

В. М. МИХЕЛЬСОН, Э. В. АЙКАЗЯН

**ОТСУТСТВИЕ ВОССОЕДИНЕНИЯ ОДИНОЧНЫХ РАЗРЫВОВ
ДНК, ВЫЗВАННЫХ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕМ В КЛЕТКАХ
БОЛЬНЫХ ПИГМЕНТНОЙ КСЕРОДЕРМОЙ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 4 II 1972)

Изучение молекулярных механизмов пострадиационной репарации клеток достигло серьезных успехов лишь после того, как были обнаружены (главным образом среди микроорганизмов) мутанты с повышенной радиочувствительностью. Исследуя способность таких мутантов репарировать поврежденную облучением ДНК и пути этой репарации, удалось во многом объяснить причины разной радиочувствительности клеток (¹, ²). Что же касается многоклеточных организмов, тем более млекопитающих, то линии — аналоги с разной радиочувствительностью (в особенности к ионизирующей радиации) среди них почти неизвестны, что сильно затрудняет изучение пострадиационной репарации их клеток (³, ⁴).

Редкое наследственное заболевание человека — пигментная ксеродерма (*Xeroderma pigmentosum*) является единственным известным в настоящее время заболеванием, связанным с дефектом пострадиационного восстановления. Эта болезнь проявляется в повышенной чувствительности поверхностных тканей к солнечному свету (⁶⁻⁸). Как показано в ряде исследований (⁵, ⁹⁻¹²), высокая чувствительность клеток этих больных к у.-ф. облучению обусловлена их неспособностью репарировать поврежденную ДНК. В то же время репарация ДНК, поврежденной ионизирующими излучениями (в том числе воссоединение одиночных разрывов), идет в клетках таких больных столь же интенсивно, как и у здоровых лиц (⁹, ¹¹, ¹³). В настоящей работе удалось, однако, обнаружить, что при определенной форме пигментной ксеродермы клетки полностью лишены способности воссоединять одиночные разрывы ДНК, вызванные гамма-облучением.

Репарацию ДНК исследовали в лимфоцитах больной 15 лет с классической картиной пигментной ксеродермы с поражением кожи и глаз. Контролем служили клетки авторов статьи. Лимфоциты получали из капиллярной крови пункцией кончика пальца и культивировали по методике Абрискеты (¹⁴) в модификации Горощенко 54 часа при 37°. Н³ — тимидин (активность 5,2 С/ммол, в концентрации 1 мС/мл) вносили на весь период инкубации, после чего культуры подвергали гамма-облучению на аппарате ЛМБ-γ1 (Cs¹³⁷) дозами 10, 20 и 30 крад (3 крад/мин.) при 0°. Облученные культуры либо замораживали немедленно при -70°, либо инкубировали 30—120 мин. при 37°, и после этого замораживали. Лимфоциты отделяли центрифугированием. К 0,5 мл суспензии лимфоцитов (1—2 · 10⁵ клеток) добавляли 0,5 мл лизирующего раствора, содержащего 1% дезоксихолата и 0,04% ЭДТА в 0,5 М NaCl при pH 12,8. Изокинетический щелочной градиент сахарозы 5—26,5% (объем 24 мл) подслаивали в центрифужные пробирки с лизатом и центрифугировали в роторе SW-25,1 ультрацентрифуги Spinco L2—65K 4 часа при 24 000 об/мин. при 20°. Фракции (по 1 мл) с градиента осаждали 7% HClO₄ в присутствии альбумина, собирали на нитроцеллюлозные фильтры и определяли радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике Nuclear Chicago Mark II.

На рис. 1, 2 показано распределение радиоактивности по фракциям. В лимфоцитах здоровых лиц пик седиментационного профиля ДНК при облучении дозой 20 крад сдвигается в легкую сторону (рис. 1, а, б — 14 фракция после облучения по сравнению с 8 фракцией в необлученном контроле), что отражает появление одиночных разрывов в ДНК. Пострадиационная инкубация при 37° приводит к постепенному возвращению пика в исходное положение (почти полное восстановление через 60 мин. — рис. 1, в), т. е. к воссоединению вызванных облучением одиночных разрывов.

В лимфоцитах больной пигментной ксеродермой облучение также вызывает сдвиг пика седиментационного профиля в легкую сторону (рис. 2,

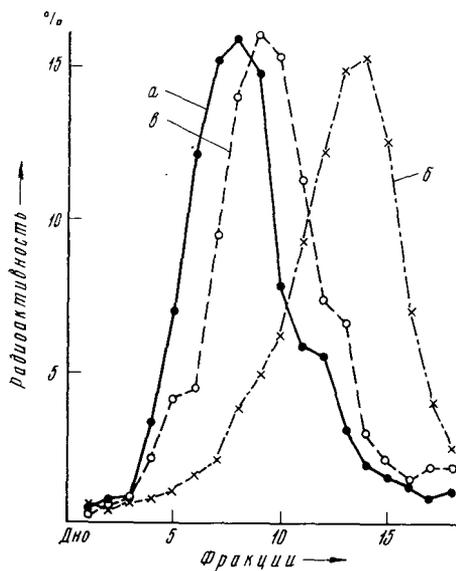


Рис. 1

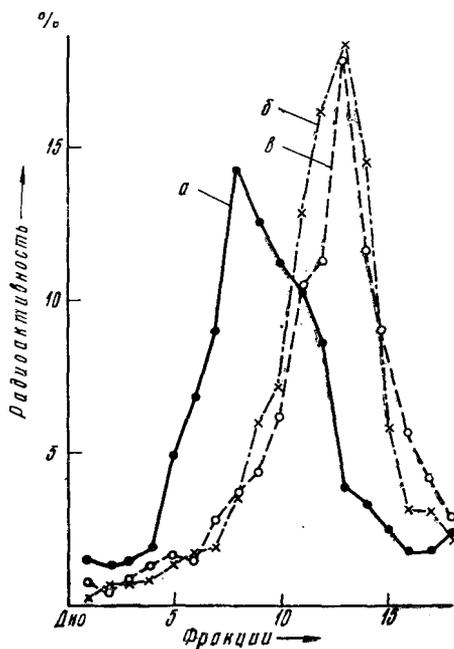


Рис. 2

Рис. 1. Воссоединение вызванных облучением однонитевых разрывов ДНК в лимфоцитах здоровых лиц. а — седиментационный профиль ДНК необлученных клеток, б — сразу после облучения дозой 20 крад, в — инкубация 60 мин. при 37° после облучения дозой 20 крад.

Рис. 2. Отсутствие воссоединения вызванных облучением однонитевых разрывов ДНК в лимфоцитах при пигментной ксеродерме (обозначения те же, что и на рис. 1)

а, б), однако пострадиационная инкубация этих клеток, в отличие от клеток здоровых лиц, не приводит к возвращению пика в область больших молекулярных весов (рис. 2, в), т. е. воссоединения одиночных разрывов ДНК не происходит. Удлинение срока пострадиационной инкубации до 120 мин. не меняет положения пика. Те же закономерности были обнаружены и при облучении клеток дозами 10 и 30 крад.

Таким образом, ДНК лимфоцитов исследованной больной не репарируется от вызванных гамма-облучением одиночных разрывов. Между тем в работе Клейера и сотрудников (13) показано, что воссоединение одиночных разрывов ДНК в клетках больных пигментной ксеродермой происходит с той же скоростью и полнотой, как и в клетках здоровых лиц. Следует сделать вывод, что Клейер и мы имеем дело с различными формами заболевания, клинически близкими, но различающимися по характеру генетического дефекта.

Из работ (⁹, ¹¹) известно, что в изучавшихся случаях пигментной ксеродермы генетический дефект состоит в нарушении первого этапа репарации ДНК от у.-ф. повреждений по способу выплечения — замещения димеров — инцизии, которая осуществляется ферментом у.-ф. эндонуклеазой. Клейер, видимо, имел дело с той же формой. В нашем случае, вероятно, отсутствует или недостаточно фермент, необходимый для воссоединения разрывов ДНК (лигаза) или для репаративного синтеза ДНК (ДНК — полимеразы). По-видимому, этой же формой заболевания страдают описанные Юнгом (¹⁵) больные, в клетках которых обнаружен ослабленный репликативный синтез ДНК.

Следует отметить, что поскольку два разных дефекта ведут к одному и тому же заболеванию, проявляющемуся в повышенной у.-ф. чувствительности (если в нашем случае не двойная мутация, что будет специально исследовано), то это свидетельствует о наличии одной общей ферментной системы, осуществляющей репарацию ДНК от повреждений, вызываемых как у.-ф., так и ионизирующей радиацией. В данной работе мы не учитывали возможности репарации клеток в момент самого облучения, которая описана для бактерий (¹⁶, ¹⁷). Можно думать, что жизнеспособность клеток при пигментной ксеродерме частично поддерживается за счет нормально идущей быстрой компоненты репарации.

Итак, существуют по крайней мере две разные формы пигментной ксеродермы с различными генетическими дефектами, изменяющими радиочувствительность клеток. При этом впервые среди клеток млекопитающих обнаружена мутация, определяющая неспособность к воссоединению одиночных разрывов ДНК.

Авторы выражают благодарность Ю. Л. Горощенко и Н. В. Томилину за методические консультации.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
4 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. B. Setlow, W. L. Carrier, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 2, 226 (1964).
² В. Д. Жестяников, Восстановление и радиорезистентность клетки, Л., 1968.
³ Н. В. Лучник, В кн.: Пострадиационная репарация, М., 1970, стр. 154. ⁴ В. М. Михельсон, Цитология, 13, 8, 932 (1971). ⁵ M. Karosi, Öster. Med. Jahrb., S, 619 (1882). ⁶ М. Г. Гулбис, С. А. Латковская, Педиатрия, 1, 76 (1963). ⁷ W. B. Read, B. Landing et al., J. Am. Med. Assoc., 207, № 11, 2073 (1969). ⁸ J. E. Cleaver, Nature, 218, 5142, 652 (1968). ⁹ J. E. Cleaver, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 2, 428 (1969). ¹⁰ J. E. Cleaver, Int. J. Rad. Biol., 18, 6, 557 (1970).
¹¹ R. B. Setlow, J. D. Regan et al., In: IV Intern. Congr. Biophys. Abstr., N. Y., 1969, p. 278. ¹² D. Bootsma, M. P. Mulder et al., Mutat. Res., 9, 5, 507 (1970).
¹³ W. J. Kleijer, P. H. M. Lohman et al., Mutat. Res., 9, 5, 517 (1970). ¹⁴ J. A. Abrisqueta, Human Chromos. Newsl., 18, 5 (1966). ¹⁵ E. G. Jung, Nature, 228, 5269, 361 (1970). ¹⁶ P. Alexander, C. J. Dean et al., In: Radiat. Protect. Sens., London, 1970, p. 15. ¹⁷ C. Town, K. Smith, H. Kaplan, Science, 172, 3985, 851 (1971).