

RADIATION-INDUCED MUTATIONS IN MAMMALIAN MINISATELLITE LOCI

РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННЫЕ МУТАЦИИ В МИНИ-САТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Y.E. Dubrova^{1,2}, M. Plumb³, J. Brown¹, A.J. Jeffreys¹

¹ Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ MRC Radiation and Genome Stability Unit, Harwell, UK

Department of Genetics, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK

tel: 44-116-252-5654; fax: 44-116-252-3378; E-mail: yed2@le.ac.uk

Ю.Е. Дуброва^{1,2}, М. Пламб³, Дж. Браун¹, А. Дж. Джеффрейс¹

¹Кафедра генетики Лестерского Университета, Лестер, Великобритания

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

³Отдел радиации и стабильности генома

Медицинского научно-исследовательского совета, Харвелл, Великобритания

tel: 44-116-252-5654; fax: 44-116-252-3378; E-mail: yed2@le.ac.uk

Abstract

Radiation-induced mutations in minisatellite loci of mice and humans were studied. Substantial minisatellite loci mutation incidence increase was shown in offspring of male mice exposed to acute irradiation within pre-meiotic stages of spermatogenesis, whereas the post-meiotic irradiation did not lead to significant growth in mutation frequency. A linear dose-response of mutations was registered among posterity of male mice irradiated in spermatogenesis pre-meiotic stages. That enabled us to estimate the doubling dose value for minisatellite loci of 0.33 Gy, being close enough to those obtained in mice under other mutation detection systems applications. A similar study was conducted among Mogilev province rural areas population, resident within territories heavily contaminated with radionuclides after the Chernobyl accident. The frequency of mutations in minisatellite loci among the mentioned contingent of families in two times was over the respective values in a control group of non-exposed families. Within the exposed families cohort positive correlation was registered between mutation rate in offspring and parental chronic exposure doses, that testifies to the radiation-stipulated minisatellite loci mutations frequency growth. Findings suggest considering minisatellite loci as the most promising system for radiation-induced mutations monitoring in human populations.

Keywords: radiation-induced mutations, minisatellite loci, Chernobyl accident, low doses, ionizing radiation.

INTRODUCTION

Highly-variable repeated DNA sequences — minisatellite loci — have several substantial advantages for radiation-induced mutation monitoring in human populations. Firstly, the high rate of spontaneous mutations incidence altering minisatellite loci length (repeated sequences number) (Jeffreys A.J. et al., 1988; 1990) presume its potential suitability for monitoring, since if ionising radiation increases mutation incidence in minisatellite loci than the unique opportunity of induced mutations detection in relatively small population samples is offered. Secondly, the majority of mutations in minisatellite loci selective neutrality enables screening conduction in any non-selected posterity group without mutations carriers substantial loss owing to selection impact being so typical for many genetic systems (Dubrova Y.E., 1992). Moreover, it is possible to extend mutation screening over single individuals exposed to mutagen effects using new approaches to mini-

ВВЕДЕНИЕ

Высоковариабельные повторяющиеся последовательности ДНК — мини-сателлитные локусы — обладают рядом существенных преимуществ для мониторинга радиационно индуцированных мутаций в популяциях человека. Во-первых, высокая частота спонтанных мутаций, изменяющих длину мини-сателлитных локусов (число повторяющихся последовательностей) (Jeffreys A.J. et al., 1988; 1990) предполагает их потенциальную пригодность для мониторинга, поскольку если ионизирующие излучения увеличивают частоту мутаций в мини-сателлитных локусах, то представляется уникальная возможность обнаружить соответствующие сдвиги в мутационном темпе при исследовании малочисленных популяционных выборок. Во-вторых, селективная нейтральность большинства мутаций в мини-сателлитных локусах позволяет проводить скрининг мутаций в любой неселективной группе потомков без существенных потерь носителей мутаций за счет действия отбора, столь характерного для многих генетических систем (Дуброва Ю.Е., 1992). Использование новых подходов к анализу мини-сателлитов (SP-PCR) позволяет проводить изучение частоты мутаций у отдель-

satellite analysis (SP- PCR) (Jeffreys A.J. et al., 1994). Finally, the mutant structures can be easily analysed (Jeffreys A.J. et al., 1994; 1991). This in its turn provides real possibilities for mutation induction mechanisms study in minisatellite loci.

In our initial study we obtained the first evidence concerning acute γ -radiation leading to a statistically substantial increase of minisatellite mutation rate in mice (Dubrova Y.E., 1993). Further, we carried out a more detailed study of mutation induction at minisatellite loci in mice after acute exposure of males to X-rays and at different stages of spermatogenesis (Dubrova Y.E., 1998). Apart from the aforementioned we applied the minisatellite loci for Mogilev region of Belarus rural population genetic peculiarities assay. Those people live within territories contaminated with radionuclides after the Chernobyl NPP (ChNPP) accident. Practically a two-fold increase in minisatellite loci mutation rate was registered compared to that among a control group of non-exposed families (Dubrova Y.E. et al., 1996; 1997). Here we summarise results of the stated research.

MUTATION INDUCTION IN LABORATORY MICE

Parental couples irradiation and interbreeding. Mutation registration

Male CBA/H mice (Harwell colony) were exposed to acute X-ray irradiation in 0.5 Gy and 1 Gy dose values (dose-rate $0.5 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) and coupled with untreated CBA/H females 3, 6 and 10 weeks after irradiation. The offspring conceived 3 weeks after male irradiation carry mutations induced in post-meiotic spermatids, whereas that from 6 and 10 weeks — in pre-meiotic A_s -spermatogonia and stem cells respectively (Searle A.G., 1974).

Minisatellite loci mutations were revealed by means of multi-locus minisatellite probes 33.15 and MMS10 (Jeffreys A.J. et al., 1985; Bois P. et al., 1998) both with two single-locus probes — Ms6-hm and Hm-2 (Kelly R. et al., 1989; Gibbs M. et al., 1993). Table 1 shows data concerning total mutation number registered with all four mentioned probes. The total mutation rate among all study groups determined as their number ratio to minisatellite bands quantity, constituted 30 per scion. Besides that the single-locus probes Ms6-hm and Hm-2 application enabled mutations effective differentiation in posterity by origin, paternal and maternal.

Mutation induction within spermatogenesis at different stages

The maximum radiation dose of 1Gy was used for mutation induction peculiarities analysis at various spermatogenesis stages. The frequency of mutations in offspring conceived 3 weeks after irradiation was

ных индивидуумов, подвергшихся воздействию мутагенов (Jeffreys A.J. et al., 1994). Наконец, структура мутантов может быть детально проанализирована (Jeffreys A.J. et al., 1991; 1994), что предоставляет реальные возможности для изучения механизмов индукции мутаций в минисателлитных локусах.

В нашей первой работе было получено первое свидетельство тому, что у мышей острое γ -облучение приводит к статистически значимому увеличению частоты мутаций в мини-сателлитных локусах (Dubrova Y.E. et al., 1993). В дальнейшем мы провели детальное изучение индукции мутаций в мини-сателлитных локусах мышей после острого рентгеновского облучения самцов на разных стадиях сперматогенеза (Dubrova Y.E. et al., 1998). Кроме того, мы использовали мини-сателлитные локусы для изучения генетических особенностей сельского населения Могилевской области Беларуси, проживающего на территориях, загрязненных радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС), и обнаружили практически двукратное увеличение частоты мутаций в мини-сателлитных локусах по сравнению с таковой в контрольной группе необлученных семей (Dubrova Y.E. et al., 1996; 1997). В данной публикации подведены итоги указанных исследований.

ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Облучение и скрещивание родительских пар. Учет мутаций

Самцы мышей линии СВА/Н (коллония Харвелл) были подвергнуты острому рентгеновскому облучению в дозах 0,5 и 1 Гр (мощностью дозы $0,5 \text{ Гр} \cdot \text{мин}^{-1}$) и через 3, 6 и 10 нед скрещены с необлученными самками СВА/Н. Потомки самцов, зачатые через 3 нед после облучения, несут мутации, индуцированные в постмейотических сперматидеях, тогда как потомки, зачатые через 6 и 10 нед — в премейотических A_s -сперматогониях и стволовых клетках соответственно (Searle A.G., 1974).

Мутации в мини-сателлитных локусах выявляли при помощи полилокусных проб 33.15 и MMS10 (Jeffreys A.J. et al., 1985; Bois P. et al., 1998), а также двух монолокусных проб — Ms6-hm и Hm-2 (Kelly R. et al. 1989; Gibbs M. et al., 1993). В таблице 1 приведены данные об общем числе мутаций, выявленных при помощи четырех указанных проб. При этом общую частоту мутаций во всех исследованных группах определяли как отношение их числа к количеству мини-сателлитных фракций, составившему 30 фракций у потомка. Кроме того, использование монолокусных проб Ms6-hm и Hm-2 позволило надежно дифференцировать мутации у потомков по их происхождению на отцовские и материнские.

Индукция мутаций на различных стадиях сперматогенеза

Максимальная доза облучения 1 Гр была использована для анализа закономерностей индукции мутаций на различных стадиях сперматогенеза. При этом частота мутаций у потомков, зачатых через 3 нед после облучения,

TABLE 1

MUTATION RATES IN OFFSPRING OF CONTROL AND EXPOSED MICE MALES (FROM Y.E. DUBROVA et al., 1998)

ТАБЛИЦА 1

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ СРЕДИ ПОТОМСТВА КОНТРОЛЬНЫХ И ОБЛУЧЕННЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ (ПО Y.E. DUBROVA et al., 1998)

Dose, Gy	Stage weeks	No. of couples	No. of offspring	Mutation rate in offspring *					
				Total**	P-value***	Paternal****	P-value***	Maternal****	P-value***
0	—	8	54	0.0123 (20)	—	0.0556 (6)	—	0.0463 (5)	—
0.5	Spermatogonia (6)	8	45	0.0193 (26)	0.1711	0.1333 (12)	0.0995	0.0667 (6)	0.7510
0.5	Stem cells (10)	8	55	0.0248 (41)	0.0129	0.1455 (16)	0.0457	0.0545 (6)	0.9999
0.5	6+10 weeks	16	100	0.0223 (67)	0.0198	0.1400 (28)	0.0325	0.0600 (12)	0.8280
1	Spermatids (3)	10	62	0.0113 (21)	0.8930	0.0806 (10)	0.6267	0.0323 (4)	0.8285
1	Spermatogonia (6)	12	73	0.0274 (60)	0.0015	0.2192 (32)	0.0003	0.0548 (8)	0.9978
1	Stem cells (10)	5	25	0.0280 (21)	0.0134	0.2400 (12)	0.0026	0.0600 (3)	0.9831
1	6+10 weeks	17	98	0.0276 (81)	0.0008	0.2245 (44)	0.0001	0.0561 (11)	0.9404

Notes. * — Number of mutations is given in brackets. ** — Total independent mutation number registered by probes 33.15, MMS10, Ms6-hm and Hm-2. *** — Probability of difference from control group (Fisher's exact test, two-sided; statistically significant values are in bold type). **** — Number of paternal and maternal mutations registered by two single-locus probes Ms6-hm, Hm-2.

Примечания. * — В скобках приведено число мутаций. ** — Общее число независимых мутаций, выявленных при помощи проб 33.15, MMS10, Ms6-hm и Hm-2. *** — Вероятность различий по сравнению с контрольной группой (точный двусторонний критерий Фишера; статистически значимые величины выделены полужирным шрифтом). **** — Число отцовских и материнских мутаций, выявленных при помощи проб Ms6-hm и Hm-2.

similar to that in the control group of non-exposed couples, whereas irradiation of both pre-meiotic stages resulted in a statistically significant increase of mutation rates (table 1, figure 1a). Furthermore, the stated mutation rate increase was mostly expressed for paternal mutations, as was expected after paternal exposure within the exact experiments session. At the same time parental irradiation did not affect the maternal mutations rate.

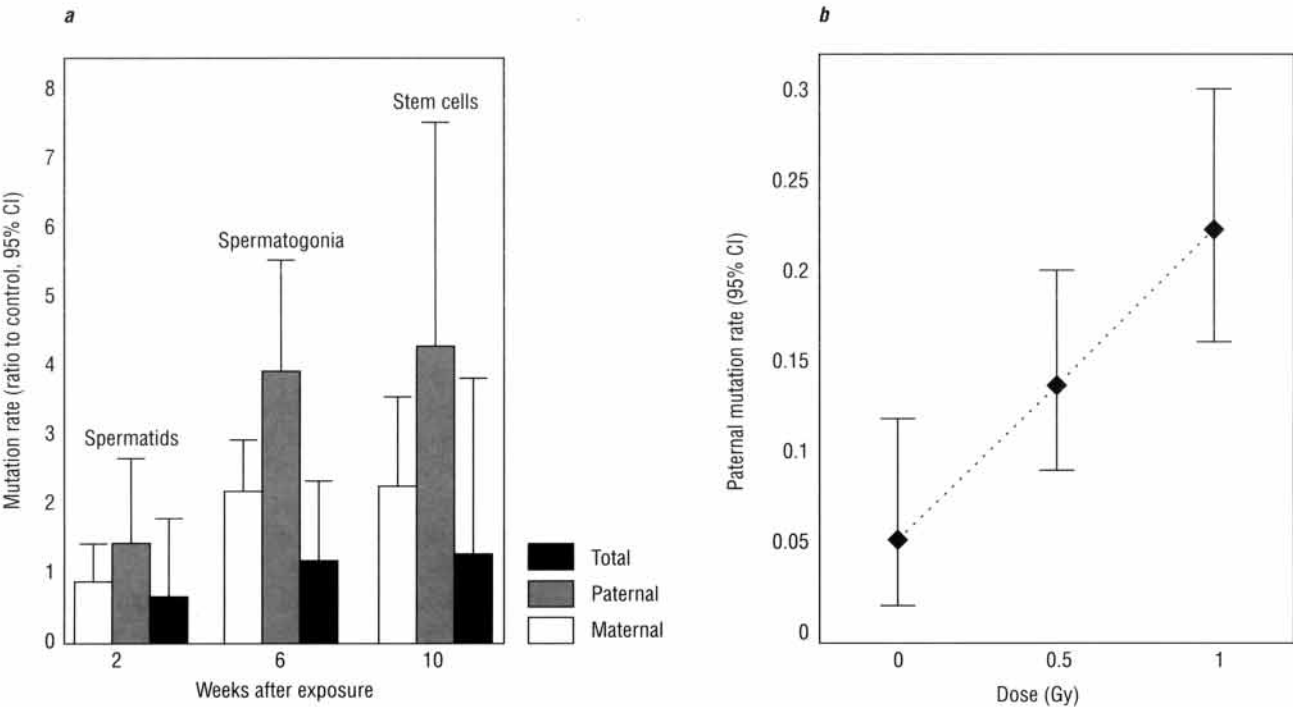
не отличалась от таковой в контрольной группе необлученных семей, тогда как облучение на обеих премейотических стадиях сперматогенеза привело к статистически значимому увеличению частоты мутаций (см. таблицу 1, рисунок 1a). Более того, указанное возрастание частоты мутаций было наиболее выражено для отцовских мутаций, что и ожидали после облучения самцов в данной серии экспериментов. В то же время облучение самцов не сказалось на частоте материнских мутаций.

FIGURE 1. MUTATION RATE IN MICE MINISATELLITE LOCI:

- a — FREQUENCIES OF MUTATION IN OFFSPRING CONCEIVED 3, 6 AND 10 WEEKS FOLLOWING MALE ACUTE X-RAY EXPOSURE IN DOSE 1 Gy;
b — PATERNAL MUTATION FREQUENCY DEPENDENCE UPON PRE-MEIOTIC IRRADIATION DOSE;
IN ALL GRAPHS THE 95% CONFIDENCE INTERVALS VALUES FOR MUTATION RATES ARE SHOWN (DEFINED FROM POISSON DISTRIBUTION)

РИСУНОК 1. ЧАСТОТА МУТАЦИЙ В МИНИ-САТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСАХ МЫШЕЙ:

- a — ЧАСТОТА МУТАЦИЙ СРЕДИ ПОТОМКОВ, ЗАЧАТЫХ ЧЕРЕЗ 3, 6 И 10 НЕД ПОСЛЕ ОСТРОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ САМЦОВ В ДОЗЕ 1 Гр;
b — ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ ЧАСТОТОЙ ОТЦОВСКИХ МУТАЦИЙ И ДОЗОЙ ПРЕМЕЙОТИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ;
НА ВСЕХ ГРАФИКАХ ПРИВЕДЕНЫ ЗНАЧЕНИЯ 95% ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ДЛЯ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ, ОПРЕДЕЛЕННЫХ НА ОСНОВАНИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПУАССОНА



According to several research data, using traditional systems for mutation registration in structural genes, male irradiation effectiveness in mice has been compared after pre- and post-meiotic irradiation (Searle A.G., 1974; Ehling U.H., Favor J., 1984). The results of conducted studies suggest that pre-meiotic A_s -spermatogonia (6 weeks after exposure) are less sensitive to ionising radiation, whereas the mutations maximal induction is observed in post-meiotic spermatids (3 weeks after irradiation). Protein-coding genes mutations induction effectiveness differences within stated spermatogenesis stages are connected with intensive reparations processes of radio-induced DNA damage taking place in spermatogenesis pre-meiotic stages, in their turn almost absent after meiosis (Ehling U.H., Favor J., 1984). At the same time mutation induction in human minisatellites stipulated by non-targeted events most probably occurs in diploid germ cells (Jeffreys A.J., Neumann R., 1977). Thus, according to our findings, induction of minisatellite mutation by ionising radiation may be greatly suppressed in post-meiotic spermatogenesis phases contrary to that of protein-coding genes. However, two recent publications data testify mice minisatellite Pc-1 (Ms6-hm) high sensitivity to irradiation in spermatogenesis post-meiotic stages (Sadamoto S. et al., 1994; Fan Y.F. et al., 1995). At the same time, the named minisatellite probe application revealed no mutation rate increase among offspring conceived 3 weeks after the males irradiation within spermatogenesis post-meiotic stages, whereas the pre-meiotic irradiation resulted in statistically significant 3.7-fold increase in the paternal mutation rate. The same pattern was traced for minisatellite Hm-2 and mutations registered by multi-locus probe MMS10. Apart from this, stated results correspond with our previous research data on mutations induction presence at mice minisatellite loci after males irradiation in spermatogenesis pre-meiotic stages (Dubrova Y.E. et al., 1993).

Mutation rate dose-response

No statistically significant differences were revealed in mutation rates in offspring conceived 6 and 10 weeks after X-ray irradiation at dose 0.5 Gy. The same result was obtained for scions of males exposed to dose 1 Gy. Data for pre-meiotic irradiation in spermatogonia (6 weeks) and stem cells stages (10 weeks) were combined.

Both irradiation dose values caused a statistically significant increase in mutation rate among offspring (table 1, figure 1b). For mutation induction in minisatellite loci main parameters evaluation, we fitted with linear regression the relationship between the number of paternal mutations registered in each offspring and paternal radiation dose

В ряде работ эффективность пост- и премейотического облучения для самцов была сопоставлена при помощи известных систем учета мутаций в структурных генах мышей (Searle A.G., 1974; Ehling U.H., Favor J., 1984). Результаты проведенных работ свидетельствуют о том, что премейотические A_s -сперматогонии (6 нед после облучения) обладают пониженной чувствительностью к ионизирующим излучениям, тогда как максимальная индукция мутаций наблюдается в постмейотических сперматидях (3 нед после облучения). Различия в эффективности индукции мутаций в структурных генах на указанных стадиях сперматогенеза связаны с интенсивными процессами репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК, происходящими на премейотических стадиях сперматогенеза, которые, в свою очередь, практически отсутствуют после мейоза (Ehling U.H., Favor J., 1984). В то же время мутации в мини-сателлитных локусах человека, обусловленные рекомбинационноподобными событиями, скорее всего происходят лишь в диплоидных половых клетках (Jeffreys A.J., Neumann R., 1997). Следовательно, согласно нашим данным, индукция мутаций в мини-сателлитных локусах, в отличие от таковой для структурных генов, в значительной степени репрессирована на постмейотических стадиях сперматогенеза. Однако результаты, приведенные в двух недавних публикациях, свидетельствуют о высокой чувствительности минисателлита Pc-1 (Ms6-hm) к облучению на постмейотических стадиях сперматогенеза у мышей (Sadamoto S. et al., 1994; Fan Y.F. et al., 1995). В то же время при использовании этой же мини-сателлитной пробы мы не смогли обнаружить увеличения частоты мутаций у потомков, зачатых через 3 нед после облучения самцов на постмейотических стадиях сперматогенеза, тогда как премейотическое облучение привело к статистически значимому 3,7-кратному увеличению частоты отцовских мутаций. Аналогичная закономерность прослежена для мини-сателлита Hm-2 и мутаций, выявленных при помощи полилокусной пробы MMS10. Кроме того, эти результаты соответствуют нашим данным относительно индукции мутаций в мини-сателлитных локусах мышей после облучения самцов на премейотических стадиях сперматогенеза (Dubrova Y.E. et al., 1993).

Зависимость между дозой облучения и частотой мутаций

В частоте мутаций у потомков, зачатых через 6 и 10 нед после рентгеновского облучения в дозе 0,5 Гр, статистически значимых различий не выявлено. Аналогичный результат был получен для потомков самцов, получивших дозу 1 Гр. Поэтому для дальнейшего анализа данные для премейотического облучения на стадиях сперматогоний (6 нед) и стволовых клеток (10 нед) были объединены.

Обе дозы облучения вызвали статистически значимое увеличение частоты мутаций у потомков (см. таблицу 1, рисунок 1б). Для оценки основных параметров индукции мутаций в мини-сателлитных локусах зависимость между числом отцовских мутаций у каждого потомка и родительской дозой облучения была аппроксимирована линейной регрессией ($y=0,111+0,338D$;

($y=0.1111+0.3379D$; $F(1/250)=15.2$; $P=0.0001$, where y — mutations number, D — paternal dose). Further, using spontaneous parental mutations rate ($6/54=0.1111$, table 1) and linear regression equation factor reflecting mutations induction effectiveness after acute X-ray exposure ($0.338\pm0.087\text{ Gy}^{-1}$) the doubling dose value for minisatellite loci mutation was revealed as $0.111/0.338=0.33\text{ Gy}$ (95% confidence interval 0.06–0.75 Gy). Named value is close to that obtained using the Russel's test (0.34 Gy, 95% confidence interval 0.06–0.5 Gy), taking stock of protein-coding genes mutations in mice (Searle A.G., 1974). However, statistically significant evidence for mutation induction at minisatellite loci was obtained here by analysis of 252 offspring of exposed and control group animals, whereas other mice mutations registration systems require thousands or even hundreds of thousands of scion studies (Searle A.G., 1974). For comparison: research for mutation induction study with the above — mentioned Russel's test (those results are at present considered as mice radiation genetics' "golden standard") are required to involve more than a million offspring of exposed and control animals (Searle A.G., 1974).

In other words, our research results once more revealed the unique advantage of minisatellite DNA for monitoring — opportunity of mutations changes adequate registration within extremely scanty statistical samples (Dubrova Y.E. et al., 1993; 1996; 1997). Furthermore, in all previous studies conducted with mice structural genes mutations screening traditional approaches, the mutation induction was estimated under high acute exposure doses (3–6 Gy) (Searle A.G., 1974).

In its turn, the high frequencies of spontaneous and induced mutations at minisatellite loci enable effective evaluation of mutation induction regularities within low and medium doses range (0.5–1 Gy) that was not studied in mice radiation genetics earlier.

HUMAN MINISATELLITE LOCI MUTATION RATE AFTER THE CHNPP ACCIDENT

Population study groups and mutation registration

Blood samples were collected from 127 complete families (father, mother, child) inhabiting the heavily radionuclide contaminated rural areas of the Belarussian Mogilev province (Dubrova Y.E. et al., 1996; 1997). All the children involved in analysis were born between February and September 1994 in families continuously resident in contaminated regions of Mogilev province. As a control sample the 120 specimens of non-irradiated Caucasian families resident within the United Kingdom territory were used. Mutations in families were registered with multi-locus probes 33.15 and 33.6 (Jeffreys A.J. et al., 1985) and 6 independent single-locus probes

$F(1/250)=15.2$; $p=0.0001$, где y — число мутаций, D — родительская доза). В дальнейшем, используя частоту спонтанных отцовских мутаций ($6/54=0.111$, см. таблицу 1) и коэффициент уравнения линейной регрессии, отражающий эффективность индукции мутаций после острого рентгеновского облучения ($0.338\pm0.087\text{ Гр}^{-1}$), мы определили значение удваивающей дозы для мутаций в мини-сателлитных локусах как $0.111/0.338=0.33\text{ Гр}$ (95% доверительный интервал 0,06–0,75 Гр). Эта величина близка к таковой, полученной при помощи теста Расселов (0,34 Гр, 95% доверительный интервал 0,06–0,5 Гр), учитывающего мутации в структурных генах мышей (Searle A.G., 1974). Однако статистически значимые свидетельства индукции мутаций в мини-сателлитных локусах были получены при анализе 252 потомков облученных и контрольных животных, тогда как использование иных систем учета мутаций у мышей предполагает изучение тысяч и даже сотен тысяч потомков (Searle A.G., 1974). Для сравнения: работы по изучению индукции мутации при помощи упомянутого теста Расселов, результаты которых в настоящее время рассматривают в качестве "золотого стандарта" для радиационной генетики мышей, потребовали изучения более миллиона потомков облученных и контрольных животных (Searle A.G., 1974).

Иными словами, результаты нашей работы еще раз показали уникальное преимущество мини-сателлитной ДНК для мониторинга — возможность адекватно регистрировать изменения частоты мутаций в пределах крайне малочисленных выборок (Dubrova Y.E. et al., 1993; 1996; 1997). Более того, во всех предыдущих работах, выполненных с использованием традиционных подходов к скринингу мутаций в структурных генах у мышей, исследовали индукцию мутаций при высоких дозах острого облучения (3–6 Гр) (Searle A.G., 1974).

В свою очередь, высокая частота спонтанных и индуцированных мутаций в мини-сателлитных локусах позволяет надежно определять закономерности индукции мутаций в интервале малых и средних доз (0,5–1 Гр), ранее не изучавшихся в радиационной генетике мышей.

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ В МИНИ-САТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСАХ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧАЭС

Исследованный контингент и учет мутаций

Образцы крови от 127 полных семей (отец—мать—ребенок) были собраны в сельских регионах Могилевской области Беларуси, существенно загрязненных радионуклидами в результате аварии на ЧАЭС (Dubrova Y.E. et al., 1996; 1997). Все включенные в анализ дети родились на протяжении января—сентября 1994 г. в семьях, постоянно проживавших в загрязненных регионах Могилевской области. В качестве контрольной выборки мы использовали образцы крови, полученные от 120 необлученных европеоидных семей, проживающих на территории Великобритании. Мутации в семьях учитывали при помощи полилокусных проб 33.15 и 33.6 (Jeffreys A.J. et al., 1985) и 6 неза-

B6.7, CEB1, CEB15, CEB25, CEB36 and MS32, characteristic with their relatively high spontaneous mutation rate (Jeffreys A.J. et al., 1988; Vergnaud G. et al, 1991; Olaisen B. et al., 1993, and J. Vanyet — unpublished data).

Mutation rate

Here the three independent estimates of mutation rate are presented received under minisatellite probes application, revealing DNA minisatellite fractions independent set (table 2). So, using multi-locus probe 33.15, a statistically significant two-fold increase in minisatellite mutation frequency was revealed within the Mogilev province families sample. A similar result was obtained by means of another multi-locus probe — 33.6. Apart from that, the average frequency of mutations revealed with 6 single-locus probes in the exposed families sample, also statistically significantly exceeded the respective index in the control group. As a result after combination of all minisatellite probes received data the integral rate of minisatellite mutations was estimated (table 2), that among Mogilev province sample highly with statistical significance exceeding respective data from the control group.

The increased mutation rate found in the Mogilev province sample can be stipulated both by genetic and environmental factors. The data obtained in present work enable rejection of the hypothesis that stated mutation rate increase is connected to the minisatellite loci with unusually high spontaneous mutation rates existente in the Belorussian population. The wide number of independent minisatellite probes application results conclusively proved the increased mutations rate inherent in minisatellites by an overwhelming majority and therefore, integral mutations rate growth cannot be stipulated by single extremely unstable locus contribution. Thus, the environmental mutagens impact on the Mo-

висимых монолокусных проб B6.7, CEB1, CEB15, CEB25, CEB36 и MS32, для которых характерна крайне высокая частота спонтанных мутаций (Jeffreys A.J. et al., 1988; Vergnaud G. et al., 1991; Olaisen B. et al., 1993 и Дж. Ванье — неопубликованные данные).

Частота мутаций

В настоящей работе приведены три независимые оценки частоты мутаций, полученные при использовании мини-сателлитных проб, выявляющих независимый набор мини-сателлитных фракций ДНК (таблица 2). Так, используя полилокусную пробу 33.15, в пределах выборки семей из Могилевской области было обнаружено статистически значимое двукратное увеличение частоты мини-сателлитных мутаций. Сходный результат был получен при помощи другой полилокусной пробы — 33.6. Кроме того, средняя частота мутаций, выявленных при помощи 6 монолокусных проб в облученной выборке семей, также статистически значимо превышала таковую в контрольной группе. В итоге, объединив данные по всем мини-сателлитным пробам, мы оценили общую частоту мини-сателлитных мутаций (см. таблицу 2), которая в выборке из Могилевской области высоко статистически значимо превышала таковую в контрольной группе.

Повышенная частота мини-сателлитных мутаций в выборке из Могилевской области может быть обусловлена как генетическими, так и средовыми факторами. Полученные в настоящей работе результаты позволяют отвергнуть гипотезу о том, что указанное увеличение частоты мутаций связано с наличием в пределах белорусской популяции нескольких мини-сателлитных локусов с необычайно высокой частотой спонтанных мутаций. Использование большого числа независимых мини-сателлитных проб убедительно показало, что повышенная частота мутаций присуща подавляющему большинству мини-сателлитов и, следовательно, увеличение общей частоты мутаций не может быть обусловлено вкладом единичного чрезвычайно нестабильного локуса. Таким образом, наиболее вероятной причиной этого является

TABLE 2
MUTATION RATES AMONG CONTROL AND EXPOSED PARENTS OFFSPRING (FROM Y.E.DUBROVA et al., 1997)

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ СРЕДИ ПОТОМКОВ КОНТРОЛЬНЫХ И ОБЛУЧЕННЫХ РОДИТЕЛЕЙ (ПО Y.E. DUBROVA et al., 1997)

Probe	Control group		Exposed group		Exposed to control ratio	P**
	No. of families	Mutation rate*	No. of families	Mutation rate*		
33.15	105	0.0100 (19)	127	0.0198 (44)	1.98	0.0073
33.6	105	0.0060 (15)	127	0.0104 (31)	1.73	0.0499
B6.7	109	0.0229 (5)	125	0.0440 (11)	1.92	0.1917
CEB1	109	0.0734 (16)	125	0.1120 (28)	1.53	0.0927
CEB15	109	0.0184 (4)	125	0.0280 (7)	1.53	0.3880
CEB25	109	0.0138 (3)	125	0.0480 (12)	3.49	0.0470
CEB36	109	0.0092 (2)	125	0.0160 (4)	1.74	0.5319
MS32	109	0.0138 (3)	125	0.0080 (2)	0.58	0.5790
Total (6 loci)	109	0.0252 (33)	125	0.0427 (64)	1.69	0.0067
Total***	94	0.0110 (56)	125	0.0206 (136)	1.87	2.53·10⁻⁵

Notes. * — Number of mutations is given in brackets. ** — Probability of difference from the control group (Fisher's exact test, two-sided; statistically significant values are in bold type). *** — Total independent mutation number registered by probes 33.15, 33.6, B6.7, CEB1, 15, 25, 36 and MS32.

Примечания. * — В скобках представлено число мутаций; ** — Вероятность различий по сравнению с контрольной группой (точный двусторонний критерий Фишера; статистически значимые величины выделены полужирным шрифтом). *** — Общее число независимых мутаций, выявленных при помощи проб 33.15, 33.6, B6.7, CEB1, 15, 25, 36 и MS32.

gilev province families sample is the most probable reason here.

Chronic radiation exposure doses and mutation rate

The Chernobyl accident led to an unprecedented release of a wide number of radioactive materials throughout the whole Northern Hemisphere particularly within the European part of the former Soviet Union (Ansbaugh L.R. et al., 1988; IAEA, 1991). Within first two months after the accident, ^{131}I with a half-life of 8 days was the main source of radiation danger (IAEA, 1991; Kenigsberg Ya.I., Minenko V.F., 1994). Following ^{131}I decay, the contaminated regions population was exposed to low-dose chronic internal and external irradiation from more long-living isotopes ^{137}Cs and ^{90}Sr (IAEA, 1991). Internal irradiation from radioactive ^{131}I has already led to a multi-fold increase in thyroid cancer incidence among Belarus and Ukraine population (Kazakov V.S. et al., 1992; Likhtarev I.A. et al., 1995). The chronic radiation exposure has also affected the somatic mutation frequency (chromosomal aberrations and gene mutations) among rural populations of some most contaminated regions (Botchkov N.P., 1993; Jensen R.H. et al., 1995).

Our previous study revealed the minisatellite loci mutation rate within families sample from Mogilev province correlation with the ^{137}Cs soil surface contamination density (Dubrova Y.E. et al., 1996). The revealed correlation provided important evidence for increased mutation rate in the Belorussian sample connected to ionising radiation impact. Nevertheless further research is required focused on chronic doses reconstruction within involved family groups. Therefore in the present study we applied the published estimation values of average yearly ^{137}Cs internal and external irradiation doses for the Belarus population (Drozdovich V.V. et al., 1989). Those are based upon named radionuclide numerous measurements of concentration in soil and milk of Mogilev province majority settlements. For every involved parent respective residence places after ChNPP accident were identified according to an individual questionnaire. The data received enabled us to estimate the personal absorbed dose of chronic irradiation from ^{137}Cs from the time of the accident up to the conception of the child. The family dose value was used in the present work as respective paternal and maternal doses average value.

The mean dose for all the studied families constituted $27.6 \pm 3.3 \text{ mSv}$. According to respective distribution median value (19.7 mSv) the involved families were divided in two groups: the less severely exposed (dose $< 20 \text{ mSv}$) and exposed to more high dose of chronic irradiation ($> 20 \text{ mSv}$). The minisatellite loci mutation rate (probes 33.15, 33.6, B6.7, CEB1, CEB15, CEB25, CEB36 and MS32) was esti-

воздействие на выборку семей из Могилевской области мутагенных факторов окружающей среды.

Дозы хронического облучения и частота мутаций

Авария на ЧАЭС привела к беспрецедентному выбросу большого числа радиоактивных элементов во всем Северном полушарии, в особенности на территории Европейской части бывшего СССР (Ansbaugh L.R. et al., 1988; IAEA, 1991). На протяжении первых двух месяцев после аварии основным источником радиационной опасности был ^{131}I с периодом полураспада 8 дней (IAEA, 1991; Кенигсберг Я.И., Миненко В.Ф., 1994). После распада радиоактивного йода население загрязненных регионов подверглось низкодозовому хроническому внутреннему и внешнему облучению, сформировавшемуся за счет более долгоживущих изотопов ^{137}Cs и ^{90}Sr (IAEA, 1991). Внутреннее облучение от радиоактивного ^{131}I уже привело к многократному возрастанию заболеваемости населения Беларуси и Украины раком щитовидной железы (Kazakov V.S. et al., 1992; Likhtarev I.A. et al., 1995). Хроническое радиационное воздействие также сказалось на частоте соматических мутаций (хромосомные aberrации и генные мутации) среди сельского населения ряда наиболее загрязненных регионов (Бочков Н.П., 1993; Jensen R.H. et al., 1995).

В нашем предыдущем исследовании в пределах выборки семей из Могилевской области была выявлена корреляция между частотой мутаций в мини-сателлитных локусах и уровнем загрязнения почвы ^{137}Cs (Dubrova Y.E. et al., 1996). Обнаруженная зависимость послужила важным свидетельством тому, что повышенная частота мутаций в белорусской выборке связана с действием ионизирующих излучений. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, направленные на реконструкцию доз хронического облучения в пределах рассмотренной группы семей. Поэтому в настоящей работе мы использовали опубликованные оценки средних годовичных доз внутреннего и внешнего облучения населения Беларуси ^{137}Cs (Дроздович В.В. и соавт., 1989). Они основаны на многочисленных измерениях концентрации этого радионуклида в почве и молоке в большинстве населенных пунктов Могилевской области. На основании индивидуального опроса для каждого родителя в обследованной выборке были установлены места проживания после аварии на ЧАЭС. Эти данные позволили оценить индивидуальную накопленную дозу хронического облучения по ^{137}Cs с момента аварии до зачатия ребенка. В работе мы использовали величину семейной дозы, определенную как среднее значение соответствующих доз для отца и матери.

Средняя доза для всех исследованных семей составила $27,6 \pm 3,3 \text{ мЗв}$. По значению медианы соответствующего распределения ($19,7 \text{ мЗв}$) обследованные семьи были распределены на две группы: менее облученные (доза $< 20 \text{ мЗв}$) и получившие большую дозу хронического облучения ($> 20 \text{ мЗв}$). В обеих группах была определена частота мутаций в мини-сателлитных локусах (пробы 33.15, 33.6, B6.7, CEB1, CEB15, CEB25, CEB36 и

mated in both groups. The mutation rate in families exposed to higher chronic irradiation doses occur 1.35 times over than that among those less exposed, and both values statistically significantly exceeded the respective figures for the control group ($p=3.03 \cdot 10^{-6}$ and 0.003, respectively according to exact unilateral Fisher criterion; figure 2). The revealed correlation indicates that minisatellite loci increased mutation rate, registered within families sample from Mogilev province most probably is connected to ionising radiation impact.

It should be noted that these data reflect one of the components among human radiation impact on population of regions affected after the ChNPP accident. The published estimates of individual radiation doses for the Belarus population are strongly correlated with the soil surface contamination value by ^{137}Cs and to a lesser extent — with that of radionuclide concentration in milk (Dubrova Y.E. et al., 1997). Therefore, in most cases the chronic exposure doses for populations can be relatively precisely reconstructed according to the level of soil surface ^{137}Cs contamination — the approach applied in our previous publication (Dubrova Y.E. et al., 1996). The strong positive correlation is present between the ^{137}Cs , ^{131}I and ^{90}Sr concentrations, i.e. radionuclides with main contribution in population radiation exposure (Pitkevich V.A. et al., 1996; Dubrova Y.E. et al., 1997).

Thus, the present study data provide the first experimental evidence of human germline mutation rate increase under ionising radiation impact. Also

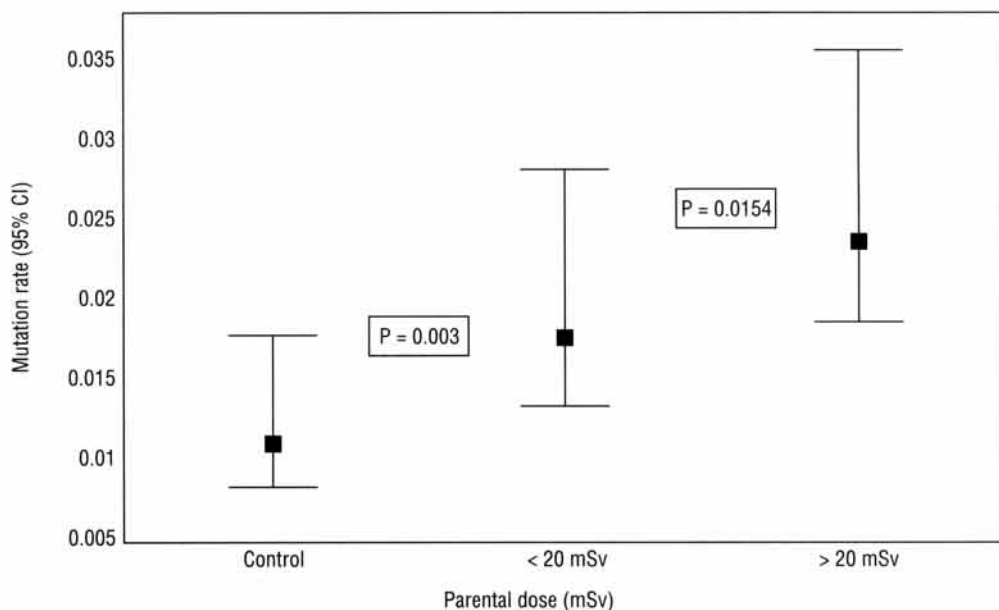
MS32). При этом частота мутаций в семьях, получивших большую дозу хронического облучения, оказалась в 1,35 раза выше таковой у менее облученных, и обе величины статистически значимо превышали аналогичное значение в контрольной группе ($p=3,03 \cdot 10^{-6}$ и 0,003 соответственно по точному одностороннему критерию Фишера; рисунок 2). Выявленная корреляция показывает, что повышенная частота мутаций в мини-сателлитных локусах, установленная в пределах выборки семей из Могилевской области, наиболее вероятно связана с действием ионизирующих излучений.

Необходимо отметить, что эти данные отражают один из многочисленных компонентов радиационного воздействия на население регионов, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС. Опубликованные оценки доз для населения Беларуси сильно коррелируют с уровнем загрязнения почвы ^{137}Cs и, в меньшей степени — с концентрацией этого радионуклида в молоке (Dubrova Y.E. et al., 1997). Следовательно, в большинстве случаев дозы хронического облучения для населения могут быть относительно точно реконструированы на основании данных об уровне загрязнения местности ^{137}Cs — подход, использованный в нашей предыдущей публикации (Dubrova Y.E. et al., 1996). Кроме того, существует сильная положительная корреляция между концентрациями ^{137}Cs , ^{131}I и ^{90}Sr — радионуклидов, внесших основной вклад в радиационную нагрузку для населения (Pitkevich V.A. et al., 1996; Dubrova Y.E. et al., 1997).

Таким образом, данные настоящего исследования являются первыми экспериментальными свидетельствами тому, что ионизирующие излучения приводит к увели-

FIGURE 2. PARENTAL CHRONIC IRRADIATION DOSES FROM ^{137}Cs AND MINISATELLITE MUTATION RATE IN HUMANS. THE PROBABILITIES OF DIFFERENCES BETWEEN NEXT GROUPS (FISHER'S EXACT TEST, ONE-TAILED) AND THE 95% CONFIDENCE INTERVALS VALUES FOR MUTATION RATES, ARE SHOWN

РИСУНОК 2. ДОЗЫ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ РОДИТЕЛЕЙ ^{137}Cs И ЧАСТОТА МУТАЦИЙ В МИНИ-САТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСАХ ЧЕЛОВЕКА. НА ГРАФИКЕ ПРИВЕДЕНЫ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ СОСЕДНИМИ ГРУППАМИ (ОДНОСТОРОННИЙ ТОЧНЫЙ КРИТЕРИЙ ФИШЕРА) И ЗНАЧЕНИЯ 95% ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ДЛЯ ЧАСТОТ МУТАЦИЙ



worth our attention is the fact that wide-scale research carried out among Hiroshima and Nagasaki atomic bombing survivors has not provided evidence for any statistically significant differences in mutation rate between exposed and control families (Neel J.V. et al., 1990). Our data were obtained under a new monitoring approach based upon hypervariable minisatellite loci use with an extraordinarily high spontaneous mutation rate. Since the minisatellite DNA mutations frequency is a thousand times higher than that among protein-coding genes, the study of low family number enables wide mutations amount detection and respectively relatively easy analysis of the mutation rate of occurring changes. Nevertheless it's worth noting, that contrary to our data the minisatellite loci use failed to show evidence for differences present in mutation events frequency among offspring of parents irradiated after atomic bombing in Hiroshima and Nagasaki (Kodiara M. et al., 1995). This can be related to several factors. Firstly, the radiation impact character in atomic bombing and the Chernobyl disaster is fundamentally different. If the explosions in Hiroshima and Nagasaki led to short-time acute radiation exposure of both cities' residents, the populations of regions contaminated after the Chernobyl accident were exposed to chronic irradiation for many years. Secondly, the majority of Japanese children examined for minisatellite loci totality were born 10 years or more after the atomic bombings (Kodiara M. et al., 1995). The DNA structure radiation-induced alterations could have been eliminated by reparation systems over that period of time. On the other hand, population resident within contaminated territories after the Chernobyl accident are still permanently exposed to both external and internal irradiation from various radionuclides.

CONCLUSION

The mutation induction regularities study in minisatellite loci held within the present work revealed the number of important aspects connected with the stated system of possible application for genetic monitoring. The ability of minisatellites to increase the mutations frequency in response to genome damages induced by ionising radiation within spermatogenesis premeiotic stages, enables stated loci use for radiation remote genetic consequences in human populations similar to those after the Chernobyl accident. Furthermore, we displayed that acute radiation results in a linear increase of minisatellite loci mutation rate, reliably detectable within low and medium doses range, that was earlier unavailable for analysis under traditional mutation screening methods. The minisatellite loci sensitivity to radiation impact (doubling dose) is comparable to that for majority monitoring

чению частоты мутаций в половых клетках человека. Следует отметить, что широкомасштабные исследования, проведенные среди потомков родителей, облученных в результате взрывов атомных бомб в Хиросиме и Нагасаки, не позволили выявить значимые различия между облученными и контрольными семьями (Neel J.V. et al., 1990). Наши данные были получены при помощи нового подхода к мониторингу, основанного на использовании гипервариабельных мини-сателлитных локусов с необычайно высокой частотой спонтанных мутаций. Поскольку частота мутаций в мини-сателлитной ДНК в тысячи раз превышает таковую для структурных генов, то изучение незначительного числа семей позволяет выявлять большое число мутаций и, соответственно, относительно просто проанализировать произошедшие изменения в мутационном темпе. Тем не менее следует отметить, что в противоположность нашим данным использование мини-сателлитных локусов не позволило обнаружить различия в частоте встречаемости мутаций среди потомков родителей, облученных в результате взрывов атомных бомб в Хиросиме и Нагасаки (Kodiara M. et al., 1995). Это может быть связано с несколькими факторами. Во-первых, характер радиационного воздействия на население при бомбардировках и после Чернобыльской катастрофы принципиально различен. Если взрывы бомб в Хиросиме и Нагасаки привели к одномоментному острому облучению жителей обоих городов, то после аварии на ЧАЭС население загрязненных регионов подверглось многолетнему хроническому облучению. Во-вторых, большинство японских детей, исследованных по совокупности мини-сателлитных локусов, родились через 10 лет и более после взрывов (Kodiara M. et al., 1995). За это время радиационно индуцированные повреждения в структуре ДНК могли быть ликвидированы системами репарации. С другой стороны, население, проживающее после аварии на ЧАЭС на загрязненных территориях, до сих пор постоянно подвергается внешнему и внутреннему облучению от различных радионуклидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение закономерностей индукции мутаций в мини-сателлитных локусах выявило ряд важных аспектов, связанных с возможным применением данной системы для генетического мониторинга. Так, способность минисателлитов увеличивать частоту мутаций в ответ на повреждения в геноме, индуцированные ионизирующими излучениями на премейотических стадиях сперматогенеза, позволяет использовать данные локусы для изучения отдаленных генетических последствий облучения на популяциях человека, сходных с таковыми после аварии на ЧАЭС. Более того, нами было показано, что острое облучение приводит к линейному возрастанию частоты мутаций в мини-сателлитных локусах, которое надежно выявляется в диапазоне малых и средних доз, ранее недоступных для анализа при использовании традиционных методов скрининга мутаций. При этом чувствительность мини-сателлитных локусов к радиационному воздействию (удваивающая доза) сопоставима с таковой для большинства систем мониторин-

systems based on protein-coding genes mutation registration. Therefore the radiation-stipulated minisatellite loci mutation rate increase should proportionately reflect the genome total damages number, connected to environmental mutagens impact, including ionising radiation. The minisatellite loci mutations frequency respective shifts are reliably registered within extremely scanty samples of irradiated parents offspring. That allows consideration of the highly-variable minisatellite loci system as the most perspective experimental approach to genetic monitoring in human populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was supported by grants from the Wellcome Trust, the Medical Research Council, the Royal Society, the Leukaemia Research Fund and the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

Бочков Н.П. Критический обзор цитогенетических исследований после Чернобыльской аварии. Вестник РАМН, 1993, 6: 51–56.

[Bochkov N.P. Critical review of cytogenetic studies after Chernobyl accident. Vestnik Russian Academy of Medical Sciences, 1993, 6: 51–56]

Дроздович В.В., Миненко В.Ф., Улановский А.Ф., Шемякина Е.В. Прогноз доз облучения населения БССР от радиоизотопов цезия. Минск: МЗ БССР, 1989.

[Drozdovich V.V., Minenko V.F., Ulanovsky A.F., Shemyakina Ye.V. Prognosis of Belorussian Republic population irradiation doses from caesium radioisotopes. Minsk: Belorussian Republic Ministry of Public Health, 1989]

Дуброва Ю.Е. Принципы и подходы к определению темпа возникновения генных мутаций в популяциях человека. Генетика, 1992, 28 (3): 182–193.

[Dubrova Y.E. Principles and approaches to gene mutations rise rate definition in human populations. Genetics, 1992, 28 (3): 182–193]

Кенигсберг Я.И., Миненко В.Ф. Дозы облучения населения и гигиенические обоснования мероприятий по радиационной защите. В кн.: В.А. Стежко, И.Г. Жаков, А.Н. Стожаров, А.К. Устинович (ред.) Чернобыльская катастрофа: медицинские аспекты, Минск: МЗ Республики Беларусь, 1994, с. 18–30.

[Kenigsberg Ya.I., Minenko V.F. Population irradiation doses and radiation protection arrangements hygienic substantiation. In: V.A. Stejko, I.G. Jakov, A.N. Stojarov, A.K. Ustinovich (ed.) Chernobyl disaster: health aspects, Minsk: Belarus Republic Ministry of Public Health, 1994, с. 18–30.]

Ansbaugh L.R., Catlin R.J., Goldman M. The global impact of the Chernobyl reactor accident. Science, 1988, 242: 1513–1519.

Bois P., Williamson J., Brown J., Dubrova Y.E., Jeffreys A.J. A novel unstable mouse VNTR family expanded from SINE B1 elements. Genomics, 1998, 49: 122–128.

га, основанных на учете мутаций в структурных генах. Поэтому радиационно-обусловленное увеличение частоты мутаций в мини-сателлитных локусах должно адекватно отражать общее число повреждений в геноме, связанных с действием мутагенов среды, включая ионизирующие излучения. При этом соответствующие изменения частоты мутаций в минисателлитных локусах надежно выявляются при изучении крайне малочисленных выборок потомков облученных родителей, что позволяет рассматривать систему высоковариабельных мини-сателлитных локусов в качестве наиболее перспективного экспериментального подхода к генетическому мониторингу в популяциях человека.

ВЫРАЖЕНИЕ БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работы выполнена при финансовой поддержке научных фондов Wellcome Trust, Leukaemia Research Fund, Медицинского научно-исследовательского совета и Королевского научного общества.

Dubrova Y.E., Jeffreys A.J., Malasbenko A.M. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. Nature Genetics, 1993, 5: 92–94.

Dubrova Y.E., Nesterov V.N., Krouchinsky N.G., Ostapenko V.A., Neumann R., Neil D.L., Jeffreys A.J. Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. Nature, 1996, 380: 683–686.

Dubrova Y.E., Nesterov V.N., Krouchinsky N.G., Ostapenko V.A., Vergnaud G., Giraudeau F., Buard J., Jeffreys A.J. Further evidence for elevated human minisatellite mutation rate in Belarus eight years after the Chernobyl accident. Mutation Research, 1997, 381: 267–278.

Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J., Fennelly J., Bois P., Goodhead D., Jeffreys A.J. Stage specificity, dose-response and doubling dose for mouse minisatellite germline mutation induced by acute radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 6251–6255.

Ehling U.H., Favor J. Recessive and dominant mutations in mice. In: E.H.Y. Chu, W.M. Generoso (eds.) Mutation, Cancer, and Malformation. New York: Plenum Press, 1984, pp. 389–428.

Fan Y.F., Wang Z.W., Sadamoto S., Ninomiya Y., Kotomura N., Kamiya K., Dobi K., Kominami R., Niwa O. Dose-response of a radiation induction of a germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus. Int. J. Radiat. Biol., 1995, 68: 177–183.

Gibbs M., Collick A., Kelly R., Jeffreys A.J. A tetranucleotide repeat mouse minisatellite displaying substantial somatic instability during early preimplantation development. Genomics, 1993, 17: 121–128.

IAEA. The International Chernobyl Project. Technical Report (International Atomic Energy, Vienna, 1991).

Jeffreys A.J., Neumann R. Somatic mutation processes at a human minisatellite. Hum. Mol. Genet., 1997, 6: 129–136.

Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V., Wong Z. Spontaneous mutation rate to new length alleles at tandem-repeat hypervariable loci in human DNA. Nature, 1988, 332: 278–281.

Jeffreys A.J., Tamaki K., MacLeod A., Neil D.L., Monckton D.G. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. Nature, 1991, 354: 204–209.

Jeffreys A.J., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D.G., Neil D.L., Armour J.A.L. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, 1994, 6: 136–145.

Jeffreys A.J., Turner M., Debenham P. The efficiency of multi-locus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, 48: 824–840.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA. *Nature*, 1985, 316: 67–73.

Jensen R.H., Langlois R.G., Bigbee W.L., Grant S.G., Moore D., Pilinskaya M., Vorobtsova I., Plesbanov P. Elevated frequency of glycophorin A mutations in erythrocytes from the Chernobyl accident victims. *Radiat. Res.*, 1995, 141: 129–135.

Kazakov V.S., Demidchik E.P., Astakhova L.N. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*, 1992, 359: 21.

Kelly R., Bulfield G., Collick A., Gibbs M., Jeffreys A.J. Characterization of a highly unstable mouse minisatellite locus: Evidence for somatic mutation during early development. *Genomics*, 1989, 5: 844–856.

Kodaira M., Satoh C., Hiyama K., Toyama K. Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem-repetitive elements in human germ cells. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 57: 1275–1283.

Likhtarev I.A., Sobolev B.G., Kairo I.A., Tronko N.D., Bogdanova T.I., Oleinic V.A., Epshtein E.V., Beral V. Thyroid cancer in the Ukraine. *Nature*, 1995, 375: 365.

Neel J.V., Schull W.J., Awa A.A., Satoh C., Kato H., Otake M., Yoshimoto Y. The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, 46: 1053–1072.

Olaisen B., Bekkemoen M., Hoff-Olsen P., Gill P. Human VNTR and sex. In: S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen, A.J. Jeffreys (eds.) *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Basel: Birkhauser, 1993, pp. 63–69.

Pitkevich V.A., Duba V.V., Ivanov V.K., Chekin C.Y., Tsyb A.F., Vakulovskii C.M., Shersbakov V.M., Makhon'ko K.P., Golubenkov A.V., Borodin R.V., Kosykh V.S. Reconstruction of the composition of the Chernobyl radioactive fallout and external radiation absorbed doses to the population in areas of Russia. *Radiat. Protec. Dosim.* 1996, 64: 69–92.

Sadamoto S., Suzuki S., Kamiya K., Kominami R., Dobi K., Niva O. Radiation induction of germline mutation at hypervariable mouse minisatellite locus. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994, 65: 549–557.

Searle A.G. Mutation induction in mice. In: J.T. Lett, H. Adler, M. Zelle (eds.) *Advances in Radiation Biology*, Vol. 4. New York: Academic Press, 1974, pp. 131–207.

Vergnaud G., Mariat D., Apiou F., Aurias A., Lathrop M., Lauthier V. The use of synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a human hypermutable sequence. *Genomics*, 1991, 11: 135–144.