

УДК 577.155.2

БИОХИМИЯ

В. Н. СОЙФЕР, А. Н. МУСТАФИНА, Н. И. ЯКОВЛЕВА

**ТЕМНОВАЯ РЕПАРАЦИЯ В ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ
ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА**

(Представлено академиком И. Л. Кнунянцем 6 XII 1971)

Явление темновой репарации подробно изучено в бактериальных клетках. Не так давно было начато изучение этого явления в клетках высших организмов и, в первую очередь, человека (¹⁻³). В качестве моделей использовали культивируемые клетки человека с анеуплоидным набором хромосом, и при этом было установлено, что, как и в бактериях, в ходе темновой репарации в клетках человека происходит надрезание нити ДНК вблизи повреждения (^{4, 5}), выщепление димеров (¹⁻³), расщирение брешь (³) и заделка ее ДНК-полимеразами. Представлялось важным выяснить, существует ли процесс темновой репарации в нормальных диплоидных клетках человека, причем в клетках различных органов. Диплоидный штамм Л-1 культуры клеток легкого эмбриона человека был получен из легочной ткани 10-недельного эмбриона человека по общепринятой методике (⁶). Клетки культивировали на среде Игла с 10% нормальной бычьей сывороткой. На 7-й генерации клетки были заморожены и хранились в жидким азоте. Для опытов они были восстановлены из замороженного состояния и использовались на 13—18-й генерациях. Чтобы выяснить, не произошла ли спонтанная трансформация клеток, параллельно с определением димеров тимины в ДНК, анализировали кариотипы клеток по методу Мурхеда (⁷).

Для количественного определения димеров тимина, за сутки до облучения клеток, культуральную жидкость, содержащую бычью сыворотку и среду Игла, сливали и заменяли средой Игла с добавлением 2 μ C/мл 5-метил-Н³-тимицина (удельная активность препарата 29 μ C/мл тимицина при концентрации тимицина 1,8 мг/мл). Облучение вели двумя лампами БУВ-15 на расстоянии 26—30 см от поверхности облучаемой культуры в течение 10 мин. Для предотвращения фотореактивации все операции от начала облучения до переноса клеток в 10% трихлоруксусную кислоту (ТХУ) вели при слабом желтом свете. Определение количества димеров включало осаждение высокомолекулярной фракции клеток 10% ТХУ (для более точного переноса материала после обработки клеток 10% ТХУ к пробиркам, содержащим этот материал, добавляли 2 капли 1% раствора человеческого альбумина; суспензии, подвергавшиеся облучению, содержали от $1,3 \times 10^7$ до $3,9 \times 10^7$ клеток), гидролиз ДНК 85% муравьиной кислотой, хроматографию гидролизата на бумаге (Ватман № 2 в смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода 40 : 6 : 15), подсчет радиоактивности по длине хроматограммы (сцинтилляционный счетчик Mark 1 Nuclear Chicago). На основании полученных данных строили радиохроматограммы и по ним определяли процентное содержание димеризованных тиминов в ДНК. Подробно методы работы изложены нами ранее (³).

Культура клеток легочной ткани человека была представлена нежными, фибробластоподобными клетками с ориентированным ростом. Анализ кариотипа этих клеток показал, что они имеют нормальный диплоидный женский набор хромосом и отвечают требованиям, предъявляемым к диплоидным клеткам человека. 1% клеток, используемых в наших опытах

тах, являлись тетраплоидными (было изучено 800 клеток на стадии метафаз), 8% клеток было представлено анеуплоидами за счет моносомии по одной, реже двум хромосомам (изучено 195 метафазных клеток), остальные клетки имели нормальный женский набор хромосом. Хроматидные разрывы были обнаружены в 6,1% клеток (изучено 195 метафазных клеток).

Хроматографическое разделение гидролизата клеток на два основных пика — пик димерной области и пик тиминовой области — было таким же,

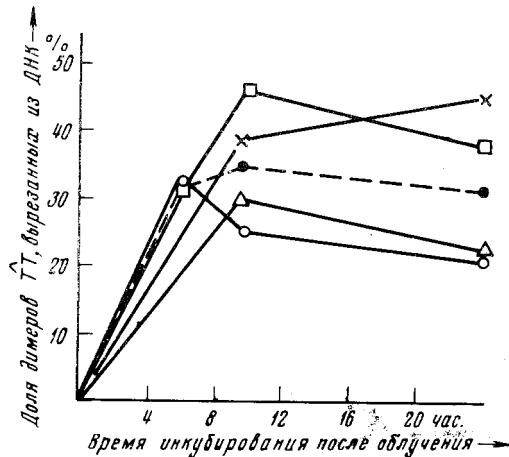


Рис. 1. Кинетика вырезания димеров тимила из ДНК клеток легкого эмбриона человека, индуцированных ультрафиолетовым облучением. Отдельные кривые представляют результаты индивидуальных опытов

как и в опытах с опухолевыми клетками HeLa. Количественно степень вырезания димеров тимила из структуры ДНК в ходе темновой репарации сохранялась для диплоидных клеток такой же, как и для клеток HeLa (табл. 1). В среднем вырезанию за 24 часа инкубации подвергалось около 40% всех индуцированных димеров. Различия в количестве индуцированных димеров в разных опытах объясняются различиями в интенсивности источников ультрафиолетового излучения. Однако, несмотря на такое различие в числе индуцированных димеров, степень вырезания димеров тимила из ДНК облученных клеток была количественно одинаковой. Таким образом, эффективность вырезания не нарушается в замеч-

Таблица 1

Вырезание димеров тимила из ДНК диплоидных клеток легкого человека

№ опыта	Время инкубации после облучения, часы	Димерная область			Тиминовая область			ТГ, %	Доля димеров, оставшихся в ДНК, %	Доля димеров, вырезанных из ДНК, %
		суммарная активность, имп/мин	фон, имп/мин	чисто тиминовая активность, имп/мин	суммарная активность, имп/мин	фон, имп/мин	чисто тиминовая активность, имп/мин			
1	0	15344	5625	10219	999446	8500	990946	1,01	100	0
	9,5	5271	1950	3321	468929	4005	465429	0,71	70	30
	24	2830	1285	1545	207537	11800	195787	0,79	78	22
2	0	33412	11150	22262	893241	18000	875241	2,54	100	0
	9,5	14774	4720	10054	676709	6700	670009	1,57	62	33
	24	16727	5300	11424	807136	7900	799236	1,43	56	44
3	0	28682	7450	21232	745109	41000	704109	3,01	100	0
	6	13332	2400	11432	562122	10000	552122	2,03	68	32
	10	12121	2100	10021	444179	5000	439179	2,28	75	25
4	24	14026	3210	10816	430033	9450	450583	2,33	79	21
	0	21246	3750	17496	545663	12000	533663	3,28	100	0
	6	10040	2790	7250	324699	3500	321199	2,26	69	31
	10	5767	1080	4637	255952	5000	250952	1,81	55	45
	24	12592	1600	10992	539545	9500	530045	2,07	63	37

ной степени при увеличении количества индуцированных у.-ф. облучением димеров тимина.

Подобно тому, как это наблюдалось с клетками HeLa, выщепление димеров из ДНК клеток легкого эмбриона человека осуществлялось наиболее эффективно в первые часы после облучения, а к 10 часу скорость выщепления димеров тимина из ДНК облученных клеток снижалась (рис. 1), и до 24 часа оставалась практически неизменной.

Таким образом, при изучении процесса вырезания диаметров тимина из ДНК облученных нормальных диплоидных клеток культуры легкого эмбриона человека нами было установлено, что этот процесс осуществляется примерно с той же эффективностью, как и в опухолевых клетках человека HeLa. Во время проведения нами этой работы была опубликована статья из лаборатории Р. Сетлоу (⁴), в которой было доказано существование процесса вырезания димеров тимина из ДНК клеток кожи человека. В совокупности с нашими данными эти результаты свидетельствуют о широкой распространенности темповой репарации у человека.

Группа молекулярной генетики
Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук
им. В. И. Ленина

Поступило
22 VII 1971

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Regan, J. Trosco, W. Carrier, Biophys. J., **29**, 319 (1968). ² M. Horikawa, O. Kaido, T. Sugahara, Nature, **218**, 489 (1968). ³ B. Soffer, L. Matusevich, G. Goroshkina, Радиобиология, **10**, 275 (1970). ⁴ R. Setlow, J. Regan et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **64**, 1035 (1969). ⁵ J. Cleaver, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **63**, 425 (1969). ⁶ L. Hayflick, P. Moorhead, Exp. Cell Res., **25**, 585 (1961). ⁷ P. Moorhead, P. Nowell et al., Exp. Cell Res., **20**, 613 (1960).