

Г. Д. ЗАСУХИНА, Н. И. ГОРДЕЕВА

**ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МУТАЦИЙ ХРОМОСОМ
В КЛЕТКАХ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО РЕПАРАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ, ПРИ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 14 XI 1974)

В последние годы в сообщениях о повреждающем действии на хромосомы мутагенов различной природы определенная роль в формировании хромосомных aberrаций отводится репаративным механизмам клеток. Так, было показано, что в клетках кожи больных *Xeroderma pigmentosum* при облучении их у.-ф. светом образуется в четыре раза больше хромосомных повреждений, чем в клетках кожи здоровых людей ⁽¹⁾. Аналогичные данные были получены на клеточных линиях крысиной лимфосаркомы, различающихся по чувствительности к X-облучению. В этой работе отмечено, что в резистентной клеточной линии уровень хромосомных aberrаций ниже, чем в клетках, чувствительных к X-облучению ⁽²⁾. Различие в динамике формирования у.-ф. индуцированных хромосомных мутаций было также обнаружено в первичных и перевиваемых клетках почек сирийского хомяка, контрастирующих по репаративной активности ⁽³⁾. Такая же закономерность наблюдалась в этой клеточной системе при инфицировании клеток РНК вируса полиомиелита. Поскольку эти клетки нечувствительны к нативному вирусу полиомиелита, повреждающее действие вируса ограничивалось продолжительностью одного вирусного цикла ⁽⁴⁾.

Наши исследования посвящены изучению формирования хромосомных aberrаций в системе клеток коммерческих и безлейкозных куриных эмбрионов, которые отличаются по способности «вырезать» из ДНК клеток тиминовые димеры, образующиеся после у.-ф. облучения ⁽⁵⁾. Клетки безлейкозных куриных эмбрионов характеризовались активной репарирующей системой, в клетках коммерческих эмбрионов эта система была репрессирована. В качестве агента, индуцирующего структурные хромосомные мутации, был использован вирус клещевого энцефалита (штамм «Пан»), активно репродуцирующийся в этих клетках и вызывающий латентное течение инфекции.

Заражение клеток производили вируссодержащей культуральной жидкостью через сутки после посева, в момент наибольшей митотической активности. Инфекционная доза вируса составляла 0,1—0,2 б.о.е. на клетку. В контрольные клетки вносили культуральную жидкость, не содержащую вирус. Клетки фиксировали через 6, 12, 18 и 24 часа после инфицирования. Первые три срока выявляли судьбу вирусиндуцированных хромосомных повреждений на протяжении одного клеточного цикла. Продолжительность вирусного цикла составляла 9—12 час. За 4 часа до фиксации клеток в культуру клеток вводили колхицин в концентрации 0,75 мкг/мл.

После гипотонической обработки колхицин клетки фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в отношении 3:1, препараты окрашивали азури-эозином. Цитогенетический анализ проводили на шести парах наиболее крупных, легко идентифицируемых хромосом. Из-за большого числа «точечных» хромосом в кариотипе кур был невозможен учет

Таблица 1

Анализ хромосомных мутаций в культурах клеток коммерческих и безлейкозных куриных эмбрионов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита (штамм «Пап»)

Клетки коммерческих куриных эмбрионов						Клетки безлейкозных куриных эмбрионов							
Время, час.	Культуры	Число исследованных клеток	Число разрывов на 1 абберационную клетку	Число абберационных клеток, %	P	Число пробелов	Время, час.	Культуры	Число исследованных клеток	Число разрывов на 1 абберационную клетку	Число абберационных клеток, %	P	Число пробелов
6	Инфицированные	230	1,0	3,0±2,2	0,1	7	6	Инфицированные	200	1,1	6,0±3,2	0,1	2
	Контрольные	220	1,0	4,5±2,7				Контрольные	185	1,2	5,9±3,2		
12	Инфицированные	410	1,1	8,8±2,7	0,05	13	12	Инфицированные	420	1,1	10,2±2,7	0,05	10
	Контрольные	410	1,0	4,4±2,0				Контрольные	345	1,1	5,2±2,3		
18	Инфицированные	410	1,1	10,9±2,7	0,05	14	18	Инфицированные	450	1,1	5,8±2,1	0,1	7
	Контрольные	410	1,0	5,7±2,0				Контрольные	330	1,0	6,9±2,7		
24	Инфицированные	425	1,0	10,3±2,7	0,1	8	24	Инфицированные	365	1,0	7,9±2,7	0,1	13
	Контрольные	360	1,1	7,4±2,7				Контрольные	320	1,0	6,3±2,6		

мелких фрагментов, поэтому из структурных повреждений регистрировались лишь хроматидные разрывы со смещением отделившихся участков.

Цитогенетический анализ клеток, представленный в табл. 1, показал, что через 6 час. после инфицирования как в клетках коммерческих, так и в клетках безлейкозных куриных эмбрионов уровень клеток с хромосомными абберациями не отличался от контрольного. К 12 час. репродукции вируса (времени, соответствующему выходу вируса из клеток) наблюдалось достоверное увеличение количества абберационных клеток до 8,8% в клетках коммерческих и 10,2% в клетках безлейкозных куриных эмбрионов при контролях 4,4% и 5,2% соответственно. Вирусиндуцированные хромосомные повреждения были представлены, главным образом, одиночными хроматидными разрывами, редко превышающими один разрыв на 1 клетку.

К 18 час. (времени, соответствующему концу клеточного цикла) в клетках коммерческих куриных эмбрионов наблюдалась та же картина, что и через 12 час. после инфицирования. Уровень абберационных клеток в инфицированных культурах достоверно отличался от контрольного, не обнаруживая тенденции к снижению. Однако в культурах безлейкозных куриных эмбрионов, активных по системе «вырезания», количество клеток с поврежденными хромосомами резко снижалось до контрольного уровня.

При анализе данных, полученных через 24 часа после инфицирования культур, оказалось, что в обеих клеточных системах уровень хромосомных аббераций в опыте достоверно превышает контрольный уровень. Одинаковый результат в клетках, различающихся по репаративной активности, можно объяснить либо тем, что к 24 час. в клетках коммерческих куриных эмбрионов под действием вируса клещевого энцефалита происходит депрессия репаративной активности, как это было показано ранее (5), либо участием системы пострепликативной репарации, действующей во время акта репликации. Элиминация поврежденных клеток из популяции вряд ли может иметь ведущее значение, так как регистрируемые изменения хромосом (одиночные хроматидные разрывы) не всегда являются летальными для клеток.

Таким образом, нами показано, что репродуцирующийся вирус клещевого энцефалита в период, соответствующий выходу вирусных частиц из клетки, индуцирует структурные мутации хромосом в клетках коммерческих и безлейкозных куриных эмбрионов. Если в клетках, дефектных по

системе репарации, количество хромосомных aberrаций сохраняется до конца клеточного цикла, то в клетках безлейкозных куриных эмбрионов с активной системой репарации поврежденные хромосомы полностью восстанавливаются. Следовательно, даже при активной репродукции вируса репаративные механизмы клеток в состоянии «купировать» некоторое число вирусиндуцированных хромосомных повреждений в условиях нарастания титров вируса.

Институт общей генетики
Академии наук СССР

Поступило
14 XI 1974

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Parrington, J. Delhanty, H. Baden, Ann. Human Genet., v. 35, 149 (1971).
² D. Scott, M. Fox, B. Fox, Mutat. Res., v. 22, 2 (1974). ³ Н. П. Дубинин, Г. И. Горошкина и др., ДАН, т. 210, 2 (1973). ⁴ Н. П. Дубинин, Г. И. Горошкина и др., ДАН, т. 212, № 3 (1973). ⁵ Н. П. Дубинин, Г. Д. Засухина, Л. Л. Матусевич, ДАН, т. 212, № 2 (1973).