

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА**

19-2002-8

На правах рукописи
УДК 577.391

**КОШЛАНЬ
Игорь Владимирович**

**МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛПЭ НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
И ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ
HPRT-МУТАНТНЫХ СУБКЛОНОВ**

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2002

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований Объединенного института ядерных исследований, г.Дубна.

Научный руководитель: кандидат биологических наук ***Р.Д.Говорун***

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор ***А.С.Саенко***
доктор биологических наук,
профессор ***И.И.Пелевина***

Ведущее учреждение: Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН,
г.Москва

Защита состоится “ ____ ” _____ 2002 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.501.001.65 в Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119899, г.Москва, ГСП, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, Диссертационный совет Д.501.001.65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ. Отзывы просим присылать по адресу: 119899, г. Москва, ГСП, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, Диссертационный совет Д.501.001.65.

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2002 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

О.Р. Кольс

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Мутагенное действие ионизирующих излучений на клетки млекопитающих и человека представляет собой одну их важнейших, но все еще слабо изученных проблем радиобиологии и радиационной генетики. Прежде всего, это относится к воздействию излучений разного качества и, в особенности, таких плотно ионизирующих видов излучений, как тяжелые ионы с разными величинами линейной передачи энергии (ЛПЭ). Количественные и качественные закономерности их мутагенного воздействия продолжают оставаться наименее изученными в радиационной генетике.

Техногенное развитие цивилизации привело к появлению в среде обитания человека соединений и источников ионизирующих излучений, обладающих высоким мутагенным действием. Мутагены физической и химической природы индуцируют широкий спектр различных повреждений. Возникающие в клетках мутации, по общепризнанному мнению, лежат в основе злокачественной трансформации клеток и развития мутагенеза в организме. Они оказывают как непосредственное негативное влияние на человека, так и влияют на последующие, даже весьма отдаленные поколения, приводя к развитию различных, в том числе наследуемых заболеваний. В обоих случаях биологические последствия существенно отдалены по времени от момента непосредственного действия вызывающих их повреждающих агентов.

Задача изучения мутагенного действия ионизирующих излучений, особенно 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) и тест-систем для оценки мутаций резистентности клеток млекопитающих и человека к ряду химических соединений. С их помощью зарегистрированы мутации отдельных генов (HPRT, APRT, TK и др.), возникающие как спонтанно, так и при воздействии ионизирующих излучений. Их анализ позволяет судить о мутагенезе клеток высших эукариотов. При этом данные по радиационно-индуцированному мутагенезу получены, в основном, при воздействии редко ионизирующих электромагнитных видов излучений (γ - и рентгеновские лучи). Что касается мутагенного действия плотно ионизирующих излучений и

особенно тяжелых ионов, то оно остается весьма слабо изученным. Имеются весьма немногочисленные и несистематичные сведения по данному вопросу.

Учитывая актуальность, научную и практическую значимость изучения мутагенного действия ионизирующих излучений разного качества, а также неполноту сведений в этой области, мы провели сравнительное исследование закономерностей индукции мутаций в клетках млекопитающих разными видами излучений, в том числе тяжелыми ионами, в широком диапазоне значений ЛПЭ и исследовали цитогенетические характеристики HPRT-мутантных субклонов, выращенных из одиночных клеток, которые сохраняют возникшие в них HPRT-мутации в последующих поколениях.

Цель и основные задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение закономерностей мутагенного действия на клетки млекопитающих редко и плотно ионизирующих излучений в широком диапазоне значений их ЛПЭ (γ -кванты, протоны высоких энергий, ускоренные ионы гелия, углерода и азота с разными энергиями).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить дозовые зависимости частоты HPRT-мутаций клеток китайского хомячка, индуцированных γ -квантами и ускоренными тяжелыми ионами широкого диапазона значений ЛПЭ;
- Изучить индукцию HPRT-мутаций в клетках китайского хомячка в зависимости от ЛПЭ излучений;
- Выявить и выделить клетки с мутациями в локусе HPRT, индуцированными γ -квантами, протонами с энергией 1 ГэВ и ионами ^{14}N с $E=50$ МэВ/нуклон, и вырастить из них радиационно-индуцированные HPRT-мутантные субклоны;
- Выявить и выделить HPRT-мутантные клетки в интактной культуре и вырастить спонтанные мутантные субклоны;
- Провести цитогенетический анализ спонтанных и радиационных HPRT-мутантных субклонов, индуцированных излучениями, различающимися по величине ЛПЭ;
- Провести сравнительный анализ по цитогенетическим показателям спонтанных и радиационных HPRT-мутантных субклонов, индуцированных излучениями с разной величиной ЛПЭ;
- Оценить по цитогенетическим показателям специфику мутагенного дейст-

вия на клетки млекопитающих редко и плотно ионизирующих излучений с разной величиной ЛПЭ.

Положения, выносимые на защиту.

- Результаты индукции HPRT-мутаций в клетках китайского хомячка в зависимости дозы и величины ЛПЭ излучений разного качества (γ -квантов, ускоренных ионов ^4He и ^{12}C с величинами ЛПЭ от 20 до 214 кэВ/мкм).
- Результаты цитогенетического исследования HPRT-мутантных субклонов, индуцированных излучениями с разной ЛПЭ (γ -квантами, протонами с $E=1$ ГэВ и ЛПЭ ~ 0.218 кэВ/мкм, ионами ^{14}N с $E=50$ МэВ/нуклон и ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм), выявившие их гетерогенность по исследованным показателям (митотической активности, спектрам хромосом, частоте aberrаций хромосом).
- Результаты анализа хромосомной (по числу aberrаций) и геномной (по спектрам хромосом) нестабильности мутантных субклонов, индуцированных излучениями с разной величиной ЛПЭ.

Научная новизна. В работе впервые:

- Проведено систематическое исследование закономерностей индукции мутаций в клетках китайского хомячка редко и плотно ионизирующими излучениями: γ -квантами, ускоренными ионами ^4He с ЛПЭ 20, 50, 78 кэВ/мкм и ^{12}C с ЛПЭ 214 и 367 кэВ/мкм;
- Получены HPRT-мутантные субклоны клеток китайского хомячка, индуцированные протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ ~ 0.218 кэВ/мкм), и исследованы их цитогенетические характеристики;
- Получены HPRT-мутантные субклоны при индукции тяжелыми ионами ^{14}N с $E=50$ МэВ/нуклон (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм) и исследованы их цитогенетические характеристики;
- Проведен сравнительный анализ по цитогенетическим показателям спонтанных и радиационных HPRT-мутантных субклонов, индуцированных γ -квантами, протонами с $E=1$ ГэВ и ионами ^{14}N : выявлена их гетерогенность, геномная (по числу хромосом) и хромосомная (по уровню aberrаций) нестабильность;
- Выявлено снижение хромосомной нестабильности HPRT-мутантных субклонов, индуцированных плотно ионизирующими ионами ^{14}N с $E=50$ МэВ/нуклон, по сравнению с мутантами, индуцированными редко ионизи-

рующими излучениями (γ -квантами и протонами с $E=1$ ГэВ), и спонтанными мутантами.

Научно-практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Прежде всего, они пополняют сведения о мутагенном действии на клетки высших эукариотов ионизирующих излучений разного качества, в том числе плотно ионизирующих тяжелых ионов с разной величиной ЛПЭ. Они могут иметь значение для установления количественных и качественных закономерностей формирования мутаций в клетках млекопитающих и человека. Результаты работы могут быть использованы для оценки отдаленных последствий воздействия ионизирующих излучений разного качества на клетки млекопитающих и человека. Такие сведения важны для уточнения критериев при гигиеническом нормировании воздействия излучений с разными физическими характеристиками при работе человека в радиационных условиях на Земле и в Космосе, для научного обоснования предельно допустимых уровней облучения человека такими видами радиации. Результаты исследования могут быть использованы также для радиобиологического обоснования применения разных видов излучений, в том числе плотно ионизирующих, в терапии новообразований у человека в онкологической практике.

Апробация работы. Основные результаты доложены на 11 конференциях и симпозиумах: I и II Межд. симпоз. “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии” (Москва - Дубна, 1997, 2001); 1 – 5-ой научных конференциях молодых ученых и специалистов ОИЯИ (Дубна, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001); Школе-конференции “Горизонты физико-химической биологии” (Пушино, 2000); Int. Assemb. “33rd COSPAR Scientific Assembly” (Warsaw, Poland, 2000); Межд. конф. “Проблемы радиационной генетики на рубеже веков” (Москва, 2000); IV съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2001); на семинарах ОРПИ ОИЯИ (Дубна).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 92 страницах машинописного текста, состоит из 4-х глав и выводов, содержит 14 таблиц, 14 рисунков. Список литературы включает 144 наименования, из которых 47 – на русском языке и 97 – на английском языке.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы культуры клеток китайского хомячка линий V79 и FAF28 (клон 431). Клетки культивировали при 37°C в стандартной среде (Игла или смесь сред Игла и 199 (1:1), соответственно) с добавлением фетальной сыворотки телянка (10%), глутамина (1%) и антибиотиков. Облучение клеток осуществляли γ -квантами и ускоренными протонами и ионами ^4He , ^{12}C и ^{14}N на установках и ускорителях ОИЯИ. Физические характеристики использованных видов излучений приведены в таблице 1. Величины ЛПЭ излучений охватывают несколько порядков.

Суспензия клеток использовалась при облучении протонами и γ -квантами. Облучение тяжелыми ионами проводили с помощью физикодозиметрической установки с электронной системой, обеспечивавшей мониторинг пучков ионов и автоматическую смену облучаемых образцов, укрепленных в гнездах контейнера, по достижении заданной дозы. Из-за малой величины пробегов ионов ^4He и ^{12}C суспензию клеток для облучения накапливали на лавсановые ядерные фильтры (поры - 0.2 мкм), лежащие на поверхности мягкого агара, до образования монослоя клеток, закрывали его пленкой толщиной 10 мкм и через нее проводили облучение. Энергия ионов задавалась таким образом, чтобы остаточный пробег ионов после монослоя намного превышал размер клетки. Для облучения клеток ионами азота с $E=50$ МэВ/нуклон были сконструированы специальные чашечки ($d=12$ мм, $h=4$ мм),

Таблица 1. Физические характеристики излучений

Виды излучений	Источники излучений	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	Доза, Гр
γ - ^{60}Co	Установка "Рокус"	~1,2 МэВ	~0,3	1 - 10
p	Синхрофазатрон	1ГэВ	0,218	1 - 2.5
^4He	Ускоритель У-200	8,35	20	1 - 4
^4He	-//-	2,8	50	1 - 4
^4He	-//-	1,58	78	1 - 4
^{12}C	-//-	7,0	214	1 - 4
^{12}C	-//-	3,3	367	1 - 4
^{14}N	Ускоритель У-400М	50	77	1 - 3

выполненные в цилиндрах из оргстекла Их закрывали тонкой пленкой (8 мкм), через которую проводилось облучение суспензии клеток.

После облучения клетки высевали на стандартную среду на “период экспрессии” мутаций (4 суток), затем пересевали на селективную среду с 6-тиогуанином (6-ТГ, 1 мкг/мл). Выявление клеток с мутацией гена HPRT позволяет осуществить тест-система, основанная на резистентности мутантных клеток к токсичному для нормальных клеток пуриновому аналогу 6-ТГ (*Thacker J., Stretch M., Stephens M., 1977*). 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 (*Konecki D.S. et al., 1982; Melton D.W. et al., 1984; Patel P.I. et al., 1986; Rossiter B.J.F. et al, 1991*). Ген кодирует фермент гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу, 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 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 получены субклоновые культуры, приготовлены препараты их клеток и проведен цитогенетический анализ метафазным методом по общепринятой методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Летальное и мутагенное действие излучений с разной величиной ЛПЭ

Данные по выживаемости клеток китайского хомячка линии FAF28 (клон 431) и частоте мутаций, индуцированных γ -квантами и ускоренными ионами ^4He и ^{12}C с разной величиной ЛПЭ в диапазоне использованных доз, приведены на рис.1. Как видно, частота мутаций существенно увеличивается, а выживаемость клеток уменьшается при увеличении дозы облучения. Зависимость частоты мутаций от дозы γ -квантов и тяжелых ионов с величинами

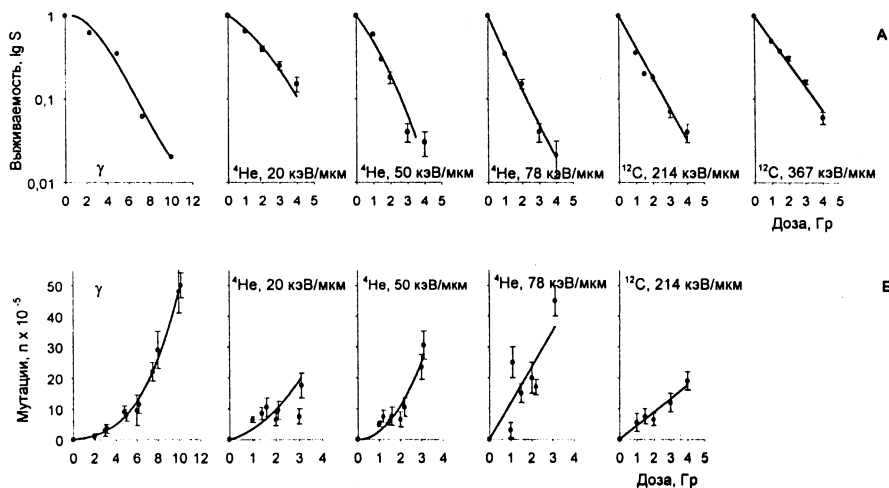


Рис. 1. Зависимость выживаемости (А) и частоты образования мутаций (Б) от дозы облучения клеток китайского хомячка γ -квантами ^{60}Co и ускоренными ионами ^4He и ^{12}C с разной величиной ЛПЭ

ЛПЭ 20–50 кэВ/мкм имеют нелинейный (степенной) характер и модифицируются в линейные при более высоких ЛПЭ. Соответственно, кривые выживаемости являются сигмоидными и модифицируются в экспоненциальные.

Отсюда следует, что величина ОБЭ тяжелых ионов по отношению к γ -лучам по этим тестам зависит от дозы. При использовании общепринятого способа оценки ОБЭ излучений по индукции мутаций на уровне начального наклона кривой доза-эффект ($5-10 \times 10^{-5}$), а по выживаемости по величине D_0 или по соотношению доз, соответствующих 10% выживаемости клеток, полученные зависимости ОБЭ от ЛПЭ по этим тестам описываются кривыми с максимумом при $\sim 80-100$ кэВ/мкм (рис. 2). Здесь же приведена полученная ранее кривая по индукции общего числа хромосомных aberrаций (Насонова Е.А., Говорун Р.Д., Красавин Е.А., 1989). Как видно, величины ОБЭ по индукции мутаций и хромосомных aberrаций примерно в 2 раза выше, чем по выживаемости клеток. 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 двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Ими обуславливается возникновение

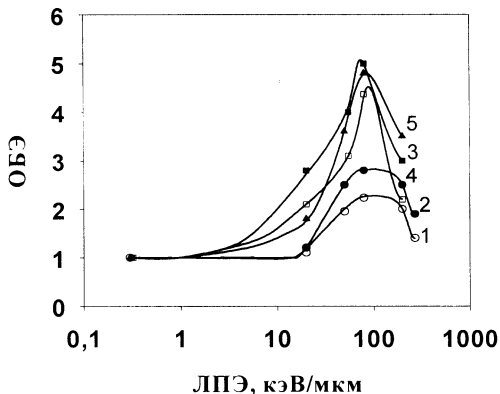


Рис.2. Зависимость ОБЭ тяжелых ионов от ЛПЭ по выживаемости клеток китайского хомячка (1 – по D_0 ; 2 – по 10% уровню выживаемости); по индукции мутаций (3 – по частоте мутаций 5×10^{-5} ; 4 – по частоте мутаций 10×10^{-5}); по индукции хромосомных aberrаций (5)

Kiefer J. et al., 1999). Некоторые авторы отметили появление хромосомных aberrаций в клетках мутантных субклонов (*Cox R. and Masson W.K., 1979*). Полагая, что мутационный процесс в клетках млекопитающих может сопровождаться нарушением структурной целостности хромосомного аппарата и может проявиться в хромосомной нестабильности клеток, мы выделили одиночные мутантные колонии, вырастили субклоны и провели их цитогенетический анализ.

Цитогенетические характеристики спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов

В ходе исследования были проанализированы мутантные субклоны клеток китайского хомячка линий V79, индуцированные разными дозами γ -квантов, протонов с $E=1$ ГэВ (ЛПЭ~0.218 кэВ/мкм) и ионов ^{14}N с $E=50$ МэВ/нуклон (ЛПЭ~77 кэВ/мкм). Проведен также анализ спонтанных мутантов клеток линии V-79 и FAF28. В качестве контроля служили образцы из интактных монослойных культур и интактных субклонов, выращенных из одиночных колоний. Полученные результаты не выявили отличий между ними и использо-

хромосомных aberrаций и таких мутаций, как макро- и микроделеции генов в ДНК.

Имеющиеся литературные данные показывают, что наличие признака резистентности к 6-TG может обуславливаться разными типами мутаций, в том числе структурными вплоть до полной делеции гена (*Niclas J.A. et al., 1989; обзор Sankaranarayanan K., 1991; Park M.S. et al., 1995; Yamada Y. et al., 1996; Little J.B. et al., 1997; Schmidt P. et al., 1998;*

ваны в качестве объединенного интактного контроля.

При выявлении и селекции мутантных субклонов было отмечено **появление мутантов с замедленным ростом по сравнению с интактным контролем**. При спонтанном мутагенезе их доля составляла примерно 60%. Она увеличивалась до 80-100% при высоких индуцирующих дозах γ -лучей (5-7 Гр) и в диапазоне использованных доз ионов азота (до 3 Гр). Индивидуальные колонии таких мутантов можно было выделить только 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%).

При цитогенетическом анализе наблюдали гетерогенность спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов по исследованным цитогенетическим показателям (митотической активности, анеуплоидии, уровню хромосомных аберраций). Была выявлена геномная (по числу хромосом в клетках) и хромосомная (по уровню аберраций) нестабильность многих HPRT-мутантов. 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 пloidии (таблица 2). Среди субклонов преобладали образцы с модальным числом, равным 21 или 22-м 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 – существенно выражена анеуплоидия в около диплоидной 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 модаль-

Таблица 2. 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	макс. 6 - 8
γ-индуцированные мутанты	2	6	21	86	30 - 75
		1	40	14	40
	3	16	21	70	30 - 70
		2	22	9	30 - 45
		3	40	13	20 - 30
		1	41	4	27
	5	1	не выражено	4	макс. 6 - 7
		13	21	100	25 - 85
		1	20	8	39
		10	21	84	40 - 85
7	1	39 и 40	8	по 36	
	1	21	25	62	
Мутанты, индуцированные протонами	1	3	22	75	53-78
		8	22	100	32-54
Мутанты, индуцированные ионами азота	1	3	22	100	69-85
		1	21	7	67
		13	22	86	32-80
	3	1	22 и 44	7	47 и 26
		4	21	50	47-72
		2	22	26	51-60
		1	21 и 42	12	30 и 29
1	42 и 44	12	20 и 21		

ным числом хромосом от 39 до 44. Все они характеризовались широкими спектрами хромосом в около тетраплоидной области и сниженной долей клеток модального класса – до 20-30%, а в ряде случаев до 10%. Кроме того, вы-

явлены 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.

При цитогенетическом анализе были **выявлены мутанты с повышенными уровнями хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем** (рис. 3). Их доля составила среди спонтанных и γ -

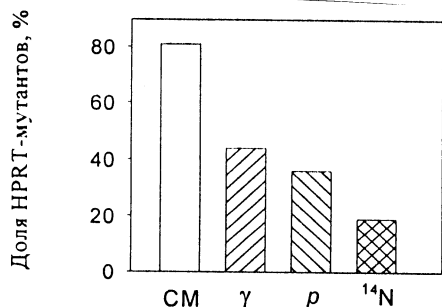


Рис.3. Частота образования HPRT-мутантов с повышенным по сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций: СМ – спонтанные; индуцированные γ -квантами (γ), протонами (p) и ионами азота (^{14}N)

локусе HPRT. Однако у 2-х из 12 проанализированных мутантов, индуцированных γ -квантами в дозе 7 Гр, почти в 90% клеток обнаружена обычно редко выявляемая при стандартном метафазном анализе стабильная хромосомная перестройка типа межхромосомного симметричного обмена.

Для оценки хромосомной нестабильности в качестве основного критерия нами использована частота хромосомных aberrаций. **По уровням хромосомных aberrаций мутанты были условно подразделены нами на несколько групп** (рис. 4). Группа I мутантов существенно не отличалась от контроля. По сравнению со спонтанными мутантами наблюдается увеличение их доли при индукции исследуемыми видами излучений, особенно выраженное при индукции ионами ^{14}N . Группа II мутантов обладает повышенным по сравнению с контролем в 1.5-3 раза уровнем хромосомных aberrаций. Их доля уменьшается с увеличением ЛПЭ излучений. Группа III мутантов с

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

Нами не отмечено появления какого-либо определенного типа хромосомной aberrации при возникновении мутаций в

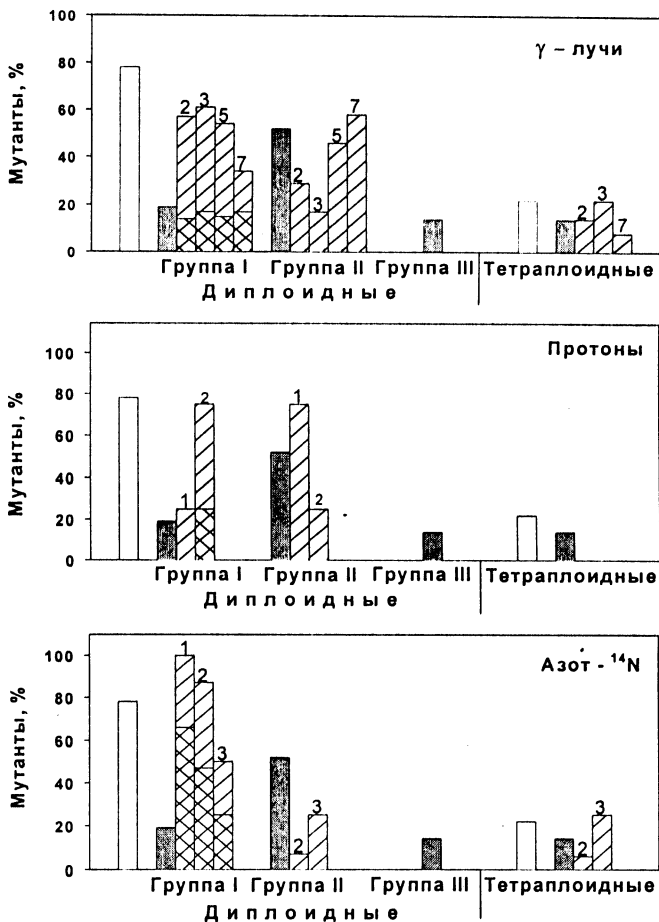


Рис. 4. Распределение HPRT- мутантных субклонов по группам (по уровню aberrаций хромосом): спонтанные мутанты (■) индуцированные (▨) γ - лучами, ионами азота ¹⁴N и протонами, (□) контроль, (▤) подгруппа Ia (пояснения в тексте), цифрами обозначены индуцирующие дозы (Гр)

экстремально высоким содержанием хромосомных нарушений в клетках (до 30% и более aberrантных клеток). Они 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 сниженными в 2-4

раза уровнями хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем (подгруппа Ia). Их доля увеличивалась с ростом ЛПЭ излучений и составила среди мутантов, индуцированных протонами – 8%, γ -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 разных ЛПЭ излучений.

Хромосомная нестабильность мутантов, индуцированных разными дозами редко ионизирующих излучений (γ -кванты и протоны с энергией 1 ГэВ), оказалась неоднозначной (рис. 5). Доля мутантов с повышенными уровнями

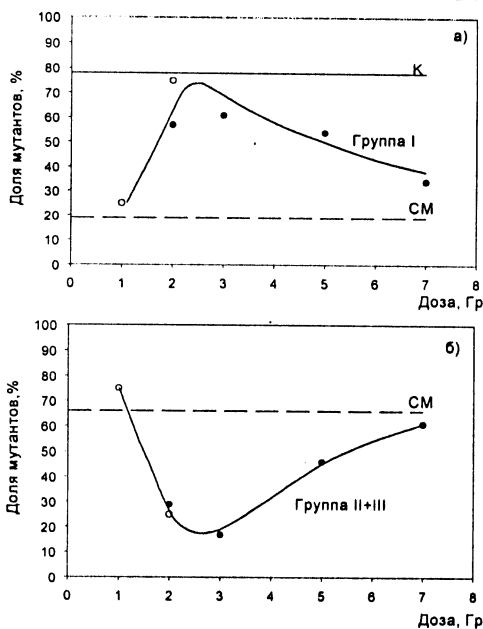


Рис.5. Индукция диплоидных HPRT-мутантов в зависимости от дозы редко ионизирующих излучений: а) мутанты, не отличающиеся от контроля по уровню хромосомных aberrаций (группа I); б) мутанты с повышенным уровнем aberrаций (группа II и III). \circ Протоны, \bullet γ -кванты, К-контроль, СМ – спонтанные мутанты.

хромосомных aberrаций, индуцированных протонами в дозе 1 Гр, практически не отличалась от соответствующего показателя при спонтанном мутагенезе. С увеличением индуцирующих доз γ -квантов и протонов до 3 Гр выявлено снижение хромосомной нестабильности мутантов. Доля таких мутантов уменьшалась в несколько раз. При более высоких дозах γ -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 хромо-

сомных аберраций (рис. 5 а). При индукции разными дозами γ -квантов и протонов доля таких мутантов варьировала таким образом, что суммарно мутанты этих групп составляли 80% и более. Можно предполагать, что существует определенный диапазон доз, при которых увеличивается число генетически устойчивых мутантов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследованы индукция HPRT-мутаций в клетках китайского хомячка в зависимости от дозы и величины ЛПЭ ускоренных заряженных частиц с разными физическими характеристиками и цитогенетические особенности мутантных субклонов, выращенных из одиночных колоний мутантных клеток.

Кривые дозовой зависимости индукции мутаций при облучении γ -квантами и ионами ^4He и ^{12}C с разными величинами ЛПЭ по своему характеру сходны с кривыми инактивации клеток: они нелинейны при γ -облучении и приближаются к линейным при более высоких ЛПЭ (рис.1). Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучений по индукции мутаций описывается кривой с максимумом в области 80 кэВ/мкм (рис.2). При сопоставлении ее с ОБЭ по выживаемости выявлен почти в 2 раза более высокий эффект, чем при оценке по инактивации клеток. Эти данные хорошо коррелируют с результатами других авторов, проводивших исследования в близком диапазоне значений ЛПЭ излучений (ионы гелия, бора и азота) на клетках китайского хомячка (*Thacker J. et al., 1979*) и фибробластах человека (*Cox R. and Masson W.K., 1979*). Их оценки ОБЭ тяжелых ионов по мутагенному эффекту также более чем в 2 раза превышают ОБЭ по выживаемости клеток.

Нами отмечено единственное отличие, которое касается области ЛПЭ излучений около 20 кэВ/мкм, где наблюдается некоторый сдвиг кривой по выходу мутаций к несколько повышенным значениям ОБЭ по сравнению с тестами инактивации клеток и образования хромосомных аберраций. Как было показано в исследованиях на бактериях (*Tokarova B. et al., 1989; Красавин Е.А. и Козубек С., 1991*), максимум зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений по мутагенному эффекту был существенно сдвинут в область меньших значений

ЛПЭ и соответствовал ~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 и леталей: мутации у бактерий являются в подавляющем большинстве точковыми и связаны, главным образом, с повреждениями оснований (*Glickman B.W. et al., 1980*), летальный же эффект определяется индукцией ДР ДНК (*Бреслер С.Е. и др., 1981*). 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 ~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.

О роли структурных повреждений ДНК в индукции мутаций генов в клетках млекопитающих и человека свидетельствуют накапливающиеся в литературе данные. Как показано рядом авторов, изучавших молекулярную природу изменений гена HPRT при действии редко ионизирующего излучения, большая часть мутантов имеет достаточно крупные делеции в этом локусе: 70–90% мутантов клеток китайского хомячка (*Morgan T.L. et al., 1990*), 50–85% мутантов лимфоидных клеток ТК6 человека (*Whaley J.M. and Little J.B., 1990*), 50–75% мутантов Т-лимфоцитов человека (*Skulimowski A.W. et al., 1986; O'Neill J.P. et al., 1990*). При исследовании расположения в хромосоме генных локусов, в которых были изучены радиационно-индуцированные делеции, показано, что они являются интерстициальными и, следовательно, должны индуцироваться при возникновении, по крайней мере, двух ДР ДНК.

Данные анализа небольшого числа HPRT-мутантных клонов клеток китайского хомячка V-79, полученные рядом авторов при действии радиации разного качества (*Stoll U. et al., 1995; Schmidt P. et al., 1995*), свидетельствуют о том, что пропорция крупных делеций в локусе HPRT увеличивается при

высоких величинах ЛПЭ излучений (160–1600 кэВ/мкм). При более низких ЛПЭ (10–50 кэВ/мкм) значительная часть мутаций обусловлена 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.

Как показали наши исследования, последствия мутационных событий проявились в возникновении геномной и хромосомной нестабильности в популяциях мутантных клеток. Потомки мутантных клеток оказались гетерогенными по исследованным цитогенетическим показателям. Выявленное замедление роста многих мутантных субклонов в среде с 6-ТГ (почти в 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 (*Yandell D.W. et al., 1986*), так и радиационно-индуцированных X-лучами, выделенных из культуры клеток китайского хомячка линии СНО (*Little J.B., 1998*).

Выявленная нестабильность хромосом была характерна как для спонтанных, так и для радиационно-индуцированных мутантов. У многих из них отмечено повышение частоты хромосомных aberrаций, уровень которой варьировал в широких пределах. Во всех категориях мутантов обнаружены образцы, не отличающиеся от контроля по уровню хромосомных aberrаций, а среди радиационно-индуцированных мутантов – даже варианты со сниженным по сравнению с ним их содержанием. На наш взгляд, этот факт, а также отсутствие среди радиационных мутантов образцов с крайне высоким уровнем хромосомных aberrаций находит свое объяснение. Можно полагать, что при облучении погибают все клетки с какими-либо дефектами, но жизнеспособные в нормальных физиологических условиях, а мутанты, возникающие

из наиболее полноценных выживших клеток (например, с эффективно работающей системой репарации повреждений), могут иметь даже сниженный уровень аберраций хромосом.

Анализируя массив полученных данных, мы попытались выяснить, не сопровождается ли мутация в локусе HPRT каким-либо характерным признаком, например появлением определенного типа хромосомной аберрации. Выявить это не представилось возможным. Но, привлекает внимание тот факт, что у 2-х из 12 проанализированных мутантов, индуцированных γ -излучением (7 Гр), почти в 90% клеток обнаружена обычно редко выявляемая при стандартном метафазном анализе стабильная хромосомная перестройка. Анализ хромосомных аберраций не выявил существенных отличий спонтанных и радиационных мутантов по типу повреждений хромосом. Отсутствие различий между ними отмечали также *Little J.B. et al. (1997)* при исследовании геномной нестабильности у потомков облученных клеток по ряду параметров (мутагенез, хромосомные аберрации и др.) и при анализе молекулярных спектров гена у мутантов по этому локусу. Вместе с тем, несомненным являлись гетерогенность мутантов по цитогенетическим показателям и повышение нестабильности хромосом в результате возникновения HPRT-мутаций.

В нашем исследовании выявлена генотипическая нестабильность мутантов, обусловленная анеу- и полиплоидией клеток. В обзоре Вахтина Ю.Б. (1980) показано, что любые отклонения условий существования клеток от оптимума приводят к повышению уровня такой 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 (*Noël B. et al., 1977; Порошенко Г.Г., 1978*). 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 исследова-

нии обращает внимание лишь более выраженная анеуплоидия с колебанием числа хромосом в околодиплоидной области у радиационных мутантов. В работах Календо Г.С. (1993, 1997) 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, amitoz, 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.

Наблюдаемая гетерогенность мутантов, вариабельность цитогенетических показателей, по-видимому, определяется типом возникших мутаций. Их последствия 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 редко ионизирующих излучений. При индукции плотно ионизирующими ионами начинают преобладать мутанты с полной делецией гена. Полученные нами данные показывают, что выход мутантов, не отличающихся от контроля по уровням 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.

Вместе с тем, 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 лейкемий (*Pui C.H. et al., 1990; Heisterkamp N. and Groffen J., 1991; Rabbits T.H., 1994; Melo J.V., 1996*).

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 ряду поколений.

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. Можно полагать, что возникновение мутаций в клетках и появление нестабильных мутантных субклонов обуславливает повышение уровней хромосомных aberrаций в популяциях облученных клеток в отдаленном периоде после 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 НРРТ-мутантов, выделенных из клеток китайского хомячка. 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 *Корогодина В.И. и др. (1972, 1977)* на дрожжевых клетках и данные, полученные на ряде других объектов (*Вахтин Ю.Б., 1980*).

ВЫВОДЫ:

1. Исследованы выживаемость и индукция HPRT-мутаций в клетках китайского хомячка (линия FAF 28, клон 431) при облучении ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками: γ -кванты ^{60}Co и ускоренные ионы гелия ^4He с ЛПЭ – 20, 50 и 78 кэВ/мкм и углерода ^{12}C с ЛПЭ – 214 и 367 кэВ/мкм. Изучены цитогенетические характеристики HPRT-мутантных субклонов (линия V-79): спонтанных и индуцированных разными дозами γ -лучей, протонов с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ – 0.218 кэВ/мкм) и ионов азота ^{14}N с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ – 77 кэВ/мкм). Выявлены количественные и качественные особенности мутагенного действия ускоренных заряженных частиц в широком диапазоне ЛПЭ.
2. Показана линейно-квадратичная зависимость от дозы для выживаемости клеток и индукции HPRT-мутаций при воздействии γ -лучами и ионами ^4He с ЛПЭ – 20 и 50 кэВ/мкм и линейный характер зависимости эффектов при индукции тяжелыми ионами с ЛПЭ ≥ 78 кэВ/мкм.
3. Показано, что зависимость ОБЭ от ЛПЭ тяжелых ионов при оценке по выживаемости и индукции HPRT-мутаций описывается кривой с локальным максимумом в области ЛПЭ около 80 кэВ/мкм. Эффективность ионов ^4He и ^{12}C с ЛПЭ 20 – 214 кэВ/мкм по индукции мутаций в два и более раз выше, чем при оценке по выживаемости клеток.
4. Выявлена гетерогенность спонтанных и индуцированных протонами, ионами азота ^{14}N и γ -лучами HPRT-мутантных субклонов по цитогенетическим показателям: митотической активности, спектрам хромосом в клетках, модальному числу хромосом, уровням хромосомных аббераций.
5. Выявлена хромосомная нестабильность мутантных субклонов. Являясь наиболее высокой при спонтанном мутагенезе, она снижалась с увеличением ЛПЭ индуцирующих излучений. Доля мутантов с повышенными в 1.5-3 и более раз уровнями хромосомных аббераций (по сравнению с субклонами интактного контроля) уменьшалась от 81% при спонтанном мутагенезе до 44%, 36% и 19% при индукции γ -лучами, протонами и ионами азота, соответственно.
6. Среди радиационно-индуцированных мутантных субклонов выявлены об-

разцы со сниженными в 2-4 раза уровнями хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем. Их доля увеличивалась с ростом ЛПЭ излучений: от 15-20% при индукции γ -лучами и протонами до 40% (в среднем) при индукции ионами азота. Среди спонтанных мутантов они не обнаружены.

7. Выявлено, что хромосомная нестабильность мутантных субклонов изменяется в зависимости от дозы при индукции редко ионизирующими излучениями (протоны и γ -кванты). С увеличением дозы она снижается от уровня, соответствующего спонтанному мутагенезу, до минимальных значений при дозах 2-3 Гр. При последующем увеличении индуцирующих доз до 7 Гр она повышается, приближаясь к уровню хромосомной нестабильности спонтанных мутантов.

8. Выявлена высокая анеуплоидия мутантных субклонов вплоть до полной плоидии. Доля мутантов с широкими спектрами хромосом (менее 60% клеток модального класса) была наибольшей при индукции редко ионизирующими протонами и γ -лучами (до 70%) и снижалась при индукции ионами азота до 40%. При спонтанном мутагенезе она составляла ~50%.

9. Обнаружены медленно растущие HPRT-мутанты среди всех исследованных типов мутантных субклонов. Их доля увеличивалась с увеличением индуцирующей дозы и ЛПЭ излучений: до 90-100% при высоких дозах редко ионизирующих протонов и γ -лучей и при всех исследованных дозах (1-3 Гр) плотно ионизирующих ионов азота.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. *Говорун Р.Д., Кошлань И.В., Красавин Е.А., Шмакова Н.Л.* Мутагенное действие γ -излучения на клетки китайского хомячка. Цитогенетическая характеристика мутантов по локусу HPRT. // Радиобиология. Радиационная экология. 1996. Т. 36. Вып.6. С. 852-859.

2. *Говорун Р.Д., Красавин Е.А., Шмакова Н.Л., Кошлань И.В.* Нестабильность хромосом спонтанных и радиационно-индуцированных γ -лучами HGPRT-мутантов клеток млекопитающих. Chromosome instability of spontaneous and radiation-induced mammalian cell mutants. // В: Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии (Тез. Межд. симпоз.). РАН, ОИЯИ. Москва,

Дубна. 1997. С. 47 и Р. 126.

3. *Govorun R.D., Krasavin E.A., Shmakova N.L., Koshlan' I.V.* Chromosome instability of spontaneous and γ -ray-induced mammalian cell mutants. // Тр. Межд. симпоз. "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". Т.2, РАН, ОИЯИ. Дубна, 1997, С. 34-42.

4. *Shmakova N.L., Krasavin E.A., Govorun R.D., Fadeeva T.A., Koshlan' I.V.* The influence of radiation quality on the survival and chromosome damage of mammalian cells. // Там же. С. 43-48.

5. *Шмакова Н.Л., Красавин Е.А., Говорун Р.Д., Фадеева Т.А., Кошлань И.В.* Летальное и мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки млекопитающих. // Радиобиология. Радиационная экология. 1997, Т.37, Вып.2, С. 85-91.

6. *Кошлань И.В., Говорун Р.Д.* Анализ хромосомных aberrаций радиационно-индуцированных γ -лучами и спонтанных HPRT-мутантов клеток млекопитающих. // Тр. Первой открытой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, УНЦ, ОМУС. Дубна. 1997, С. 178-182.

7. *Кошлань И.В., Кошлань Н.А., Говорун Р.Д.* Цитогенетический анализ мутантов клеток млекопитающих, индуцированных ускоренными ионами азота ^{14}N . // Тр. Второй открытой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, УНЦ, ОМУС. Дубна. 1998. С.154-156.

8. *Кошлань И.В.* Радиационно-индуцированная геномная нестабильность // Тр. Третьей открытой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, УНЦ, ОМУС. Дубна. 1999. С.187-189.

9. *Кошлань И.В., Кошлань Н.А.* /Различия мутантов, индуцированных излучениями с разными ЛПЭ, по цитогенетическим показателям // Тр. Четвертой открытой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, УНЦ, ОМУС. Дубна. 2000. С. 203-204 .

10. *Кошлань И.В., Кошлань Н.А., Говорун Р.Д.* Геномная нестабильность мутантов клеток млекопитающих, спонтанных и индуцированных гамма-лучами и ускоренными протонами и ионами азота. // В: Горизонты физико-химической биологии. (Тез. Школы-конф.). Т.1. Пушино. 2000. С. 296-297.

11. *Кошлань И.В., Говорун Р.Д., Кошлань Н.А., Красавин Е.А., Шмакова Н.Л.* Индукция HPRT-мутантов клеток млекопитающих излучениями с разной

ЛПЭ. Induction of HPRT-mutants of the mammalian cells by radiation with different LET. // В: Проблемы радиационной генетики на рубеже веков. (Тез. Межд. Конф.). Москва. 2000. С. 36-37.

12. Кошлань И.В., Говорун Р.Д., Кошлань Н.А. Индукция HPRT-мутантов клеток млекопитающих излучениями с разной ЛПЭ. // Тр. Пятой открытой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, УНЦ, ОМУС. Дубна. 2001. С. 120-122.

13. Кошлань Н.А., Кошлань И.В., Говорун Р.Д. Продолжительность роста HPRT-мутантов, индуцированных излучениями с разной ЛПЭ. // Там же. С. 123-125.

14. Говорун Р.Д., Кошлань И.В., Кошлань Н.А., Красавин Е.А., Фадеева Т.А., Шмакова Н.Л. Закономерности мутагенного действия на клетки млекопитающих γ -лучей и тяжелых ионов. Геномная нестабильность HPRT-мутантов. // IV съезд по радиационным исследованиям (Тез.) Москва. 2001. С. 718.

Получено 22 января 2002 года.

Макет Н. А. Киселевой

Подписано в печать 23.01.2002
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. л. 1,50
Тираж 100. Заказ 53072

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области