

## СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ И HPRT-МУТАГЕНЕЗ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

*И.В. Кошлань*<sup>1,2</sup>, *Н.А. Кошлань*<sup>1</sup>, *П.Блага*<sup>1</sup>, *Ю.В. Мельникова*<sup>1</sup>, *Д.В. Петрова*<sup>1</sup>,  
*Р.Д.Говорун*, *И.В. Смирнова*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>2</sup>Государственный университет «Дубна», Дубна,

[koshlan@jinr.ru](mailto:koshlan@jinr.ru)

*Резюме.* В экспериментах, проведенных на клетках китайского хомячка линии V79, исследовано мутагенное действие тяжелых заряженных частиц. Проанализированы HPRT-мутация, хромосомные аберрации и структурные нарушения гена у спонтанных и облученных клеток на протяжении длительного времени экспрессии (до 45 суток) после воздействия излучений с разными физическими характеристиками. Максимальный выход мутантных клонов наблюдался в разные времена экспрессии в зависимости от характеристик ионизирующего излучения. В тестируемом интервале ЛПЭ излучений положение максимального выхода мутантной фракции смещалось в сторону увеличения времени экспрессии при более высоких ЛПЭ. В отдаленные сроки после облучения уровень мутагенеза снижался ниже спонтанного уровня. Хромосомные аберрации на протяжении всего срока исследования (до 45 суток) постепенно восстанавливались до контрольного уровня. У радиационно-индуцированных ионами <sup>11</sup>B мутантов наблюдалось увеличение доли делеционных мутантов с ростом дозы облучения (до ~70 %). У спонтанных мутантов делеционные образцы составляли не более 10 % от общего количества исследованных образцов.

*Ключевые слова:* V79, HPRT-мутация, облучение, ускоренные тяжелые ионы, геномная нестабильность, ЛПЭ, хромосомные аберрации

## STRUCTURAL DISORDERS AND HPRT-MUTAGENESIS AFTER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION WITH DIFFERENT PHYSICAL CHARACTERISTICS

*I.V. Koshlan*<sup>1,2</sup>, *N.A. Koshlan*<sup>1</sup>, *P. Bláha*<sup>1</sup>, *J.V. Melnikova*<sup>1</sup>, *D.V. Petrova*<sup>1</sup>,  
*R.D.Govorun*, *I.V. Smirnova*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow Region, Russia

<sup>2</sup>Dubna State University, Dubna, Moscow Region, Russia

e-mail: [koshlan@jinr.ru](mailto:koshlan@jinr.ru)

*Summary.* Resume. In experiments conducted on the cells of the Chinese hamster line V79, the mutagenic effect of heavy charged particles was investigated. HPRT mutagenesis, chromosomal aberrations and structural disorders of the gene in spontaneous and irradiated cells were analyzed for a long time of expression (up to 45 days) after exposure to radiation with different physical characteristics. The maximum yield of mutant clones was observed at different expression times depending on the characteristics of ionizing radiation. In the tested range of LPE emissions, the position of the maximum yield of the mutant fraction shifted towards an increase in the expression time at higher LPE. In the long term after irradiation, the level of mutagenesis decreased even below the spontaneous level. Chromosomal aberrations throughout the entire study period (up to 45 days) gradually decreased to the control level. Radiation-induced mutants with <sup>11</sup>B ions showed an increase in the proportion of deletion mutants with an increase in the radiation dose (up to ~70%). In spontaneous mutants, deletion samples were no more than 10% of the total number of samples studied.

*Keywords:* V79 hamster cells, HPRT mutagenesis, irradiation, accelerated heavy ions, genomic instability, LET, chromosomal aberrations

Воздействие ускоренных тяжелых ионов на клетки млекопитающих и проявления отдаленных эффектов у потомков находятся в фокусе фундаментальных радиобиологических исследований [1,2,3]. Повышенное внимание к исследованию воздействия ускоренных ионов с высоким зарядом и высокой энергией на биологические объекты наблюдается в связи с подготовкой к долгосрочным межпланетным полетам за пределы магнитосферы земли, например, на Марс, где основной вклад в эквивалентную дозу космонавтов составят высокоэнергетические и тяжело заряженные частицы Галактического Космического Излучения [4], а также в связи с расширением использования тяжелых ионов в терапии рака [5].

*Целью работы* явилось исследование отсроченных генетических эффектов в клетках китайского хомячка V79 после воздействия излучений с разными физическими характеристиками. В ходе исследования особое внимание уделялось индукции мутаций в гене HPRT на протяжении длительного времени экспрессии (до 40 суток), а также анализу хромосомных нарушений и структурных изменений в *hprt*-гене у мутантов, индуцированных излучениями с разной ЛПЭ.

*Материалы и методы исследования.* Для облучения клеток использовали излучения разного качества:  $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$  с расчетным ЛПЭ  $\sim 0,23$  кэВ/мкм, ускоренные тяжелые ионы  $^{18}\text{O}$ ,  $^{20}\text{Ne}$  и  $^{11}\text{B}$  с ЛПЭ в диапазоне от 49 до 149 кэВ/мкм. Во всех экспериментах как с редко-, так и с плотноионизирующим излучением экспоненциально растущие клетки облучали в виде суспензии в стандартной питательной среде в концентрации  $10^6$  клеток/мл. После облучения клетки высевали в соответствующих концентрациях для экспрессии мутаций в стандартную среду ДМЭМ, содержащую 10% сыворотки, глутамин и антибиотик. Через каждые трое суток клетки пассировали. При пересеве часть суспензии использовали для исследования мутагенеза. Клетки сеяли на селективную среду с 6-тиогуанином для выявления мутантных клонов. Каждый выделенный клон впоследствии был исследован на предмет хромосомных нарушений и наличие структурных нарушений в *hprt*-гене.

*Результаты работы и обсуждение.*

В ходе работы было обнаружено, что выход фракции мутантов является немонотонной функцией и зависит от сроков посева облученных клеток («времени экспрессии» мутаций) на селективную питательную среду с 6-тиогуанином и качества излучения. Для излучений с низким ЛПЭ, в частности гамма-квантов, эта функция монотонно уменьшается на протяжении всего исследования. С увеличением ЛПЭ излучения максимальный выход мутантов сдвигался в сторону более длительных времен экспрессии с последующим снижением уровня мутагенеза до показателей спонтанного мутагенеза. В диапазоне от 49 до 149 кэВ/мкм зависимость максимального положения по выходу мутантов от ЛПЭ излучения может быть описана экспоненциальной функцией. На основании проведенных исследований можно предположить, что повышенный уровень радиационно-индуцированного мутагенеза определяется возросшей хромосомной нестабильностью популяции облученных клеток, и его проявление в разные «времена экспрессии» зависит от тяжести первоначальных повреждений.

Выход радиационно-индуцированных мутантов в разные времена экспрессии соотносили с количеством и типом хромосомных aberrаций на одинаковых сроках исследования. Сопоставление данных HPRT-мутагенеза и хромосомных нарушений на протяжении длительного периода исследования (до 45 суток) выявило постепенное снижение как уровня мутагенеза, так и выхода хромосомных aberrаций. Обнаружено, что при высоких дозах  $\gamma$ -облучения уровень хромосомных нарушений в отдаленные сроки наблюдений не только снижается до спонтанного уровня, но и становится даже ниже значений спонтанного мутагенеза. Аналогичная картина наблюдалась после

облучения ускоренными ионами бора. Это может указывать на некие различия в природе спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза.

Наряду с исследованием хромосомных aberrаций у потомков облученных клеток, был проведен анализ aberrаций у HPRT-мутантных субклонов и их отдаленных потомков (после ~ 40 генераций). У потомков облученных к этим срокам наблюдений уровень ХА снижался до спонтанных значений вне зависимости от дозы облучения.

Параллельно с исследованием уровня мутагенеза, хромосомных aberrаций у потомков облученных клеток был проведен анализ повреждений *hprt*-гена. В ходе исследования методом ПЦР структурных нарушений в *hprt*-гене у спонтанных и радиационно-индуцированных мутантных субклонов отмечается возрастание частоты встречаемости мутантов с делециями разного вида: как частичных, так и полных, у мутантов. В HPRT мутантных клетках, облученных тяжелыми ионами  $^{11}\text{B}$  в дозах 0,5, 1 и 2 Гр, доля делеций разного вида возросла до 46% после облучения в дозе 1 Гр и увеличилась до 67% после облучения в дозе 2 Гр. Спонтанные мутанты в основном характеризуются наличием точковых мутаций до 80-90%, а делеционные образцы представляют собой единичные экземпляры с выпадением единичных экзонов, и их доля составляет не более 10-20% от общего числа. Подобные данные для спонтанных HPRT-мутантов опубликованы в работе по исследованию молекулярной природы спонтанно возникающих и индуцированных рентгеновскими лучами мутаций в соматических клеточных системах млекопитающих методом Саузерн-блоттинга [6].

Поддержание генетической целостности является ключевым процессом жизнеспособности клеток. Нарушение этой целостности является причиной геномной нестабильности [7], приводит к накоплению хромосомных aberrаций и мутаций, которые могут быть ответственны за возникновение онкогенеза [8].

Полученные данные свидетельствуют о возникновении и сохранении хромосомной нестабильности в поколениях облученных клеток. Наблюдаемая вариабельность полученных данных по мутагенезу, цитогенетическим показателям и данным молекулярного анализа, по-видимому, определяется типом возникающих мутаций у спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов после воздействия излучений разного качества. Последствия этого воздействия могут проявляться в длинном ряду клеточных поколений. И могут быть связаны не только с точковыми мутациями, но и со структурными изменениями гена.

#### Список литературы

1. *Michaletou, T.D., Michalopoulos I, Costes S. V. et al.* 2021. V. 11. Iss. 2. № 115.
2. *Okayasu R.* 2012. V. 130. № 5. P. 991-1000.
3. *Yatagai F.* Biological Sciences in Space. 2004. V. 18. № 4. P. 224-234.
4. *Fogtman A., Baatout S., Baselet B. et al.* *NPJ Microgravity*. 2023. V. 9. № 8.
5. *Hellweg C.E., Chishti A.A., Diegeler S. et al.* International Journal of Particle Therapy. 2018. V. 5. № 1. P. 60-73.
6. *Sankaranarayanan K.* Mutation Research. 1991. V. 258. № 1. P. 75-97.
7. *Sumption N., Goodhead D.T. and Anderson R M.* PLoS One. 2015. V. 10. № 8.
8. *Kanagaraj K., Rajan V., Pandey B.N. et al.* International Journal of Radiation Biology. 2019. V. 95. № 12. P. 1648-1658.