

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ С РАЗНЫМИ ЛПЭ

*И. В. Кошлань^{а,б,1}, Н. А. Кошлань^а, П. Блага^{а,в}, Ю. В. Богданова^а,
Д. В. Петрова^а, Р. Д. Говорун^а, Е. А. Красавин^{а,б}*

^а Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^б Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

^в Чешский технический университет, Прага

Исследовано мутагенное действие ускоренных тяжелых заряженных частиц на клетки китайского хомячка линии V79. Проанализирована индукция HPRT-мутаций у облученных клеток в течение длительного времени экспрессии (до 45 сут) после воздействия излучений с разной ЛПЭ. Максимальный выход мутантных клонов наблюдался в разное время экспрессии в зависимости от характеристик ионизирующего излучения, причем положение максимума с увеличением ЛПЭ излучений смещалось в сторону более поздних временных интервалов.

The mutagenic effect of accelerated heavy charged particles on the cells of the V79 Chinese hamster was studied. The induction of HPRT mutations in cells exposed to radiations with various values of LET for a prolonged expression time (up to 45 days) was analyzed. The maximum level of mutant clones was observed at different expression times depending on the characteristics of ionizing radiation. Moreover, with an increase in the LET of the used radiation, the position of the maximum was shifted toward later time intervals.

PACS: 87.53.-j; 87.17.-d; 87.17.Ee

ВВЕДЕНИЕ

Индукция мутаций является одним из основных показателей воздействия ионизирующего излучения, способствующего злокачественной трансформации клеток [1–4]. Начиная с первых работ по анализу радиационно-индуцированных мутаций, возникающих в гене *hprt* (кодирующем гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу), было проведено множество исследований по индукции HPRT-мутаций ионизирующим излучением в клетках млекопитающих (особенно в клеточных линиях человека и грызунов) [5–12]. Выявлен широкий диапазон частот радиационно-индуцированного

¹E-mail: koshlan@jinr.ru

мутагенеза после облучения рентгеновскими лучами, α -частицами или ускоренными ионами углерода [8, 13].

Мутации, а также другие радиационно-индуцированные биологические эффекты (отдаленная гибель репродуктивных клеток, мутации генов, хромосомные aberrации, образование микроядер, анеуплоидия и др.) могут проявляться в потомстве облученных клеток через много поколений после воздействия ионизирующего излучения [2, 14–17]. Это явление получило название «геномная нестабильность». Было показано, что нестабильность генома может приводить к увеличению частоты спонтанного мутагенеза в потомках облученных клеток [8, 18]. Молекулярные механизмы, связанные с индукцией геномной нестабильности, до настоящего времени детально не выяснены, и необходимо проведение более глубоких исследований [2, 3, 5, 14, 16, 17, 19].

Степень радиационного воздействия зависит от качества ионизирующего излучения. Ускоренные тяжелые ионы с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) более эффективно индуцируют различные биологические эффекты по сравнению с редко ионизирующим излучением, таким как гамма- или рентгеновское излучение [5, 10, 13, 20–22]. В обзоре [20] авторы предполагают, что ЛПЭ является адекватным параметром для описания относительной биологической эффективности (ОБЭ) по параметру 10%-й выживаемости в клеточных культурах линий V79, CHO и T1 с максимумом в области около 100–200 кэВ/мкм, хотя другие исследования показывают, что для точной оценки биологических последствий излучений необходимо учитывать тип частиц и их энергию [11, 13, 23]. Как правило, максимум индукции HPRT-мутаций находится в области ЛПЭ около 100–200 кэВ/мкм. Его положение может зависеть от типа частиц, энергии, конкретной используемой культуры клеток и других параметров. Согласно опубликованным данным значения ОБЭ для индукции HPRT-мутаций выше, чем для инактивации клеток [11, 12, 24–26].

Радиационно-индуцированные мутагенные эффекты на культурах клеток обычно изучались только в первые несколько дней после облучения [13, 27]. Частоту мутагенеза оценивали в одно конкретное время экспрессии [5, 28], либо точное время экспрессии не указывалось [8, 29]. Ввиду ограниченной информации о влиянии продолжительного времени экспрессии на радиационно-индуцированный мутагенез нами была проанализирована индукция HPRT-мутаций в клетках V79 в разные сроки наблюдений после воздействия редко и плотно ионизирующих излучений. Уровень мутагенеза у потомков облученных клеток периодически измеряли в течение приблизительно 45 сут после облучения (около 80–90 клеточных поколений). Полученные данные могут помочь прояснить связь между отдаленной реакцией клеток на облучение и качеством излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована культура клеток китайского хомячка линии V79 (ECACC 86041102). Культура фибробластов линии V79 была предоставлена Институтом цитологии РАН (ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург). Для стандартного культивирования и пересевов облученных клеток использовали полную питательную среду (ППС), состоящую из модифицированной по Дульбекко среды Игла (DMEM, «ПанЭко») с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FBS, «PAA Laboratories»),

1%-го L-глутамина («ПанЭко»), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В («Sigma-Aldrich»). Культивирование проводили в культуральных флаконах («Corning») объемом 25 см³ при 37 °С и влажности 95 % в атмосфере с содержанием 5 % CO₂. Пересевы клеток осуществляли примерно через каждые 3 дня при достижении 80–90%-й конфлюэнтности. Монослой культуры клеток линии V79 снимали с культурального пластика с использованием стандартных методов открепления путем последовательной обработки раствором версена («ПанЭко») и 0,05%-м раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко»). Время удвоения составляло от 12 до 14 ч.

Во всех экспериментах как с редко, так и с плотно ионизирующим излучением экспоненциально растущие клетки облучали в виде суспензии в стандартной питательной среде в концентрации 10⁶ клеток/мл. Гамма-облучение ⁶⁰Со проводили на установке «Рокус-М» на базе Медико-технического комплекса в Лаборатории ядерных проблем им. В. П. Дзелепова ОИЯИ (Дубна) в диапазоне доз от 0,5 до 7 Гр. Мощность дозы во время облучения составляла 0,9 Гр/мин. ЛПЭ гамма-излучения ⁶⁰Со можно оценить примерно в 0,23 кэВ/мкм. Суспензию клеток облучали в стандартных центрифужных пробирках объемом 15 мл («Corning»). Облучения ускоренными тяжелыми ионами проводились на циклотроне У-400М в Лаборатории ядерных реакций им. Г. Н. Флерова ОИЯИ (Дубна). Суспензию клеток облучали на автоматизированной радиобиологической установке «Геном-М» [30]. Специально подготовленные для облучения цилиндры заполняли суспензией клеток, покрывали майларовой пленкой толщиной 6 мкм и устанавливали во вращающийся диск для последующего облучения. Энергии ионов при входе и выходе из клеточной суспензии рассчитывали с использованием программного обеспечения LISE++ [31], а ЛПЭ в образце оценивали с использованием программного пакета SRIM [32]. В ходе этой работы клетки китайского хомячка линии V79 облучали ускоренными ионами ¹¹В, ²⁰Ne и ¹⁸О в дозах 0,5, 1 и 2 Гр с ЛПЭ от 49 до 149 кэВ/мкм. Количественные и качественные характеристики облучения подробно представлены в таблице. Мощность дозы во всех экспериментах оставалась постоянной и составляла около 1 Гр/мин.

После облучения суспензию с клетками высевали в соответствующих концентрациях в стандартную ППС для экспрессии мутаций. После достижения плотности монослоя приблизительно 80–90 % (обычно через 3–5 дней) одну часть клеток использовали для дальнейшей рекультивации потомков облученных клеток в тех же условиях (ППС) в течение 45 сут.

Параметры облучения

Вид излучения	Доза, Гр	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм
γ(⁶⁰ Со)	0,5–7	—	0,23*
¹¹ В	0,5, 1, 2	32,4	49
¹⁸ О	0,5, 2	35,2	115
²⁰ Ne	0,5, 1, 2	51,8	136
²⁰ Ne	0,5, 1, 2	47,7	149

*По оценке [46].

Вторую часть клеток использовали для оценки мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на клетки китайского хомячка. Для выявления и выделения HPRT-мутантных клонов высевали по 30 000 клеток в стандартные культуральные флаконы объемом 25 см³, содержащие питательную среду с 20%-й фетальной телячьей сывороткой, 1%-м глутамином, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В и 5 мкг/мл селективного агента 6-тиогуанин (6-TG, «Sigma Aldrich») [33]. Для каждой дозы высевали по 7–10 чашек. Через 5 дней селективную среду заменяли для удаления остатков мертвых клеток, а также для обновления питательных веществ.

Третью часть клеток использовали для определения эффективности клонирования. Для анализа выживаемости высевали по 200–300 клеток в стандартную среду с 20%-й FBS по 3 флакона на дозу. Через 7–10 дней выросшие колонии, образованные из отдельных клеток, фиксировали этанолом и окрашивали 4%-м раствором метиленового синего. После окрашивания подсчитывали колонии, состоящие из 50 и более клеток. Клетки высевали для анализа мутаций и выживаемости во время каждой рекультивации, приблизительно через каждые 3 дня в течение ~ 45 сут после облучения. У необлученных клеток аналогичным образом выявляли эффективность клонирования и уровень спонтанного мутагенеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ HPRT-мутаций в клетках млекопитающих является весьма эффективным подходом к исследованию радиационно-индуцированного мутагенеза. Использование клеток фибробластов китайского хомячка (линия V79) удобно тем, что мужские клетки содержат гемизиготный ген *hprt*, поэтому для его инактивации достаточно повредить всего одну копию.

Для анализа отсроченных мутагенных эффектов ионизирующих излучений подсчитывали количество HPRT-мутантных колоний, возникших в разные сроки после облучения («времена экспрессии»). На графиках рис. 1 представлена зависимость по частоте мутагенеза, индуцированного γ -квантами ⁶⁰Со в разные времена экспрессии, вплоть до 40 сут (около 70–80 клеточных поколений) после облучения. Частоты гамма-индуцированного мутагенеза, которые выше, чем у спонтанных мутантов, увеличиваются с дозой. Наиболее заметен вклад высоких частот мутагенеза для доз более 2 Гр и для первых времен экспрессии. Разумно предположить, что клетки с HPRT-мутацией имеют более низкую пролиферативную активность по сравнению с немутантными «здоровыми» клетками, главным образом из-за нарушенного синтеза пуриновых оснований, аналогично тому, как это показано для клеток Т-лимфоцитов [34]. Следовательно, в конечном итоге мутантные клетки будут замещены «здоровыми» клетками. Через 20 дней после облучения частоты индуцированного мутагенеза снижаются до уровня спонтанного мутагенеза для всех исследованных доз. При сравнении только первых сроков наблюдений (время экспрессии 3–4 сут) мы можем наблюдать рост частот индуцированного мутагенеза с увеличением дозы. При дальнейшем культивировании дозовая зависимость нивелируется.

Обращает на себя внимание тот факт, что в некоторых случаях уровень радиационно-индуцированного мутагенеза в отдаленные сроки наблюдений опустился ниже зна-

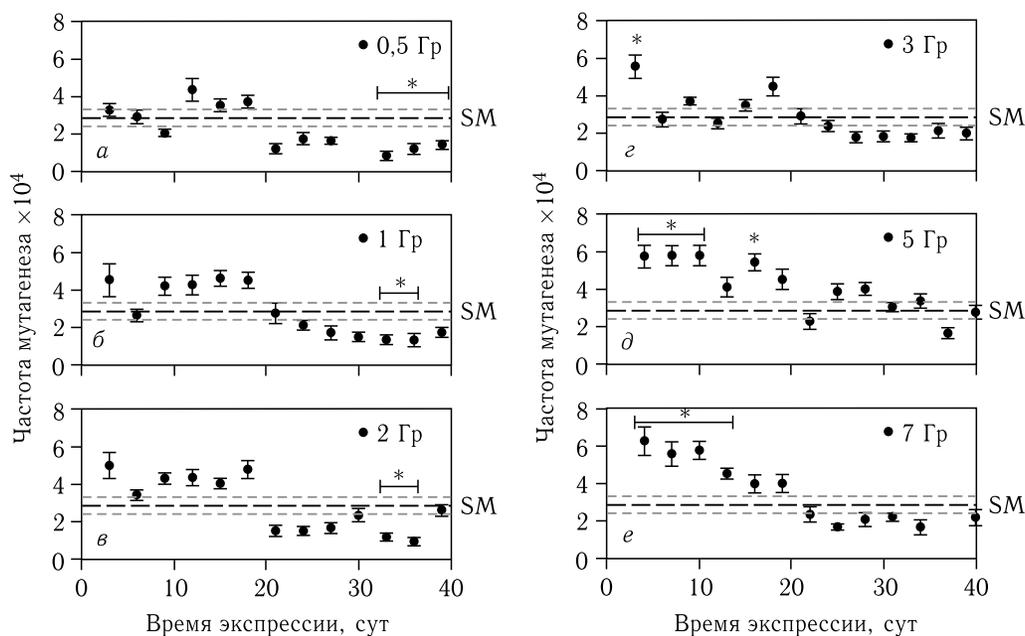


Рис. 1. Уровень спонтанного (SM) и радиационно-индуцированного мутагенеза после облучения γ -квантами ^{60}Co в зависимости от времени экспрессии мутантов

чений уровня спонтанного мутагенеза (рис. 1, а–в). Колебания уровня спонтанного мутагенеза в течение всех сроков наблюдений были минимальными, поэтому на графиках его уровень отображается в виде штриховой линии. Среднее значение частот спонтанного мутагенеза во всех экспериментах составило $(4,2 \pm 1,7) \cdot 10^{-4}$. Явление с низкими частотами HPRT-мутаций в облученной культуре характерно только для низких доз гамма-облучения (0,5–2 Гр) и не наблюдалось ни при более высоких дозах, ни при облучении ускоренными ионами. В опубликованных данных можно найти упоминания о положительном воздействии ионизирующего излучения, особенно в малых дозах [35–37]. Вместе с тем гипотеза радиационного гормезиса не была принята международными органами, такими как Международная комиссия по радиологической защите, Научный комитет ООН по действию атомной радиации. Тем не менее было бы интересно продолжить изучение этого явления, чтобы объяснить снижение спонтанного уровня частот радиационно-индуцированного мутагенеза.

В случае облучения ускоренными ионами бора (рис. 2) частоты радиационно-индуцированного мутагенеза стали значительно выше, чем после гамма-облучения, и достигли уровня $(13,0 \pm 3,1) \cdot 10^{-4}$. Значительные отличия по частотам индуцированного мутагенеза по сравнению со спонтанным уровнем наблюдаются в основном в первые времена экспрессии для всех исследованных доз. Аналогичная картина характерна для более высоких доз после облучения γ -квантами ^{60}Co (3–5 Гр). Частота индуцированного мутагенеза неуклонно снижалась, достигая «естественного фона» примерно через 20–25 сут, и оставалась на уровне спонтанного мутагенеза до конца исследуемого периода (до 41 сут) без дальнейшего снижения.

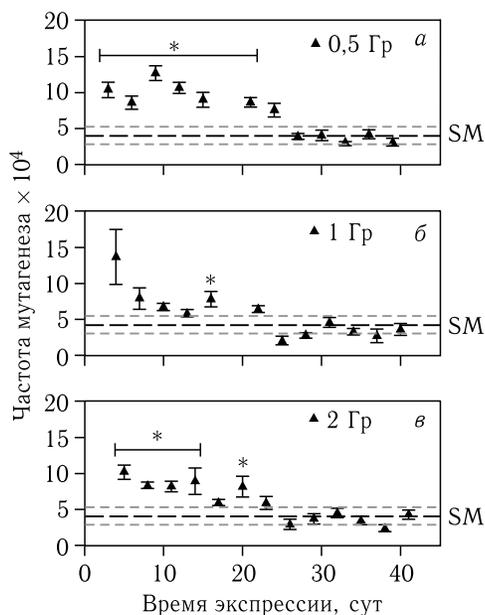


Рис. 2. Уровень спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами ^{11}B (ЛПЭ ~ 49 кэВ/мкм)

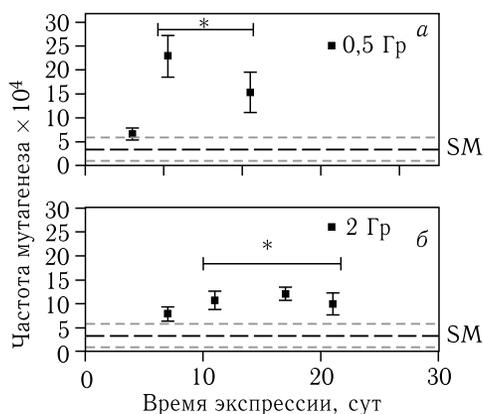


Рис. 3. Уровень спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами ^{18}O (ЛПЭ ~ 115 кэВ/мкм)

Результаты эксперимента по облучению ускоренными ионами кислорода (ЛПЭ ~ 115 кэВ/мкм) представлены малым количеством исследуемых времен экспрессии (рис. 3). Это был первый эксперимент из серии, и в основную задачу входило исследование хромосомных aberrаций, возникающих после облучения тяжелыми ионами. Вместе с тем в этом эксперименте было выявлено увеличение частот индуцированного мутагенеза после нескольких рекультиваций (отдаленные времена экспрессии). В случае облучения в дозе 0,5 Гр максимальный уровень частот индуцированного мутагенеза был обнаружен приблизительно через 7–14 сут и через 11–20 сут в клетках, облученных в дозе 2 Гр. Эти данные позволили предположить, что в случае облучения клеток тяжелыми заряженными частицами (ТЗЧ) с высокими значениями ЛПЭ зависимость уровня индуцированного мутагенеза от времени экспрессии может проходить через максимум и затем уменьшаться.

Данное предположение было подтверждено в следующем эксперименте, в котором клеточная культура была подвержена облучению ускоренными ионами ^{20}Ne (ЛПЭ ~ 136 кэВ/мкм). Данные представлены на рис. 4. При самой низкой дозе облучения 0,5 Гр увеличение частот индуцированного мутагенеза было обнаружено примерно через 15–23 сут после облучения, при дозе 1 Гр — через 17–26 сут и при дозе 2 Гр — приблизительно через 12–20 сут. Максимальные значения частот индуцированного мутагенеза обнаружены во времена экспрессии 17, 19 и 17 сут для 0,5, 1 и 2 Гр соответственно. Впоследствии уровень радиационно-индуцированного мутагенеза сошел до значений, типичных для спонтанных мутантов.

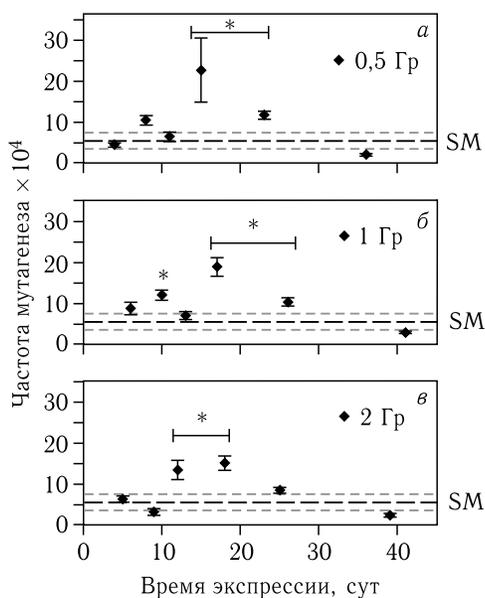


Рис. 4. Уровень спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами ^{20}Ne (ЛПЭ ~ 136 кэВ/мкм)

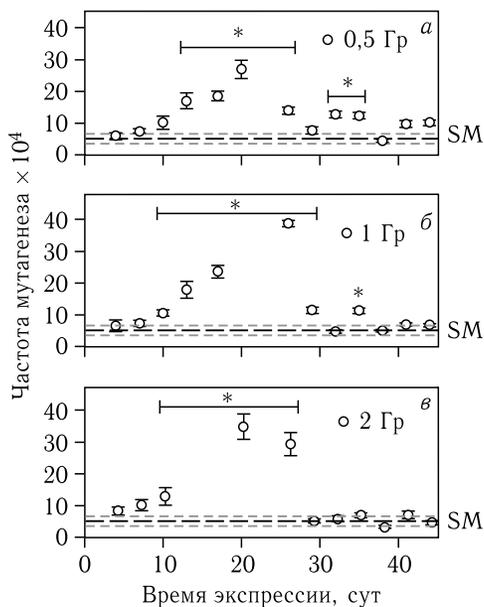


Рис. 5. Уровень спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами ^{20}Ne (ЛПЭ ~ 149 кэВ/мкм)

Эффект максимума по уровню радиационно-индуцированного мутагенеза наблюдался и в последующем эксперименте с ионами ^{20}Ne с несколько меньшими энергиями (ЛПЭ ~ 149 кэВ/мкм). Данные эксперимента представлены на рис. 5. При дозе облучения, равной 0,5 Гр, максимальные частоты индуцированного мутагенеза наблюдались примерно через 13–27 сут после облучения, для 1 Гр — через 10–28 сут и для 2 Гр — через 10–27 сут. Максимальные значения частот индуцированного мутагенеза были достигнуты примерно через 21, 24 и 21 сут после воздействия дозами 0,5, 1 и 2 Гр соответственно. Примерно через 30 сут после облучения уровень радиационно-индуцированного мутагенеза вернулся к значениям естественного фона. Вместе с тем возврат к уровню спонтанного мутагенеза произошел несколько позднее по сравнению с другими типами излучения. Кроме того, период времени, в который наблюдались повышенные частоты индуцированного мутагенеза, был длиннее, чем в экспериментах с облучением ускоренными ионами с более низкими ЛПЭ.

Из всех приведенных данных видно, что с увеличением ЛПЭ ионов время экспрессии, после которого уровень индуцированного мутагенеза достигает своего максимума, смещается в сторону более длительных сроков наблюдений. Более того, максимальные значения частот индуцированного мутагенеза также растут с увеличением ЛПЭ частиц.

Эти запаздывающие максимумы индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами с ЛПЭ более 115 кэВ/мкм и последующее резкое снижение индуцированного уровня до спонтанного представляют интересное явление, которое тре-

бует дальнейшего объяснения. Наблюдаемая геномная нестабильность, по-видимому, коррелирует с ЛПЭ использованного излучения, которое напрямую связано с распределением энергии в треке тяжелых ионов. Излучение с высокой ЛПЭ может повредить несколько «чувствительных» сайтов, расположенных в ДНК близко друг к другу, вблизи трека частицы, и образовать кластер повреждений [5, 13, 22]. Показано, что сложность и количество повреждений в кластерах возрастают с увеличением плотности ионизации излучения [38, 39]. Повреждение кластера в клетке гораздо сложнее отрепарировать (если вообще возможно) по сравнению с более простыми повреждениями, вызванными ионизирующими излучениями с более низкими ЛПЭ [10, 12, 40, 41]. Возможно, сложность возникающих повреждений влияет на индукцию мутаций. Например, максимальный уровень индуцированного мутагенеза обнаруживается примерно через 15–20 сут после облучения ионами ^{20}Ne с ЛПЭ ~ 135 кэВ/мкм, но при облучении теми же ионами с более высокими ЛПЭ (~ 149 кэВ/мкм) наблюдается более поздний выход на максимальный уровень мутагенеза — примерно через 20–25 сут после воздействия. В работе [13] демонстрируется влияние эффектов характеристик трека частицы на возникновение мутаций внутри клеток. Авторы [42] приходят к аналогичному выводу, что распределение энергии в структуре трека высокоэнергетического иона играет важную роль в создаваемом биологическом эффекте и влияет на качество индуцируемых мутаций.

Предполагается, что задержанные мутации после облучения ускоренными ТЗЧ, скорее всего, возникают *de novo*. Клетки, в которых произошли HPRT-мутации, могут давать потомство с такими же клональными мутациями. Однако, как упоминалось выше, мутанты, вероятно, находятся в неблагоприятном положении по сравнению с клетками дикого типа (если рассматривать только мутации в локусе *hprt*). Если предположить, что мутанты были индуцированы во время облучения, их число должно неуклонно уменьшаться, как в случае с гамма-облучением (см. рис. 1). Вместе с тем обнаруживается увеличение частот индуцированного мутагенеза после облучения ускоренными ионами (см. рис. 5) в отдаленные сроки наблюдений, что указывает на нестабильность генома и вновь возникающие мутации. Эти различия между редко и плотно ионизирующими излучениями позволяют предположить, что механизмы действия ТЗЧ с высокими ЛПЭ принципиально иные. Чтобы проверить данную гипотезу, планируется проанализировать на молекулярном уровне типы возникших мутаций, полученных в разные времена экспрессии после облучения. Если предположение окажется верным, то большая часть проанализированных мутаций будут неклональными, т. е. мутации создаются *de novo* и не наследуются от родительской клетки.

В наших экспериментах мы наблюдали своего рода стабилизацию генома. После воздействия каждого из излучений частоты радиационно-индуцированного HPRT-мутагенеза возвращались к уровням спонтанного мутагенеза приблизительно через 20–30 сут, независимо от того, наблюдался ли задержанный максимум уровня индуцированного мутагенеза или нет. Это может быть опять же связано с различиями в сложности повреждений, вызванных различными типами ионизирующих излучений. Другой причиной данного явления может быть накопление хромосомных aberrаций. Авторы [43, 44] показывают, что через несколько пассажей после облучения тяжелыми ионами фибробластов человека клетки приобретают хромосомные aberrации *de novo*, часто характеризующиеся высоким выходом дицентриков (рассматриваемых как неклональные aberrации), а в работе [19] сообщается о тесной взаимосвязи между

хромосомной нестабильностью и задержкой гибели репродуктивных клеток. Авторы [45] также указывают, что в большинстве исследований индукция хромосомных aberrаций не зависит от дозы, а скорее коррелирует с качеством излучения. Накопление хромосомных aberrаций вместе с HPRT-мутациями может вызывать ингибирование роста клеток и, возможно, также более высокую их гибель, что может быть частью объяснения, почему в экспериментах наблюдается довольно резкое снижение числа HPRT-мутантов после достижения максимального уровня индуцированного мутагенеза. Однако причина изменения скорости создания новых мутаций во время длительной рекультивации неизвестна и требует дальнейших исследований.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ Г. Н. Тимошенко и В. А. Крылова за техническое сопровождение экспериментов, сотрудников Лаборатории ядерных реакций им. Г. Н. Флерова ОИЯИ Ю. Г. Тетерева и А. А. Безбаха за облучение образцов ускоренными тяжелыми ионами на циклотроне U400M и сотрудников Лаборатории ядерных проблем им. В. П. Дзельцова ОИЯИ В. Н. Гаевского и А. Г. Молоканова за гамма-облучение на установке «Рокус-М».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kiefer J.* Mutagenic Effects of Heavy Charged Particles // *J. Rad. Res.* 2002. V. 43. P. S21–S25.
2. *Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M.* Radiation-Induced DNA Damage and Delayed Induced Genomic Instability // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 6988–6993.
3. *Smith L.E., Nagar S., Kim G.J., Morgan W.F.* Radiation-Induced Genomic Instability: Radiation Quality and Dose Response // *Health Phys.* 2003. V. 85. P. 23–29.
4. *Limoli C.L., Ponnaiya B., Corcoran J.J., Giedzinski E., Kaplan M.I., Hartmann A., Morgan W.F.* Genomic Instability Induced by High and Low LET Ionizing Radiation // *Adv. Space Res.* 2000. V. 25. P. 2107–2117.
5. *Rosendahl I.M., Baumstark-Khan C., Rink H.* Mutation Induction in Mammalian Cells by Accelerated Heavy Ions // *Adv. Space Res.* 2005. V. 36. P. 1701–1709.
6. *Kranert T., Schneider E., Kiefer J.* Mutation Induction in V79 Chinese Hamster Cells by Very Heavy Ions // *Intern. J. Rad. Biol.* 1990. V. 58. P. 975–987.
7. *Schmidt P., Kiefer J.* Deletion-Pattern Analysis of α -Particle and X-Ray Induced Mutations at the HPRT Locus of V79 Chinese Hamster Cells // *Mut. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1998. V. 421. P. 149–161.
8. *Little J.B., Nagasawa H., Pfenning T., Vetrovs H.* Radiation-Induced Genomic Instability: Delayed Mutagenic and Cytogenetic Effects of X-Rays and Alpha Particles // *Rad. Res.* 1997. V. 148. P. 299–307.
9. *Kiefer J., Kohlpoth M., Kuntze M.* Mutation Induction by Continuous Low Dose Rate Gamma Irradiation in Human Cells // *Intern. Congr. Ser.* 2002. V. 1236. P. 255–263.
10. *Suzuki M., Tsuruoka C., Kanai T., Kato T., Yatagai F., Watanabe M.* Cellular and Molecular Effects for Mutation Induction in Normal Human Cells Irradiated with Accelerated Neon Ions // *Mut. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2006. V. 594. P. 86–92.
11. *Stoll U., Barth B., Scheerer N., Schneider E., Kiefer J.* HPRT Mutations in V79 Chinese Hamster Cells Induced by Accelerated Ni, Au and Pb Ions // *Intern. J. Rad. Biol.* 1996. V. 70. P. 15–22.
12. *Stoll U., Schmidt A., Schneider E., Kiefer J.* Killing and Mutation of Chinese Hamster V79 Cells Exposed to Accelerated Oxygen and Neon Ions // *Rad. Res.* 1995. V. 142. P. 288.

13. Suzuki M., Watanabe M., Kanai T., Kase Y., Yatagai F., Kato T., Matsubara S. LET Dependence of Cell Death, Mutation Induction and Chromatin Damage in Human Cells Irradiated with Accelerated Carbon Ions // *Adv. Space Res.* 1996. V. 18. P. 127–136.
14. Chang W.P., Little J.B. Persistently Elevated Frequency of Spontaneous Mutations in Progeny of CHO Clones Surviving X-Irradiation: Association with Delayed Reproductive Death Phenotype // *Mut. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1992. V. 270. P. 191–199.
15. Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I., McGhee E.M., Limoli C.L. Genomic Instability Induced by Ionizing Radiation // *Rad. Res.* 1996. V. 146. P. 247.
16. Suzuki K. Multistep Nature of X-Ray-Induced Neoplastic Transformation in Mammalian Cells: Genetic Alterations and Instability // *J. Rad. Res.* 1997. V. 38. P. 55–63.
17. Somodi Z., Zyuzyukov N.A., Kashino G., Trott K.-R., Prise K.M. Radiation-Induced Genomic Instability in Repair Deficient Mutants of Chinese Hamster Cells // *Intern. J. Rad. Biol.* 2005. V. 81. P. 929–936.
18. Little J.B., Gorgojo L., Vetrovs H. Delayed Appearance of Lethal and Specific Gene Mutations in Irradiated Mammalian Cells // *Intern. J. Rad. Oncol.* 1990. V. 19. P. 1425–1429.
19. Limoli C.L., Kaplan M.I., Corcoran J., Meyers M., Boothman D.A., Morgan W.F. Chromosomal Instability and Its Relationship to Other End Points of Genomic Instability // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 5557–5563.
20. Sørensen B.S., Overgaard J., Bassler N. In Vitro RBE-LET Dependence for Multiple Particle Types // *Acta Oncol. (Madrid)*. 2011. V. 50. P. 757–762.
21. Barendsen G.W. The Relationships between RBE and LET for Different Types of Lethal Damage in Mammalian Cells: Biophysical and Molecular Mechanisms // *Rad. Res.* 1994. V. 139. P. 257.
22. Goodhead D.T. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations // *J. Rad. Res. Suppl.* 1999. V. 40. P. 1–13.
23. Kiefer J., Schmidt P., Koch S. Mutations in Mammalian Cells Induced by Heavy Charged Particles: An Indicator for Risk Assessment in Space // *Rad. Res.* 2001. V. 156. P. 607–611.
24. Thacker J., Stretch A., Stephens M.A. Mutation and Inactivation of Cultured Mammalian Cells Exposed to Beams of Accelerated Heavy Ions. II. Chinese Hamster V79 Cells // *Intern. J. Rad. Biol. Rel. Stud. Phys. Chem. Med.* 1979. V. 36. P. 137–148.
25. Govorun R.D., Koshlan I.V., Koshlan N.A., Krasavin E.A., Shmakova N.L. Chromosome Instability of HPRT-Mutant Subclones Induced by Ionizing Radiation of Various LET // *Adv. Space Res.* 2002. V. 30. P. 885–890.
26. Cox R., Masson W.K. Mutation and Inactivation of Cultured Mammalian Cells Exposed to Beams of Accelerated Heavy Ions. III. Human Diploid Fibroblasts // *Intern. J. Rad. Biol. Rel. Stud. Phys. Chem. Med.* 1979. V. 36. P. 149–160.
27. Thacker J., Stretch A., Stephens M.A. The Induction of Thioguanine-Resistant Mutants of Chinese Hamster Cells by Gamma Rays // *Mut. Res.* 1977. V. 42. P. 313–326.
28. Cox R., Thacker J., Goodhead D.T. Inactivation and Mutation of Cultured Mammalian Cells by Aluminium Characteristic Ultrasoft X-Rays. II. Dose-Responses of Chinese Hamster and Human Diploid Cells to Aluminium X-Rays and Radiations of Different LET // *Intern. J. Rad. Biol. Rel. Stud. Phys. Chem. Med.* 1977. V. 31. P. 561–576.
29. Kiefer J., Schreiber A., Gutermuth F., Koch S., Schmidt P. Mutation Induction by Different Types of Radiation at the HPRT Locus // *Mut. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1999. V. 431. P. 429–448.
30. Bezbakh A.A., Zager V.B., Kaminski G., Krylov A.I., Krylov V.A., Teterev Yu.G., Timoshenko G.N. Upgrading the Genome Facility for Radiobiological Experiments with Heavy-Ion Beams // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2013. V. 10. P. 175–178.

31. *Tarasov O. B., Bazin D.* LISE++: Radioactive Beam Production with In-Flight Separators // Nucl. Instr. Meth. B. 2008. V. 266. P. 4657–4664.
32. *Ziegler J. F., Ziegler M. D., Biersack J. P.* SRIM — The Stopping and Range of Ions in Matter // Nucl. Instr. Meth. B. 2010. V. 268. P. 1818–1823.
33. *Thacker J., Stephens M. A., Stretch A.* Factors Affecting the Efficiency of Purine Analogues as Selective Agents for Mutants of Mammalian Cells Induced by Ionizing Radiation // Mut. Res. 1976. V. 35. P. 465–478.
34. *Podlutsky A., Bastlová T., Lambert B.* Reduced Proliferation Rate of Hypoxanthine-phosphoribosyl Transferase Mutant Human T-Lymphocytes In Vitro // Environ. Mol. Mutagen. 1996. V. 28. P. 13–18.
35. *Vaiserman A. M.* Radiation Hormesis: Historical Perspective and Implications for Low-Dose Cancer Risk Assessment // Dose-Response. 2010. V. 8. doi:10.2203/dose-response.09-037.Vaiserman.
36. *Upton A. C.* Radiation Hormesis: Data and Interpretations // Crit. Rev. Toxicol. 2001. V. 31. P. 681–695.
37. *Zhikreutskaya S., Peregudova D., Danilov A., Plyusnina E., Krasnov G., Dmitriev A., Kudryavtseva A., Shaposhnikov M., Moskalev A.* Effect of Low Doses (5–40 kGy) of Gamma Irradiation on Lifespan and Stress-Related Genes Expression Profile in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0133840.
38. *Nikjoo H., O'Neill P., Terrissol M., Goodhead D. T.* Quantitative Modelling of DNA Damage Using Monte Carlo Track Structure Method // Rad. Environ. Biophys. 1999. V. 38. P. 31–38.
39. *Goodhead D. T.* Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA // Intern. J. Rad. Biol. 1994. V. 65. P. 7–17.
40. *Asaithamby A., Chen D. J.* Mechanism of Cluster DNA Damage Repair in Response to High-Atomic Number and Energy Particles Radiation // Mut. Res. — Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 2011. V. 711. P. 87–99.
41. *Sutherland B. M., Bennett P. V., Schenk H., Sidorkina O., Laval J., Trunk J., Monteleone D., Sutherland J.* Clustered DNA Damages Induced by High and Low LET Radiation, Including Heavy Ions // Phys. Med. 2001. V. 17, Suppl. 1. P. 202–204.
42. *Baumstark-Khan C., Rosendahl I. M., Rink H.* On the Quality of Mutations in Mammalian Cells Induced by High LET Radiations // Adv. Space Res. 2007. V. 40. P. 474–482.
43. *Sabatier L., Dutrillaux B., Martin M. B.* Chromosomal Instability // Nature. 1992. V. 357. P. 548.
44. *Martins M. B., Sabatier L., Ricoul M., Pinton A., Dutrillaux B.* Specific Chromosome Instability Induced by Heavy Ions: A Step towards Transformation of Human Fibroblasts? // Mut. Res. Mol. Mech. Mutagen. 1993. V. 285. P. 229–237.
45. *Testard I., Sabatier L.* Is Delayed Genomic Instability Specifically Induced by High-LET Particles? // Nucl. Instr. Meth. B. 1998. V. 146. P. 518–527.