

Ж. А. КЦОЯН, М. Г. ПЕРИХАНЯН

РЕПАРАЦИЯ ДНК КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Статья посвящена проблеме репарации ДНК клеток млекопитающих. Рассматриваются ферментативные системы, принимающие участие в этом процессе, их выявление в клетках различных типов, а также роль репарационных ферментов в поддержании нормальной жизнедеятельности клеток млекопитающих.

Существование репарационной системы, способной восстанавливать ДНК клеток млекопитающих, подвергнутых воздействию различных физико-химических агентов, в настоящее время считается установленным фактом.

Большая часть работ по расшифровке механизмов репарации проведена на бактериальных системах. Репарация ДНК клеток млекопитающих изучена мало, однако имеющиеся данные указывают на аналогичность механизмов репараций в клетках прокариотических и эукариотических организмов, а именно, механизмов репарации по способу «выщепление—замещение» и пострепликативной репарации [9, 55, 73]. Как известно, основным фотопродуктом ультрафиолетового (УФ) облучения являются димеры пиримидиновых оснований, выщепление которых в клетках млекопитающих долгое время не удавалось доказать. Однако в последнее время показано частичное удаление димеров в клетках человека (HeLa, WI-38, RA, RAX-10, клетки амниона и фибробласты кожи здоровых людей); значительно более высокий процент выщепления (75—80%) наблюдался в фибробластах крупного рогатого скота. [25, 26, 61, 62, 72]. Обнаружение выщепления димеров в клетках грызунов стало возможным лишь благодаря новому высокочувствительному методу фотолиза светом в 313 нм ДНК, обработанной бромдезоксиуридином [65]. Был описан простой и чувствительный метод быстрого определения количества повреждений ДНК, вызванных УФ-облучением клеток человека в культуре [81]. Метод основан на способности некоторых эндонуклеаз *Micrococcus luteus* специфически реагировать с поврежденными участками ДНК с образованием односторонних разрывов, которые определяются путем седиментационного анализа в щелочи.

Известно два метода обнаружения репаративного синтеза ДНК клеток млекопитающих: автордиографический, регистрирующий внеплановый синтез, происходящий независимо от синтетической стадии клеточного цикла, и метод равновесного центрифугирования в хлористом цезии, позволяющий выявлять репаративную репликацию. Внеплановый синтез и репаративную репликацию ДНК наблюдали в клетках человека и в клетках китайского хомячка линии DON. Обнаруженный внеплановый синтез в клетках грызунов линии L, B-14, DFAP протекал менее интенсивно [9, 56]. Было показано возобновление полуконсерва-

тивного репликативного синтеза ДНК на репарированной матрице после действия малых доз УФ [57, 60].

Наблюдение репарации повреждений ДНК, индуцированных редко-ионизирующим излучением, стало возможным лишь после введения метода Мак Граса и Енльямса [48], позволяющего обнаруживать однонитевые и двойные разрывы ДНК, вызванные рентгеновскими лучами, не прибегая к выделению ДНК из клетки. Ликвидация этих разрывов, сопровождающаяся репаративной репликацией и восстановлением молекулярного веса ДНК, выдает нам информацию о репарации ДНК в облученных клетках млекопитающих. Впервые воссоединение однонитевых разрывов ДНК клеток млекопитающих (L—5178У) было продемонстрировано Летт с соавторами при помощи техники Мак Граса и Вильямса [42]. В последующих работах объектами наблюдения данного эффекта послужили клетки китайского хомячка, клетки L, лимфомы Р₃₈₈F, асцитного рака Эрлиха, клетки HeLa, T—клетки почки человека, фибробласты кожи и лимфоциты периферической крови человека [9].

Новый этап в исследовании механизмов возникновения и репарации однонитевых разрывов связан с разработкой более тонкого метода их обнаружения—метода фотолиза светом в 313 нм ДНК, в поврежденные участки которой включен бромдезоксисуридин [64].

Ранее на объекте *E. coli* K-12 были охарактеризованы три типа репарации одиночных разрывов ДНК, индуцируемых рентгеновскими лучами: ультрабыстрая репарация, восстанавливающая преимущественно разрывы, образованные в аноксических условиях; несколько замедленный полимеразно-зависящий процесс, который может идти в буфере; и третий тип—медленный и зависящий от среды культивирования [67].

Изучение репарации ДНК клеток яичников китайского хомячка после облучения рентгеновскими лучами в оксических и аноксических условиях при культивировании в различных средах дало основание предположить, что и в клетках млекопитающих осуществляются репарационные процессы, аналогичные таковым в бактериях. Так, например, было предположено, что при облучении в N₂ имеет место ультрабыстрая репарация одиночных разрывов. При инкубации клеток в среде роста количество нерепарируемых одиночных разрывов оказалось меньше, чем при инкубации в фосфатно-солевом буфере, что указывает на существование зависимых от среды репарационных процессов [67]. Однако этот вопрос остается спорным и требует дальнейших исследований.

Внеплановый синтез ДНК обнаружен в клетках HeLa, облученных рентгеновскими лучами в дозе 5 кр. [59]. Первые данные свидетельствовали о наличии репаративной репликации ДНК в клетках HeLa лишь в случае больших доз облучения, но дальнейшее усовершенствование методики позволило наблюдать репаративную репликацию и после облучения сравнительно малыми дозами [9, 15, 55, 77, 78].

Согласно данным по кинетике воссоединения одноцепочечных разрывов и внепланового синтеза ДНК в лимфоцитах человека при действии

редкоионизирующей радиации можно предположить, что воссоединение и внеплановый синтез причастны к одному и тому же процессу репарации ДНК. Как показывают расчеты в среднем на одно повреждение приходится 1—2 нуклеотида, включающихся в ДНК в ходе внепланового синтеза, а скорость ликвидации повреждений в ходе репарации одноцепочечных разрывов сравнима со скоростью внепланового синтеза ДНК [1, 29, 77, 78].

Природа восстановления в случае двойных разрывов ДНК в клетках пока не выяснена, однако имеются данные, свидетельствующие об обратимости двойных разрывов ДНК в клетках млекопитающих [27, 28, 71]. Показано устранение разрывов ДНК в γ -облученных клетках HeLa Ж-63 [1].

Димеры пиримидиновых оснований не всегда удаляются в ходе репарации. Вместе с тем они не препятствуют дальнейшему синтезу ДНК, который приводит к образованию новой цепи на поврежденной матрице в виде небольших фрагментов с пробелами против димеров. Репликация во время последующей инкубации приводит к восстановлению молекулярного веса ДНК [68]. Предложены две гипотезы механизма пострепликативной репарации: а. пострепликативное восстановление происходит путем рекомбинационного обмена между двумя сестринскими дуплексами [67]; б. заполнение пробелов, образующихся против димеров, происходит путем синтеза ДНК *de novo* [43].

Пострепликативная репарация ДНК наблюдалась в клетках китайского хомячка [24, 49], в фибробластах мышей линии L [20, 31, 39] в клетках лимфомы мышей [41] и в фибробластах кожи человека [31]. Механизм ее не выяснен, хотя методом фотолиза светом в 313 нм ДНК с бромдезоксиуридином удалось выявить синтез *de novo* образующихся пробелов. Предположено, что он осуществляется путем медленной полимеризации «в обход» димера [38].

Ферменты репарации клеток млекопитающих. Ферментативный характер процессов репарации не вызывает сомнения. Репарация по способу «выщепление—замещение», как известно, требует присутствия таких ферментов, как эндо- и экзонуклеаз, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы.

Эта репарация включает в себя следующие этапы: «узнавание» повреждения эндонуклеазой и надрез нити ДНК вблизи повреждения со стороны 5' конца; удаление экзонуклеазой участка, содержащего димер, с последующей деградацией нуклеиновой кислоты, далее репаративный ресинтез удаленного участка цепи ДНК ДНК-полимеразой, и, наконец, воссоединение ДНК-лигазой вновь синтезированного фрагмента с основной нитью ДНК.

Ферменты, вовлекающиеся в эксцизионную репарацию животных клеток, которые, как предполагается, инициируют репликацию ДНК, полностью не идентифицированы. Различные нуклеазы были найдены в ядрах эукариотических клеток. Было показано, что ДНК-эндонуклеаза ассоциирована с ядрами из печени крыс, мышей; между тем в костном мозгу кролика были найдены две ДНК-специфические экзонуклеазы,

локализованные преимущественно в ядрах [15, 18, 33, 45, 46, 54]. Недавние работы выявили в экстрактах очищенных HeLa ядер множественную нуклеазную активность, которая может быть разделена методом хроматографии на четыре различных фермента, каждый из которого может увеличивать активность матрицы-затравки нативной ДНК к действию ДНК-полимеразы. Эти нуклеазы различаются своей сопротивляемостью к термической инактивации и относительной активностью в отношении различных субстратов. Активность двух нуклеаз (А и В) изменяется не сильно, когда субстрат—ДНК денатурируется или облучается УФ-светом. Активность же двух других (С и Д) заметно увеличивается по отношению к денатурированной ДНК; с другой стороны нуклеаза D характеризуется низкой способностью атаковать УФ-облученную ДНК [21].

Имеются также данные о присутствии в клеточных экстрактах тимуса теленка, по крайней мере, четырех различных ДНК-полимеразных активностей, которые имеют довольно отличные от трех бактериальных ДНК-полимераз свойства [47, 75]. Два из этих ферментов тимуса являются иммунологически родственными, но выявляют различное субклеточное распределение и реакцию индукции клеточной пролиферации [19].

В репарацию повреждений ДНК, индуцируемых ионизирующими излучениями, вовлекаются те или иные ферменты в зависимости от характера разрывов. Так, например, репарация одиночных разрывов, приводящих к образованию 3'ОН—5'РО₄ концов, является одноэтапным процессом, протекающим лишь с участием полинуклеотидлигазы. Это основной тип разрывов, индуцированных малыми дозами ионизирующего излучения [5, 35]. Репарация разрывов других типов протекает более сложным путем и требует присутствия дополнительных репарационных ферментов [3]. Изучению ДНК-лигазы, являющейся одним из важных репарационных ферментов, а именно ДНК-связывающим ферментом, уделяется большое внимание [5, 6, 12, 35, 79]. Имеется очень много данных, полученных при изучении как клеток высших организмов, так и клеток человека, свидетельствующих о том, что образующиеся в процессе синтеза низкомолекулярные фрагменты ДНК объединяются в высокомолекулярные с помощью ДНК-лигазы [34, 51, 52]. Идентифицированы и очищены ДНК-лигазы из клеток животных [6, 7, 40, 44, 74, 88], клеток человека [58, 76]. Несмотря на то, что все известные ДНК-лигазы специфичны для одного и того же субстрата—нативной ДНК с 5'РО₄ и 3'ОН разрывами, они требуют различных кофакторов. Лигаза из клеток млекопитающих строго специфична к АТФ [4, 14, 36, 44, 50, 65]. Большая часть ДНК-лигазы сосредоточена в ядре (около 60%) [44]; часть фермента присутствует в хроматине [6, 7, 32].

В последнее время из культуры гетероплоидных клеток человека (линия EUE) была выделена и очищена ДНК-лигаза со специфическими свойствами. Проведенные анализы показали, что у этого фермента,

имеющего в свежем грубом экстракте клеток оптимум рН 8,1, при дальнейшей очистке появляются два оптимума—рН 8,1 и рН 7,5. Установлено, что данная ДНК-лигаза в клетках находится в виде димера, который в процессе очистки диссоциирует на два мономера. Молекулярный вес димера 190 000, а мономера—95 000 [58]. Специфичность данного фермента проявляется еще в том, что для выявления оптимальной активности он требует, в отличие от АТФ-зависимых лигаз из клеток высших организмов, кроме АТФ, Mg^{2+} и тиоловых добавок, присутствия специфического активатора в виде эндогенного фактора белковой природы [4].

Две ДНК-лигазные активности были выявлены также и в клеточных экстрактах тимуса телят [75]. Их молекулярные веса, оцененные по коэффициентам седиментации и радиуса Стокса, оказались равными $M=175\ 000$ и $M=85\ 000$. Обеим активностям в качестве кофакторов требуется Mg^{+2} и АТФ.

Большая из двух активностей оказалась более теплоустойчивой, а также активной в более широкой области рН.

Идентичность вновь обнаруженной лигазной активности II с ДНК лигазой была подтверждена этими же авторами наблюдением превращения молекул циркулярной ДНК, содержащей одиночные разрывы в ковалентно замкнутые круговые ДНК с помощью данного фермента. Было предложено три возможных объяснения полученных данных по клеточным экстрактам тимуса телят:

а) в тимусе телят присутствуют две различные ДНК-лигазы; в) лигаза II является активной субъединицей лигазы I; с) меньшая лигаза II является активным фрагментом лигазы I, продуцируемым при протеолитическом расщеплении [16, 75]. Эти же авторы считают, что с точки зрения большого различия в тепловой стабильности между двумя активностями, кажется невероятным, чтоб меньшая, но более теплолабильная лигаза II являлась мономером или же другим типом субъединицы лигазы I. Однако хотя в своих экспериментах они не наблюдали взаимопревращения между двумя формами, ими не исключалась возможность превращения лигазы I в активный фрагмент лигазы II—при протеолитической деградаци. Дальнейшие работы по изучению свойств этих активностей послужат выяснению предложенных точек зрения.

Роль репарации ДНК в нормальной жизнедеятельности клетки. В последнее время получено много данных, указывающих на существенную роль репарационных систем в нормальной жизнедеятельности клетки и в поддержании стабильности генетического материала (термин И. А. Захарова).

Обнаружение Парибоком и Семеновой [11] спонтанно протекающего внепланового синтеза ДНК в клетках HeLa свидетельствовало о том, что функция репарационной системы не ограничивается устранением индуцированных повреждений. Вероятно, любое нарушение репарационной системы должно отражаться на нормальной жизнедеятель-

ности клетки. Примером тому может служить наследственная болезнь — пигментная ксеродерма (ПК), проявляющаяся в двух формах и приводящая к кожному раку. Клетки кожи больных ПК формы I обладают низкой способностью восстанавливать повреждения ДНК, индуцированные УФ облучением и солнечным светом [20]. Предполагается отсутствие или пониженная способность клеток вырабатывать УФ-эндонуклеазу, инициирующую репаративный синтез [23, 63, 72]. Имеются данные также о значительно более низкой активности полинуклеотидлигазы в фибробластах больных ПК одновременно с неизменной ДНК-полимеразной активностью в сравнении со здоровыми клетками [53].

При форме II заболевания ПК обнаружена повышенная чувствительность хромосом к ионизирующему излучению и отсутствие репарации однонитевых разрывов ДНК, вызванных γ -облучением [10]. Было предположено, что в данном случае имеется дефект по ДНК-полимеразе I, осуществляющей репаративный синтез ДНК и необходимой для воссоединения однонитевых разрывов ДНК в клетке [2, 8].

Весьма интересные данные по изучению репаративных процессов при ПК получены Клейджером с сотрудниками. Ими показано, что различные случаи ПК по кинетике репаративного синтеза в культуре фибробластов кожи можно разделить на 4 типа: 1. ПК с низкой остаточной способностью к репарации; 2. ПК с промежуточной, зависящей от дозы УФ-света способностью к репарационному синтезу; 3. ПК с незначительно измененной способностью к репарации; 4. ПК с синдромом De Sanctis-Cacchione, дефектная по репаративному синтезу [37].

Полученные данные подтверждают связь между нарушением репарации ДНК в норме и процессами малигнизации клеток [9].

Представляет интерес также и изучение репаративных процессов в связи со старением клеток животных *in vitro*. Было предположено, что моделью старения всех животных клеток может служить явление ограниченности *in vitro* продолжительности жизни (± 50 поколений), закономерно наблюдаемое в диплоидных клетках человека в культуре. Относительно явлений, ведущих к старению клетки *in vitro*, были выдвинуты различные гипотезы, включающие аккумуляцию генетических повреждений в геноме клеток, либо насыщение, либо выключение механизмов репарации, ответственных за исправление повреждений ДНК [30].

Изложенные сведения указывают на необходимость дальнейших исследований репаративных систем, участвующих в жизненно важных процессах.

ժ. Ա. ԿՄՈՅԱՆ, Մ. Գ. ՓԵՐԻԽԱՆՅԱՆ

ԿԱԹՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՌԵՊԱՐԱՑԻԱՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հոդվածը նվիրված է կաթնասունների բջիջների 'ԻնՏ'-ի ռեպարացիայի պրոբլեմին:

Նշված է այդ պրոցեսին մասնակցող ֆերմենտատիվ սիստեմների դերը, նրանց հայտնաբերումը տարբեր տեսակի բջիջներում, ինչպես նաև ռեպարացիոն ֆերմենտների դերը կաթնասունների բջիջների նորմալ կենսագործունեության պահպանման գործում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айказян Э. В. Автореф. канд. дисс., Л., 1973.
2. Айказян Э. В. и др. Цитология, 15, 7, 804—808, 1973.
3. Газиев А. И. Мат-лы симпоз. Механизмы радиац. поражения и восстановления ДНП. Репрнт. Пущино, 1972.
4. Газиев А. И. Успехи современной биологии. 78, вып. 2 (5), 1973.
5. Газиев А. И. и др. ДАН СССР. 195, 479, 1970.
6. Газиев А. И. и др. ДАН СССР. 199, 467, 1971.
7. Газиев А. И. и др. Тезисы докл. IV Международного биофизического конгресса, 1, 262, М., 1972.
8. Гентер Е. И., Михельсон В. М. X Всесоюзное совещание по УФ-излучению. Горький, 1973.
9. Жестяников В. Д., Семенова Е. Г. В сб.: Поражение и восстановление структур и функций макромолекул в облученной живой клетке. М., 1973.
10. Михельсон В. М., Айказян Э. В. ДАН СССР, 206, 6, 1462, 1972.
11. Парибок В. П., Семенова Е. Г. Цитология, 11, 4, 469, 1969.
12. Постнова Т. И. и др. ДАН СССР, 195, 976, 1970.
13. Фодор И. Успехи современной биологии. 71, вып. 3, 1971.
14. Ando T., Kasawa T. Biochim et biophys. acta, 204, 257, 1970.
15. Baril E. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 43, 754, 1971.
16. Beard P. Biochim et biophys. acta. 269, 385, 1972.
17. Brent T. P., Wheatly G. A. Intern. J. Radiat. Biol. v, 19: 339—348, 1971.
18. Burgoyne L. A. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 39, 254, 1970.
19. Chang L. M. S. et al. J. Mol. Biol. 74, 1, 1973.
20. Chiu S. F. H., Ranth A. M. Biochem. Biophys. Acta, v. 259: 164—174, 1972.
21. Churchill J., Urbanczyk J. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. v. 53, № 3, 1009—1016, 1973.
22. Cleaver J. E. Nature, v. 218: 652—656, 1968.
23. Cleaver J. E. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A, 63: 428—435, 1969.
24. Cleaver J. E., Thomas G. H. Biochim. Biophys. Res. Comm. 36: 203—208, 1969.
25. Cleaver J. E., Trosko J. E. Rad. Res. 39: 471—472, 1969.
26. Cleaver J. E. et al. Exptal. Cell. Res. 74: 67—80, 1972.
27. Corry P. M. and Cole A. Rad. Res. 36: 528—543, 1968.
28. Corry P. M., Cole A. IV. Intern. Biophys. Congr. Moscow, 211, 1972.
29. Donlon T., Norman A. Mut. Res. 13: 97—107, 1971.
30. Epstein J. et al. Rad. Res. 55, 3, 527, 1973.
31. Fujiwara Y., Kondo T. Biochem. Biophys. Res. Com. 47: 557—564, 1972.
32. Gaziev A., Kuzin A. Europ. J. Biochem., 37, 7, 1973.

33. *Hewish D. R., Burgoyne L. A.* Biochem. Biophys. Res. Com. 52, 475, 1973.
34. *Hyodo M. et al.* Exptal. Cell. Res., 67, 461, 1971.
35. *Jacobs A. et al.* Intern. Radiat. Biol. 22, 431, 1972.
36. *Kessler.* Biochim. et biophys. acta, 240, 330, 1971.
37. *Kleijer W. J. et al.,* Mutat. Res. 20, 3, 417—428, 1973.
38. *Klimek M., Vantcek.* Mathematical Biosciences, 9: 165—177, 1970.
39. *Klimek M. Zemanova L.* Neoplasma. 18: 87—97, 1971.
40. *Kuzin A., Gaziev A.* Studia biophys. 29, 125, 1971.
41. *Lehman A., R.* Biophys. J., 12: 1316—1325, 1972.
42. *Lett J. T. et al.* Nature. 214: 790—792, 1967.
43. *Ley R, D., Setlow R. B.* Biophys. Coc. 12-th Ann. Mut. 153a Abstr. 1972.
44. *Lindahl T., Edelman G.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61, 680, 1968.
45. *Lindahl T. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62, 597, 1969.
46. *Lindahl T. et al.* J. Biol. Chem. 244, 5014, 1969.
47. *McCaffrey R. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 521, 1973.
48. *McGraph R. A., Willlams R. W.* Nature, 212: 534—535, 1966.
49. *Meyn R. E., Humphrey R. M.* Rad. Res. 43: 253—262, 1970.
50. *Mizutani. et al.* Nature New Biol. 230, 232, 1971.
51. *Modrich P., Lehman Y. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1002, 1971.
52. *Nuzzo F. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65, 1017, 1970.
53. *Nuzzo F. et al.* Atti. Assoc. genet. ital. 17, 23—24, 1972.
54. *O'Connor P. J.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 805, 1969.
55. *Painter R. B.* Current topics in Radiat. Res., v. 7: 45—70, 1970.
56. *Painter R. B., Cleaver Y. E.* Rad. Res. 37: 451—466, 1969.
57. *Painter R. B. et al.* Rad. Res. 44: 133—140, 1970.
58. *Pedrini. et al.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 1221, 1972.
59. *Rasmussen R. E., Painter R. B.* J. Cell. Biol. 29: 11—19, 1966.
60. *Rasmussen R, E. et al.* Intern. J. Rad. Biol. 17: 285—291, 1970.
61. *Regan J. D., Trosko J. E.* Rad. Res. 31: 548—549, 1967.
62. *Regan J. D. et al.* Biophys., J., 8: 319—325, 1968.
63. *Regan J. D. et al.* Science 174: 49—52, 1971.
64. *Regan J. D. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68: 708—712, 1971.
65. *Regan J. D. and Setlow R. B.* IV. Intern. Biophys. Congres. Moscow, 117—118, 1972.
66. *Richardson et al.* Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 33, 151, 1968.
67. *Roots R., Smith K. C.* Rad. Res. 55, 3, 520, 1973.
68. *Rupp W., Howard-Flanders P. J.* Mol. Biol. 31: 291—304, 1968.
69. *Rupp W. D. et al.* J. Mol. Biol. 61: 25—44, 1971.
70. *Sambrook Y., Shatkin A. J.* Virol. 4, 719, 1969.
71. *Sawada S., Okada S.* Int. J. Radiat. Biol. 21: 599—602, 1972.
72. *Setlow R. B. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64: 1035—1041, 1969.
73. *Setlow R. B., Setlow J. K.* Ann. Rev. Biophys. Bioengineering, 1: 243—246, 1972.
74. *Söderhall S., Lindahl T.* J. Biol. Chem. 248, 672, 1973.
75. *Söderhall S., Lindahl T.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 3, 910—916, 1973.
76. *Spadori. et al.* Europ. J. Biochem. 22, 75, 1971.
77. *Splegler P., Norman A.* Rad. Res., 39: 400—412, 1969.
78. *Splegler P., Norman A.* Mut. Res. 10: 379—387, 1970.
79. *Town C. et al.* Intern. J. Rad. Biol. 22, 513, 1972.
80. *Tsukada K., Ishimura M.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 1156, 1971.
81. *Wilkins R. J.* Int. J. Rad. Biol. 24, 6, 609—613, 1973.