

УДК 577.346; 577.217

**ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ
В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ
ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ**

М. В. Репин, Р. Д. Говорун, Е. А. Красавин

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна
Отделение радиационных и радиобиологических исследований

ВВЕДЕНИЕ	747
ИНДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ	749
ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ЛПЭ	752
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	763
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	764

УДК 577.346; 577.217

ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ

М. В. Репин, Р. Д. Говорун, Е. А. Красавин

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна
Отделение радиационных и радиобиологических исследований

Изучены закономерности образования стабильных и нестабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека после облучения γ -лучами, релятивистскими протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ $\sim 0,218$ кэВ/мкм) и плотноионизирующими ионами азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм). С использованием стандартного и FISH-методов получены линейные зависимости частот клеток с aberrациями и фрагментов и линейно-квадратичные зависимости общего числа aberrаций и частот дицентриков и транслокаций от дозы γ -лучей и протонов. Получены линейные дозовые зависимости после облучения ионами ^{14}N для всех использованных цитогенетических показателей, но после доз > 2 Гр наблюдалось отклонение от линейности с небольшим уменьшением частот дицентриков и клеток с aberrациями. Показана высокая частота делеций хромосомы-1 (с образованием фрагментов) после облучения ионами ^{14}N (до 40–50 % от общего числа aberrаций), тогда как после γ -облучения преобладали транслокации хромосомы-1 (до 50 %). Биологическая эффективность протонов с энергией 1 ГэВ была аналогична биологической эффективности γ -лучей. Высокая ОБЭ была получена для ионов ^{14}N с ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм (≥ 3). FISH-анализ выявил, что хромосомы-1 и -2 были схожи по количественным показателям частот aberrаций при всех дозах излучений в широком диапазоне ЛПЭ. Полученные данные свидетельствуют о повышенной радиочувствительности хромосом-1 и -2 по сравнению с остальными хромосомами генома человека.

The regularities of stable and unstable chromosome aberrations' formation were studied in the human lymphocytes after irradiation by γ rays, relativistic 1 GeV protons (LET ~ 0.218 keV/ μm) and densely ionizing ^{14}N ions with energy of 50 MeV/nucleon (LET ~ 77 keV/ μm). Using conventional and FISH-methods the linear dependencies on γ and proton doses were revealed for the frequencies of aberrant cells and fragments and linear-quadratic ones for total number of aberrations and the frequencies of dicentrics and translocations. After irradiation by ^{14}N ions linear dose-dependencies were shown for all investigated cytogenetical tests, but after doses > 2 Gy a deflection from linearity was observed to some decrease of aberrant cell and dicentric frequencies. High frequency of chromosome-1 deletions with fragments' formation was shown after ^{14}N irradiation (up to 40–50 % from total number of aberrations), while after γ irradiation chromosome-1 translocations were predominated (up to 50 %). The biological efficiency of 1 GeV protons was analogous to γ rays. High RBE was obtained for ^{14}N ions with LET ~ 77 keV/ μm (≥ 3). FISH-analysis showed that chromosomes-1 and 2 were quantitatively identical on the frequencies of aberrations at all doses of radiation with a wide LET range. The obtained data testify higher radiosensitivity of chromosomes-1 and 2 than that of the other chromosomes in human genome.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема биологического действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками является весьма актуальной в радиобиологии. Помимо фундаментального значения такие исследования важны и для решения ряда прикладных задач: радиоэкологических проблем, вопросов нормирования лучевых нагрузок для работников атомной энергетики и промышленности, проблем радиационной безопасности длительных космических полетов человека, использования различных источников ионизирующих излучений для лучевой терапии онкологических заболеваний и др.

Наименее изученным является мутагенное действие плотноионизирующих излучений, в частности разных видов ускоренных тяжелых ионов. Прежде всего это касается исследования закономерностей и механизмов индукции мутаций у клеток высших эукариот (млекопитающих и человека). Практически не изучены закономерности образования стабильных хромосомных мутаций при действии излучений разного качества. Исследование закономерностей и механизмов образования такого типа повреждений генетических структур представляется весьма важным, поскольку стабильные аберрации способны длительно сохраняться в популяциях облученных клеток, причем с ними связывается инициация ряда онкологических заболеваний. Так, в настоящее время установлена корреляция между возникновением хронической и острой миелоидной лейкемии, промиелотической лейкемии, лимфомы Беркитта и наличием транслокаций между различными хромосомами: $t(9; 22)$, $t(21; 8)$, $t(17; 15)$, $t(8; 14)$ соответственно.

Реализация программ длительных космических полетов человека ставит задачу детального изучения биологического действия протонов релятивистских энергий, составляющих основную часть спектра космических излучений. В этой связи крайне важно оценить биологическую эффективность таких излучений на основе различных показателей и, прежде всего, учета индукции хромосомных нарушений в клетках. Кроме того, количественный учет стабильных хромосомных аберраций может рассматриваться и как один из надежных способов для разработки и применения методов биологической дозиметрии, особенно в отдаленные сроки после лучевого воздействия при случайных неконтролируемых облучениях человека.

Широко известный классический цитогенетический метод [1, 2] для исследования хромосомных нарушений в лимфоцитах человека позволяет выявлять такие аберрации, как дицентрики и кольца. Они были использованы в ряде случаев для определения поглощенной дозы [3–5], и в настоящее время их оценка является общепризнанным методом в биологической дозиметрии [6]. Но возможность оценки поглощенной дозы при этом ограничивается острым периодом после лучевого воздействия, поскольку такие хромосомные аберрации являются нестабильными и быстро элиминируют из популяции об-

лученных клеток. В настоящее время этот, ставший стандартным, метафазный метод анализа хромосомных aberrаций широко используется в радиобиологических исследованиях. Всемирной организацией здравоохранения культура лимфоцитов человека рекомендована в качестве тест-системы при оценке влияния мутагенных факторов окружающей среды на наследственность. Использование лимфоцитов крови человека как объекта радиобиологических исследований позволяет избегать вынужденных экстраполяций и оговорок, неизбежно возникающих при интерпретации результатов, получаемых при использовании других видов объектов. Более того, как было показано рядом исследователей [7–10], выход хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека, индуцированных воздействием ионизирующих излучений «*in vitro*», совпадает с выходом aberrаций после облучения «*in vivo*».

Большим достижением явилась в последние годы разработка FISH-техники — флуоресцентной гибридизации «*in situ*» (fluorescence *in situ* hybridization) для изучения закономерностей образования стабильных хромосомных aberrаций [11–14]. Она позволяет выявлять отдельные хромосомы человека посредством их «окрашивания» с использованием специфичных проб с уникальными нуклеотидными последовательностями ДНК этих хромосом [15–17]. С использованием этого метода рядом авторов [18–21] показано, что стабильные aberrации в клетках человека сохраняются даже спустя несколько десятков лет после облучения. Это привлекло к ним внимание, так как появилась возможность ретроспективной оценки дозы лучевого воздействия на человека.

В настоящее время во многих научных лабораториях проводятся исследования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в клетках человека с использованием этого метода при действии редкоионизирующих излучений (X - и γ -лучи). В последние годы появились единичные работы по изучению стабильных aberrаций при действии плотноионизирующих α -частиц [22] и тяжелых ионов [23–27].

Все вышесказанное определяет большой интерес к такого рода исследованиям. Их проведение требует соответствующей ускорительной техники для получения разных видов заряженных частиц. Уникальные ускорители и установки Объединенного института ядерных исследований позволяют проводить радиобиологические и радиационно-генетические эксперименты с использованием ускоренных тяжелых ионов в широком диапазоне ЛПЭ. В представленной работе изложены результаты исследования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах человека при действии высокоэнергетических заряженных частиц, генерируемых на базовых установках ОИЯИ: протонов релятивистских энергий — на синхрофазотроне Лаборатории высоких энергий, ускоренных тяжелых ионов ^{14}N — на У-400М Лаборатории ядерных реакций им. Г. Н. Флерова.

1. ИНДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ

Ионизирующие излучения индуцируют широкий спектр повреждений хромосом в клетках млекопитающих и человека. Как известно, хромосомные повреждения являются определяющим фактором в лучевой гибели клеток. Но наряду с этим с ними связывается инициация мутагенных процессов и индукция малигнизации клеток, что приводит к развитию онкологических заболеваний.

Разработанный в конце 50-х гг. и ставший классическим метафазный метод анализа хромосом в лимфоцитах крови человека [1] позволяет обнаруживать хромосомные aberrации при воздействии разных физических и химических агентов, в том числе ионизирующих излучений. С его помощью были выявлены разные типы хроматидных и хромосомных делеций и обменов между поврежденными хромосомами. Были установлены закономерности их выхода от дозы облучения, времени после воздействия, ЛПЭ излучений, физиологического состояния клеток и т. п. Вместе с тем стандартный метафазный метод не позволял проанализировать полный спектр возникающих в клетках хромосомных нарушений, ограничивая анализ только категорией так называемых нестабильных aberrаций хромосом, к которым относятся разные виды фрагментов и несимметричных обменов. Как известно, возникновение таких aberrаций приводит к нарушению процессов деления клеток, что завершается их гибелью в ходе первых циклов деления. Вне поля зрения оставались так называемые стабильные aberrации, связанные с формированием транслокаций (симметричных хромосомных обменов) и инсерций хромосом. При образовании транслокаций происходит обмен участками между хромосомами. В последующих клеточных делениях такие aberrантные хромосомы ведут себя как нормальные, не нарушая процессов деления клеток, что способствует их длительному сохранению в популяции. Но со временем они приводят к развитию мутационных процессов в организме и потенциально являются предшествующими повреждениями для индукции опухолей и канцерогенеза. Причем ряд авторов полагает [28], что уровень стабильных aberrаций может быть использован как показатель тяжести радиационного поражения для индукции малигнизации клеток.

В течение длительного времени постоянно сохранялся интерес к разработке достаточно простого и эффективного метода выявления стабильных хромосомных aberrаций, индуцированных ионизирующими излучениями. В последнее десятилетие была разработана и продолжает совершенствоваться FISH-техника, которая позволяет выявлять отдельные хромосомы при использовании хромосом-специфичных ДНК-проб, меченных флуоресцентными красителями. В настоящее время для исследователей стали доступны полученные с помощью метода проточной цитофлуориметрии фаговые и плазм-

мидные библиотеки, содержащие уникальные последовательности ДНК человека [15, 17]. С их помощью можно отличить одну хромосому от другой и четко детектировать структурные перестройки помеченных флуоресцентным красителем хромосом. FISH-метод представляет собой мощный инструмент для выявления хромосомных aberrаций после воздействия ионизирующими излучениями, в том числе таких стабильных перестроек исследуемых хромосом, как транслокации и инсерции [12, 28–35]. Этот метод, однако, имеет определенные ограничения, связанные, главным образом, с небольшим числом хромосом, которые могут быть уникально помечены разноцветными красителями одновременно. Так, при использовании двух проб, окрашенных различающимися по цвету красителями, число анализируемых хромосом ограничено двумя парами. Вместе с тем этот метод позволяет детектировать все обменные aberrации между этими окрашенными и неокрашенными хромосомами даже при их низкой частоте, то есть при тех уровнях, какие обычно обнаруживаются у людей, пострадавших от действия ионизирующих излучений. Кроме того, он оказывается успешным и через длительный интервал времени после облучения [12, 30], что предоставляет возможность ретроспективной оценки воздействия радиации.

Индукция транслокаций в лимфоцитах крови человека, облученных разными дозами рентгеновских и γ -лучей, была показана многими исследователями [20, 30, 35–37]. Вместе с тем встречаются только единичные данные по их частотам в лимфоцитах, облученных плотноионизирующими ускоренными частицами [23–25]. Хотя анализ транслокаций проводится в ограниченном числе хромосом, их детектирование с помощью FISH-техники свидетельствует о высокой чувствительности этого метода и для таких видов излучений.

Стандартный метафазный метод широко использовался для учета хромосомных aberrаций, возникающих в геноме различных биообъектов при воздействии многих физических и химических агентов. Вместе с тем он позволяет учитывать только нестабильные aberrации хромосом в геноме в целом, а стабильные aberrации не поддаются оценке этим методом. Но нестабильные хромосомные aberrации быстро элиминируют из популяции облученных клеток в течение первых циклов деления [38, 39]. Так, в ряде исследований [38, 40] «*in vivo*» показано, что после лучевой терапии больных анкилирующим спондилитом дицентрические хромосомы, являющиеся нестабильными aberrациями, со временем исчезают из популяции лимфоцитов, в то время как частота образования таких индуцированных стабильных aberrаций, как транслокации, остается практически на том же уровне, что и непосредственно после облучения.

Отличительной чертой FISH-техники является то, что она позволяет проводить флуоресцентную гибридизацию с отдельными хромосомами. Эта особенность является как большим преимуществом, поскольку позволяет сравни-

тельно легко детектировать стабильные хромосомные aberrации, так и недостатком данного подхода, так как при этом детектируются только aberrации отдельных исследуемых хромосом [41]. Однако этот метод позволяет исследователю для решения той или иной задачи выбирать определенную часть генома для гибридизации и детектировать хромосомные aberrации между выбранной «окрашенной» и «неокрашенной» частями генома.

При использовании FISH-метода и сравнении данных, получаемых при окрашивании разных хромосом, с данными стандартного метафазного метода обычно исходят из того, что в первом приближении «радиочувствительность» хромосом пропорциональна содержанию в них ДНК. В работе [42] было отмечено, что все хромосомы участвуют в радиационно-индуцированных aberrациях в соответствии с репрезентативностью их ДНК в геноме. Однако к настоящему времени появились данные, которые указывают на большую или меньшую радиочувствительность разных хромосом. Так, в ряде работ сообщалось о том, что хромосома-1 проявляет большую радиочувствительность, чем ожидалось, исходя из содержания ДНК в этой хромосоме [43, 44]. Другими авторами отмечено, что частота образования aberrаций хромосомы-2 [45, 46] ниже ожидаемой.

С момента разработки FISH-техника привлекала внимание исследователей с точки зрения ее использования для целей биологической дозиметрии. Она была успешно апробирована при определении поглощенной дозы в случаях неконтролируемого облучения людей в результате Чернобыльской аварии [47–50], атомной бомбардировки в Хиросиме [20, 51], а также при других случайных облучениях [52, 53]. В работах этих авторов была продемонстрирована возможность успешного использования метода учета стабильных aberrаций хромосом в отдаленные сроки после облучения, а также показано, что их уровень существенно не менялся на протяжении длительного периода времени. Так, у пострадавших от атомной бомбардировки в Хиросиме было обнаружено сохранение уровня стабильных хромосомных aberrаций в течение длительного времени после облучения [20, 33]. В работе [51] было показано, что частоты образования транслокаций, выявленные через один год у пострадавших в результате аварии в Бразилии (Goiania), были ниже частот образования дицентриков, детектированных непосредственно после аварии, что авторы связывают с гибелью клеток, содержащих одновременно нестабильные aberrации и транслокации. В исследованиях, проведенных с использованием FISH-техники «*in vitro*» для анализа лимфоцитов крови человека после воздействия рентгеновскими лучами, выявлено уменьшение доли клеток с aberrациями в последующих поколениях [54–56]. Было обнаружено, что на фоне значительного снижения уровня нестабильных хромосомных aberrаций (50–60 % на поколение) частота стабильных aberrаций остается относительно неизменной.

С введением в практику цитогенетических лабораторий FISH-техники окрашивания отдельных хромосом появилось большое количество работ по изучению стабильных хромосомных aberrаций, индуцируемых редкоизирующими X- и γ -излучениями. Однако до недавнего времени отсутствовали сведения об индукции стабильных хромосомных aberrаций после воздействия плотноизирующими заряженными частицами. К настоящему времени появились единичные работы, в которых проведен анализ стабильных и нестабильных aberrаций в лимфоцитах крови человека после воздействия тяжелыми ионами [23–27]. Так, с помощью FISH-метода было показано, что ускоренные ионы кислорода вызывают значительную задержку деления и множественные хромосомные повреждения в лимфоцитах крови человека [27], причем отмечено, что хромосома-1 характеризуется высокой частотой повреждений и комплексными перестройками. В работе [27] при исследовании хромосомы-4 было показано, что протоны с энергией 250 МэВ, ионы углерода с энергией 290 МэВ/нуклон, ионы железа с энергией 1 ГэВ/нуклон вызывают в лимфоцитах крови и фибробластах человека аналогичные цитогенетические эффекты.

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют об отсутствии систематических исследований, касающихся формирования стабильных aberrаций хромосом в клетках человека и млекопитающих при воздействии ионизирующими излучениями. Имеются лишь весьма немногочисленные сведения о действии излучений с разными физическими характеристиками, особенно тяжелых заряженных частиц. В связи с этим нами предпринято сравнительное исследование с использованием FISH-техники и стандартного метафазного метода количественных и качественных закономерностей образования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах крови человека при действии редкоизирующих γ -лучей и протонов с энергией 1 ГэВ и плотноизирующих тяжелых ионов ^{14}N (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм).

2. ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ЛПЭ

При облучении использована плазма крови человека с лимфоцитами, выделенная из свежезятой крови здоровых доноров (23–40 лет). Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов для цитогенетического анализа проводили по общепринятой методике. Физические характеристики использованных в исследовании излучений приведены в табл. 1. Для последующего FISH-анализа облучение лимфоцитов проводили γ -лучами ^{137}Cs , для анализа стандартным метафазным методом — γ -лучами ^{60}Co . Облучение лимфоцитов ионами азота ^{14}N проводили с помощью физико-дозиметрической установки

Таблица 1. Физические характеристики излучений

Вид излучений	Источник	Энергия излучений	ЛПЭ, кЭВ/мкм	Доза, Гр
γ -лучи ^{60}Co	Установка «Рокус»	1,1–1,3 МэВ	0,3	0,5 ÷ 5,0
γ -лучи ^{137}Cs	Установка «Свет»	0,66 МэВ	0,3	1,0 ÷ 7,0
Протоны	Синхрофазотрон	1 ГэВ	0,218	0,15 ÷ 3,6
Ионы ^{14}N	Ускоритель У-400М	50 МэВ/нуклон	~ 77	0,5 ÷ 3,0

«Геном» [57], обеспечивающей формирование пучка, определение ЛПЭ частиц и дозы облучения в биообъекте и автоматическую смену образцов по получении заданной дозы. Облучение лимфоцитов протонами с энергией 1 ГэВ проводили на синхрофазотроне, поток протонов при поглощенной дозе 1 Гр составил $2,71 \cdot 10^9$ част./см² [58]. ЛПЭ протонов и ионов азота различались более чем на два порядка.

Препараты для анализа стандартным метафазным методом подвергали гидролизу 5N HCl (10 мин при ~ 20 °С), окрашивали 15 мин 3% раствором Гимза на фосфатном буфере (рН 6,8). Для учета хромосомных aberrаций использовали световые микроскопы. Для гибридизации «*in situ*» хромосомы-1 использовали биотинилированные пробы ДНК («Сambio», Великобритания), для хромосомы-2 — дигоксигенированные пробы ДНК («Oncor», Великобритания), для выявления центромер — флуоресцеиновые панцентромерные пробы ДНК («Сambio»). Процедуры проводили согласно инструкциям фирм. Для FISH-анализа лимфоцитов использовали компьютеризированные флуоресцентные микроскопы («Zeiss» и «Leica», Германия; «Hamamatsu», Япония). Хромосомные aberrации классифицировали в соответствии с общепринятой номенклатурой и модифицированным вариантом PAINT-системы. С использованием FISH-техники нами исследованы нарушения хромосом-1 и -2 лимфоцитов человека. Они являются самыми крупными хромосомами генома человека и представляют собой наибольшие мишени для воздействующих излучений. Это повышает вероятность обнаружения хромосомных повреждений.

FISH-анализ выявил высокую частоту образования стабильных aberrаций этих хромосом. Существенных различий по уровню aberrаций, возникающих в хромосомах-1 и -2, не было отмечено. Основную часть aberrаций составили транслокации. Инсерции были единичными и составляли от долей процента до максимально 2–4% при наибольших исследованных дозах облучения. Зависимость частоты образования транслокаций от дозы облучения протонами и γ -лучами описывается линейно-квадратичной функцией (рис. 1, а). По своей эффективности протоны с энергией 1 ГэВ аналогичны действию γ -излучения.

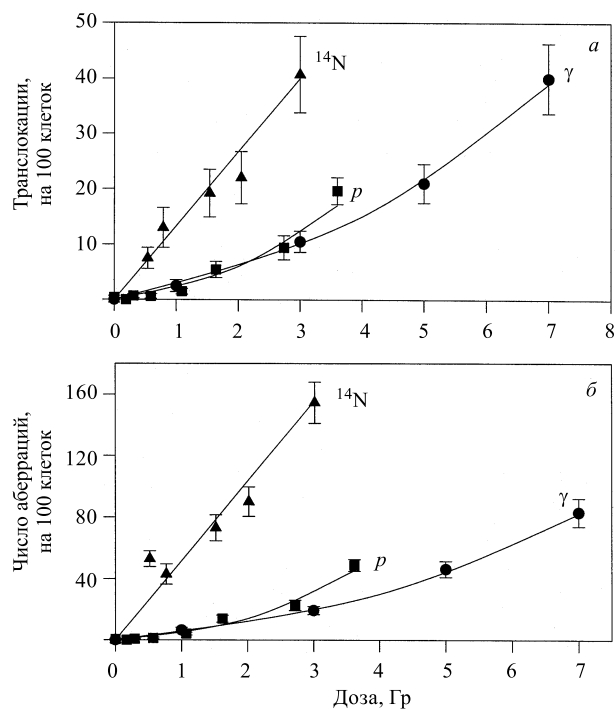


Рис. 1. Дозовые зависимости частоты образования транслокаций (а) и общего числа aberrаций (б) хромосомы-1 после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (●), протонами (■) и ионами ^{14}N (▲) (FISH)

Высокий уровень транслокаций хромосом наблюдается при действии плотно-ионизирующих ионов ^{14}N . Зависимость эффекта от дозы имеет линейный характер.

FISH-методом выявляются также и другие виды aberrаций помеченных хромосом (уже нестабильные). Оценка показала, что доля транслокаций от общего числа aberrаций хромосом-1 и -2 составила 40–45 % после облучения протонами и γ -лучами в дозах 1 Гр и выше. При меньших дозах облучения протонами наблюдали только транслокации, другие виды aberrаций обменного типа не были обнаружены. Но при облучении ионами ^{14}N доля транслокаций составила $\sim 25\%$. Последнее определялось выраженным фрагментозом хромосом, характерным для облучения тяжелыми ионами. В результате наблюдалось относительное снижение доли стабильных хромосомных aberrаций.

Общее число aberrаций хромосом-1 и -2 от дозы облучения описывается линейно-квадратичной функцией при действии протонов и γ -лучей (рис. 1, б).

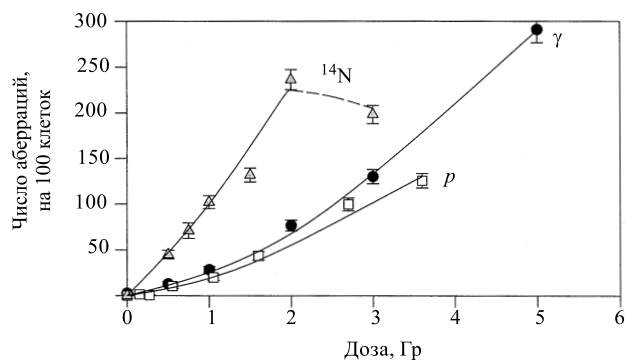


Рис. 2. Дозовые зависимости общего числа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека после облучения γ -лучами (●), протонами (□) и ионами ^{14}N (△) (стандартный метафазный метод)

Также не отмечаются различия по уровням эффекта при их воздействии. Наблюдается высокая эффективность ионов азота, при этом зависимость эффекта от дозы приближается к линейной. Аналогичный характер имеют дозовые зависимости общего числа хромосомных aberrаций при действии этих видов излучения при анализе стандартным метафазным методом генома в целом (рис. 2).

Данные по частотам образования клеток с aberrациями хромосом-1 и -2 свидетельствуют, с одной стороны, о высокой частоте повреждения этих хромосом (рис. 3), с другой — об отсутствии существенных различий по уровням клеток с aberrациями в этих хромосомах. Показан линейный характер до-

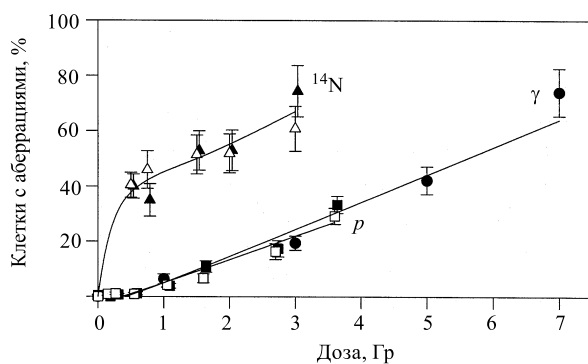


Рис. 3. Дозовые зависимости частоты образования клеток с aberrациями хромосомы-1 (темные значки) и хромосомы-2 (светлые значки) после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (●), протонами (■, □) и ионами ^{14}N (▲, △) (FISH-метод)

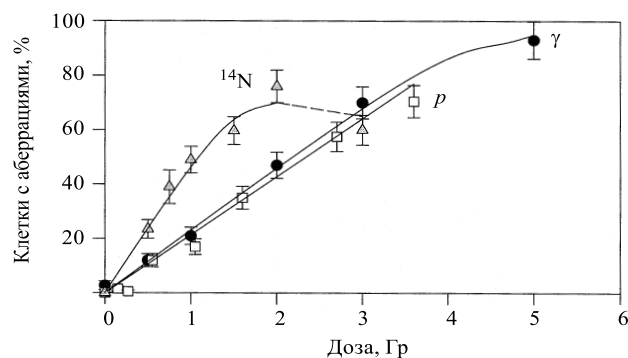


Рис. 4. Дозовые зависимости частоты образования клеток с хромосомными aberrациями после облучения лимфоцитов крови человека γ -лучами (\bullet), протонами (\square) и ионами ^{14}N (\triangle) (стандартный метафазный метод)

зовых зависимостей эффекта при действии протонами и γ -лучами. Высокоэффективны ионы азота, причем частоты образования клеток с aberrациями хромосом-1 и -2 резко увеличиваются (до 45%) уже при дозах до 0,75 Гр, а при дальнейшем увеличении доз облучения эффекты линейно возрастают до 65%. При анализе стандартным метафазным методом частота образования клеток с aberrациями возрастает линейно при воздействии всеми видами излучений (рис. 4). Но при высоких уровнях доз отмечаются отклонения от линейности со снижением уровня эффекта, что определяется задержкой вступления в митоз клеток с множественными aberrациями хромосом.

При действии редкоионизирующих протонов и γ -лучей в большинстве клеток наблюдалось повреждение только одной из гомологичных хромосом. Клетки с обоими поврежденными гомологами составляли только 1–2%. Число таких клеток повышалось при действии ионов азота: от 5 ÷ 11% при дозах до 1,5 Гр до 20 ÷ 30% с увеличением дозы до 3 Гр. Показателем высокой повреждающей способности ионов азота также служат данные о лимфоцитах, у которых повреждены хромосомы-1 и -2 одновременно. Их число возрастало с увеличением дозы от 0,5 до 3 Гр от 20 до почти 50% проанализированных клеток. При действии протонов число таких клеток составило только 1–3%. Интересным представляется факт высокой повреждаемости хромосом-1 и -2 исследуемыми видами излучений. Хотя они составляют только 16,2% генома, суммарно общее число их aberrаций оказалось сопоставимым с числом нестабильных aberrаций генома в целом.

В табл. 2 приведены данные по ОБЭ протонов и ионов азота, оценка которых проведена по разным цитогенетическим показателям при анализе FISH- и стандартным метафазным методами. Видно, что по своей эффективности протоны не отличаются от γ -излучения. Коэффициенты ОБЭ близки к

Таблица 2. Коэффициенты ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ускоренных ионов ¹⁴N (по цитогенетическим тестам)

Тест	Протоны, 1 ГэВ		Ионы ¹⁴ N	
	FISH-метод	Стандартный метафазный метод	FISH-метод	Стандартный метафазный метод
Клетки с хромосомными aberrациями	0,9	1,0	3,4	2,0
Общее число aberrаций хромосом	1,4	0,9	6,0	2,6
Транслокации	1,1	—	3,1	—
Дицентрики	1,7	0,9	5,2	2,3
Интерстициальные делеции	—	1,0	—	2,5
Фрагменты	0,7	1,0	5,7	2,0

единице. В несколько раз эффективнее ионы азота. Более высокие коэффициенты ОБЭ получены по данным FISH-анализа: 3 и выше. При стандартном метафазном методе анализа они находятся в пределах $2,0 \div 2,6$.

Нами была предпринята попытка сопоставить данные, полученные FISH-и стандартным метафазным методами. Выведены формулы для пересчета частот образования транслокаций, дицентриков и фрагментов, суммарно выявляемых в хромосомах-1 и -2, на геномные частоты образования таких aberrаций. Поскольку для флуоресцентной гибридизации можно использовать пробы на разные хромосомы, а также их комбинации, то возникает вопрос о возможности нормирования детектируемых FISH-методом aberrаций отдельных хромосом. Так, можно пересчитать частоты образования их aberrаций на полный геном, исходя из количественного соотношения части генома, покрываемой пробами, и остальной его части. Нами получены формулы, позволяющие рассчитать геномные частоты образования транслокаций F_T , дицентриков F_D и фрагментов F_A путем пересчета на полный геном их частот F_t , F_d и F_a , детектируемых при окрашивании одновременно n хромосом в разные цвета:

$$F_T = F_t \frac{1 - \sum_{i=1}^N C_i^2}{2 \sum_{i=1}^n C_i - \sum_{i=1}^n C_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n C_i \right)^2}, \quad (1)$$

$$F_D = F_d \frac{1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N C_i^2}{2 \sum_{i=1}^n C_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n C_i \right)^2}, \quad (2)$$

$$F_A = \frac{F_a}{\sum_{i=1}^n C_i}, \quad (3)$$

где C_i — доля i -й хромосомы в геноме; N — общее число хромосом в геноме. По этим формулам был проведен пересчет на полный геном частот образования aberrаций хромосом-1 и -2, исходя из их доли в геноме (согласно [59] $C_1 = 0,082$ и $C_2 = 0,080$). Если исходить из того, что теоретически нет предпосылок для преимущественного образования симметричных обменов хромосом по сравнению с асимметричными, то пересчитанные на полный геном частоты образования транслокаций, выявляемых FISH-методом в хромосомах-1 и -2, могут быть сопоставлены с частотами образования дицентриков, детектированных в геноме в целом стандартным метафазным методом. Данные приведены в табл. 3.

Сравнение геномных частот образования дицентриков, определенных стандартным метафазным и FISH-методами, показывает аналогичный характер их зависимостей от дозы облучения при воздействии соответствующими видами излучений. Однако при облучении лимфоцитов человека разными дозами γ -лучей отмечено превышение в $2,5 \div 5$ раз частоты образования дицентриков, определенных стандартным метафазным методом, над частотой образования дицентриков, пересчитанных на полный геном по данным, полученным для хромосом-1 и -2. При сравнении частот образования транслокаций хромосом-1 и -2, пересчитанных на полный геном, и частот образования дицентриков, определенных стандартным метафазным методом, выявлен аналогичный характер их дозовых зависимостей при воздействии соответствующими видами излучений. Однако показано превышение геномных частот образования транслокаций над уровнем дицентриков. Что касается фрагментов, то полученные данные свидетельствуют о превышении пересчитанных на полный геном частот образования фрагментов, детектированных FISH-методом в хромосомах-1 и -2, над их частотами, выявленными стандартным метафазным методом: после γ -облучения в исследованных дозах — в $3,9 \div 6,3$ раза, после воздействия протонами — в $2,2 \div 4,8$ и ионами азота — в $21 \div 25$ раз.

Детектированная в наших опытах FISH-методом частота разных типов aberrаций в зависимости от дозы γ -облучения находится в хорошем соответствии с данными, полученными в работе [30] для хромосомы-1 в лимфоцитах,

Таблица 3. Частоты аберраций, выявленных FISH-методом в хромосомах-1 и -2, пересчитанные на полный геном и детектированные стандартным метафазным методом в геноме в целом

Виды излучений	Доза, Гр	Виды аберраций, на 100 клеток				
		Транслокации Т(п)	Дицентрики		Фрагменты	
			Д(п)	Д(м)	Ф(п)	Ф(м)
γ-лучи	1,0	15,1	3,2	12,0	23,2	6,0
	2,0	—	—	31,5	—	13,5
	3,0	63,3	12,1	68,0	53,7	8,5
	5,0	126,6	44,3	101,0	176,9	51,5
	7,0	241,2	63,3	—	329,4	—
Протоны ЛПЭ 0,218 кэВ/мкм	0,15	1,0	0	1,7	3,7	0
	0,27	4,0	0,7	0,5	1,2	0
	0,55	4,0	0	5,0	5,6	1,5
	1,05	8,0	10,1	7,0	18,5	5,0
	1,6	32,3	20,2	11,0	26,5	12,5
	2,7	60,9	38,8	42,5	67,3	18,0
3,6	111,9	90,3	54,5	119,1	25,5	
Ионы ¹⁴ N ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм	0,5	60,0	8,2	14,0	351,9	10,5
	0,75	93,2	32,6	28,0	265,3	12,0
	1,0	—	—	42,0	—	15,0
	1,5	94,9	68,1	56,5	434,4	20,3
	2,0	149,9	52,2	104,0	376,4	34,5
3,0	212,8	26,4	64,5	939,1	37,5	

Примечание. Т(п), Д(п), Ф(п) — пересчитанные на полный геном частоты аберраций, выявленных FISH-методом в хромосомах-1 и -2. Д(м), Ф(м) — частоты аберраций генома в целом, детектированные стандартным метафазным методом.

облученных γ-лучами ⁶⁰Со. Более высокие частоты образования транслокаций и дицентриков детектированы при анализе одновременно окрашенных трех пар хромосом [31]. Возможно, это отличие определяется учетом большего числа таких аберраций при анализе нескольких пар одновременно «окрашенных» хромосом. Однако не отмечается существенных различий между данными, полученными нами и в работе [35], в которой была использована другая комбинация из трех пар «окрашенных» хромосом.

Частота образования транслокаций, выявленная в нашем опыте при γ-облучении, в 3 ÷ 5 раз выше (в среднем в 4,3 раза) частоты образования дицентриков, детектированных FISH-методом в хромосоме-1. Эти данные находятся в соответствии с ранними данными Лукаса и др. [60], отмечавших при разных дозах такие превышения в 1,2 ÷ 9 раз, Кремера и др. [30] —

в $1 \div 12$ раз, Натарайяна и др. [31] — в $1,5 \div 9$ раз. Однако авторы предполагают, что это связано, вероятнее всего, с затрудненным выявлением центромер (и, соответственно, дицентриков) при анализе без дополнительного панцентромерного «окрашивания» хромосом. При этом могли наблюдаться сдвиги в соотношении между этими аберрациями в случае, если дицентрик оценивался как нерцепрокная транслокация. Основанием для такого суждения могут служить и полученные нами данные при облучении лимфоцитов протонами, которые так же, как и γ -лучи, являются редкоионизирующим излучением и по своей эффективности аналогичны их воздействию. В этом случае FISH-анализ был проведен с дополнительным докрасиванием флуоресцентным красителем центромерных регионов хромосом при использовании панцентромерных проб. Однако величины соотношений между транслокациями и дицентриками для хромосомы-1 после облучения в дозах свыше 1 Гр оказываются сниженными по сравнению с γ -излучением, тем не менее выход транслокаций остается примерно в 1,4 раза более высоким, чем дицентриков. А при облучении протонами в дозах менее 1 Гр в хромосоме-1 нами были обнаружены только транслокации. Что касается воздействия ускоренными ионами азота ^{14}N , то, как и при γ -облучении, соотношение между транслокациями и дицентриками составило в среднем $\sim 3,5$. Превышение уровня транслокаций над дицентриками было отмечено также в работе [24] при FISH-анализе хромосом-4 и -8 в фибробластах человека, облученных ионами ^{12}C (ЛПЭ $\sim 16,2$ кэВ/мкм) и рентгеновскими лучами: в 1,7 и 2,4 раза соответственно.

Сопоставление полученных нами данных по FISH-анализу с результатами стандартного метафазного анализа показало, что пересчитанные на полный геном частоты образования транслокаций в хромосомах-1 и -2 примерно в два раза выше, чем частоты образования дицентриков, выявленных в лимфоцитах стандартным метафазным методом, при действии всеми исследованными видами излучений в дозах более 1 Гр.

Наблюдаемые различия в геномных частотах образования фрагментов, детектируемых разными методами (табл. 3), возможно, определяются методическими особенностями FISH-анализа метафазных клеток. При таком анализе затруднена идентификация таких аберраций хромосом, как интерстициальные и хроматидные делеции и их дифференцировка от свободных фрагментов хромосом. При этом появляется вероятность объединения их в группу фрагментов. Но даже если сравнивать пересчитанные на полный геном частоты образования фрагментов, выявленных FISH-методом в хромосомах-1 и -2, с суммой геномных частот интерстициальных делеций, хромосомных и хроматидных фрагментов, детектированных стандартным метафазным методом, при воздействии соответствующих видов излучений, то превышения первых над вторыми сохраняются и составляют при облучении γ -лучами и протонами в среднем $1,2 \div 1,4$ раза, а ионами азота — примерно в 8 раз.

Результаты этого рассмотрения подтверждают предположение о более высокой вероятности повреждения хромосом-1 и -2 по сравнению с другими хромосомами генома при воздействии ионизирующими излучениями, особенно плотноионизирующими. Что касается последних, то в имеющихся единичных работах [25] также отмечен высокий уровень фрагментов, не связанных с обменов, при изучении FISH-методом хромосомных аберраций в фибробластоидных клетках человека после облучения α -частицами. Согласно теоретическим представлениям, радиационно-индуцированные ДНК-повреждения распределяются среди хромосом случайно. Однако сравнение общего числа аберраций, детектированных стандартным метафазным методом в геноме в целом, с данными, полученными при пересчете на полный геном их частот, детектируемых FISH-методом, в хромосомах-1 и -2 показывает, что число аберраций не просто пропорционально содержанию ДНК в хромосомах. Представляется, что существуют еще другие факторы, влияющие на индукцию аберраций в разных хромосомах.

К настоящему времени накапливаются данные, полученные FISH-методом, которые указывают на разную радиочувствительность отдельных хромосом в геноме человека при воздействии редкоионизирующими излучениями [20, 44, 46]. Причем она не может быть объяснена только на основе предположения о пропорциональности радиочувствительности хромосом их длине. При использовании FISH-метода неравномерность распределения точек разрыва была обнаружена в хромосомах-1, -2 и -4 человека у случайно облученных людей [61]. Авторы [32] показали, что конденсированный хроматин в эмбриональных фибробластах китайского хомячка оказывается более резистентным к радиационно-индуцированным повреждениям по сравнению с неконденсированным. Ранее это было отмечено и для лимфоцитов человека [62]. Также было выявлено различие в кинетике репарации хромосом, показывающее, что процессы репарации проходят более быстро в эухроматине, чем в гетерохроматине [63]. В своем исследовании мы также наблюдали высокую индукцию аберраций в хромосоме-1 по сравнению с Y-хромосомой при облучении лимфоцитов нейтронами и γ -лучами [64]. Повреждения Y-хромосомы были выявлены только после крайне высоких доз γ -лучей (30 Гр) и нейтронов со средней энергией 7 МэВ (15 Гр) и составляли 25 и 4 % соответственно, в то время как аберрации хромосомы-1 наблюдались почти в 80 % клеток уже после дозы 7 Гр γ -лучей и 5 Гр нейтронов. Это может определяться не только меньшим содержанием ДНК в Y-хромосоме, длина которой, согласно [59], составляет 2,3 % генома (то есть она в 4 раза короче хромосомы-1), но и ее гетерохроматиновой структурой.

Принимая во внимание эти результаты, мы можем предположить, что наблюдаемая в наших экспериментах высокая частота аберраций в хромосомах-1 и -2 по сравнению с остальным геномом может определяться эухроматиновой структурой этих хромосом.

Существует также мнение о том, что на радиочувствительность хромосом влияет их пространственная организация в клетке [64, 65]. Полученные в последнее время данные с применением FISH-техники «окрашивания» отдельных хромосом непосредственно в ядрах клеток, находящихся в интерфазе клеточного цикла, показывают, что хромосомы в них специфически плотно упакованы и занимают строго ограниченную территорию [66]. Отсюда следует предположение, что вероятность образования аберраций между определенными хромосомами, граничащими в ядре клетки друг с другом, будет выше, чем вероятность образования аберраций между хромосомами, имеющими те же физические длины, но пространственно разделенными друг с другом.

Таким образом, накопленные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что разная радиочувствительность отдельных хромосом не может быть объяснена только на основе их физической длины. Кроме того, поскольку аберрации хромосом детектированы разными методами в разных частях генома, не исключается вероятность получения различающихся результатов. Эти обстоятельства, наряду с другими, связанными с особенностями используемых методов, могли сказаться и на различиях в коэффициентах ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ускоренных ионов ^{14}N , оценка которых проведена нами по разным цитогенетическим показателям при анализе стандартным метафазным и FISH-методами (табл. 2). Так как стандартный метафазный метод не позволяет детектировать симметричные обменные аберрации (транслокации) хромосом, то общее число выявленных этим методом хромосомных аберраций оказывается сниженным по сравнению с реально возникающими при воздействии ионизирующими излучениями. В свою очередь, FISH-методом, позволяющим детектировать транслокации, анализируются аберрации только в небольшой части генома клеток. Эти обстоятельства могут сказываться на соотношениях разных видов хромосомных аберраций и обуславливать различия их долей от общего числа регистрируемых повреждений.

При анализе метафазным методом хромосом генома в целом мы наблюдали, что большую часть их аберраций в облученных лимфоцитах составляли такие несимметричные обменные аберрации, как дицентрики и кольца, на долю которых приходилось в среднем $45 \div 50\%$ от общего числа выявленных хромосомных нарушений. Для суждения о возможном уровне симметричных обменных аберраций в полном геноме может быть полезным установление соотношения между фракцией транслокаций и фракцией дицентриков и колец, выявляемых FISH-методом в хромосомах-1 и -2. Так, по полученным нами данным не отмечено существенных количественных различий между ними при FISH-анализе обеих хромосом в лимфоцитах, облученных, соответственно, протонами или ионами азота в дозах более 1 Гр. Доли этих видов аберраций от общего числа составили при облучении протонами в среднем $\sim 35\%$, а ионами азота $\sim 25\%$. Мы можем предположить, что подобные со-

отношения сохраняются и в геноме в целом. Для проверки было суммировано количество транслокаций, пересчитанных на полный геном, исходя из данных FISH-анализа для хромосом-1 и -2, с общим числом aberrаций, детектированных стандартным метафазным методом в геноме в целом, и рассчитаны доли транслокаций и доли дицентриков и колец от такого суммарного числа хромосомных aberrаций. Действительно, оказалось, что при воздействии редкоизирующими излучениями (γ -лучи и протоны) доли этих видов aberrаций от обобщенного числа aberrаций составляли около 30–35 %. При воздействии ионами азота доля дицентриков и колец также имела близкие значения (в среднем 27 %), но доля транслокаций оказалась существенно более высокой и в среднем составила 48 %. Видимо, не исключается вероятность того, что воздействие излучениями с высокими плотностями ионизации обеспечивает некоторые преимущества для формирования симметричных обменных aberrаций (транслокаций) по сравнению с несимметричными обменами. Хотя в этом случае также может иметь место недоучет числа дицентриков в соответствующие сроки фиксации вследствие более длительной задержки деления клеток с такими aberrациями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изложены результаты исследования стабильных и нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах человека, выполненного в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ и в лаборатории высокоточной цитометрии Института биофизики АН ЧР (Брно, Чехия). Оно стало возможным благодаря использованию пучков высокоэнергетических заряженных частиц, генерируемых на базовых установках ОИЯИ: протонов релятивистских энергий (синхрофазотрон ЛВЭ), ускоренных тяжелых ионов ^{14}N (У-400М ЛЯР).

Изучались количественные закономерности образования стабильных aberrаций хромосом (транслокации и инсерции) с использованием техники флуоресцентной гибридизации «*in situ*» (FISH-метод) при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ. Установлена высокая частота образования таких aberrаций в хромосомах-1 и -2 человека при действии излучений разного качества. Основную их часть составили транслокации. На их долю приходилась значительная часть от общего числа хромосомных aberrаций: при γ -облучении и действии протонов их вклад достигает 40–45 %, при облучении ионами ^{14}N ~ 25 %. При действии редкоизирующих излучений выявлен линейно-квадратичный характер дозовых зависимостей для общего числа хромосомных aberrаций, частоты образования дицентриков и транслокаций хромосом-1 и -2 и линейный характер дозовых зависимостей для числа клеток с aberrациями и частоты образования фрагментов. Аналогич-

ный характер имели дозовые зависимости при анализе хромосомных aberrаций стандартным метафазным методом. Облучение ускоренными ионами ^{14}N характеризовалось линейным характером дозовых зависимостей по разным цитогенетическим показателям при оценке как классическим метафазным методом, так и FISH-методом.

Показано, что уровень транслокаций при действии γ -лучей, протонов и ионов ^{14}N превышал частоту возникновения дицентриков в 4,3; 1,4 и 3,5 раза соответственно. FISH-методом выявлена высокая частота образования фрагментов хромосом-1 и -2 при облучении клеток ионами ^{14}N — до 50 % от общего числа хромосомных aberrаций. При действии γ -лучей и протонов на их долю приходилось ~ 25 %.

Оценка ОБЭ протонов с энергией 1 ГэВ и ионов ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон по выходу стабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека показала высокую эффективность ионов ^{14}N . Коэффициенты ОБЭ протонов и ионов азота по выходу транслокаций составили 1,1 и 3,1 соответственно. По другим цитогенетическим показателям коэффициенты ОБЭ протонов близки к единице, а коэффициенты ОБЭ ускоренных ионов азота находятся в пределах $3,1 \div 6,0$ при анализе хромосомных aberrаций FISH-методом.

Разработан математический метод пересчета на полный геном частот образования транслокаций, дицентриков и фрагментов, выявляемых FISH-методом, для случаев «окрашивания» разными флуоресцентными красителями одной или нескольких пар хромосом. Анализ результатов пересчета свидетельствует о более высокой радиочувствительности хромосом-1 и -2 среди других хромосом генома человека.

Авторы глубоко благодарны академику А. М. Балдину, члену-корреспонденту РАН Ю. Ц. Оганесяну, профессору А. И. Малахову за внимание к проведенным работам, доктору С. Козубеку и доктору Е. Лукашевой за плодотворные дискуссии и поддержку в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moorhead P. S. *et al.* // *Exp. Cell Res.* 1960. V. 20. P. 613.
2. Hungerford D. A. // *Stain Technol.* 1965. V. 40. P. 333.
3. Awa A. A. *et al.* // *J. Radiat. Res.* 1978. V. 19. P. 126.
4. Sasaki M. S., Miyata H. // *Nature (London)*. 1968. V. 220. P. 1189.
5. Lloyd D. C., Purrott R. J. // *Radiat. Prot. Dosimetry*. 1981. V. 1. P. 19.
6. IAEA (International Atomic Energy Agency, Vienna). *Technical Report Series*. 1986. P. 260.
7. Bajerska A., Liniecki J. // *Mutat. Res.* 1975. V. 27. P. 271.
8. Brewen J.G., Gengozian N. // *Mutat. Res.* 1971. V. 13. P. 383.

9. *Buckton K. E. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1971. V. 19. P. 369.
10. *Schmid E. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1974. V. 26. P. 31.
11. *Pinkel D., Straume T., Gray J. W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 2934.
12. *Pinkel D. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 9138.
13. *Viscidi R. P., Connelly C. J., Yolken R. H.* // *J. Clin. Microbiol.* 1986. V. 23. P. 311.
14. *Cremer T. et al.* // *Hum. Genet.* 1988. V. 80. P. 235.
15. *Collins C. et al.* // *Genomics.* 1991. V. 11. P. 997.
16. *Krumlauf R., Jeanpierre M., Young B. D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 2971.
17. *Van Dilla M. A. et al.* // *Biotechnology.* 1986. V. 4. P. 537.
18. *Leonard A., Deknudt C., Leonard E. D.* // *Radiat. Prot. Dosim.* 1988. V. 22. P. 55.
19. *Lindholm C. et al.* // *Radiat. Res.* 1998. V. 150. P. 237.
20. *Lucas J. N. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. V. 62. P. 53.
21. *Salassidis K. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. V. 68. P. 257.
22. *Griffin C. S. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. V. 67. P. 431.
23. *Durante M. et al.* // *Proc. of 6th Workshop on Heavy-Charged Particles in Biology and Medicine, Baveno. GSI, Report 97-09.* 1997. V. C2. P. 1.
24. *Fussel K., Ritter S., Kraft G.* // *Proc. of 6th Workshop on Heavy-Charged Particles in Biology and Medicine, Baveno. GSI, Report 97-09.* 1997. V. C3. P. 1.
25. *Testard I., Ditrillaux B., Sabatier L.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1997. V. 72. P. 27.
26. *Yang T. C. et al.* // *Abstr. of Eight Annual Space Radiation Health Investigators' Workshop, Apr. 29–May 3, 1997.* P. 20.
27. *Wu H. et al.* // *Radiat. Res.* 1997. V. 148. P. 102.
28. *Natarajan A. T. et al.* // *Mutat. Res.* 1991. V. 247. P. 103.
29. *Lichter P. et al.* // *Hum. Genet.* 1988. V. 80. P. 224.
30. *Cremer T. et al.* // *Cytometry.* 1990. V. 11. P. 110.
31. *Natarajan A. T. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. V. 61. P. 199.
32. *Natarajan A. T. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1994. V. 66. P. 615.
33. *Awa A. A. et al.* // *J. Radiat. Res.* 1992. V. 33 (Suppl.). P. 206.
34. *Gray J. W. et al.* // *J. Radiat. Res.* 1992. V. 33 (Suppl.). P. 80.
35. *Schmid E. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. V. 62. P. 673.
36. *Nakano M. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. V. 64. P. 565.
37. *Straume T., Lucas J. N.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. V. 64. P. 185.
38. *Buckton K. E. et al.* *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* / Eds. by H. Evans, D. Lloyd. Edinburgh University Press, 1978. P. 142.
39. *Lucas J. N. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1996. V. 70. P. 309.
40. *Buckton K. E.* *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man* / Eds. by T. Ishihara, M. S. Sasaki. N. Y., 1983. P. 491.
41. *Savage J. R. K., Simpson P.* // *Mutat. Res.* 1994. V. 307. P. 345.
42. *Seabright M.* // *Chromosoma.* 1973. V. 40. P. 333.

43. *Bauchinger M., Gotz G.* // Rad. and Environ. Biophys. 1979. V. 16. P. 355.
44. *Finnon P., Lloyd D. C., Edwards A. A.* // Int. J. Radiat. Biol. 1995. V. 68. P. 429.
45. *Holmerg M., Jonasson R.* // Hereditas. 1973. V. 74. P. 57.
46. *Stephan G., Pressl S.* // Int. J. Radiat. Biol. 1997. V. 71. P. 293.
47. *Воробцова И. Е., Богомазова А. Н.* // Рад. биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35, вып. 5. С. 636.
48. *Обухова Т. Н., Домрачева Е. В.* // Рад. цитогенетика. 1998. Т. 38, вып. 6. С. 793.
49. *Снигирева Г. П., Шевченко В. А., Новицкая Н. Н.* // Рад. биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35, вып. 5. С. 654.
50. *Sevan'kaev A. V. et al.* // Radiat. Protection Dosimetry. 1995. V. 58. P. 247.
51. *Straume T. et al.* // Health Physics. 1991. V. 60. P. 71.
52. *Lloyd D. C. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 73. P. 543.
53. *Ramallo A. T., Curado M. P., Natarajan A. T.* // Mutat. Res. 1995. V. 331. P. 47.
54. *Boei J. J. W. A., Vermeulen S., Natarajan A. T.* // Mutat. Res. 1996. V. 349. P. 127.
55. *Hoffmann G. R. et al.* // Environ. Mol. Mutagen. 1999. V. 33. P. 94.
56. *Matsumoto K. et al.* // Radiat. Res. 1998. V. 149. P. 602.
57. *Череватенко А. П.* // Тр. рабоч. совещ. по генетическому действию корпускулярных излучений (Дубна, 4–6 окт. 1988 г.). Дубна, 1989. С. 300.
58. *Timoschenko G. N., Bamblevski V. P., Krylov A. R.* JINR Preprint E16-99-47. Dubna, 1999.
59. *Morton N. E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 7474.
60. *Lucas J. N. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 1989. V. 56. P. 201.
61. *Tucker J. D., Senft J. R.* // Radiat. Res. 1994. V. 140. P. 31.
62. *Vyas R. X., Darraudi F., Natarajan A. T.* // Mutat. Res. 1991. V. 249. P. 29.
63. *Sljepcevic P., Natarajan A. T.* // Mutat. Res. 1994. V. 323. P. 113.
64. *Lukasova E. et al.* // Hum. Genet. 1997. V. 100. P. 525.
65. *Chen A. M. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 1996. V. 69. P. 411.
66. *Cremer C. et al.* // Mutat. Res. 1996. V. 366. P. 97.