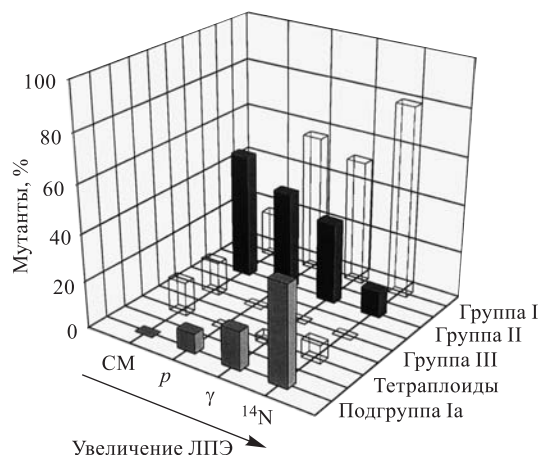


Рис. 4. Спонтанные и индуцированные  $\gamma$ -квантами, протонами и ионами азота HPRT-мутантные субклоны с разной частотой aberrаций хромосом

Для оценки хромосомной нестабильности в качестве основного критерия нами использована частота хромосомных aberrаций. По уровням хромосомных aberrаций мутанты были условно подразделены на несколько групп (рис. 4). Группа I мутантов существенно не отличалась от контроля. По сравнению со спонтанными мутантами наблюдалось увеличение их доли при индукции исследуемыми видами излучений, особенно выраженное при индукции ионами  $^{14}\text{N}$ . Группа II мутантов обладала повышенным в 1,5–3 раза уровнем хромосомных aberrаций по сравнению с контролем. Их доля уменьшалась с увеличением ЛПЭ излучений. Группа III мутантов отличалась экстремально высоким содержанием хромосомных нарушений в клетках (до 30 % и более aberrантных клеток). Такие мутанты были обнаружены только при спонтанном мутагенезе. Отдельную группу составили тетраплоидные мутанты (около 10–15 % среди разных типов мутантов). Кроме того, при радиационно-

индуцированном мутагенезе выявлены мутанты со сниженным в 2–4 раза уровнем хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем (подгруппа Ia). Их доля увеличивалась с ростом ЛПЭ излучений и составила среди мутантов, индуцированных протонами, 8 %,  $\gamma$ -квантами — 16 %, ионами азота — 48 %. Последнее может свидетельствовать о том, что при высоких ЛПЭ излучений увеличивается число генетически устойчивых мутантов. Их процентное содержание среди радиационно-индуцированных мутантов зависело от качества излучения, что косвенно указывает на разный характер иницирующих повреждений при воздействии излучений с разными ЛПЭ.

Хромосомная нестабильность мутантов, индуцированных разными дозами редкоизионизирующих излучений ( $\gamma$ -кванты и протоны), оказалась неоднозначной (рис. 5). Доля мутантов с повышенным уровнем хромосомных aberrаций, индуцированных протонами в дозе 1 Гр, практически не отличалась от соответствующего показателя при спонтанном мутагенезе. С увеличением индуцирующих доз  $\gamma$ -квантов и протонов до 3 Гр выявлено снижение хромосомной нестабильности мутантов. Доля таких мутантов уменьшалась в несколько раз. При более высоких дозах  $\gamma$ -квантов хромосомная нестабильность мутантов вновь увеличивалась, приближаясь к уровню спонтанного мутагенеза. Соответственно, неоднозначной оказалась и группа I мутантов, не отличающихся от интактного контроля по уровню хромосомных aberrаций (рис. 5, a). При индукции разными дозами  $\gamma$ -квантов и протонов доля таких мутантов варьировала таким образом, что суммарно мутанты групп I, II и III составляли 80 % и более. Можно предполагать, что существует определенный диапазон доз, при которых увеличивается число генетически устойчивых мутантов.

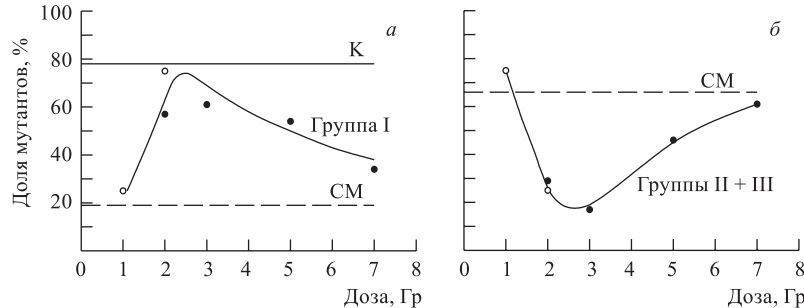


Рис. 5. Зависимость частоты диплоидных HPRT-мутантных субклонов от дозы редкоизионизирующих излучений: а) мутанты, не отличающиеся от контроля по уровню хромосомных aberrаций; б) мутанты с повышенным уровнем aberrаций хромосом, индуцированные протонами (○),  $\gamma$ -квантами (●). К — контроль; СМ — спонтанные мутанты

Наблюдаемая гетерогенность мутантов, варибельность цитогенетических показателей, по-видимому, определяется типом возникших мутаций. Их по-

следствия могут проявляться в ряду клеточных поколений как через изменение и нарушение активности гена, так и через нарушение активности соответствующего фермента. Они могут быть связаны не только с точковыми мутациями, но и со структурными изменениями гена: микроделециями, инверсиями, вставками, а также частичной или полной потерей гена в случае структурной делеции X-хромосомы, в которой он находится. Литературные данные по молекулярному анализу мутантов (блот-анализ, ПЦР) свидетельствуют об увеличении доли мутантов не только с частичной, но и с полной делецией HPRT-гена уже при воздействии редкоизионизирующих излучений. При индукции плотноизионизирующими ионами начинают преобладать мутанты с полной делецией гена. Полученные нами данные показывают, что выход мутантов, не отличающихся от контроля по уровню хромосомных aberrаций (группа I), и особенно мутантов со сниженным их уровнем (подгруппа Ia) в определенной мере коррелирует с этими данными. Это приводит к предположению, что они являются мутантами с полной (или крупной) делецией гена и заблокированным синтезом hprt-фермента.

Если это предположение справедливо, то может иметь право на существование «метаболическая гипотеза» хромосомной нестабильности. Как известно, у клетки есть два пути синтеза пуриновых нуклеотидов: синтез *de novo* (строится поэтапно на рибозо-5'-фосфате) и синтез из готовых продуктов. Второй путь для клетки энергетически более выгоден. Он осуществляется при синтезе нативного hprt-фермента. При мутациях в HPRT-локусе, сопровождающихся прекращением синтеза фермента, образование пуриновых нуклеотидов должно идти по пути *de novo*. В случае синтеза фермента со сниженной активностью или при синтезе недостаточного количества нативного фермента в клетке появляются условия для конкуренции обоих путей. Возникает ситуация, приводящая к нарушению равновесия в метаболизме клетки, когда клетка включает необходимую машинерию для синтеза ДНК с участием hprt-фермента, но он недостаточно функционален и не успевает поставлять необходимые нуклеотиды. Это приводит к метаболическому дисбалансу, что служит сигналом для включения механизмов поиска равновесия, и в результате нехватки пуриновых оснований при застройке цепей ДНК включается путь синтеза *de novo*. Вероятно, такое неустойчивое состояние может сопровождаться хромосомной нестабильностью как этапом в поиске равновесия и адаптации к изменившимся условиям существования. В итоге будут формироваться мутантные субклоны с повышенным по сравнению с контролем выходом хромосомных aberrаций. Из этого следует, что для выживания мутантных клеток более благоприятным будет полное прекращение синтеза фермента (в случае полной или крупной делеции гена), чем синтез фермента со сниженной активностью. В то же время появление и сохранение мутантных клеток в организме приводит к развитию патологических процессов. В настоящее время структурные хромосомные аномалии, затрагивающие

определенные гены, привлекают повышенное внимание исследователей, поскольку становится все более очевидной их роль в патогенезе ряда опухолевых заболеваний у человека, в частности в развитии лейкоемий [34–37].

С точки зрения метаболической гипотезы становится понятным механизм нестабильности хромосом у потомков мутантных клеток. Мутации передаются из поколения в поколение, и тем самым снимается вопрос о консервации инициирующего события в последующих поколениях мутантных клеток. Полученные данные по хромосомной нестабильности мутантных субклонов могут в какой-то мере объяснить отмечаемое рядом авторов повышение хромосомной нестабильности в популяциях облученных клеток в отдаленные сроки (через 20–40 поколений) после воздействия [38]. Можно полагать, что возникновение мутаций в клетках, приводящих к хромосомной нестабильности у их потомков, обуславливает повышение уровня хромосомных aberrаций в популяциях облученных клеток в отдаленном периоде после лучевого воздействия. Очевидно, в этот период становится возможным выявление этого феномена вследствие увеличения числа размножившихся выживших клеток с мутациями разных генов.

Таким образом, в проведенном нами исследовании выявлена геномная и хромосомная нестабильность HPRT-мутантов, выделенных из клеток млекопитающих. При этом речь может идти о воспроизводимой нестабильности хромосом в длинном ряду поколений мутантной клетки. Становится также очевидной существенная роль структурных повреждений хромосом (и, соответственно, генов) в реализации этих процессов. Появление повышенного количества хромосомных aberrаций в клетках многих спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов может свидетельствовать о том, что при мутагенезе в клетках млекопитающих с неизбежностью повышается вероятность нарушения целостности хромосом, что можно рассматривать как этап соответствующей перестройки генома, адекватной изменившимся условиям существования. Длительное сохранение нестабильности хромосом у мутантных субклонов, очевидно, может рассматриваться как универсальное явление для всех диплоидных и полиплоидных клеток эукариотов. Подтверждением этого могут также служить многолетние исследования на дрожжевых клетках [39–41] и данные, полученные на ряде других объектов [29].

## **2. ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ**

Многолетние цитогенетические исследования на лимфоцитах человека, проведенные нами, свидетельствуют о том, что все виды излучений вызывают образование структурных мутаций хромосом разных видов. Как известно, возникают мутации двух типов: нестабильные и стабильные хромосомные aberrации.



**2.1. Нестабильные хромосомные aberrации.** К ним относятся разного вида хроматидные и хромосомные обмены, приводящие к появлению несвойственных для клеточной популяции измененных хромосом, таких как дицентрики, полицентрики, кольца, а также разного рода фрагменты хромосом. Их появление сопровождается нарушением процессов деления клеток и, как правило, их быстрой гибелью. Нестабильные хромосомные aberrации анализируют с помощью общепринятого стандартного метафазного метода, позволяющего выявлять их во всем геноме клеток при микроскопировании лимфоцитов с использованием обычных световых микроскопов. Как видно на рис. 6, *a*, при воздействии всеми исследованными видами излучений имеет место линейная зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения. Для общего числа хромосомных aberrаций (рис. 6, *b*) выявлена степенная зависимость эффекта от дозы редкоизионизирующих излучений (протоны и  $\gamma$ -кванты). Она модифицируется в линейную при воздействии тяжелых ионов с высокой плотностью ионизации:  $^{12}\text{C}$  ( $E = 473$  МэВ/нуклон, ЛПЭ  $\sim 12$  кэВ/мкм),  $^{14}\text{N}$  ( $E = 50$  МэВ/нуклон, ЛПЭ  $\sim 77$  кэВ/мкм) и  $^{24}\text{Mg}$  ( $E = 500$  МэВ/нуклон, ЛПЭ  $\sim 39,8$  кэВ/мкм). Однако наблюдается снижение эффектов при воздействии высоких доз таких излучений, что является следствием существенной задержки митозов, особенно тяжело поврежденных клеток со множественными aberrациями хромосом, как это показано в [6, 42–44]. Полученные данные свидетельствуют о том, что протоны релятивистских энергий ( $E = 1$  ГэВ) существенно не отличаются по эффективности от воздействия  $\gamma$ -излучения. Коэффициенты их ОБЭ близки к 1.

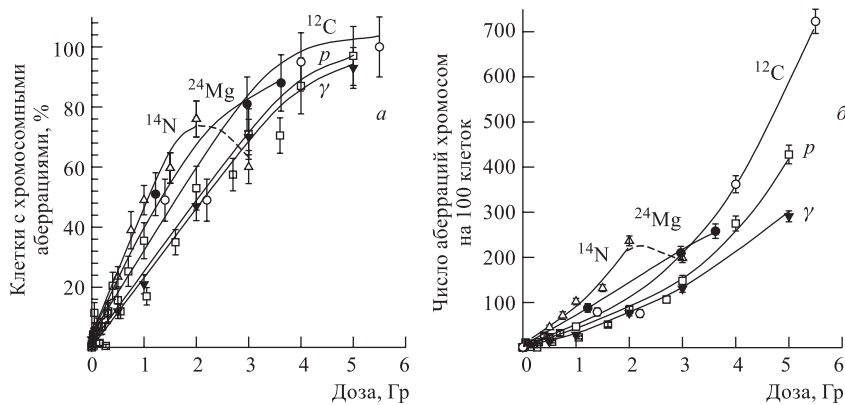


Рис. 6. Зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями (*a*) и общего числа aberrаций хромосом (*b*) от дозы облучения лимфоцитов крови человека  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  ( $\blacktriangledown$ ), ускоренными протонами ( $\square$ ), ионами  $^{12}\text{C}$  ( $\circ$ ),  $^{14}\text{N}$  ( $\triangle$ ) и  $^{24}\text{Mg}$  ( $\bullet$ )

Тяжелые ионы характеризуются более высокой эффективностью. Значения коэффициентов ОБЭ ионов  $^{12}\text{C}$ ,  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{14}\text{N}$  по разным цитогенетическим тестам составили 1,2–1,3, 1,4–1,7 и 2,0–2,2 соответственно. Более подробно данные цитогенетического исследования действия протонов с энергией 1 ГэВ и ионов  $^{14}\text{N}$  на лимфоциты крови человека изложены в [45].

Вместе с тем проведенный анализ хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови человека после облучения протонами релятивистских энергий в дозах от 0,05 до 5,0 Гр показал, что кривые дозовой зависимости эффектов в диапазоне малых доз облучения (до  $\sim 1,0$  Гр) отличаются от соответствующих кривых, получаемых при экстраполяции с более высоких доз (рис. 7). Причем наблюдается сложный нелинейный характер зависимости частоты образования хромосомных aberrаций от дозы облучения. Частота образования клеток с хромосомными aberrациями и общее число aberrаций оказались в несколько раз ( $\sim 4\text{--}5$ ) большими по сравнению с уровнями эффектов, соответствующими экстраполяционным кривым. В диапазоне малых доз облучения протонами выявляется область «гиперчувствительности» лимфоцитов при сверхмалых дозах (0,05–0,1 Гр). Наблюдаемые эффекты связаны с фрагментозом хромосом и возникновением главным образом хроматидных и парных хромосомных фрагментов. Среди них преобладают хроматидные фрагменты, доля которых составляла до 70–80% от общего числа фрагментов хромосом. При дозах в области  $\sim 0,2$  Гр наблюдаемые эффекты снижались и соответствовали значениям экстраполяционной кривой. При последующем увеличении доз они вновь повышались до уровня эффектов при дозе 1 Гр.

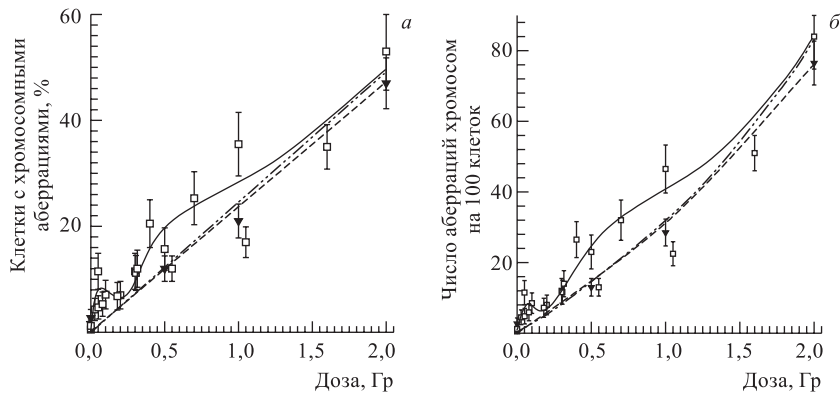


Рис. 7. Изменение частоты образования клеток с хромосомными aberrациями (а) и общего числа aberrаций хромосом (б) лимфоцитов крови человека после облучения протонами ( $\square$ ) в малых дозах (сплошные кривые); штриховые и штрихпунктирные кривые — экстраполяционные кривые для  $\gamma$ -квантов ( $\blacktriangledown$ ) и протонов соответственно

Таким образом, данные, полученные при облучении лимфоцитов человека малыми дозами протонов, указывают на неправомотность оценки действия малых доз редкоизирующиих излучений по экстраполяционным значениям эффектов со средних и высоких доз облучения клеток человека.

**2.2. Стабильные хромосомные аберрации.** Они образуются в результате симметричного обмена участками между двумя поврежденными хромосомами, что не приводит к нарушению поведения хромосом в процессе клеточного деления. При последующих делениях клеток такие хромосомы ведут себя как нормальные и передаются последующим поколениям клеток, неся искаженную генетическую информацию. Такие стабильные хромосомные аберрации, как транслокации и инсерции (вставки в хромосому участка другой хромосомы), длительно сохраняются в клетках в последующих поколениях. Общеизвестно, что такие хромосомные перестройки со временем могут приводить к развитию в организме человека мутагенных процессов и канцерогенезу. Возможность выявления стабильных хромосомных аберраций появилась с разработкой в последнее десятилетие так называемой FISH-техники — флуоресцентной гибридизации *in situ*. При этом с помощью люминесцентных микроскопов в геноме клеток обнаруживаются стабильные аберрации отдельных хромосом, помеченных флуоресцентными красителями при использовании специфических для них проб, содержащих уникальные последовательности ДНК.

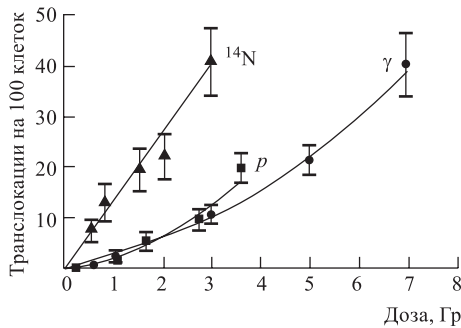


Рис. 8. Дозовые зависимости частоты образования транслокаций хромосомы 1 лимфоцитов человека после облучения протонами (■), ионами  $^{14}\text{N}$  (▲) и  $\gamma$ -лучами (●)

В нашем исследовании были использованы ДНК-пробы, специфические для хромосом 1 и 2 генома человека. Эти хромосомы являются наиболее крупными в геноме человека, и их повреждения могут происходить с большей вероятностью при воздействии неблагоприятных факторов, например ионизирующих излучений. С помощью FISH-анализа нами выявлена высокая частота образования таких стабильных аберраций этих хромосом, как транслокации (рис. 8). Как можно видеть, по своей эффективности действие протонов с энергией 1 ГэВ аналогично действию  $\gamma$ -излучения. При действии плотноизирующиих ионов  $^{14}\text{N}$  отмечается высокий уровень транслокаций хромосом, причем зависимость эффекта от дозы приобретает линейный характер. Коэффициенты ОБЭ ионов  $^{14}\text{N}$  оказываются повышенными до  $\sim 3$ . Подробно результаты такого исследования изложены в [45].

### 3. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МАЛЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ

Как известно, оценка биологического действия малых доз ионизирующего излучения является необходимым условием для прогнозирования генетического и канцерогенного риска облучения. Трудности оценки эффектов и установление формы кривой доза–эффект в области малых доз связаны со сложностью получения статистически достоверных данных при низких уровнях повреждений, вызываемых этими дозами. Вследствие этого оценка риска при действии малых доз осуществляется на основе экстраполяции эффектов высоких доз на область низких доз, и результаты оценки зависят от модели, положенной в основу экстраполяции. Характерным примером противоречий, возникающих по этой причине, является прогнозирование последствий облучения большой популяции людей в результате Чернобыльской аварии. Так, Д. Гофман [46] предсказывает 300 тысяч летальных исходов от злокачественных опухолей, а Т. D. Lukey [47] — снижение смертности от спонтанных раков до 20 тысяч случаев.

Беспороговая линейная концепция, как наиболее «осторожная», предполагающая опасность любого, даже самого малого, превышения естественного радиационного фона, является официально признанной и положена в основу рекомендаций МКРЗ [48, 49]. Однако экспериментальные данные, полученные в последние годы, вступают в явное противоречие с этой концепцией и свидетельствуют о неправомерности линейной экстраполяции эффектов с высоких доз на низкие.

**3.1. Эффекты малых доз облучения.** При оценке эффектов биологического действия малых доз излучений, как правило, регистрируется частота цитогенетических повреждений, а именно индукция хромосомных аберраций (ХА) и микроядер (МЯ) в клетках разного типа, характеризующаяся четкой количественной зависимостью в широком диапазоне доз. Универсальной особенностью дозовых кривых, хорошо воспроизводимой на разных объектах, является наличие дозозависимого участка в диапазоне 0,1–0,5 Гр [50–55].

Использование прецизионных методов динамического компьютерного микроскопического сканирования [56] в последнее десятилетие позволило точно оценить выживаемость клеток млекопитающих при облучении дозами в диапазоне 0–1 Гр [57, 58], что было невозможно при применении классического метода Т. Т. Puck и Р. J. Marcus [59]. Показана сложная нелинейная зависимость доза–эффект в области малых доз, характеризующаяся наличием дозозависимого участка или обратной зависимостью эффекта от дозы в диапазоне 0–1 Гр. При этом, как правило, отмечается более высокая эффективность воздействия на единицу дозы при малых дозах (~ до 0,3 Гр), чем при облучении высокими дозами. Гиперчувствительность (ГЧ), наблюдаемая при малых дозах и показанная по критерию выживаемости для большого числа в основном опухолевых линий клеток человека [58–61], не может быть пред-

сказана обратной экстраполяцией с кривой выживаемости в диапазоне доз 1–10 Гр (так называемый диапазон индуцированной резистентности (ИР)). Таким образом, линейно-квадратичная модель, используемая для описания формы кривой выживаемости клеток, «недооценивает» эффект облучения в дозах ниже 1 Гр.

Несмотря на большое число работ по дозовой зависимости цитогенетических эффектов облучения, до настоящего времени в литературе нет однозначных данных, свидетельствующих о проявлении феномена ГЧ/ИР по мутагенному эффекту в клетках млекопитающих, в том числе и в лимфоцитах человека. ГЧ может быть связана с наличием генетически или фенотипически обусловленной популяции радиочувствительных клеток. Первое предположение было опровергнуто прямыми экспериментами с двукратным облучением клеток [57]. Наличие фенотипически обусловленной радиочувствительной фракции клеток может быть связано с распределением клеток асинхронной популяции по фазам клеточного цикла, и, таким образом, ГЧ может быть следствием гибели клеток, находящихся в радиочувствительной фазе цикла, при малых дозах. Однако согласно математической модели [58] в этом случае радиочувствительная фракция должна составлять  $\sim 4\%$  от всей популяции и обладать в 60 раз более высокой радиочувствительностью, чем все остальные клетки. Это маловероятно, так как максимальное различие в радиочувствительности фаз клеточного цикла у клеток млекопитающих *in vitro* не превышает 10 [62]. Тем не менее, как отмечается некоторыми авторами [61, 63], приведенные аргументы не исключают *a priori* того, что ГЧ при малых дозах является следствием преимущественной гибели клеток в радиочувствительной фазе цикла. Большинство исследователей, однако, дают другое объяснение сложной формы кривой доза–эффект: ГЧ отражает высокую радиочувствительность всех клеток на фоне постоянно функционирующей конститутивной репарации. Повышение же радиорезистентности популяции в целом происходит в результате включения ИР при определенном уровне повреждения клеток [58–65], что означает изменение биологического ответа с изменением дозы облучения.

Другим аспектом действия малых доз облучения, в основе которого также, по-видимому, лежат стрессовые ответы клеток, запуск индуцибельных процессов репарации или других радиозащитных механизмов, является адаптивный ответ (АО). Лимфоциты человека, предварительно облученные в малых дозах излучением инкорпорированного тритиевого тимидина [66–68] или рентгеновскими лучами [69, 70], становятся менее чувствительными к последующему воздействию высокой дозой. АО был показан и на других типах клеток [71–74]. Механизмы инициации АО изучены пока недостаточно [75]. АО сложным образом зависит от мощности дозы предварительного облучения [70], а также индуцируется другими ДНК-повреждающими агентами, такими как алкилирующие соединения и перекись водорода [76, 77]. Все это

создает сложности при сопоставлении результатов и объясняет противоречия в данных разных авторов.

В качестве критерия для оценки величины АО, как и при анализе зависимости доза–эффект, обычно используются цитогенетические повреждения. Однако практически во всех экспериментальных работах два указанных аспекта действия малых доз рассматриваются отдельно друг от друга.

Задачей настоящих исследований являлось изучение дозовой зависимости цитогенетических повреждений клеток млекопитающих разного типа, анализ закономерностей, обуславливающих проявление феномена ГЧ/ИР, и сопоставление зависимости доза–эффект со способностью к формированию АО с целью идентификации общих механизмов, лежащих в их основе.

**3.2. Исследование феномена ГЧ/ИР и адаптивного ответа на клетках млекопитающих.** Эксперименты были выполнены на лимфоцитах периферической крови человека, на асинхронной и синхронизированной популяции клеток китайского хомячка линии V-79 и клетках меланомы человека линии BRO. Для облучения использовали  $\gamma$ -лучи  $^{60}\text{Co}$  с мощностью дозы 0,18 Гр/мин (установка «Рокус»). Рис. 9 и 10 отражают количество клеток с ХА, выявляемых метафазным и анафазным методами, в зависимости от дозы облучения. На рисунках приведены данные отдельных типичных экспериментов из одиннадцати, проведенных на клетках китайского хомячка, восьми — на клетках меланомы и четырех — на лимфоцитах человека. Эксперименты проводились в течение нескольких лет, при этом наблюдалась некоторая вариабельность положения и амплитуды пика ГЧ и дозозависимого участка в зависимости от сезона, состояния культуры клеток, а также от донора. По этой причине усреднение данных не имело смысла.

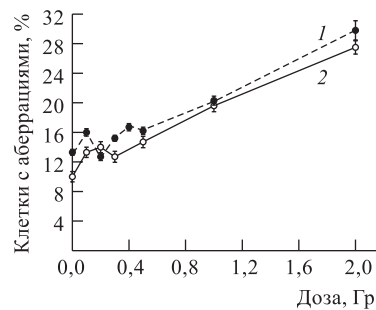
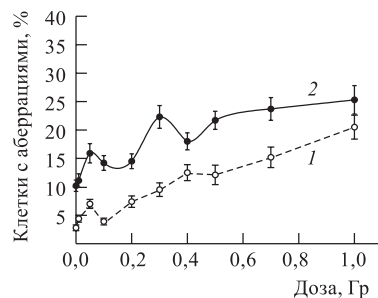


Рис. 9. Количество клеток с хромосомными aberrациями, выявляемых метафазным (1) и анафазным (2) методами, после  $\gamma$ -облучения лимфоцитов человека

Рис. 10. Зависимость выхода клеток с хромосомными aberrациями от дозы облучения, выявляемая анафазным методом при  $\gamma$ -облучении асинхронной популяции клеток меланомы человека (1, фиксация через 11 ч после облучения) и китайского хомячка (2, фиксация через 8 ч после облучения)

Кривые доза–эффект для лимфоцитов человека, клеток китайского хомячка и меланомы человека имеют сходный ярко выраженный нелинейный характер. При облучении в диапазоне доз 0–0,05 Гр (лимфоциты), 0–0,1 Гр (клетки меланомы) и 0–0,2 Гр (клетки китайского хомячка) количество хромосомных повреждений резко возрастает по сравнению с контрольным уровнем (диапазон ГЧ), затем значительно снижается, образуя дозозависимый участок кривой. При дозах выше 0,5 Гр резистентность клеток повышается (ИР) и дозовая зависимость приобретает линейный характер. Наклон кривых при переходе от ГЧ к ИР снижается в 2–3 раза для клеток китайского хомячка и меланомы и в 5–10 раз для лимфоцитов человека в зависимости от используемого метода анализа. Аналогичные кривые доза–эффект получены при облучении лимфоцитов от других доноров рентгеновскими лучами (данные не приводятся).

Для анализа индукции цитогенетических нарушений в лимфоцитах человека малыми дозами нами были использованы различные методы, так как каждый из них имеет свои достоинства и недостатки [78–84]. Как видно на рис. 9, форма кривых, полученных двумя методами анализа ХА, хорошо воспроизводится. Однако кривая, полученная анафазным методом, лежит выше кривой, полученной при анализе метафаз, что связано с более высоким уровнем спонтанных ХА, обнаруживаемых анафазным методом, при котором выявляются нарушения процесса деления клетки на стадии расхождения хромосом [82–84].

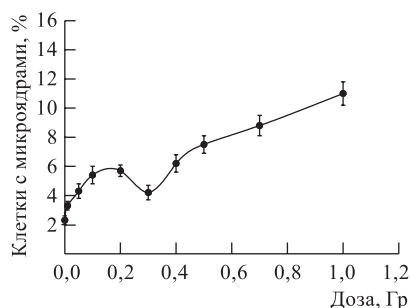


Рис. 11. Количество клеток с микроядрами среди двуядерных цитохалазин-блокированных лимфоцитов человека после  $\gamma$ -облучения (цитохалазин вводили через 24 ч, фиксировали через 58 ч после облучения)

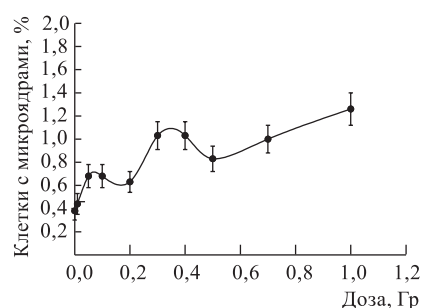


Рис. 12. Количество клеток с микроядрами, выявляемых среди одноядерных лимфоцитов человека без цитохалазина после  $\gamma$ -облучения (фиксация через 48 ч после облучения)

На рис. 11 и 12 показана дозовая зависимость индукции МЯ, являющихся приблизительным показателем хромосомных повреждений [78], в интерфазных двуядерных клетках, блокированных цитохалазином, и в одноядерных —

без цитохалазина. Оба метода регистрации лимфоцитов с МЯ четко выявляют ГЧ при дозах ниже 0,05 Гр, сменяющуюся дозозависимым диапазоном, а начиная с 0,5 Гр наблюдается линейная зависимость эффекта от дозы (ИР), характеризующаяся в 6–7 раз меньшим наклоном, чем на участке ГЧ, что хорошо коррелирует с данными, полученными по ХА.

Исследование частоты различных типов aberrаций в лимфоцитах человека после  $\gamma$ -облучения (рис. 13) свидетельствует о том, что ГЧ обусловлена в основном увеличением числа aberrаций хроматидного типа, которые преобладают при дозах ниже 0,5 Гр. Согласно классической теории формирования ХА в лимфоцитах, облученных в  $G_0$ -фазе клеточного цикла, должны возникать преимущественно aberrации хромосомного типа. Однако только при учете всех типов aberrаций, хроматидных и хромосомных, на кривой доза–эффект выявляется ГЧ, регистрируемая при использовании МЯ-теста, анафазного метода и по выживаемости клеток [57, 58]. Это дает основание предполагать, что механизмы, лежащие в основе ГЧ при малых дозах облучения, отличаются от классической модели формирования ХА.

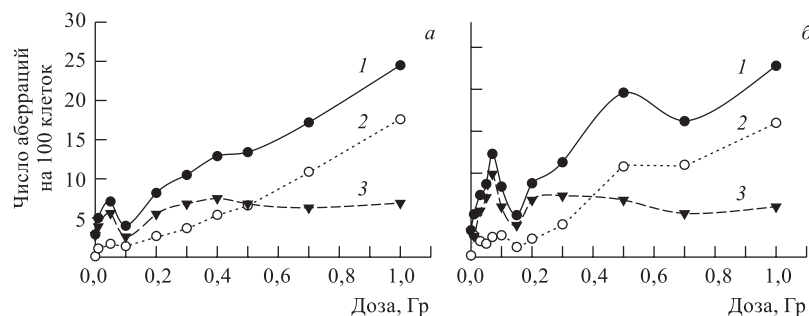


Рис. 13. Количество aberrаций разного типа в лимфоцитах человека после  $\gamma$ -облучения: а) донор 1; б) донор 2. 1 — сумма aberrаций; 2 — хромосомные aberrации; 3 — хроматидные aberrации

Анализ природы феномена ГЧ/ИР проводился на клетках китайского хомячка и меланомы человека. Установлено, что форма кривой доза–эффект, показанная на асинхронной популяции клеток китайского хомячка по индукции ХА (рис. 10), хорошо воспроизводится на синхронизированных клетках, облученных в фазе  $G_1$  клеточного цикла (рис. 14). Это свидетельствует о том, что ГЧ обусловлена высокой радиочувствительностью популяции в целом и не связана с гибелью фракции клеток, находящихся в момент облучения в наиболее радиочувствительной фазе клеточного цикла. С увеличением дозы облучения все клетки становятся более радиорезистентными, как можно предполагать, вследствие индукции процессов репарации [57, 58, 60–65].



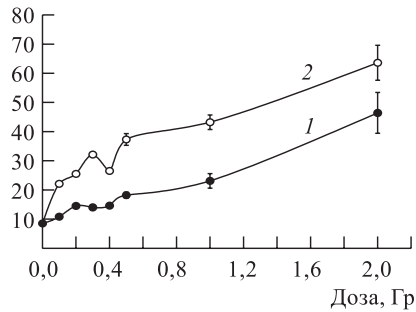


Рис. 14. Дозовая зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями (1) и общего числа aberrаций хромосом (2) на 100 клеток, выявляемых метафазным методом после  $\gamma$ -облучения синхронизированных клеток китайского хомячка (клетки облучали в  $G_1$ -фазе клеточного цикла, фиксировали через 14 ч после облучения)

Таким образом, наиболее вероятное объяснение нелинейности кривой доза–эффект и перехода от ГЧ к ИР состоит в том, что при определенном уровне повреждения клеток запускаются индуцибельные репарационные системы. Следствием этого является уменьшение радиочувствительности клеток и, соответственно, наклона кривых. Сопоставление дозовых зависимостей индукции ХА у клеток китайского хомячка и меланомы человека (рис. 10) дает основание полагать, что индуцибельные системы репарации клеток меланомы включаются при меньших дозах и работают более эффективно, чем у клеток китайского хомячка.

Весьма вероятно, что феномен ГЧ/ИР при однократном облучении аналогичен по своей природе АО, наблюдаемому при двукратном облучении, проявление которого также связывают с индуцибельными системами репарации [66–70]. В связи с этим представлялось интересным исследование способности указанных двух линий клеток к индукции АО. Изучалось влияние величины адаптирующей и тестируемой доз на степень выраженности АО по критерию индукции ХА. Как видно из данных, представленных в табл. 4, на клетках китайского хомячка АО наиболее выражен при предварительном облучении в дозе 0,2 Гр и эффективность АО практически не зависит от величины повреждающей дозы в диапазоне 0,5–1,5 Гр. На клетках меланомы человека максимальная величина АО имеет место при адаптирующей дозе 0,01 Гр и тестируемой дозе 0,5–1 Гр. Предварительное облучение в дозе 0,3 Гр усиливает эффективность последующего облучения.

Результаты свидетельствуют о том, что АО проявляется в небольшом диапазоне адаптирующих доз с экстремумом в очень узкой области, различающимся для разных типов клеток. Кроме того, получено подтверждение предположения, сделанного на основании сопоставления дозовых зависимостей выхода ХА, о большей эффективности индуцибельных процессов репарации у клеток меланомы человека по сравнению с клетками китайского хомячка: максимальный АО индуцируется в клетках меланомы при более низкой дозе. Все это дает основание полагать, что переход от ГЧ к ИР, показанный при изучении зависимости доза–эффект по выходу цитогенетических повреждений, обусловлен включением процессов индуцибельной репарации при опре-

Таблица 4. Зависимость КАО\* для клеток китайского хомячка и меланомы от величины адаптирующей и тестируемой доз

Тип клеток	Тестируемая доза, Гр	Адаптирующая доза, Гр				
		0,01	0,05	0,1	0,2	0,3
Клетки китайского хомячка	0,5	—	—	—	0,48 ± 0,01	—
	1,0	0,82 ± 0,2	0,82 ± 0,07	—	0,56 ± 0,08	—
	1,5	—	—	—	0,54 ± 0,02	—
Меланома человека	0,5	0,52 ± 0,06	—	0,85 ± 0,03	0,7 ± 0,04	1,12 ± 0,01
	1,0	0,45 ± 0,09	—	0,77 ± 0,16	0,71 ± 0,04	1,23 ± 0,05
	2,0	0,78 ± 0,02	—	0,88 ± 0,09	0,78 ± 0,1	0,99 ± 0,07

\*При изучении АО интервал между облучением адаптирующей и тестируемой дозами составлял 5 ч. Коэффициент АО (КАО) рассчитывали по формуле

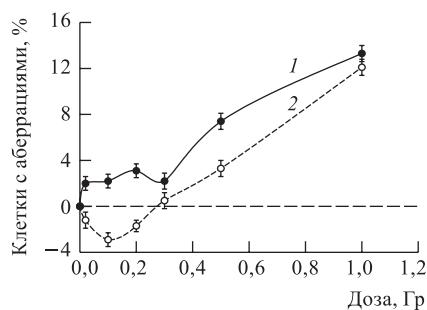
$$\text{КАО} = (\text{ХПа} + \tau - \text{ХПк}) / ((\text{ХПа} - \text{ХПк}) + (\text{ХПт} - \text{ХПк})),$$

где ХПа + τ — процент клеток с ХА после облучения адаптирующей и тестируемой дозами; ХПа — процент клеток с ХА после облучения только адаптирующей дозой; ХПт — процент клеток с ХА после облучения только тестируемой дозой; ХПк — процент клеток с ХА в контроле. При КАО = 1 АО не обнаружен; при КАО < 1 клетки проявляют АО; при КАО > 1 предварительное облучение в малой дозе повышает эффективность последующего тестируемого облучения.

деленном уровне повреждения и по своим механизмам и проявлению (в том числе и в количественном отношении) аналогичен АО.

Если эта гипотеза справедлива, то на фоне индуцированных предоблучением репарационных процессов должен меняться характер кривой доза-эффект: участок ГЧ не будет выявляться. Для проверки этого предположения клетки меланомы человека облучали дозой, оптимальной для индукции АО (0,01 Гр), а через 5 ч — дозой 0,01–1 Гр. На рис. 15 показана зависимость числа индуцированных вторым облучением клеток с ХА. В качестве нулевого уровня принимали количество aberrантных клеток в контроле. Дозовая зависимость индукции клеток с aberrациями на фоне предоблучения характеризуется не только отсутствием ГЧ, но и снижением процента aberrантных

Рис. 15. Дозовая зависимость индукции клеток с хромосомными aberrациями, выявляемыми анафазным методом, в асинхронной популяции клеток меланомы человека при однократном γ-облучении (1) и предоблученных адаптирующей дозой 0,01 Гр (2) (интервал между дозами 5 ч, фиксация через 11 ч после второго облучения)



клеток ниже нулевого уровня, т. е. восстановлением некоторой части предсуществующих хромосомных перестроек (спонтанных или индуцированных первым облучением). ИР при однократном облучении проявляется начиная с дозы 0,5 Гр; после предоблучения линейная зависимость от дозы на фоне ИР наблюдается начиная с дозы 0,1 Гр. Аналогичные результаты получены на клетках китайского хомячка (данные не приводятся).

Представленные результаты в целом однозначно свидетельствуют о том, что, несмотря на количественные различия цитогенетических показателей, полученных различными методами на разных типах клеток, все они отражают сложную зависимость доза–эффект, характеризующуюся ГЧ, дозозависимым участком и линейной зависимостью на фоне повышенной радиорезистентности (ИР) при дозах выше  $\sim 0,5$  Гр. Поэтому оценка риска малых доз облучения путем линейной экстраполяции эффектов высоких доз неправомерна, поскольку биологический ответ на действие ионизирующей радиации меняется с изменением дозы. Можно предполагать, что это является следствием индукции процессов репарации, «запуск» которых происходит после некоторого порога повреждения клеток. При настоящем уровне понимания феномена ГЧ/ИР оценка риска при дозах облучения ниже 0,5 Гр не представляется возможной, и генетический риск, по всей видимости, в значительной степени зависит от метаболического и физиологического состояния клеток организма, определяющего их способность к индукции процессов репарации.

Феномен ГЧ/ИР имеет отношение также к проблеме биологической дозиметрии. Исходя из анализа наших данных биодозиметрия в области малых доз в принципе невозможна, поскольку диапазон дозозависимости, а также положение (и/или наличие) и амплитуда пика ГЧ варьируют в зависимости от выбранного теста, вида клеток, донора, уровня доз и многих других неконтролируемых факторов. Этот вывод подтверждается тем фактом, что успешная оценка индивидуальных доз на основе анализа ХА у лиц, подвергшихся облучению в результате Чернобыльской аварии, возможна лишь при дозах выше 0,5 Гр [85].

**Благодарности.** Авторы выражают глубокую признательность директору Лаборатории высоких энергий им. В. И. Векслера и А. М. Балдина в лице А. И. Малахова и А. Д. Коваленко за предоставленную возможность постановки радиобиологических экспериментов на синхрофазотроне и нуклотроне, благодарят сотрудников ОРРИ Г. Н. Тимошенко и А. П. Череватенко за обеспечение постановки экспериментов, А. П. Булаха, Н. А. Кошлань, Л. А. Мельникову и Т. А. Фадееву за помощь в работе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thacker J., Stretch A., Stephens M.* // *Mutat. Res.* 1977. V. 42. P. 316–326.
2. *Konecki D. S. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1982. No. 10. P. 6763–6775.

3. Melton D. W. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 1984. No. 81. P. 2147–2151.
4. Patel P. I. et al. // Mol. Cell Biol. 1986. No. 6. P. 393–403.
5. Rossiter B. J. F. et al. // Genomics. 1991. V. 9. P. 247–256.
6. Насонова Е. А., Говорун Р. Д., Красавин Е. А. // Тр. рабоч. совещ. по генетическому действию корпускулярных излучений, Дубна, окт. 1988 г. Дубна, 1989. С. 169–182.
7. Thacker J., Stretch A., Stephens M. A. // Intern. J. Radiat. Biol. 1979. V. 36, No. 2. P. 137–148.
8. Cox R., Masson W. K. // Ibid. P. 149–160.
9. Tokarova B. et al. // Mutat. Res. 1989. V. 227. P. 199–205.
10. Красавин Е. А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991. 182 с.
11. Glickman B. W., Rietveld K., Aaron C. S. // Mutat. Res. 1980. V. 69. P. 1–12.
12. Бреслер С. Е., Носкин Л. А., Суслов А. В. // Радиобиология. 1981. Т. 21, вып. 1. С. 3–8.
13. Nicklas J. A. et al. // Mutat. Res. 1989. V. 215. P. 147–160.
14. Sankaranarayanan K. // Mutat. Res. 1991. V. 258. P. 75–97.
15. Park M. S. et al. // Radiat. Res. 1995. V. 141. P. 11–18.
16. Yamada Y. et al. // Radiat. Res. 1996. V. 145. P. 481–490.
17. Little J. B. et al. // Radiat. Res. 1997. V. 148. P. 299–307.
18. Schmidt P., Kiefer J. // Mutat. Res. 1998. V. 421. P. 149–161.
19. Kiefer J. et al. // Mutat. Res. 1999. V. 431. P. 429–448.
20. Morgan T. L. et al. // Mutat. Res. 1990. V. 232. P. 171–182.
21. Whaley J. M., Little J. B. // Ibid. V. 234. P. 35–45.
22. Skulimowski A. W. et al. // Mutat. Res. 1986. V. 162. P. 105–112.
23. O'Neill J. P. et al. // Mutat. Res. 1990. V. 240. P. 143–149.
24. Govorun R. D. // Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation. NATO Science Series 2: Environmental Security. V. 55. Dordrecht; Boston; London, 1999. P. 249–258.
25. Stoll V. et al. // Radiat. Environm. Biophys. 1995. V. 34. P. 91–94.
26. Schmidt P., Scheerer N., Pede S. // Fifth Workshop on Heavy Charged Particles in Biology and Medicine, GSI, Darmstadt, Aug. 23–25, 1995. GSI-Report 95-10. Darmstadt, 1995. P. 45–48.
27. Yandell D. W., Dryja T. P., Little J. B. // Somat. Cell Mol. Genet. 1986. V. 12. P. 255–263.
28. Little J. B. // Intern. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74, No. 6. P. 663–671.
29. Вахтин Ю. Б. Генетическая теория клеточных популяций. Л.: Наука, 1980. 168 с.
30. Noël B. et al. // Exper. Cell Res. 1997. V. 104, No. 2. P. 423–426.
31. Порошенко Г. Г. // Генетика человека / Ред. Н. П. Бочков. Т. 3. М., 1978. С. 193–218.
32. Календо Г. С. // Радиобиология. 1993. Т. 33, вып. 1. С. 76–80.
33. Календо Г. С. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37, вып. 4. С. 532–535.
34. Pui C. H., Crist W. M., Look A. T. // Blood. 1990. V. 76, No. 8. P. 1449–1463.
35. Heisterkamp N., Groffen J. // Hematol. Pathol. 1991. V. 5, No. 1. P. 1–10.
36. Rabbitts T. H. // Nature. 1994. V. 372, No. 6502. P. 143–149.
37. Melo J. V. // Leukaemia. 1996. V. 10, No. 5. P. 751–756.

38. *Sabatier L. et al.* // Proc. of the Tenth Intern. Congr. «Radiation Research 1895–1995», Wurzburg, Germany, 1995. V. 2. P. 509–512.
39. *Корогодин В. И., Близник К. М.* // Радиобиология. 1972. Т. XII, вып. 2. С. 163–171.
40. *Корогодин В. И., Близник К. М., Капутьцевич Ю. Г.* // Радиобиология. 1972. Т. XII, вып. 3. С. 416–424.
41. *Корогодин В. И., Близник К. М., Капутьцевич Ю. Г.* // Радиобиология. 1977. Т. XVII, вып. 4. С. 492–499.
42. *Говорун Р. Д. и др.* // Радиобиология. 1982. Т. XXII, вып. 5. С. 648–653.
43. *Ritter S. et al.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1994. V. 66. P. 625–628.
44. *Ritter S. et al.* // Intern. J. Radiat. Biol. 2000. V. 76, No. 2. P. 149–161.
45. *Репин М. В., Говорун Р. Д., Красавин Е. А.* // ЭЧАЯ. 2000. Т. 33, вып. 3. С. 746–766.
46. *Гофман Д.* // Чернобыльская авария. Радиационные последствия для настоящего и будущего поколения. Минск: Вышэйша школа, 1999.
47. *Lukey T. D.* Radiation hormesis. Boca Raton: CRS Press, 1991.
48. International Commission on Radiation Protection. 1990. Recommendation of the ICRP. Pub. 60. Annals of the ICRP. V. 21, No. 1–3. Oxford, 1991.
49. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99). М.: М-во здравоохранения РФ, 1999.
50. *Pohl-Rulling J. et al.* // Mutat. Res. 1983. V. 110. P. 71.
51. *Lloyd D. C. et al.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1992. V. 61. P. 335.
52. *Севаньякаев А. В., Лучник Н. В.* // Генетика. 1977. Т. 13. С. 524.
53. *Гераськин С. А.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. С. 563.
54. *Заичкина С. И. и др.* // Радиобиология. 1992. Т. 32. С. 38.
55. *Mitchell J. C., Norman A.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1987. V. 52. P. 527.
56. *Palvic B., Jaggi B.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1986. V. 50. P. 345.
57. *Marples B., Joiner M. C.* // Radiat. Res. 1993. V. 133. P. 41.
58. *Lambin P. et al.* // Radiat. Res. 1994. V. 138. P. 32.
59. *Puck T. T., Marcus P. J.* // Exp. Med. 1956. V. 103. P. 653.
60. *Wouuter B. J., Skarsgard I. D.* // Radiat. Res. 1997. V. 148. P. 435.
61. *Short S. et al.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1999. V. 75. P. 1341.
62. *Sinclair W. K.* // Curr. Top. Radiat. Res. 1972. V. 7. P. 264.
63. *Lambin P., Marples B., Fertil B.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1993. V. 63. P. 639.
64. *Skov K. A.* // Mutat. Res. 1999. V. 430. P. 241.
65. *Joiner M. C. et al.* // Intern. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001. V. 49. P. 379.
66. *Olivieri G., Bodycote J., Wolff S.* // Science. 1984. V. 223. P. 549.
67. *Wiencke J. K. et al.* // Mutagenesis. 1986. V. 1. P. 375.
68. *Wolff S. et al.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1988. V. 53. P. 39.
69. *Shadley J. D., Wolff S.* // Mutagenesis. 1987. V. 2. P. 95.
70. *Shadley J. D., Wiencke J.* // Intern. J. Radiat. Biol. 1989. V. 56. P. 107.
71. *Ikushima T.* // Mutat. Res. 1987. V. 180. P. 215.

72. *Ikushima T.* // *Mutat. Res.* 1989. V. 227. P. 241.
73. *Гильяно Н.Я. и др.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 1998. Т. 38. С. 663.
74. *Hiendorff K. et al.* // *Mutat. Res.* 1987. V. 190. P. 131.
75. *Эйдус Л.Х.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. С. 874.
76. *Shadley J.D., Afsal V., Wollf S.* // *Radiat. Res.* 1987. V. 111. P. 511.
77. *Vijayalaxmi A., Burkart W.* // *Mutat. Res.* 1989. V. 211. P. 1.
78. *Jones L.A. et al.* // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1994. V. 66. P. 39.
79. *Ramahlo A., Sunjevaric I., Natarajan A. T.* // *Mutat. Res.* 1988. V. 207. P. 141.
80. *Bilbao A. et al.* // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1989. V. 56. P. 287.
81. *Obe G.* // *Chromosomal Aberrations. Basic and Applied Aspects.* Springer-Verlag, 1984. P. 212.
82. *Vral A., Thieerens H., De Ridder L.* // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1997. V. 71. P. 61.
83. *Norppa H., Renzi L., Lindholm C.* // *Mutagenesis.* 1993. V. 8. P. 519.
84. *Huber R. et al.* // *Environm. Molecular Mutagenesis.* 1996. V. 27. P. 105.
85. *Севанькаев А.В.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. С. 589.