

Академик АН ГрузССР Э. Л. АНДРОНИКАШВИЛИ, Л. М. МОСУЛИШВИЛИ,
В. П. МАНДЖГАЛАДЗЕ, А. И. БЕЛОКОБЫЛЬСКИЙ, Н. Е. ХАРАБАДЗЕ,
Е. Ю. ЕФРЕМОВА

СВЯЗЫВАНИЕ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

В последних работах нашей группы было выяснено, что у некоторых биомакромолекул, например коллагена, характер процессов трансформации, растворимости и т. п. существенно неодинаков в зависимости от того, экстрагирована ли молекула из нормальной ткани (¹, ²) или из злокачественной (³). Это, естественно, наводит на мысль о том, что и химический состав макромолекул в этих двух случаях должен быть различен.

За последнее время стало очевидным, что в препаратах нуклеиновых кислот всегда содержится довольно большое число различных элементов, не входящих в состав нуклеотидов (⁴⁻⁸). Это создало предпосылки для исследования распределения микроэлементов в биомакромолекулах не только нормальных тканей, но и злокачественных опухолей.

В настоящей работе в качестве экспериментального материала были использованы препараты ДНК и общей РНК, выделенные из карциносаркомы Walker-256, саркомы М-1 и печени здоровых крыс по методу Кирби — Георгиева (⁹⁻¹¹) с некоторой модификацией, обусловленной тем, что к чистоте реактивов, используемых в процессе препаративного выделения нуклеиновых кислот, предъявлялись очень жесткие требования.

Реактивы подвергали многократной очистке с использованием различных физико-химических методов: дистилляции, экстракции и очистке на ионообменных смолах КУ-2, АВ-17, IRA-410.

Препараты нуклеиновых кислот выделяли из перевиваемых опухолей на 12—15 день после перевивки. В качестве нормы рассматривались препараты, выделенные из печени здоровых крыс. Число животных, использованных в каждом опыте, составляло 6—8 штук.

Полученные препараты нуклеиновых кислот в количестве 10—20 мг сухого веса помещали в кварцевые ампулы и облучали в центре активной зоны реактора ИРТ-2000 Института физики АН ГрузССР интегральным потоком тепловых нейтронов порядка $2 \cdot 10^{19}$ нейтр/см². При облучении образцов в таком интегральном потоке нейтронов происходит активация не только короткоживущих, но и долгоживущих радиоизотопов. К числу долгоживущих радиоизотопов следует отнести, например, Ag^{110m}, Co⁶⁰, Sb¹²¹, Sc⁴⁶, Sn⁶⁵, Fe⁵⁹.

Исследование γ -спектров облученных образцов ДНК и РНК через 2—3 недели после облучения позволило обнаружить и измерить весьма слабую активность, обусловленную долгоживущими радиоизотопами. Для обнаружения и измерения такого низкого уровня активности в наших экспериментах использовали сцинтилляционный 4π - γ -спектрометр полного поглощения с кристаллом NaJ(Tl) размером 150 × 150 мм с колодцем и ФЭУ-49. Заметим, что полная эффективность данной системы при регистрировании γ -квантов с энергией 662 кэВ от изотопа Cs¹³⁷ по фотопике составляет ~25%.

γ -Спектры ДНК представлены на рис. 1а, где наряду с ДНК, извлеченной из печени здоровых крыс, представлена ДНК из злокачественных

тканей (нормирование на 1 мг сухого веса). Сопоставление спектров позволяет установить степень связывания различных элементов нуклеиновыми кислотами злокачественных опухолей по сравнению с нормой.

Сравнительный анализ приведенных гистограмм удобнее начинать с правой стороны.

Первый фотопик с самой высокой энергией γ -излучения 2911 кэв, обусловленный изотопом серебра $\text{Ag}^{110\text{m}}$, получается за счет многократного

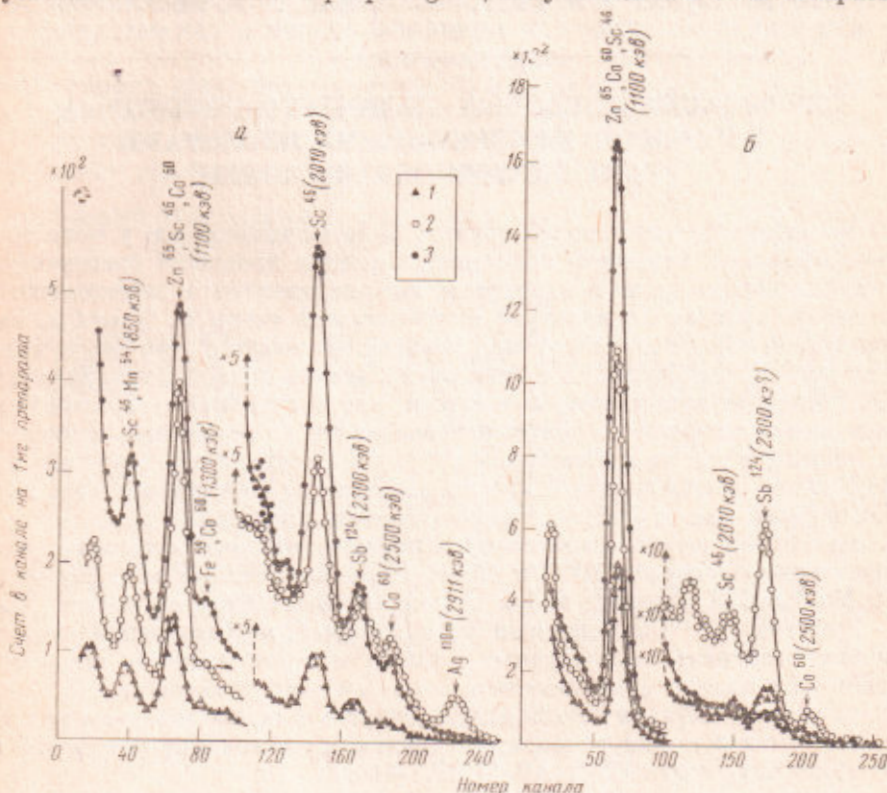


Рис. 1. γ -Спектры образцов ДНК (а) и РНК (б), облученных в потоке нейтронов $2 \cdot 10^{19}$ нейтр/см² ($0,5 \leq E_{\gamma} \leq 3,5$ Мэв). 1 — ДНК из печени здоровых крыс, 2 — из саркомы М-1, 3 — из карциносаркомы Walker-256

$\gamma\gamma$ -самосовпадения в кристалле большого размера и лежит в свободной от интерференции области γ -спектра. Далее регистрируется суммарный фотопик Co^{60} с энергией 2500 кэв. Точное значение величины площади под этим фотопиком определяется вычитанием вклада, вносимого радиоизотопом $\text{Ag}^{110\text{m}}$.

Следующие фотопики обусловлены изотопами Sb^{124} с энергией 2300 кэв и Sc^{46} с энергией 1300 кэв. Область энергии γ -излучения ~ 1300 кэв является слабо разрешенной, однако можно дать качественную характеристику содержания железа в нуклеиновых кислотах по приведенным спектрограммам.

Наиболее интенсивная линия в гистограммах всех образцов обусловлена изотопом Zn^{65} с энергией 1120 кэв.

Область спектра ниже 800 кэв представляет собой суперпозицию комптоновских спектров более энергичных γ -квантов и тормозного γ -излучения от изотопа P^{32} .

Методом последовательного вычитания были разложены приведенные γ -спектры по изотопам $\text{Ag}^{110\text{m}}$, Co^{60} , Sb^{124} , Sc^{46} , Fe^{59} , Zn^{65} и т. д. Далее по методу сравнения было определено содержание этих элементов в исследуемых образцах ДНК. Результаты этих определений приводятся в табл. 1.

Как видно из рис. 1а и табл. 1, микроэлементный состав ДНК, выделенной из карциносаркомы Walker-256, характеризуется наличием пиков Co^{60} , Sb^{124} , Sc^{46} , Fe^{59} и Zn^{65} . ДНК, выделенная из саркомы М-1, характеризуется дополнительным пиком $\text{Ag}^{110\text{m}}$. Если не считать пика Co в саркоме М-1, который превышает соответствующий пик в карциносаркоме, то для всех остальных перечисленных элементов пики карциносаркомы значительно выше пиков саркомы М-1. Что касается микроэлементов ДНК, вы-

Таблица 1

Образец	Сухой вес, мг	Содержание элемента, 10^{-4} г на 1 мг сух. препарата					
		Zn	Co	Fe	Ag	Sc	Sb
ДНК (Walker-256)	5,6	$2,06 \pm 0,18$	$0,34 \pm 0,05$	32 ± 6	$0,45 \pm 0,5$	$0,28 \pm 0,08$	$2,5 \pm 1,6$
ДНК (М-1)	3,9	$1,93 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,06$	24 ± 5	$2,29 \pm 0,7$	$0,08 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,8$
ДНК (норма)	21,7	$0,54 \pm 0,05$	$< 0,05$	16 ± 3	$0,23 \pm 0,3$	$0,03 \pm 0,02$	~ 1
РНК (Walker-256)	33,0	$10,3 \pm 0,5$	$< 0,05$	$< 0,5$	$< 5,10^{-2}$	$< 10^{-2}$	$1,6 \pm 1,2$
РНК (М-1)	20,5	$6,65 \pm 0,7$	$0,45 \pm 0,07$	$< 0,5$	$< 5,10^{-2}$	$< 10^{-2}$	$5 \pm 1,5$
РНК (норма)	39,1	$3,03 \pm 0,1$	$< 0,05$	$< 0,5$	$< 5,10^{-2}$	$< 10^{-2}$	~ 1
Чувствительность определения	—	0,3	0,15	16	2	0,07	0,2

Таблица 2

Распределение радиоактивных Co^{60} , $\text{Ag}^{110\text{m}}$ и Zn^{65} в реактивах, использованных при получении препаратов ДНК и РНК из печени здоровых крыс (%)

Образец	Co	Ag	Zn
Остаток после фильтрации гомогената	15—25	70—80	20—25
Фенол pH 6,0 после обработки гомогената	20,4	6,0	11,3
0,14 M NaCl после обработки ДНК	8,4	ф	2
Осадок после 1-го центрифугирования	0,6	8,3	0,54
Фенол pH 6 после обработки ДНК	ф*	7,7	ф
Фенол pH 8,3	ф	ф	46,6
Спирт после осаждения ДНК	3,9	»	7,5
Фенол pH 6,0 после обработки РНК	2,4	»	ф
Спирт после осаждения РНК	40,9	»	7,0
Препарат РНК	ф	»	2,9
Препарат ДНК	»	»	0,02

* ф — активность образцов не превышает фона.

деленной из печени здоровых крыс, то они представляют собой как бы естественный фон, на котором очень резко выделяются описанные пики. Распределение микроэлементов в РНК (см. рис. 1б) отличается от распределения в ДНК отсутствием пика серебра для обеих сарком. Пики Sb и Sc для саркомы М-1 лежат значительно выше соответствующих пиков карциносаркомы, микроэлементы которой в пределах погрешности эксперимента не отличаются от фоновых количеств нормальной ткани. Обращает на себя внимание полное отсутствие пика Fe^{59} . Особое внимание при рассмотрении таблицы следует обратить на содержание Zn , Fe и Ag .

Возникает вопрос о том, не могли ли упомянутые элементы войти в состав нуклеиновых кислот в результате биохимических препаративных манипуляций. С целью определения степени связывания металлов нуклеиновыми кислотами из реактивов в процессе их препаративного выделения нами были поставлены специальные опыты, в которых реактивы искусственно «загрязнялись» радиоактивной меткой Zn^{65} , Co^{60} , $\text{Ag}^{110\text{m}}$. Количество каждого элемента 10 мг и активность 50—100 μC . Радиоактивная метка в виде хлорида цинка и нитратов кобальта и серебра вводилась в 200 мл 0,14 M раствора NaCl, использовавшегося на стадии гомогенизации ткани.

Экспериментальные результаты распределения меченых изотопов приводятся в табл. 2. Приведенные в ней данные свидетельствуют о том, что

для каждого радиоизотопа характерно свое распределение, и он практически не связывается с нуклеиновыми кислотами.

Вместе с тем был проведен эксперимент со скормливанием 6 лабораторным крысам радиоизотопа Zn^{65} в течение 3 недель. Концентрация этого элемента, а также его активность по β - и γ -излучению были подобраны таким образом, чтобы не оказывать на животных значительного токсического и радиационного воздействия. Голодавших в течение 2 дней животных декапитировали и выделяли из печени ДНК, РНК и ДНП и белок после депротенизации ДНП. Активность полученных препаратов измеряли при помощи сцинтилляционного γ -спектрометра. Данные этих изме-

Образец	РНК	ДНК	ДНП	Белок
Число γ -квантов с энергией 1120 кэв на 10 мг образца	426	400	408	301

рений являются еще одним доказательством связывания металлов нуклеиновыми кислотами *in vivo*.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Я. В. Пейве и акад. И. П. Алимарину за обсуждение результатов и ценные советы.

Институт физики
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
10 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили и др., ДАН, 183, № 1 (1968).
- ² Э. Л. Андроникашвили, Н. Г. Бакрадзе и др., Письма в ЖЭТФ, 8, 10 (1968).
- ³ Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, ДАН, 183, № 2 (1968).
- ⁴ W. E. C. Wacker, B. L. Valee, J. Biol. Chem., 234, 3257 (1959).
- ⁵ W. E. C. Wacker, M. P. Gordon, H. J. Huff, Biochemistry, 2, 716 (1963).
- ⁶ H. J. Huff, R. S. Sastry et al., Biochemistry, 3, 501 (1964).
- ⁷ А. И. Белокобыльский, Э. Н. Гинтури и др., Авт. свид. № 232588; Бюлл. изобр., № 1 (1969).
- ⁸ А. И. Белокобыльский, Э. Н. Гинтури и др., Биофизика, 13, в. 6 (1968).
- ⁹ K. Kirby, Biochem. J., 66, 495 (1957).
- ¹⁰ K. Kirby, Biochim. et biophys. acta, 55, 545 (1962).
- ¹¹ Г. П. Георгиев, Биохимия, 24, 472 (1959).