

## Влияние гетерогенности системы соматических клеток млекопитающих на проявление мутагенеза, индуцированного трансформирующими генами аденовируса

С. И. Лукаш\*, Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>

Институт кибернетики НАН Украины  
252187, Киев, пр. Академика Глушкова, 40

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

---

*На основании анализа литературных и собственных данных предложена математическая модель проявления индуцированного мутагенеза, учитывающая клеточную гетерогенность по периоду деления в системе онкогенный аденовирус — соматическая клетка млекопитающих. Исследовано влияние параметров, использованных при построении математической модели, на динамику мутагенеза. Результаты теоретических расчетов сопоставляются с экспериментальными данными.*

---

Опухолевые клетки *in vivo*, нормальные и трансформированные клетки *in vitro* обладают выраженной фенотипической гетерогенностью, что является результатом комбинации генотипических изменений, селекции определенных субпопуляций клеток и физиологической адаптации [1]. Сравнение свойств нормальных и злокачественных клеток часто затруднено из-за того, что при планировании экспериментов и представлении результатов, полученных разными исследователями, не учитываются условия поддержания клеточной культуры, число удвоений популяции, время генерации клеточных субкультур [2].

Анализ имеющихся данных [3] позволяет сделать заключение, что кинетика пролиферации трансформированных клеток может отличаться от таковой нормальных, по крайней мере, по четырем параметрам. Во-первых, по времени прохождения клеточного цикла. Во-вторых, по изменению продолжительности той или иной фазы клеточного цикла. В-третьих, по количественному распределению клеток, находящихся в различных фазах цикла. В-четвертых, по скорости клеточного метаболизма.

Относительная однородность длительно культивируемых линий достигается клонированием клеток аналогично тому, как это делается на бактериях [4]. Однако даже в клонированных культурах можно выделить субпопуляции, различающиеся по длительности клеточного цикла. Чем дольше пассируется культура, тем больше возрастает степень гетерогенности. При моделировании структуры таких популяций могут быть использованы подходы и параметры, разработанные на микроорганизмах: количество генераций (дискретное время) и астрономическое (непрерывное) время [5, 6].

---

\*Correspondence address.

Механизмы регуляции клеточного роста, злокачественной трансформации и мутагенеза неразрывно связаны с клеточным циклом. По классификации, разработанной Говардом и Пелком [7], клеточный цикл у эукариот разделен на четыре фазы: М (для митоза), S (для синтеза ДНК) и две промежуточные фазы ( $G_1$  и  $G_2$ ), отделяющие фазы S и М. Считается общепризнанным [1—3], что нарушение регуляции размножения является общим механизмом, лежащим в основе злокачественной трансформации клеток. Связь генетической изменчивости клеток с регуляцией клеточного роста также показана, хотя она и менее очевидна [8]. При оптимальном времени прохождения клеточного цикла обеспечивается реализация всех матричных процессов и сохранение генетической стабильности. Сведений такого рода гораздо меньше для эукариотических клеток, нежели для прокариотических [9].

Опухолеродные вирусы являются активными стимуляторами пролиферативных процессов [2, 3, 10, 11]. Клетки, трансформированные ДНК-содержащими онкогенными вирусами, не способны переходить в состояние покоя ( $G_0$ ) даже при очень высоких плотностях насыщения [2, 3]. Вероятно, ранние вирусспецифические белки (Т-антигены) оказывают регуляторное воздействие на критическую точку R (restriction) в фазе  $G_1$  таким образом, что происходит стимуляция репликации ДНК и рекомбинационных событий, приводящих к эффективной интеграции вирусных геномов с клеточной ДНК [10—15] при одновременном ингибировании эксцизионной системы репарации [16]. Наблюдаемое в экспериментах по мутагенезу повышение частоты хромосомных разрывов и генных мутаций в ранние сроки после трансфекции соматических клеток онковирусами [17—31], по-видимому, является следствием этого регуляторного воздействия на матричные процессы. Именно с этого момента клетки приобретают трансформированный фенотип, который поддерживается в значительной степени путем постоянной «насильственной» реинициации синтеза клеточной ДНК [10—13].

Со временем развиваются и другие признаки злокачественного роста [1—3], в становлении которых могут участвовать как генетические, так и эпигенетические изменения. В случае высоко- и слабоонкогенных серотипов аденовирусов, в частности, исследуемого нами BAV3, за стимуляцию вхождения клеток в фазу S и поддержание трансформированного фенотипа ответственна ранняя область вирусного генома E1 (опероны E1A и E1B) [32—35].

В данной статье детально рассмотрена структура некоторых параметров, использованных нами при построении математической модели индуцированного мутагенеза в системе онкогенный аденовирус — соматическая клетка [36].

Как и в случае бактерий, только часть популяции клеток млекопитающих *in vitro* способна поглощать экзогенную ДНК, а именно — компетентные клетки [9]. Под влиянием ранних вирусных генов компетентные клетки могут трансформироваться. Другая часть клеток остается нетрансфицированной, или нормальной. Мы попытались рассмотреть зависимость изменения частоты мутантов во времени от структуры такой смешанной гетерогенной популяции с учетом неоднородности ее состава по периодам деления клеток. При этом для полноты анализа учитывались данные по индукции мутаций в различных маркерных генах под воздействием вирусов и ранних вирусных генов, полученные нами и другими исследователями [17—31], а также данные по встраиванию и эволюции интегрированных вирусных последовательностей [32—35, 37—45].

Результаты и выводы представленных выше работ [1—45] позволяют по-новому взглянуть на динамику мутагенеза, вызванного экзогенной

вирусной ДНК, и на основании математического моделирования явления предложить возможное объяснение имеющимся фактам.

В выбранном для эксперимента множестве клеток (исходная популяция)  $N_0$  выделим подсистемы клеток (субпопуляции)  $N_1, \dots, N_n$ , каждой из которых можно приписать соответственно средний период деления  $\tau_1, \dots, \tau_n$ . Тогда отклонение среднего периода деления  $\tau_0$  всего множества от минимального или максимального значений  $\tau_n$  в какой-либо из подсистем запишем так:  $\tau_0 - \Delta\tau < \tau_0 < \tau_0 + \Delta\tau$ . Чем меньше  $\Delta\tau$ , тем лучше синхронизирована система клеток по периоду деления.

При достаточно большом  $N_0$  и малом отклонении периодов  $|\tau_0 - \tau_n| \geq 0$  нормированная зависимость  $N/N_{max} = f(\tau)$  будет иметь вид нормального распределения Гаусса (рис. 1, а):

$$N/N_{max} = A \exp[-(\tau_0 - \tau_n)^2 / \sigma^2], \quad (1)$$

где  $A$  — предэкспоненциальный множитель;  $\sigma^2$  — дисперсия.

Как показано ранее [21], инфицирование клеток китайского хомячка и мыши онкогенным аденовирусом или трансфицирование их фрагментом ДНК, содержащим трансформирующую область E1, приводит к стимуляции клеточных делений и уменьшению длительности периода генерации. В контрольных культурах наблюдалось отклонение периода деления  $\tau'_0 \pm \Delta\tau = 1 \pm 0,1$  сут, а распределение клеток по периоду деления имело хорошее совпадение с аппроксимирующей кривой Гаусса с  $A'_0 = 120$ ,  $\tau'_0 = 1,01$  и стандартным отклонением  $\sigma' = 0,011$ . После введения экзогенной вирусной ДНК распределение клеток по периоду деления аппроксимировалось Гауссианом с параметрами  $A''_0 = 112$ ,  $\tau''_0 = 0,72$  и  $\sigma'' = 0,017$  (см. рис. 1).

В работах [20, 21] впервые помимо ранних сроков (3—7-е сут) проявления мутагенной активности вирусной ДНК в клетках китайского хомячка мутагенный эффект был зафиксирован и в более поздний срок: через две-три недели после трансфекции. Этот эффект совпадал во времени с максимумом проявления опухолеобразующей способности клеток, трансфицированных вирусом BAV3 [46]. Это позволило высказать предположение о том, что трансформирующая область вируса обладает мутаторными свойствами, т. е. ведет себя как ген-мутатор.

Как уже отмечалось, каждая клетка из подсистем проходит жизненный цикл, представляющий собой чередование индивидуальных фаз. Для на-

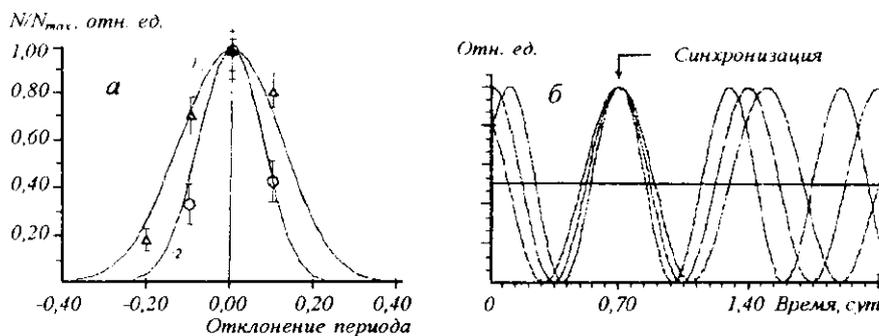


Рис. 1. Распределение наблюдаемых экспериментально значений периодов деления клеток китайского хомячка и их аппроксимация: а — отклонение периода деления клеток от среднего значения (1 — трансфицированные клетки,  $\tau_0 = 0,7$ ; 2 — нормальные клетки,  $\tau_0 = 1,0$ ); б — представление жизненного цикла клетки

глядности (см. рис. 1, б) жизненный цикл клетки опишем функцией синуса и будем считать на основании анализа имеющихся данных, что 1) индукция мутаций происходит в трансфицированных клетках с нерепарированными повреждениями; 2) индукция мутаций, вероятно, связана с индукцией репликации клеточной ДНК под влиянием ранних вирусных генов в S-фазе (для функции синуса эту фазу можно представить как его положительную полуволну); 3) не происходит изменений в длительности фаз каждой подсистемы; 4) для всех подсистем имеется конечная вероятность возникновения мутаций для каждой генерации по исследуемому локусу; 5) результат действия различных мутагенных факторов на популяцию аддитивен и 6) время жизни мутанта меньше или равно периоду деления нормальных клеток, поэтому в общей популяции они очень быстро вытесняются нормальными клетками. Пункт 6 в такой формулировке несколько упрощает расчеты. Но наше допущение вполне правомочно, если учесть тот факт, что по сравнению с нормальными клетками жизнеспособность исследуемых мутантов в стандартной ростовой среде снижена. Только создание специальных селективных условий позволяет обеспечить выживание и размножение мутантных клеток. При этом следует учитывать, что мутанты по локусу *hprt* независимого происхождения в действительности могут иметь различную жизнеспособность и периоды генерации.

Тогда для  $n$ -й подсистемы и для действующего мутагенного фактора  $\gamma_n$  можно записать:

$$m_n(t) = N_{int} \cdot \rho_n A_n \cdot \sin(v_n t - \phi_n). \quad (2)$$

Здесь  $m_n$ ,  $N_{int}$  и  $A_n$  — количество мутантов, трансфицированных клеток и их доля из общего числа клеток популяции в  $n$ -й подсистеме соответственно;  $\rho_n$  — функция вероятности появления мутантов по исследуемому локусу;  $v_n = \ln 2 / \tau_n$  — скорость и  $\phi_n$  — фазовое смещение, выбираемое из условия, что первое деление клеток является синхронным и происходит в момент времени  $t = \tau''_0$ . Этот момент отмечен на рис. 1, б. Примем, что единицей измерения времени и периода деления будут сутки.

В общем, исходя из представленной формулы можно допустить три возможных пути увеличения числа мутантов во времени: 1) увеличение количества трансфицированных клеток; 2) повышение вероятности образования мутантов и 3) комбинация первых двух. Вначале рассмотрим первый путь.

Для определения числа мутантов в популяции суммирование ведется по всему количеству субпопуляций с учетом количества трансфицированных клеток и вероятности появления мутантов в каждой из них:

$$M(t) = \sum_{n=1}^n m_n \sum_{n=1}^n N_{int} \cdot \rho_n \cdot A_n \cdot \sin[\ln 2(t/\tau_n) - \phi_n]. \quad (3)$$

Для наглядности на рис. 2 представлен результат наложения (суперпозиция) зависимостей  $m_n(t)$  для трех субпопуляций, доля которых в общей популяции составляет приблизительно 75%. Здесь использованы параметры реального распределения клеток по периодам деления:  $\tau_1 = 0,6$ ,  $\tau_2 = 0,7$ ,  $\tau_3 = 0,8$ ,  $A_1 = 0,61$ ,  $A_2 = 1$ ,  $A_3 = 0,81$  с коэффициентом масштабирования 0,25 для огибающей и вероятностью возникновения мутаций для каждой генерации  $\rho_n = 10^{-5} = \text{const}$ . Заметен спектр возможного появления мутантов в популяции за время эксперимента. Нетрудно рассчитать, что максимальная амплитуда суперпозиции  $M(t)$  будет при соблюдении условия:

$$k_1 \tau_1 = k_2 \tau_2 = k_3 \tau_3, \quad (4)$$

где  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  — количество генераций в каждой субпопуляции. В реальном времени максимальная амплитуда  $M(t)$  будет в момент времени:

$$t_{\max} = k_1 \tau_1 = k_2 \tau_2 = k_3 \tau_3. \quad (5)$$

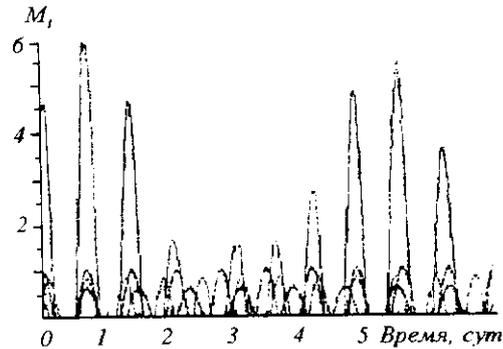


Рис. 2. Суперпозиция генераций подсистем клеточной популяции (экспрессия мутагена)

Можно установить связь между изменением периода деления клетки  $\tau$  и вероятностью появления мутанта в течение периода  $\rho_\tau$ . Подобный параметр впервые был введен в работе [5]. Этот параметр, по нашему мнению, является составляющим параметра  $\rho_n$ .

Согласно классическому определению, вероятность события равна отношению числа исходов, благоприятных для данного события, к общему числу исходов. Для  $\rho_\tau$  общим числом исходов будет величина отношения времени эксперимента к периоду деления:  $N = t/\tau = k$ , т. е. количество генераций, а числом исходов, благоприятных для данного события, будет число мутантов. Тогда

$$\rho_\tau = m/N = m\tau/t \quad (6)$$

или

$$\rho_\tau t = m\tau. \quad (7)$$

Правая часть выражения (7) для конкретного эксперимента есть постоянная величина. Тогда, переходя к пределу  $t \rightarrow \tau$ , получаем:

$$\lim_{t \rightarrow \tau} (\rho_\tau t) = \rho_\tau \tau = \text{const}. \quad (8)$$

Смысл этой формулы состоит в следующем. При изменении периода деления клетки в результате обработки мутагеном изменяется вероятность появления мутанта за время, равное периоду деления. Так, например, сокращение периода деления клетки (уменьшение  $\tau$ ) ведет к возрастанию вероятности появления мутанта, что может объясняться снижением эффективности работы систем репликации, репарации и рекомбинации, обеспечивающих генетическую стабильность клетки. Известно, что в клетках с укороченной S-фазой под влиянием Т-антигенов ДНК-геномных вирусов инициируется больше репликаторов (паповавирусы распознают точки начала репликации в области *Alu*-повторов) и соответственно больше таких повреждений ДНК, как однонитчатые разрывы [14, 15]. При недостаточной эффективности репарации они могут стать источником индуцированных мутаций. Таким образом, индукция репликации клеточной ДНК под влиянием онкогенных вирусов является одним из возможных механизмов мутагенеза.

Частоту мутаций можно определить по формуле, представленной в работе [5], следующим образом:

$$f(t) = M(t)/N_i, \quad (9)$$

где  $N_i$  — общее число клеток.

Задача теоретического расчета динамики мутагенеза сводится к определению зависимостей  $N_i(t)$ ,  $N_i(t)$  и некоторых коэффициентов, соответствующих реалиям.

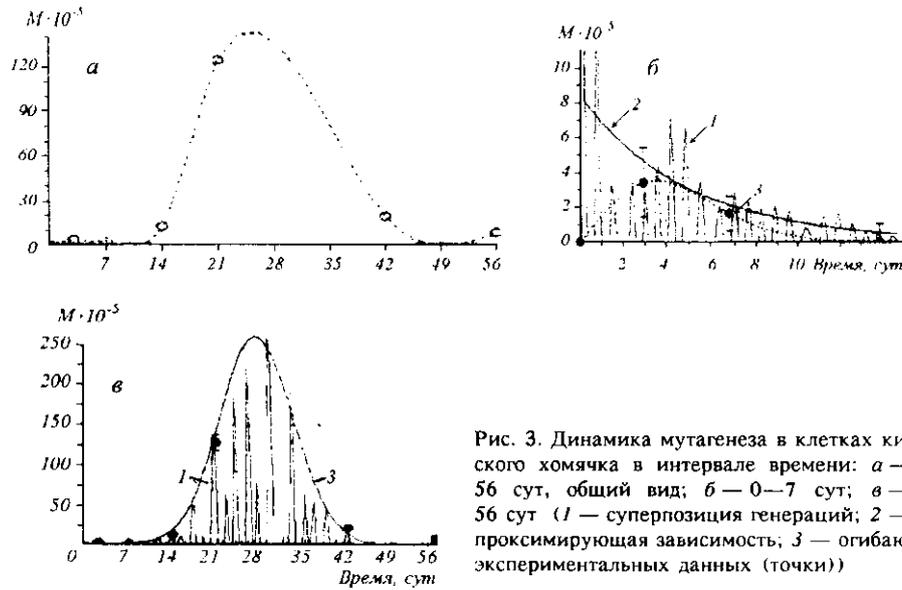


Рис. 3. Динамика мутагенеза в клетках китайского хомячка в интервале времени: а — 0—56 сут, общий вид; б — 0—7 сут; в — 0—56 сут (1 — суперпозиция генераций; 2 — аппроксимирующая зависимость; 3 — огибающая экспериментальных данных (точки))

На рис. 3, а, приведена зависимость частоты мутаций от времени из работы [21]. Аппроксимация экспериментально полученных данных выполнена функцией «spline». Можно выделить два временных участка, на которых имеются пики зависимости. Качественно эти наблюдения можно описать следующим образом. В результате трансфекции на клетки действовали два фактора:  $\gamma_1$  (вирусная ДНК вне клеточного генома) и  $\gamma_2$  (вирусная ДНК, ассоциированная с клеточным геномом). Оба фактора, являясь генетическим материалом экзогенного происхождения, оказывали воздействие на матричные процессы в клетке, что с малой конечной вероятностью приводило к появлению мутантов.

Начальное количество трансфицированных фактором  $\gamma_1$  клеток было  $N_{i01}$ , а фактором  $\gamma_2$  —  $N_{i02}$ . Нельзя не учитывать, что клетки  $N_{i02}$  просто составляют какую-то определенную часть субпопуляции  $N_{i01}$ , поскольку возникают вследствие ассоциации первоначально невстроенной экзогенной ДНК с определенными хромосомными структурами [4, 9]. Можно сказать, что субпопуляция  $N_{i01}$  доминирует сразу после обработки и состоит из трансфицированных клеток 1-го порядка, а субпопуляция  $N_{i02}$  становится доминирующей по прошествии определенного времени, пройдя через селекцию на ростовые преимущества в смешанной популяции, и состоит из трансфицированных клеток 2-го порядка.

Трансфицированные клетки  $N_{i01}$ , размножаясь, довольно быстро восстанавливаются (переходят в состояние нормальных клеток), так как происходит разбавление и деградация невстроенной экзогенной ДНК. Даже автономно реплицирующиеся структуры экзогенной ДНК постепенно утрачиваются вследствие аномальной сегрегации в митозе [9, 48]. В общем виде действие систем восстановления таково, что убыль трансфицированных клеток  $N_{i01}$  происходит по экспоненциальному закону и к 9—12-м сут их количество приближается к нулю. Мутагенный эффект проявляется в ранние сроки после инфицирования или трансфекции [17—22], и частота мутантов довольно быстро снижается в соответствии с динамикой снижения доли клеток  $N_{i01}$  в популяции.

Однако предполагаем, что часть клеток, утративших фактор  $\gamma_1$ , все же

сохраняет фактор  $\gamma_2$ . Действие второго фактора мы связываем с интегрированным фрагментом вирусной ДНК, который не подвержен быстрой элиминации и реплицируется в составе клеточного генома. Клетки, содержащие этот фактор, обладают ростовыми преимуществами и могут со временем стать доминирующей субпопуляцией. Действительно, было показано наличие встроенной вирусной ДНК в клетках китайского хомячка и мыши в отдаленные сроки после трансфекции [21, 22], что позволяет объяснить проявление генетической нестабильности: появление мутаций в последующих поколениях трансфицированных клеток.

Клетки  $N_{i02}$ , также размножаясь, восстанавливаются по аналогичному закону (но с другими параметрами) или мутируют с определенной частотой. На основании имеющихся литературных данных по ДНК-содержащим вирусам можно представить судьбу фактора  $\gamma_2$  следующим образом. После относительно недолгого периода структурной нестабильности, когда вирусные и фланкирующие клеточные последовательности подвергаются делециям и перестройкам [37—43], наступает период стабильного состояния интеграции. Это состояние сохраняется на протяжении многих клеточных поколений. Тем не менее, клеточные ферментные системы постепенно «распознают» чужеродные вирусные гены, и в процессе субкультивирования происходит их репрессия с помощью метилирования и поэтапная утрата [44—45]. Прежде всего утрачиваются поздние вирусные гены, затем ранние. Примерно на второй—третьей неделе снимается эффект ингибирования клеточных репаративных ферментов, обусловленный онковирусами [16]. Этот процесс гораздо более длительный по сравнению с элиминацией невстроенной ДНК экзогенного происхождения. Можно проследить, как изменение соотношения трансфицированных клеток 2-го порядка в популяции оказывает влияние на частоту выявляемых мутаций по исследуемому генному локусу. Вначале происходит постепенное увеличение доли этих клеток благодаря ростовым преимуществам и значительное увеличение частоты мутантов на второй—третьей неделе культивирования.

Вместе с увеличением доли мутабельных клеток в популяции начинает действовать противоположная тенденция, приводящая к вытеснению этих клеток нормальными. При этом происходит резкое снижение частоты мутаций. По нашему мнению, это объясняется не только репрессией и потерей вирусных нуклеотидных последовательностей, но и накоплением вредных мутаций, в том числе летальных (генетический груз), в трансфицированной субпопуляции, что приводит к снижению ее выживаемости.

Можно прогнозировать появление новых всплесков мутагенеза в нестабильной клеточной популяции. Появление мутаций в клеточных генах, по-видимому, связано с увеличением вероятности ошибок при осуществлении матричных процессов (репликации, рекомбинации и репарации) под влиянием экспрессирующихся вирусных генов [8—16]. При этом мутации возникают и в вирусных нуклеотидных последовательностях, но рассмотрение этого вопроса выходит за рамки данной работы.

Таким образом, наблюдаемый нами второй пик мутагенеза отражает конкуренцию процессов размножения и выведения клеток  $N_{i02}$ .

Запишем вышеизложенное при помощи математических соотношений с учетом формул (1—5, 9):

$$\gamma_1: \quad M_1(t) = \{A_1 \sin[\ln 2(t/\tau_1) - \phi_1] + A_2 \sin[\ln 2(t/\tau_2) - \phi_2] + A_3 \sin[\ln 2(t/\tau_3) - \phi_3]\} B_1 \exp(-gt); \quad (10)$$

$$f_1(t) = M_1(t)/N_i; \quad (11)$$

$$\gamma_2: \quad M_2(t) = \{A_1 \sin[\ln 2(t/\tau_1) - \phi_1] + A_2 \sin[\ln 2(t/\tau_2) - \phi_2] + A_3 \sin[\ln 2(t/\tau_3) - \phi_3]\} 2^{t/\tau_2} [1 + B_2 \exp(-\varepsilon(t-t_m)^2)]; \quad (12)$$

$$f_2(t) = M_2(t)/N_i. \quad (13)$$

Значения коэффициентов аппроксимирующих функций

Пик	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$B_1$	$B_2$	$\nu_1$	$\nu_2$	$\nu_3$
1-й	0,61	1	0,81	8,5	—	7,85	9	10,5
2-й	0,61	1	0,81	—	170	7,85	9	10,5

Пик	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\phi_3$	$\phi_3$	$\phi_3$	$g$	$\epsilon$	$t_m$
1-й	0,6	0,7	0,8	0,304	0,175	0,05	0,2	—	—
2-й	0,6	0,7	0,8	0,304	0,175	0,05	—	0,015	27

Значения коэффициентов, приведенных в формулах (10—13), указаны в таблице. Значения  $N_i$  взяты из работы [36].

Анализируя зависимости, представленные на рис. 3, можно сделать вывод, что данные эксперимента и кривая, по ним построенная, есть ни что иное, как случайное наблюдение аддитивного результата возникновения мутантов в каждой субпопуляции. При этом следует учитывать особенность исследуемого локуса *hprt*: поскольку мутации рецессивны, они требуют как минимум двух клеточных генераций для своего проявления. На основании анализа теоретически рассчитанной (см. рис. 3, кривая 1) зависимости можно заключить, что статистически достоверное повышение частоты мутантов при выполнении пункта б можно наблюдать в определенные дни (моменты), тогда как в остальное время будут наблюдаться частоты возникновения мутантов, близкие к спонтанному уровню (контролю).

Это позволяет сделать некоторые важные замечания: случайное наблюдение (снятие данных) мутационного процесса не всегда дает возможность выявить истинный мутагенный эффект. При случайном выборе момента наблюдения мутаций можно получить значения частоты мутантов, близкие к контрольному уровню (сравните кривые 1 и 2 на рис. 3). Совершенно очевидно, что в случае любого мутагена важно правильно спланировать моменты снятия данных для того, чтобы получить максимальные значения частоты индуцированных мутаций. Предлагаемый нами подход может иметь особое значение в случае мутагенных факторов, оказывающих непосредственное воздействие на процессы роста и размножения клеток и приводящих к ярко выраженной гетерогенности клеточных популяций по времени генерации.

Перед постановкой экспериментов по мутагенезу следует протестировать избранную клеточную систему на отклонения в периодах генерации и определить время резонансного эффекта, когда клетки в своем развитии совпадают по фазе клеточного цикла и согласованно начинают акт клеточного деления. При условии сохранения к этому времени мутагена и индукции мутаций в клетках субпопуляций с измененным периодом генерации предлагаемый подход позволит выявить суммарную частоту индуцированных мутантов. Если же время жизни мутанта окажется больше периода деления клеток, то станет возможным накопление мутантов, т. е. результат будет отличаться от рассчитанного по предлагаемым формулам в сторону увеличения (это явление отмечено в работе [21]).

Следует обратить внимание на то, что форма огибающей первого проявления мутагенеза приобрела название пика несколько условно из-за того, что при  $t = 0$  принимаем количество мутантов также равным нулю. Как видно из кривой 1 (см. рис. 3, б), уже после первого деления следовало бы ожидать появления определенного числа мутантов. Однако в действительности вследствие биологических особенностей выбранной клеточной

системы (исследование рецессивных мутаций по локусу *hprt*) и мутагена их можно обнаружить спустя 2—3 генерации. Поэтому считаем целесообразным аппроксимировать первое проявление мутагенеза убывающей экспонентой. Подтверждением этого вывода являются данные работы [49]: при исследовании других генных локусов и мутагенов максимальный мутагенный эффект обнаруживался иногда сразу с  $t = 0$  и убывал по экспоненте.

В работе [36] была предпринята попытка аппроксимации огибающей динамики мутагенеза путем Фурье-преобразований. Как следует из настоящей работы, первая попытка была полезным приближением в стремлении понять биологическую суть явления. Очевидно, что замена предыдущего приближения представлением о суперпозиции является еще одним шагом в направлении понимания количественных закономерностей мутационного процесса, индуцированного ДНК-содержащим онкогенным вирусом.

**Выводы.** 1. На основании анализа литературных и собственных данных по закономерностям индуцированного мутагенеза в системе онковирус — клетка сформулированы предпосылки и условия для построения математической модели мутационного процесса.

2. Построена математическая модель индуцированного мутагенеза, учитывающая гетерогенность клеточной системы по периоду деления и соотношению трансфицированных и нормальных клеток в различные периоды времени после трансфекции.

3. Введено понятие суперпозиции генераций клеточных субпопуляций для того, чтобы выявить моменты времени, когда мутагенный эффект может проявиться максимально. Зафиксирована зависимость мутагенного эффекта от относительно синхронного вступления клеток в фазу деления в определенные периоды времени. Это позволяет использовать кривую суперпозиции генераций для построения огибающей динамики мутагенеза и сформулировать рекомендации по выбору времени для съема информации.

4. Показано, что изменение соотношения трансфицированных и нормальных клеток в популяции оказывает влияние на частоту выявляемых мутаций по исследуемому генному локусу. Эти наблюдения согласуются с литературными данными по эволюции и проявлению интегрированных вирусных последовательностей в составе клеточного генома.

5. Предлагаемая модель позволяет прогнозировать всплески мутагенеза в нестабильной клеточной популяции.

*С. І. Лукаш, Л. Л. Лукаш*

Вплив гетерогенності системи соматичних клітин ссавців на прояв мутагенезу, індукованого трансформуючими генами аденовірусу

Резюме

*На підставі аналізу літературних та власних даних запропоновано математичну модель прояву індукованого мутагенезу, яка враховує клітинну гетерогенність по періоду генерації в системі онкогенний аденовірус — соматична клітина ссавців. Досліджено вплив деяких параметрів, використаних для побудови математичної моделі, на динаміку мутагенезу. Результати теоретичних розрахунків порівнюються з експериментальними даними.*

*S.I. Lukash, L.L. Lukash*

The influence of heterogeneity of somatic mammalian cell system on mutagenesis manifestation induced by transforming genes of adenovirus

Summary

*In this paper on the basis of literature and own data analysis mathematical model of manifestation of induced mutagenesis have been proposed taking into account heterogeneity of cell generation period in the system oncogenic adenovirus — somatic mammalian cell. The influence of some parameters which being*

used for creation of mathematical model on dynamics of mutagenesis have been carried out. Results of theoretical computations and experimental measurements have been compared.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скехан Ф., Фридман С. Дж. Злокачественная трансформация: корреляции методов *in vivo* и *in vitro* // Трансформированная клетка / Под ред. И. Л. Камерона и Т. Б. Пула.— Киев: Наук. думка, 1985.—С. 12—70.
2. Мойер М., Мойер Р. Вирус-индуцированная трансформация // Там же.—С. 176—220.
3. Магун Б. Е., Гернер Ю. У. Регуляция клеточного цикла в нормальных и трансформированных клетках // Там же.—С. 134—157.
4. Методы генетики соматических клеток / Под ред. Дж. Шея.— М.: Мир, 1985.—Т. 1.—312 с.
5. Luria S. E., Delbruk M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics.—1943.—28.—P. 491.
6. Школьник Е. М. Динамические модели клеточного цикла: Сб. науч. тр. «Динамика химических и биологических систем».— Новосибирск: Наука, 1989.—С. 230—260.
7. Howard A., Pelc S. R. Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relationship to chromosome breakage // Heredity.—1952.—6.—P. 261—273.
8. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение.—Ленинград: Наука, 1979.—286 с.
9. Томилин Н. В. Генетическая стабильность клетки // Там же.—1983.—156 с.
10. Pardee A. A restriction point for control of normal animal cell proliferation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1974.—71.—P. 286—290.
11. Dubrow R., Riddle V. G. H., Pardee A. B. Different responses to drugs and serum of cells transformed by various means // Cancer Res.—1979.—39.—P. 2718—2726.
12. Fujinaga K., Sawada Y., Uemizu Y. et al. Nucleotide sequences, integration and transcription of the adenovirus-12 transforming genes // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1979.—44.—P. 519—532.
13. Bos J., Jonemsen A. G., Schrier P. I. et al. Deletion mutations of region E1A of Ad12 E1 plasmids: effect on oncogenic transformation // Virology.—1983.—129.—P. 393—400.
14. Ariga H. Replication of cloned DNA containing the *Alu* family sequence during cell extract-promoting simian virus 40 DNA synthesis // Mol. and Cell. Biol.—1984.—50, N 2.—P. 387—396.
15. Chow K.-C., Pearson G. D. Adenovirus infection elevates levels of cellular topoisomerase I // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 2247—2251.
16. Засухина Г. Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды.—М.: Наука, 1979.—184 с.
17. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I., Varshaver N. B., Shapiro N. I. Oncogenic adenovirus as mutagen for Chinese hamster cells *in vitro* // Somat. Cell. Genet.—1981.—7, N 2.—P. 133.
18. Shapiro N. I., Marshak M. I., Varshaver N. B. Mutagenic effects of DNA-containing oncogenic viruses and malignant transformation of mammalian cells // Cancer Genet. and Cytogenet.—1984.—13, N 1.—P. 167—179.
19. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I., Varshaver N. B., Shapiro N. I. The oncogene of BAV3 as mutagen // J. Cell. Sci.—1985.—1.—P. 97—103.
20. Лукаш Л. Л. Мутационный процесс и злокачественная трансформация, индуцированные аденовирусами в клетках млекопитающих // Цитология и генетика.—1986.—20, № 1.—С. 55—58.
21. Лукаш Л. Л. Мутагенез и злокачественная трансформация, вызванные онкогеном аденовируса // Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов / Под ред. В. В. Моргуна.— Киев: Наук. думка, 1990.—С. 76—93.
22. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I. Role of early viral genes in mutagenesis // Biotechnology (PA 17604, USA).—Lancaster: Curr. progr. techn. Co., 1991.—V. 1.—P. 119—131.
23. Theile M., Scherneck S., Geissler E. Mutagenesis by Simian virus 40. 1. Detection of mutations of Chinese hamster cell lines using different resistance markers // Mutat. Res.—1976.—37, N 1.—P. 111—124.
24. Goldberg S., Defendi V. Increased mutation rates in doubly viral transformed Chinese hamster cells // Somat. Cell. Genet.—1979.—5, N 4.—P. 887—895.
25. Bellett A. I. D., Younghusband H. B. Spontaneous, mutagen-induced and adenovirus induced anchorage independent tumorigenic variants of mouse cells // J. Cell. Physiol.—1979.—101, N 1.—P. 33—48.
26. Marengo C., Mbikay M., Weber I. et al. Adenovirus-induced mutations at the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase locus of Chinese hamster cells // J. Virol.—1981.—38, N 2.—P. 184—190.
27. Paraskeva C., Roberts C., Biggs et al. Human adenovirus type 2 but not adenovirus type 12 is mutagenic at the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase locus of cloned rat liver epithelial cells // Ibid.—1983.—46, N 1.—P. 131—136.

28. Schlehofer I. R., zur Hausen H. Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated Herpes simplex virus type 1 // *Virology*.—1982.—122, N 3.—P. 471—475.
29. Рубашевский Е. Л., Лукаш Л. Л., Бужиевская Т. И. и др. Мутагенность вируса простого герпеса и плазмиды pBR325tk в культивируемых клетках млекопитающих // Докл. АН СССР.—1984.—279, N 3.—С. 752—754.
30. Pilon L., Royal A., Longeliet L. Induced mutation frequency after Herpes simplex virus type 2 infection in non-permissive XC cells // *J. Virol.*—1985.—66, N 2.—P. 259—265.
31. Pilon L., Langelier L., Royal A. Herpes simplex 2 mutagenesis: characterization of mutants induced at the *hprt* locus of non-permissive XC cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—8, N 6.—P. 2977—2083.
32. Агеенко А. И. Онкогены и канцерогенез.— М.: Медицина, 1986.—256 с.
33. Kurokawa T., Igarashi K., Sugino Y. Biochemical studies on bovine adenovirus type 3. III. Cleavage maps of viral DNA by restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII* // *J. Virol.*—1978.—28, N 1.—P. 212—218.
34. Igarashi K., Niiyama Y., Kurokawa T., Sugino Y. Biochemical studies on bovine adenovirus type 3. IV. Transformation by viral DNA and DNA fragments // *Ibid.*—P. 219—226.
35. Zalmanzon E. S., Vinkele R. A., Grigoreva L. V., Turetskaya R. L. A study of rat embryo cells transformed *in vitro* by the bovine adenovirus type 3 (BAV3) DNA before and after the passage in the host // *Virology*.—1982.—123.—P. 420—435.
36. Лукаш С. И., Лукаш Л. Л., Задорожный В. Ф. Математическая модель динамики мутагенеза в соматических клетках млекопитающих под действием фрагмента ДНК аденовируса // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 3.—С. 7—16.
37. Stabel S., Doerfler W., Friss R. R. Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells // *J. Virol.*—1980.—36.—P. 22—40.
38. Eick D., Stabel S., Doerfler W. Revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cell line T637 as a tool in the analysis of integration patterns // *Ibid.*—P. 41—49.
39. Botchan M., Stringer J., Mitchison T. et al. Integration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell // *Cell.*—1980.—20, N 1.—P. 143—152.
40. Della Valle G., Fenton R. C., Basilico C. Poliovirus large T antigen regulates the integration of DNA sequences into the genome of transformed cells // *Ibid.*—1981.—23, N 2.—P. 347—355.
41. Hiscott I. B., Murphy D., Defendi V. Instability of integrated viral DNA in mouse cells transformed by SV40 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 6.—P. 1736—1740.
42. Sager R., Anizowicz A., Howell N. Genomic rearrangements in mouse cell line containing integrated SV40 DNA // *Cell.*—1981.—23.—P. 41—50.
43. Stringer J. R. DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA integration // *Nature.*—1982.—296, N 5855.—P. 363—366.
44. Kuhlman I., Doerfler W. Loss of viral genomes from hamster tumor cells and nonrandom alterations in patterns of methylation of integrated adenovirus type 12 DNA // *J. Virol.*—1983.—147.—P. 631—636.
45. Schultz M., Doerfler W. Deletion of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA012-1-T // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12.—P. 4959—4976.
46. Лукаш Л. Л., Бужиевская Т. И., Быкорез А. И., Шапиро Н. И. Злокачественная трансформация культивируемых клеток мыши бычьим аденовирусом типа 3 и модификация этого процесса МННГ // Эксперим. онкология.—1984.—6, № 5.—С. 33—35.
47. Лукаш Л. Л., Швачко Л. П., Костецкая Е. В. Мобильные генетические элементы в процессах мутагенеза, рекомбинации и злокачественной трансформации клеток человека // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 2.—С. 7—19.
48. Perucho M., Hanahan D., Wigler M. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells // *Cell.*—1980.—22.—P. 309—317.
49. Shapiro N. I., Khalizev A. E., Luss E. V. et al. Mutagenesis in cultured mammalian cells // *Mutat. Res.*—1972.—16, N 1.—P. 89—101.