

На правах рукописи

ГЕНТЕР
Елизавета Ивановна

ДЕФЕКТЫ ВНЕПЛАНОВОГО СИНТЕЗА ДНК
ПРИ γ - И УФ-ОБЛУЧЕНИИ В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ
ДВУМЯ ФОРМАМИ ПИГМЕНТНОЙ КСЕРОДЕРМЫ

ЦИТОЛОГИЯ — 03.00.17

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте цитологии АН СССР.

Научные руководители:

доктор биологических наук В. Д. ЖЕСТЯНИКОВ,
кандидат биологических наук В. М. МИХЕЛЬСОН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор С. Н. АЛЕКСАНДРОВ,
кандидат биологических наук Ю. Л. ГОРОЩЕНКО

Ведущее учреждение: Институт общей генетики АН СССР.

Защита состоится « 20. » *января* . 197 *8* г. в 14 час. на заседании специализированного совета по специальности «цитология» (К 002.73.01) Института цитологии АН СССР по адресу: ул. Союза Печатников, 16.

Автореферат разослан « . *2* . » *декабря* . . 197 *7* г.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР.

Ученый секретарь специализированного совета
доктор биологических наук Г. Н. МОЖАЕВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение механизмов репарационных процессов в ДНК является одной из центральных проблем радиационной цитологии. Первые крупные успехи в этой области были достигнуты в исследованиях на микроорганизмах, среди которых, начиная с 50-х годов, были обнаружены и исследованы многочисленные мутанты с измененной радиочувствительностью. Обнаружение в таких мутантных клетках дефектов отдельных репарационных процессов и недостаточности определенных ферментов резко продвинуло понимание механизмов репарации ДНК. На клетках млекопитающих такие исследования стали возможны лишь в последние несколько лет, когда подобные дефекты репарационных систем были обнаружены при некоторых наследственных заболеваниях человека.

Первыми были исследованы заболевания с дефектами ферментов, участвующих в репарации ДНК, поврежденной УФ-облучением - классическая форма пигментной ксеродермы или XP I (Cleaver, 1968), "вариант" пигментной ксеродермы (Burk et al., 1971), анемия Фанкони (Foon et al., 1974) и некоторые другие, несколько позже - болезни с нарушениями репарации ДНК от повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией: форма II пигментной ксеродермы (Михельсон и Айказян, 1972), прогерия (Erstein et al., 1973, 1974), атаксия-телеангиэктазия (Paterson et al., 1976).

Исследование репарационных процессов в клетках больных этими и некоторыми другими наследственными болезнями позволило во многом понять механизмы восстановления в поврежденной ДНК клеток человека.

В лаборатории радиационной цитологии Института цитологии АН СССР с 1970 г. ведутся исследования репарационных дефектов в клетках больных различными формами пигментной ксеродермы. Была, в частности, обнаружена ранее не описанная форма этого заболевания, при которой наряду с дефектом эксцизионной репарации ДНК в УФ-облученных клетках оказалась нарушенной и репарация ДНК от повреждений, вызванных ионизирующими излучениями. Оказалось, что при этой форме пигментной ксеродермы, названной формой II, нарушено воссоединение односторонних разрывов ДНК, вызываемых γ -радиацией, а также повышена частота хромосомных aberrаций, индуцированных рентгеновским облучением.

Дальнейшее исследование репарационных процессов при форме II пигментной ксеродермы представляется особенно существенным, т.к. позволяет использовать эту редкую мутацию для выяснения процессов репарации ДНК клеток человека, поврежденных ионизирующими излучениями, т.е. изучить именно те репарационные механизмы, которые с одной стороны, до сих пор наименее исследованы, а с другой - представляют наибольший практический интерес.

Задача работы. Настоящая работа предпринята с целью изучить активность репарационных процессов в ДНК клеток, пораженных пигментной ксеродермой в форме II (XP II) в сравнении со здоровыми клетками и с клетками классической пигментной ксеродермы, имеющей дефект в системе эксцизионной репарации пиримидиновых димеров (XP I). На основании первых результатов исследования репарационных процессов при XP II казалось логичным предположить (Михельсон и Айказян, 1972; Михельсон и др., 1974), что при этой форме заболевания наследственный дефект касается не УФ-эндонуклеазы, как при XP I, недостаток которой не должен сказываться на воссоединении γ -индуцированных разрывов ДНК, а какого-то другого фермента репарации, скорее всего - одной из ДНК-полимераз. Дефект по репаративной ДНК-полимеразе мог бы объяснить нарушения репарации как при УФ, так и при γ -облучении. Дефект по ДНК-лигазе казался менее вероятным.

Соответственно задачей работы было исследование тех репаративных процессов в ДНК, в которых участвует репаративная ДНК-полимераза. Основной задачей работы было исследование репарации ДНК при УФ и γ -облучении по критерию внепланового синтеза ДНК, т.е. синтеза, возникающего вне S-фазы клеточного цикла только в клетках, поврежденных радиацией. Исследовалось также модифицирующее действие специфического ингибитора репарации ДНК - кофеина на интенсивность внепланового синтеза ДНК в этих клетках.

Поскольку ДНК-полимеразы, в том числе репаративные, участвуют и в нормальном репликативном синтезе ДНК, этот процесс также был исследован при XP I и при XP II.

Научная новизна работы. Проведенные исследования репарационных процессов в клетках человека при пигментной ксеродерме и полученные в работе результаты являются оригинальными и не име-

ют прямых аналогий в мировой радиационной литературе, так как χ -чувствительная форма II пигментной ксеродермы впервые описана и исследуется в Институте цитологии АН СССР. Обнаруженные позже подобные дефекты репарации при других наследственных заболеваниях человека (прогерия и атаксия-телеангиэктазия) существенно отличаются от исследованной нами формы пигментной ксеродермы, и изучение дефектов репарации при них лишь начинается. Полученные здесь результаты позволяют сделать определенные выводы о некоторых этапах репарации клеток человека, поврежденных ионизирующей радиацией, о роли репарации ДНК в нормальной жизнедеятельности клетки и о связи между репарацией ДНК и репарацией хромосом.

Практическое значение. Результаты, полученные в настоящей работе, проясняя механизмы репарационных процессов в ДНК, увеличивают понимание путей пострадиационного восстановления клеток человека, важность которого в наши дни трудно оспаривать.

С другой стороны, исследование молекулярных процессов, лежащих в основе таких тяжелых заболеваний человека как пигментная ксеродерма, имеет значение для перспектив лечения этой болезни, и позволило дать определенные практические рекомендации для клиники.

Сопоставление нарушений репарации ДНК при изучаемых наследственных болезнях с почти неизбежным при них злокачественным ростом или преждевременным старением клеток в культурах позволяет сделать **важные выводы** о роли репарационных процессов в патогенезе злокачественного роста и старения.

Апробация работы. Результаты, включенные в настоящую работу, докладывались на семинарах лаборатории радиационной цитологии АН СССР, научных конференциях Института цитологии АН СССР в 1972-1977 гг., на заседаниях отделения Общества рентгенологов и радиологов в 1972-1976 гг., на II и III съездах Всесоюзного общества генетиков в 1972 г. (Москва) и в 1977 г. (Ленинград), на IУ Международном конгрессе биохимиков в 1972 г. (Москва), на X Всесоюзном совещании по биологическому действию УФ-лучей в 1973 г. (Торский), на II Всесоюзном симпозиуме по молекулярным механизмам генетических процессов в 1973 г. (Москва), на I Радиобиологической конференции социалистических стран в 1974 г. (Чехо-

словакия), на I Всесоюзной конференции по медицинской генетике в 1975 г. (Москва).

Объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора (3 главы), описания методики, собственных экспериментальных исследований (5 глав), заключения и выводов. Работа изложена на 158 стр. машинописного текста, включает 18 рисунков и 15 таблиц (13 таблиц составляет приложение к диссертации). Список цитируемой литературы включает 262 работы, в том числе 61 работу отечественных авторов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на краткосрочных культурах лимфоцитов периферической крови человека, полученных культивированием цельной крови (Abrisquea, 1966; Федорцева и др., 1973) от здоровых доноров, 3 больных пигментной ксеродермой в форме I (ХР1ЛЕ, ХР3ЛЕ, ХР4ЛЕ, больной пигментной ксеродермой в форме II (ХР2ЛЕ) и матери последней больной - гетерозиготы по дефектному гену (ХРГ2ЛЕ).

Клетки культивировали в питательной среде следующего состава: 2/3 среды I99 и 1/3 бычьей сыворотки, инактивированной нагреванием в течение 40 мин. при 54° С. Концентрация клеток в культуре составляла $1-2 \cdot 10^7$ клеток/мл. Для работы с клетками в фазе G₁ в культуру вносили ФГА (фитогемагглютинин) М фирм "Difko" (США) или "Wellcome" М10 (Англия) в концентрации 0,03 мл на 1 мл среды. При работе с клетками в фазе G₀ (большая часть опытов) ФГА в среду не добавляли. Культуру инкубировали при 37° С в течение 30 мин. до облучения и от 2 до 72 часов после облучения, в зависимости от нужд эксперимента.

При автордиографическом исследовании репликативного синтеза ДНК клетки инкубировали в течение 20 мин. в среде с Н³-тимидином (0,5 мкКюри/мл), а при исследовании внепланового синтеза ДНК в среде с Н³-тимидином (10 мкКюри/мл) в течение 2 часов перед фиксацией или всего срока инкубации клеток (при γ-облучении). В ряде случаев одновременно с изотопом в культуру добавляли кофеин ($1 \cdot 10^{-3}$ М) и оксимочевину ($2 \cdot 10^{-3}$ М).

При исследовании репликативного синтеза ДНК препараты покрывали эмульсией типа "М" и экспонировали под эмульсией 2 неде-

ли при $+4^{\circ}\text{C}$. При исследовании внепланового синтеза ДНК экспозиция препаратов под эмульсией типа "Р" была более длительной (8 недель при $+4^{\circ}\text{C}$). Затем препараты проявляли, окрашивали через эмульсию гемалауном (3-4 мин.) и заключали в канадский бальзам.

Для каждого варианта опыта при подсчете 500 клеток на вариант определяли процент клеток, выполняющих внеплановый синтез ДНК, и среднюю ошибку в %. Статистическая обработка результатов проводилась по формуле Стьюдента (см. Урбах, 1963). Клетки, содержащие 0-5 зерен над ядром, относили к числу меченых за счет фона. Клетки, имеющие более 5 зерен над ядром, считали выполняющими внеплановый синтез ДНК.

Для определения скорости репликативного синтеза ДНК подсчитывали процент меченых клеток, находящихся в стадии синтеза ДНК (в них число зерен над ядром было в 2 раза и более выше фона), и среднюю ошибку в %. На каждый срок фиксации подсчитывали от 1000 до 2500 клеток.

Для УФ-облучения культур лимфоцитов использовали бактерицидную лампу БУВ-30П с основной $\lambda = 254\text{ нм}$. Интенсивность УФ-облучения при исследовании репликативного синтеза ДНК составляла $11,2\text{ эрг/мм}^2\cdot\text{сек}$, а при исследовании внепланового синтеза ДНК - $23\text{ эрг/мм}^2\cdot\text{сек}$. УФ-облучение проводили в кварцевых флаконах Карреля. Толщина слоя жидкости с лимфоцитами не превышала 2 мм. Гамма-облучение проводили на установке ЛМБУ1 (Св¹³⁷) с мощностью дозы 47 рад/сек в пенициллиновых флаконах (по 2 мл культуры на флакон).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Репликативный синтез ДНК в лимфоцитах здоровых лиц и больных двумя формами ХР

На рис. 1А показана кинетика репликативного синтеза ДНК в стимулированных ФГА периферических лимфоцитах здорового донора и больных двумя формами ХР. Репликативный синтез ДНК в здоровых лимфоцитах (кривая I) достигает максимума через 38-40 час. после стимуляции ФГА и вновь снижается к 44 часам, когда большинство клеток вступает в фазу G_2 клеточного цикла. В дальнейшем продвижение клеток по циклу в таких культурах быстро десинхронизируется. В целом полученные здесь данные о времени первого после

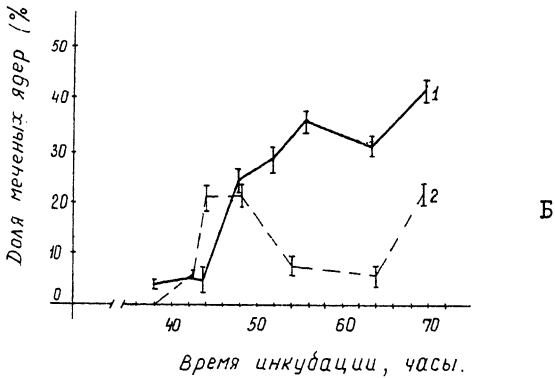
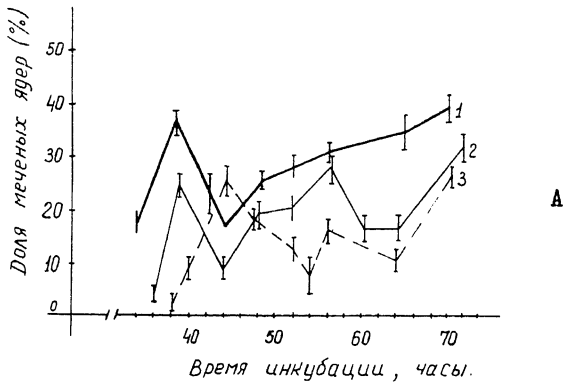


Рис. 1А и 1Б. Кинетика репликативного синтеза ДНК в культуре лимфоцитов периферической крови человека в норме и после УФ-облучения. (Доза УФ-лучей - 100 эрг/мм²).

1А. Контроль

1Б. УФ-облучение

1 - культура здорового донора

1 - культура здорового донора

2 - культура больной XPI

2 - культура больной XPII

3 - культура больной XPII

стимуляции периода синтеза ДНК в лимфоцитах крови здорового человека соответствуют имеющимся литературным данным (Bender and Prescott, 1962; Cave, 1966; Левина и Шапиро, 1967).

При ХРІ кинетика репликативного синтеза ДНК (кривая 2) не отличается существенно от таковой в здоровых стимулированных лимфоцитах.

При ХРІІ (кривая 3) репликативный синтез ДНК через 38 часов после стимуляции еще ничтожен, а максимум достигается лишь через 44 часа, когда в здоровых лимфоцитах большинство клеток уже вступило в G_2 . Таким образом, имеет место примерно 6-часовое отставание репликации ДНК при ХРІІ по сравнению со здоровыми клетками. Такое отставание можно объяснить недостаточностью ДНК-полимеразы.

Сравнение кривых 1, 2 и 3 на рис.1А позволяет также отметить определенное (хотя и не очень значительное) общее снижение доли ДНК-синтезирующих клеток в культурах больных ХР- в особенности ХРІІ - по сравнению со здоровыми культурами. Возможно, это объясняется ослабленной реакцией лимфоцитов при ХР на ФГА.

Сравнивалось также действие УФ-облучения на репликативный синтез ДНК в здоровых лимфоцитах и при ХРІІ (рис.1Б). Облучение в дозе 100 эрг/мм² значительно задерживает репликацию ДНК в здоровых лимфоцитах (кривая 1), но почти не влияет на репликативный синтез в клетках больной ХРІІ (кривая 2). По-видимому, УФ-облучение повреждает в здоровых клетках те самые механизмы, которые при ХРІІ повреждены и без облучения.

Изложенное позволяет сделать вывод, что репликативный синтез ДНК в лимфоцитах при ХРІІ значительно отсрочен по сравнению с клетками здорового человека и больного формой ХРІ. Полученные результаты можно объяснить дефектом по репаративной ДНК-полимеразе при ХРІІ. Это согласуется также с последними данными (Михельсон, 1977), согласно которым пролиферация фибробластов кожи этой больной в культуре резко замедлена, и число Хэйфлика ограничено по сравнению со здоровыми клетками и ХРІ.

2. Внеплановый синтез ДНК, вызываемый УФ-облучением в лимфоцитах здоровых доноров и больных двумя формами ХР

Для исследования внепланового синтеза ДНК нестимулированные лимфоциты здорового донора и больных ХРІ и ХРІІ после УФ-облуче-

ния (50–300 эрг/мм²) инкубировали в течение 2, 4, 8 и 12 часов в среде с Н³-тимидином (2 часа) в концентрации 10 мкКюри/мл (таблица I).

Обнаружено, что в необлученных клетках как больных (2 формы), так и здоровых доноров, внеплановый синтез ДНК незначителен. Наибольшей интенсивности достигает внеплановый синтез ДНК после облучения в дозе 100 эрг/мм². Он составляет при этом в здоровых лимфоцитах $76,9 \pm 2,0\%$ (2 часа инкубации) и $81,1 \pm 1,6\%$ (4 часа инкубации). При ХР I внеплановый синтез при облучении в дозе 100 эрг/мм² достигает $25,0 \pm 1,9\%$, а при ХР II – $14,2 \pm 1,5\%$ (2 часа инкубации в среде с Н³-тимидином). При более высоких дозах облучения (200–300 эрг/мм²) внеплановый синтез ДНК в клетках здоровых доноров несколько снижается, по-видимому, из-за подавления облучением самих репаративных процессов. В то же время при УФ-облучении ксеродермальных клеток в этих дозах, особенно большой формой ХР I, такого подавления репарационных процессов не наблюдается, вероятно, в связи с вообще низкой способностью этих клеток к репарации ДНК от повреждений, индуцированных УФ.

В целом полученные результаты четко показывают, что при обеих формах ХР внеплановый синтез ДНК при УФ-облучении резко ослаблен по сравнению с таковым в здоровых облученных клетках. По-видимому, обе исследуемые формы ХР приблизительно в равной мере дефектны по репаративным процессам, идущим в ДНК при повреждениях УФ-светом.

При обеих формах ХР не только снижена доля клеток, выполняющих внеплановый синтез ДНК после УФ-облучения, но и в клетках, выполняющих внеплановый синтез, интенсивность его значительно уменьшена. Интенсивность внепланового синтеза ДНК в УФ-облученных лимфоцитах больного ХР I несколько выше, чем при ХР II, однако различия эти невелики, и репарация ДНК резко ослаблена при обеих формах заболевания.

Известно, что при форме ХР I внеплановый синтез ДНК не только снижен по интенсивности, но и растянут во времени (Robbins and Kraemer, 1972). Полученные данные (таблица I) свидетельствуют о том, что внеплановый синтез ДНК, вызываемый УФ-облучением в лимфоцитах здоровых доноров в стадии G₀, полностью завершается через 4–6 часов после облучения, тогда как в клетках больных двумя формами ХР он продолжается до 12 часов и дольше.

Таблица I

Внеплановый синтез ДНК (% слабо меченых клеток), индуцированный УФ-облучением в лимфоцитах здорового донора и больных двумя формами пигментной ксеродермы (ХР I и ХР II) в стадии G₀.

Доза облучения (в эрг/мм ²)	Время инкубации в H ³ -тимидине (в час.)	Здоровый донор	ХР I	ХР II
Контроль	0-2	11.2±1.4	2.2±0.6	0.6±0.3
	2-4	0	0.8±0.4	3.4±0.8
	6-8	0.2±0.2	0.6±0.4	3.5±0.8
	10-12	0	3.4±0.8	6.6±1.0
50	0-2	72.8±2.0	21.8±1.9	7.4±1.2
	2-4	19.5±1.6	2.2±0.6	20.0±1.8
	6-8	0.6±0.3	3.6±0.8	7.8±1.2
	10-12	0.8±0.4	0.2±0.2	5.2±1.0
100	0-2	76.9±2.0	25.0±1.9	14.2±1.5
	2-4	81.1±1.6	5.0±1.0	25.2±1.9
	6-8	1.2±0.5	6.0±1.0	13.4±1.2
	10-12	1.9±0.6	0.6±0.3	20.0±1.7

Импульсная метка в H³-тимидине (10 мкКюри/мл) - 2 часа в присутствии оксимочевины (2·10⁻³ М).

Однако интенсивность внепланового синтеза при этом значительно ниже, чем в клетках здоровых лиц. Инкубирование в течение этих же сроков культур лимфоцитов больных пигментной ксеродермой, стимулированных ФГА и облученных в стадии G_1 , через 12 часов после стимуляции не выявило увеличения внепланового синтеза ДНК по сравнению с наблюдаемым в стадии G_0 . В культуре лимфоцитов больной формой II этот синтез не превышал 5,0%, при ХР1 он был еще ниже.

Из данных таблицы I можно сделать вывод, что при ХРII величина внепланового синтеза, индуцированного УФ-облучением, снижена столь же резко, как и при классической ХР1.

При ХР1 низкий уровень внепланового синтеза ДНК при УФ-облучении хорошо объясняется недостаточностью УФ-эндонуклеазы, дефект которой доказан при этой форме заболевания (Tanaka et al., 1975). Что касается формы ХРII, то результаты, полученные в этой части работы, тоже могут быть объяснены дефектом по УФ-эндонуклеазе, равно как и по репаративной ДНК-полимеразе.

3. Внеплановый синтез ДНК, вызываемый γ -облучением в лимфоцитах здоровых доноров и больных двумя формами пигментной ксеродермы

При классической ХР1 внеплановый синтез ДНК, вызываемый ионизирующей радиацией, был неоднократно исследован и оказался таким же, как при облучении здоровых клеток (Cleaver, 1969; Kleijer et al., 1970, 1973).

При исследуемой нами форме ХРII внеплановый синтез ДНК в γ -облученных клетках до сих пор не изучался. Между тем, именно в клетках больной ХРII было обнаружено нарушение воссоединения односторонних разрывов ДНК при γ -облучении (Михельсон и Айказян, 1972) и повышенная частота хромосомных aberrаций при рентгеновском облучении (Михельсон и др., 1974). Таким образом, настоящий раздел работы является основным. Лимфоциты подвергали γ -облучению в дозах 50 и 100 крад. Кинетика внепланового синтеза ДНК (изменение % меченых клеток во времени) при облучении лимфоцитов в фазе G_0 клеточного цикла показана на рис.2. Импульсную 2-часовую метку H^3 -тимидином (10 мкКюри/мл) производили в присутствии оксимочевины ($2 \cdot 10^{-3}$ М) сразу, через 3,

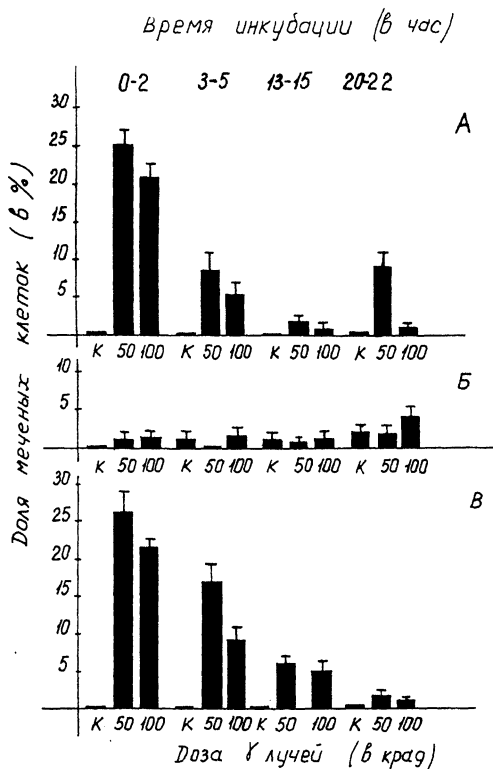


Рис.2. Кинетика внепланового синтеза ДНК, стимулированного γ -облучением в лимфоцитах человека в стадии G_0 .
 А - здоровый донор,
 Б - пигментная ксеродерма (форма II),
 В - пигментная ксеродерма (форма I).

13, или 20 часов после облучения, т.е. инкубация облученных культур продолжалась соответственно 2,5, 15 и 22 часа.

Видно, что в первые 2 часа после облучения внеплановый синтез ДНК в лимфоцитах здорового донора и больного ХРІ затрагивает при применявшихся дозах облучения 20-25% клеток. Некоторое снижение доли меченых клеток с ростом дозы облучения мы объясняем так же, как подобное явление при УФ-облучении. С увеличением времени между облучением и внесением метки величина внепланового синтеза в этих клетках быстро снижается.

Аналогичные результаты были получены на стимулированных ФГА лимфоцитах, облученных в фазе G_1 клеточного цикла, то есть при инкубации в присутствии ФГА.

Таким образом, внеплановый синтез ДНК при γ -облучении в клетках больного ХРІ существенно не отличается от такового в клетках здорового донора. Напротив, при γ -облучении лимфоцитов больной ХРІІ внеплановый синтез возникает в очень незначительной доле клеток. Следовательно, γ -индуцированный внеплановый синтез ДНК при ХРІІ резко ослаблен по сравнению с ХРІ и здоровыми клетками.

Результаты, полученные при 20 и 40-часовой инкубации клеток с H^3 -тимидином, показали, что общее количество меченых клеток в γ -облученных культурах здоровых доноров существенно не изменилось по сравнению с 2-часовой импульсной меткой. Это свидетельствует о том, что за первые 2 часа метка включается практически во все клетки, способные выполнять внеплановый синтез ДНК.

При длительной метке клеток больной ХРІІ доля клеток, включающих тимидин, не превышала 2-4%. Дефект внепланового синтеза ДНК, вызываемого γ -облучением в лимфоцитах ХРІІ, таким образом, не вызывает сомнения. Однако, не исключено, что 40-часовое пребывание в культуре приводит к более сильному повреждению ксеродермальных клеток по сравнению с клетками здоровых доноров и к элиминации какой-то части их популяции. Полученные результаты позволяют более обоснованно предполагать, что наследственный дефект, лежащий в основе ХРІІ, связан с недостаточностью именно фермента репаративной ДНК-полимеразы. Действительно, недостаточность по ДНК-лигазе могла бы быть причиной отсутствия воссоединения одонитевых разрывов ДНК при γ -облучении, но не должна сказываться на уровне γ -индуцированного внепланового синтеза ДНК.

4. Внеплановый синтез ДНК при УФ и γ -облучении в клетках, гетерозиготных по форме ХРII

Мать больной пигментной ксеродермой в форме II не имеет никаких внешних проявлений пигментной ксеродермы. Ранее в нашей лаборатории исследовалась частота спонтанных (Михельсон и др., 1976) и индуцированных (Михельсон и др., 1974, 1977) aberrаций хромосом, и не было обнаружено различий по этим критериям между здоровыми лимфоцитами и гетерозиготными по ХРII.

В настоящей работе интенсивность внепланового синтеза ДНК в гетерозиготных лимфоцитах исследовалась при УФ и γ -облучении. На рис.3 можно видеть, что внеплановый синтез ДНК в гетерозиготных лимфоцитах не отличается от такового в здоровых клетках ($76,4 \pm 2,7\%$ и $76,9 \pm 2,0\%$ соответственно), синтезирующих ДНК после облучения дозой 100 эрг/мм^2 . Такое же отсутствие различий имеет место и при других дозах облучения.

Внеплановый синтез ДНК в гетерозиготных клетках при γ -облучении (50 и 100 крад) исследовался в опытах с длительной меткой (20-часовая инкубация в среде с H^3 -тимидином). Как и при УФ-облучении, сколько-нибудь существенной разницы в количестве клеток, выполняющих внеплановый синтез при γ -облучении, между гетерозиготными и здоровыми клетками отмечено не было. Интенсивность внепланового синтеза ДНК при дозе 50 крад составила в клетках здоровых доноров $26,3 \pm 1,8\%$, а в клетках гетерозиготы по форме ХРII - $23,6 \pm 1,7\%$. Таким образом, клетки гетерозиготы по ХРII не отличались от здоровых клеток по способности репарировать свою ДНК как при УФ, так и при γ -облучении.

5. Модификация кофеином внепланового синтеза ДНК в лимфоцитах человека при УФ и γ -облучении

Кофеин является одним из немногих агентов, действие которого можно назвать специфическим, так как он подавляет репаративный синтез ДНК и практически не влияет на репликацию (Bauth, 1967; Domon and Bauth, 1969).

Данные по действию кофеина на внеплановый синтез ДНК в лимфоцитах здоровых доноров и больных двумя формами пигментной ксеродермы приведены в таблице 2. Кофеин в концентрации $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ вводили в культуру всегда сразу после облучения, независимо от

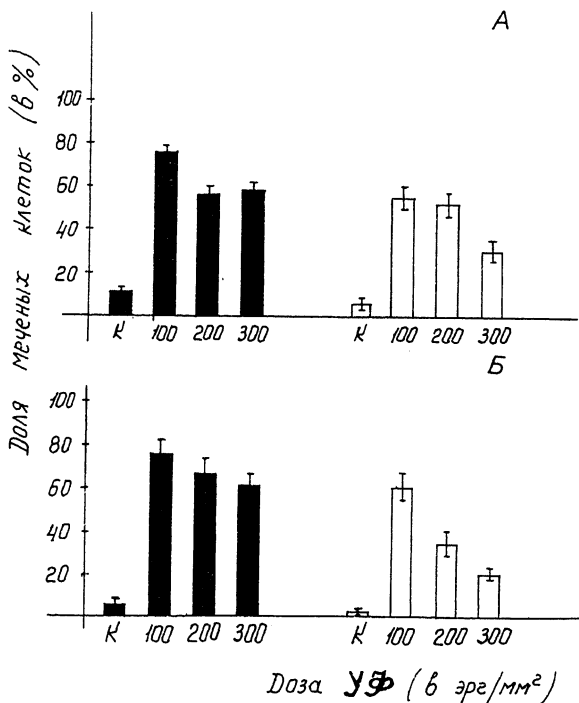


Рис.3. Внеплановый синтез ДНК, стимулированный УФ-облучением в лимфоцитах здорового донора (А) и гетерозиготы по форме II пигментной ксеродермы (Б) в стадии G₀ при 2 часах инкубации с Н³-тимидином (10 мкКюри/мл). Темные столбики - без ингибитора. Светлые столбики - с кофеином 1·10⁻³ М.

Таблица 2

Модификация кофеином внепланового синтеза ДНК, стимулированного Уф-облучением в лимфоцитах человека при 2 часах инкубации в среде с H^3 -тимидином (10 мкКюри/мл) (% слабо меченых клеток)

Доза Уф в эрг/мм ²	Здоровый донор		Пигментная ксеродерма I форма		Пигментная ксеродерма II форма	
	без кофеина	кофеин $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$	без кофеина	кофеин $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$	без кофеина	кофеин $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$
Без облучения	11.2±1.4	6.4±1.1	2.2±0.6	1.2±0.4	0.6±0.3	0.6±0.3
50	72.8±2.0	43.8±2.2	21.8±1.9	11.0±1.4	7.4±1.2	1.0±0.4
100	76.9±2.0	55.8±2.2	25.0±1.9	19.4±1.8	14.2±1.5	1.0±0.4
200	46.2±2.0	51.6±2.0	16.6±1.8	13.8±1.5	7.2±1.1	1.6±0.6
300	47.0±1.8	32.6±2.1	21.5±1.8	13.0±1.5	32.8±2.1	4.8±0.9

тогда, когда клетки метили H^3 -тимидином.

Из таблицы 2 очевидно, что кофеин, присутствуя в среде после УФ-облучения, заметно подавляет внеплановый синтез ДНК в здоровых лимфоцитах и при ХРІІ. Аналогичные результаты получены и при 4 часах инкубации с H^3 -тимидином здоровых лимфоцитов и клеток больной ХРІІ, причем ингибирующий эффект кофеина выражен в этом случае наиболее четко.

В опытах по изучению кинетики УФ-индуцированного внепланового синтеза ДНК кофеин испытывался при всех сроках инкубации лимфоцитов и оказывал тормозящий эффект на величину внепланового синтеза во всех случаях, где внеплановый синтез имел достаточную величину.

В целом опыты по действию кофеина на УФ-индуцированный внеплановый синтез ДНК свидетельствуют о существенном тормозящем его влиянии на этот показатель пострадиационной репарации ДНК в здоровых клетках и клетках больного ХРІІ и менее заметном при ХРІ. Этим косвенно подтверждается разное происхождение репарационных дефектов при двух формах ХР.

Можно предполагать, что при классической форме ХРІ подавлены те самые ферментные системы, на которые в здоровых облученных клетках действует кофеин, а при ХРІІ дефект касается других ферментов, не имеющих отношения к действию кофеина. Можно думать, что эффект кофеина связан с его действием на УФ-эндонуклеазу, дефектную при классической ХРІ.

Действие кофеина на величину внепланового синтеза ДНК, индуцированного γ -облучением, мы исследовали только при длительной метке облученных клеток H^3 -тимидином. На рис.4 представлены данные по действию кофеина на γ -индуцированный внеплановый синтез ДНК в здоровых клетках и больных двумя формами пигментной ксеродермы при 40-часовой инкубации в H^3 -тимидине. Ни в здоровых лимфоцитах, ни при пигментной ксеродерме в двух формах, кофеин не оказывал достоверного эффекта на внеплановый синтез ДНК при γ -облучении. Отсутствие тормозящего действия кофеина на внеплановый синтез при γ -облучении соответствует предположению о том, что его эффект связан с действием на УФ-эндонуклеазу, которая, по всей вероятности, не участвует в репарации ДНК, поврежденной ионизирующей радиацией.

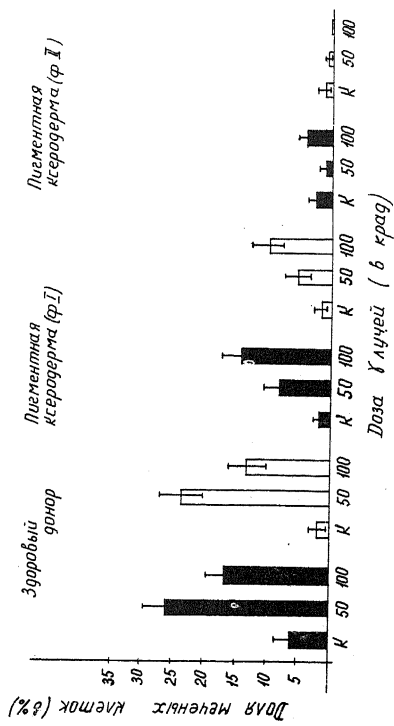


Рис. 4. Внеплановый синтез ДНК, стимулированный γ -облучением в лимфоцитах здорового донора и больных пигментной ксеродермой при длительной инкубации (40 час.) в среде с H^3 -тимидином (10 мкКюри/мл).
 Дозы γ -облучения: 50 и 100 крад.
 Темные столбики - без ингибитора; светлые столбики - с кофеином ($1 \cdot 10^{-3}$ М).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что в лимфоцитах больных пигментной кератодермой ослабление стимулированного излучением внепланового синтеза ДНК коррелирует с чувствительностью клеток к действию излучений. При ХРІ повышенная чувствительность лимфоцитов к УФ при нормальной чувствительности к ионизирующей радиации сопровождается резко ослабленным внеплановым синтезом ДНК при УФ-облучении и неизменным γ -индуцированным внеплановым синтезом. При впервые исследованной форме ХРІІ с повышенной чувствительностью клеток как к УФ, так и к ионизирующей радиации (Михельсон и др., 1974) резко ослаблен внеплановый синтез ДНК, стимулированный обоими типами излучения.

Характер молекулярного дефекта при ХРІ известен и касается УФ-эндонуклеазы, начального фермента эксцизионной репарации пиримидиновых димеров. Если повышенную чувствительность клеток больной ХРІІ к УФ-свету, как и при ХРІ, можно объяснить недостаточностью УФ-эндонуклеазы, то дефектом только этого фермента нельзя объяснить наблюдающуюся при ХРІІ повышенную частоту хромосомных аберраций и неспособность репарировать одностранные разрывы при действии ионизирующей радиации: УФ-эндонуклеаза не принимает участия в ликвидации одностранных разрывов ДНК. Последний процесс, как известно из опытов на клетках бактерий и в системах *in vitro*, требует обязательного участия репаративной ДНК-полимеразы, осуществляющей репаративный синтез, и ДНК-лигазы, соединяющей ресинтезированный фрагмент ДНК с основной нитью. Оба фермента участвуют и в эксцизионной репарации УФ-индуцированных повреждений, и недостаточность любого из них объясняет повышенную чувствительность клеток не только к ионизирующей радиации, но и к УФ-свету. На основании этих данных допустимо предположение, что при ХРІІ дефектной является репаративная ДНК-полимераза. По-видимому, можно исключить предположение о недостаточности ДНК-лигазы: во-первых, в этом случае не был бы нарушен внеплановый синтез ДНК при γ -облучении; во-вторых, лигаза играет важнейшую роль в нормальной репликации ДНК, и ее дефект вряд ли совместим с жизнью.

В нашей работе показано, что при ХРІІ, в отличие от ХРІ, в лимфоцитах замедлен нормальный репликативный синтез ДНК. Этим

обстоятельством объяснима обнаруженная недавно сниженная пролиферация кожи этой больной (Михельсон, 1977).

Данные опытов на бактериях показывают, что ДНК-полимеразы не могут быть строго разграничены на репаративные и репликативные, так как репаративная ДНК-полимераза I участвует в репликации, а "репликативная" ДНК-полимераза III - в репарации. Отсюда следует, что дефект в репаративной ДНК-полимеразе может отразиться на нормальной репликации, как это имеет место у *E.coli* (Okazaki et al., 1974).

Следовательно, можно предполагать, что наблюдающийся при ХРII дефект репликативного синтеза ДНК также объясним дефектом репаративной ДНК-полимеразы.

В настоящее время неизвестно, какая из ДНК-полимераз в клетках млекопитающих является репаративной (пока также не установлена и реплицирующая ДНК-полимераза). Из 4-х ДНК-полимераз (помимо митохондриальной) - $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - только последняя обладает экзонуклеолитической активностью (Burnes et al., 1976), подобно ДНК-полимеразам I и III из *E.coli*. Вместе с тем, только малая ДНК-полимераза β локализована исключительно в ядре. Не исключено, что либо ДНК-полимераза β (Vollum, 1975), либо ДНК-полимераза δ являются репаративными.

Несомненно, что репарационные процессы в ДНК так или иначе связаны с хромосомными перестройками, и следовательно, нарушение этих процессов может приводить к росту aberrаций, что известно в случаях ХР и при других нарушениях репарации ДНК. Причиной возникновения хромосомных aberrаций с повышенной частотой при ХРII может быть накопление нерепарированных одностранных разрывов ДНК.

Пигментная ксеродерма является предраковым заболеванием: во всех случаях злокачественные опухоли развиваются с первых лет жизни больных и рано или поздно приводят их к гибели (Robbins et al., 1974). Однако у наблюдаемой нами больной пигментной ксеродермой в форме II тяжелые кожные проявления болезни до настоящего времени (больной 22 года) ни разу не осложнились развитием опухолей. Этот факт, наряду с ограниченной пролиферацией клеток в культуре, позволяет высказать предположение, что именно сниженная пролиферативная способность клеток и является причиной отсутствия злокачественных новообразований (Михельсон,

1977).

В заключение следует сказать, что полученные в работе результаты не противоречат представлению о дефекте репаративной ДНК-полимеразы при ХРІІ, однако не дают бесспорных доказательств этого. Не исключено также, что при ХРІІ имеется дефект второго фермента - УФ-эндонуклеазы.

ВЫВОДЫ

1. Репликативный синтез ДНК в ФГА-стимулированных лимфоцитах больного ХРІІ задержан примерно на 6 час. по сравнению с репликативным синтезом в лимфоцитах здоровых лиц и больных ХРІ.

2. УФ-облучение в умеренных дозах существенно задерживает репликативный синтез ДНК в здоровых лимфоцитах, но практически не влияет на репликацию ДНК при ХРІІ, что можно объяснить тормозящим действием облучения в здоровых клетках на репарационные системы, которые дефектны при ХРІІ.

3. Внеплановый синтез ДНК, стимулированный УФ-облучением ($50-300$ эрг/мм²) в лимфоцитах человека в фазах G₀ и G₁ клеточного цикла значительно ослаблен и растянут во времени как при ХРІІ, так и при ХРІ.

4. Внеплановый синтез ДНК, вызываемый γ -облучением ($50-100$ крад) лимфоцитов, резко ослаблен при ХРІІ по сравнению со здоровыми донорами и больными ХРІ.

5. Кофеин ($1 \cdot 10^{-3}$ М), добавляемый после УФ-облучения, подавляет внеплановый синтез ДНК в здоровых лимфоцитах и при ХРІІ, но не оказывает достоверного действия при ХРІ.

6. Кофеин, добавляемый после γ -облучения, не влияет заметно на величину внепланового синтеза ДНК в здоровых лимфоцитах и при обеих формах ХР.

7. Лимфоциты донора, гетерозиготного по ХРІІ, не отличаются достоверно по величине УФ и γ -индуцированного внепланового синтеза ДНК от лимфоцитов здоровых доноров.

8. Обнаруженные дефекты репаративного и репликативного синтеза ДНК при ХРІІ позволяют предполагать недостаточность фермента репаративной ДНК-полимеразы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гентер Е.И. 1973. Задержка УФ-облучением продвижения клеток по циклу в синхронной культуре лимфоцитов человека. В сб. "Структура, функция и реактивность клеток". Л., 93-95.

2. Гентер Е.И., Носкова И.С., Михельсон В.М. 1974. Модификация кофеином внепланового синтеза ДНК при ультрафиолетовом облучении клеток человека в норме и при наследственно-измененной радиочувствительности. В сб. "Функциональная морфология, генетика и биохимия клетки". Л., 223-225.

3. Михельсон В.М., Айказян Э.В., Гентер Е.И., Плескач Н.М. 1974. Повышенная чувствительность клеток человека к ионизирующей радиации при одной из форм наследственного заболевания пигментной ксеродермы. (Исследование однонитевых разрывов ДНК и хромосомных aberrаций). Цитология 16, 2, 203-210.

4. Жестяников В.Д., Крупнова Г.Ф., Михельсон В.М., Семенова Е.Г., Пинто Р.И., Айказян Э.В., Виханская Ф.Л., Гентер Е.И. 1974. Действие кофеина и акрифлавина на процессы репарации в клетках бактерий, животных и растений. В сб. материалов I-й радиобиологической конференции социалистических стран. ЧССР, Шпиндлерув, Млын-Бедрихов, 122.

5. Гентер Е.И., Михельсон В.М. 1975. Ослабленный внеплановый синтез ДНК при УФ-облучении клеток больного пигментной ксеродермой с повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации. В сб. "Биологическое действие ультрафиолетового излучения". Наука. М., 100-103.

6. Гентер Е.И., Михельсон В.М. 1975. Ослабленный внеплановый синтез ДНК в гамма-облученных лейкоцитах человека при одной из форм пигментной ксеродермы. Опер.-инф. материалы. "Радиоцитология-74". Л., 15.

7. Михельсон В.М., Гентер Е.И., Плескач Н.М., Прокофьева В.В. 1977. Радиочувствительность хромосом человека при двух формах пигментной ксеродермы с разными наследственными дефектами. В сб. материалов III Всесоюзного съезда ВОГиС. Л., 302.



М-46826 Подписано к печати 24/8 77 Заказ 2659
Тираж 150. Формат бумаги 60 x 84 1/10
1,5 печ.л. Ротапринт тип. №2 "Ленуниверситета"
192104, Ленинград, Литейный пр., дом №55.