

Ф. Л. ВИХАНСКАЯ, Р. И. ПИНТО

**ВОССОЕДИНЕНИЕ ДВОЙНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК
В γ -ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ HeLa Ж-63 ПРИ ИНКУБАЦИИ
В ПРИСУТСТВИИ КОФЕИНА**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 29 VII 1975)

Механизм воссоединения двойных разрывов ДНК клеток млекопитающих еще далеко не исследован. Однако в ряде работ подтверждается существование энзиматической репарации двойных разрывов ДНК в облученных клетках (¹⁻³). Кроме того, установлены некоторые различия при воссоединении одиночных и двойных разрывов ДНК. Показано, что для репарации двойных разрывов ДНК необходимо большее время инкубации клеток после облучения, чем для репарации одиночных (³). Степень восстановления молекулярного веса двухтяжевой молекулы ДНК после облучения клеток в дозах, превышающих 50 крад, понижается (²). Возможно, эти различия в ходе процессов воссоединения одиночных и двойных разрывов ДНК и были причиной того, что долгое время подвергалась сомнению возможность воссоединения двойных разрывов (⁴).

Целью настоящей работы было исследование воссоединения двойных разрывов ДНК клеток HeLa Ж-63 после γ -облучения, а также изучение влияния на процесс воссоединения ингибитора репарации — кофеина. Работа проведена на асинхронной монослойной культуре клеток HeLa Ж-63, выращиваемой на среде, содержащей гидролизат лактальбумина, сыворотку человеческой крови.

Клетки в лаг-фазе роста метили 6 час. ³H-тимидином (0,2 мкС/мл, 11,6 С/ммол), затем отмывали нерадиоактивной средой и культивировали до момента облучения 18 час., что давало возможность анализировать эффекты в матричной ДНК (⁵). В некоторых опытах для введения метки в белковые молекулы клетки культивировали 24 часа в присутствии ¹⁴C-лейцина (25 мкС/мл, 14,4 С/ммол). Монослой клеток снимали 0,02% версеном.

Клетки облучали в растворе 0,02% версена при 0° на установке ЛМБ- γ -1 (¹³⁷Cs), мощность дозы 2800 рад/мин на воздухе. Для изучения воссоединения двойных разрывов облученные клетки помещали в питательную среду на 2,5 часа при 37°. В опытах с кофеином ингибитор в концентрации 10⁻² М добавляли в среду на все время репарации.

Клетки осаждали из раствора версена центрифугированием при 0° 10 мин. при 4000 об/мин. Затем клетки (2·10⁵) лизировали прямо на дне центрифужных стаканов в 0,2 мл 1% дезоксихолата+0,01 М ЭДТА (рН 8) в течение 3—4 час. при комнатной температуре. Изокинетический градиент сахарозы в 1 М NaCl, 0,01 М ЭДТА (рН 8) с начальной концентрацией 5% рассчитывали по методу Нолля (⁶), значения V_m и C_r были соответственно равны 4,03 мл и 29,5%. Центрифугирование проводили в бакет-ротаторе SW65L препаративной центрифуги «Beckman» при 10 000 об/мин 14 час. при 20°. Градиент фракционировали от дна центрифужного стаканчика при помощи перистальтического насоса. Фракции собирали на диски фильтровальной бумаги, затем высушивали и промывали в 5% ТХУ, спирте, эфире. Радиоактивность измеряли в растворе 0,1 г ROPOR—4 г РРО на 1 л толуола в счетчике «Nuclear Chicago Mark 11».

Коэффициент седиментации ДНК рассчитывали по формуле Ноля (⁶), молекулярный вес двухтяжевой ДНК в указанном градиенте — по Штудиеру (⁷). Средневесовой молекулярный вес оценивали по Чарлсби (⁸). Среднее число разрывов, приходящихся на один дальтон двухтяжевой ДНК, рассчитывали по формуле $\lambda = 2[1/(M_w)_0 - 1/(M_w)_k]$, где $(M_w)_0$ — средневесовой молекулярный вес ДНК из облученных клеток, $(M_w)_k$ — средневесовой молекулярный вес ДНК из необлученных клеток.

Описанная методика позволяла получать воспроизводимые результаты. Средневесовой молекулярный вес ДНК необлученных клеток составлял $1,5 \cdot 10^9$. В опытах с меченым лейцином (¹⁴C) не было выявлено повышение радиоактивности ¹⁴C в области пика ДНК, что указывало на отсутствие примесей ДНК. Для повышения достоверности результатов были

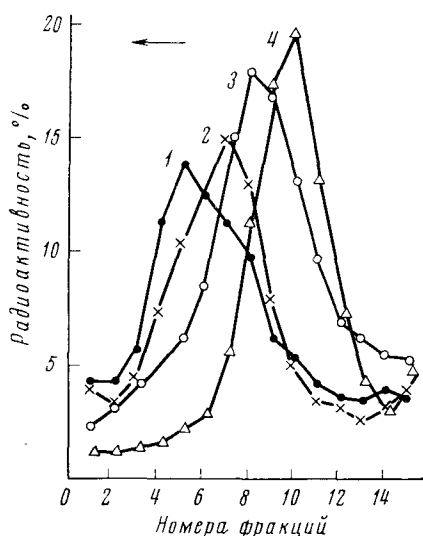


Рис. 1

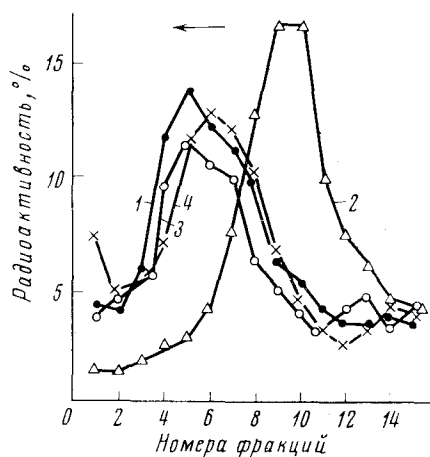


Рис. 2

Рис. 1. Профили седиментации ДНК необлученных клеток (1) и облученных в дозах 10 крад (2), 20 крад (3) и 30 крад (4)

Рис. 2. Профили седиментации ДНК необлученных клеток (1), облученных в дозе 20 крад (2), а затем инкубированных 2,5 часа при 37° в чистой питательной среде (3) и в присутствии кофеина, $10^{-2} M$ (4). Стрелкой указано направление седиментации

применены условия центрифугирования, предложенные Лемоном и Ормеродом (⁴), т. е. скорость центрифугирования составляла 10 000 об/мин.

Облучение клеток HeLa в дозах 10, 20, 30 крад γ -лучами вызывало смещение профилей седиментации ДНК в легкую сторону (рис. 1). Для ДНК, облученной в дозах 10, 20, 30 крад, вычисляли M_w и среднее число разрывов λ . Было рассчитано уравнение линейной регрессии для данного промежутка доз: $B = 0,3 \cdot 10^{14} R$, где R — доза облучения в рад, B — число двойных разрывов на 1 г ДНК. Наши данные об эффективности накопления двойных разрывов ДНК хорошо согласуются с данными (⁴).

Исследовалось восстановление двойных разрывов ДНК после облучения клеток HeLa в дозе 20 крад при инкубации в течение 2,5 час. Результаты одного из опытов представлены на рис. 2. Инкубация вызвала смещение профилей седиментации ДНК в тяжелую сторону, в положение, практически полностью совпадающее с профилем седиментации необлученной ДНК. Это свидетельствует о восстановлении двойных разрывов ДНК при инкубации.

Инкубация клеток, облученных в дозе 20 крэд в течение 2,5 час. в присутствии кофеина (10^{-2} М), не изменяла профиль седиментации ДНК по сравнению с профилем седиментации ДНК клеток, проинкубированных после облучения в чистой питательной среде (рис. 2). Таким образом, влияния кофеина на процесс воссоединения двойных разрывов ДНК обнаружено не было. Кофеин в этой концентрации, введенный в среду с необлученными клетками, также не изменял характера седиментации ДНК.

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют о том, что в клетках HeLa Ж-63, облученных в дозах 20 крэд, а затем проинкубированных в питательной среде 2,5 часа при 37°, происходит практически полное воссоединение двойных разрывов ДНК. Сопоставим данные по выживаемости облученных клеток HeLa Ж-63, полученные в работе (9), и наши данные о количестве двойных разрывов, приходящихся на 1 клетку, при облучении. Экстраполяция данных об эффективности накопления двойных разрывов ДНК в области низких доз показывает, что при облучении в дозе 50 рад в клетке возникает 15 двойных разрывов. Выживаемость при этой дозе составляет 90%. Это сравнение позволяет предположить, что при облучении в дозах, сопоставимых с выживаемостью клетки, воссоединение двойных разрывов ДНК имеет биологический смысл и вносит вклад в судьбу облученной клетки. Однако следует иметь в виду, что методика градиентного центрифугирования дает представление лишь о восстановлении молекулярного веса ДНК и не позволяет судить об идентичности структуры по нуклеотидному составу ДНК из необлученных клеток и ДНК, воссоединившейся после облучения и инкубации клеток.

В наших опытах кофеин не оказывал влияния на воссоединение двойных разрывов ДНК клеток, облученных в дозе 20 крэд (рис. 2). В то же время, как следует из работы (10), выполненной на той же линии клеток HeLa Ж-63, кофеин существенно снижает выживаемость облученных клеток. Эти данные свидетельствуют о сложном механизме его действия на облученные клетки.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
29 VII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. M. A. Cole, Abstr. Rad. Res. Soc. Meeting, Dallas, Texas, 1970. ² P. M. Corry, A. Cole, Nature New Biol., v. 245, 143, 100 (1973). ³ S. Sawada, S. Okada, Intern. J. Rad. Biol., v. 21, 6, 599 (1972). ⁴ A. R. Lehmann, M. G. Ormerod, Biochim. et biophys. acta, v. 217, 2, 268 (1970). ⁵ B. W. Fox, M. Fox, Intern. J. Rad. Biol., v. 18, 5, 479 (1970). ⁶ H. Noll, Nature, v. 215, 360 (1967). ⁷ F. W. Studier, J. Mol. Biol., v. 11, 373 (1965). ⁸ A. Charlesby, Proc. Roy. Soc., v. 224A, 120 (1954). ⁹ В. П. Парибок, Е. Г. Семенова, Цитология, т. 12, 11, 1423 (1970). ¹⁰ Е. Г. Семенова, З. М. Волкова, В. Д. Жестяников, Цитология, т. 16, 8, 1010 (1974).