

УДК 577.11

БИОХИМИЯ

Г. А. КРИТСКИЙ, А. И. БАТИЩЕВ, С. В. АЛЕКСАНДРОВ,
Н. А. ФЕДОРОВ, Р. Е. АБРАМОВ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НУКЛЕОТИДНЫХ БЛОКОВ ДНК ПРИ ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ И ЛЕЙКОЗЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 V 1971)

В предыдущих исследованиях (¹⁻³) было показано уменьшение облученности оснований ДНК костного мозга после воздействия ионизирующей радиации на животный организм. При этом относительное содержание одиночного тимидилового нуклеотидного остатка в ДНК увеличивалось. Так как отдаленным последствием после воздействия ионизирующей радиации на животный организм является возникновение злокачественных опухолей и в особенности лейкозов, то мы предположили, что изменения в нуклеотидных блоках ДНК при злокачественном росте имеют некоторые сходные черты по сравнению с изменениями в нуклеотидных блоках ДНК при радиационном поражении организма.

Большинство авторов считает, что нет разницы в составе и структуре ДНК опухолевых и нормальных клеток (⁴⁻¹⁰). Некоторым исследователям за последнее время удалось найти отличия опухолевой ДНК от нормальной ДНК по увеличению в опухолевой ДНК содержания прочно связанных аминокислот (¹¹), по уменьшению вязкости (¹²) и по увеличению метилирования (¹³). Однако в литературе нет данных по исследованию опухолевой ДНК с помощью блочного метода анализа. В настоящей работе приведены полученные нами результаты по характеру распределения нуклеотидных блоков ДНК при лучевом поражении и при лейкозе Ла.

В серии опытов с облучением использовали белых крыс «Вистар» обоего пола, вес 250—300 г. Производили тотальное облучение животных в дозе 500 р с помощью рентгеновского аппарата РУП-200—20—5. Фокусное расстояние 65 см. Мощность дозы 18,6 р/мин. Фильтры 0,5 Си и 0,75 А1. Время облучения 27 мин. Крыс (обычно 4 шт. необлученных, контрольных, и 12 шт. облученных) забивали декапитацией и обескровливанием через двое суток после облучения. Кости конечностей очищали от мышц и связок и замораживали в твердой СО₂. Затем, обычно через сутки или двое суток, кости оттаивали, размельчали пестиками в фарфоровых ступках и костный мозг вымывали встряхиванием со 100 мл холодного буферного раствора 0,1 М NaCl + 0,05 М цитрата натрия. Затем в гомогенаты добавляли равные объемы водонасыщенного фенола с рН 8,3 (2 мл 5 N NaOH на 100 мл водонасыщенного фенола). Последующее выделение ДНК производили по методике (¹⁴). Определение пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК производили по методике Бартона с модификацией (^{1, 2}).

В серии опытов с лейкозом использовали селезенки мышей С₅₇В1₆. Для каждого опыта брали 25—30 селезенек нормальных (не лейкозных) мышей и 10—12 селезенек мышей на 6 сутки после прививки им лейкоза Ла. Непосредственно после изолирования селезенек их замораживали в жидком азоте или в твердой СО₂. Затем, обычно на следующие сутки, селезенки оттаивали, гомогенизировали растиранием в фарфоро-

вых ступках, добавляли 40-кратное по весу количество холодного буферного раствора 0,1 M NaCl + 0,05 M цитрата натрия и сильно встряхивали. В гомогенаты добавляли равные объемы водонасыщенного фенола с pH 8,3. Последующее выделение ДНК и определение пиримидиновых нуклеотидных блоков производили, как и в опытах с облучением, по методике (¹, ², ¹⁴).

Результаты определения пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК представлены на рис. 1, а также в табл. 1 и 2. Рис. 1 показывает хорошее разделение большинства пятен, в частности пятен 7 и 8. Раздельное определение этих пятен оказалось существенным, так как их количественные изменения при облучении и лейкозе носят противоположное направление. Табл. 1 показывает сходство изменений в распределении пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК кроветворной системы животных при лучевом поражении и лейкозе La.

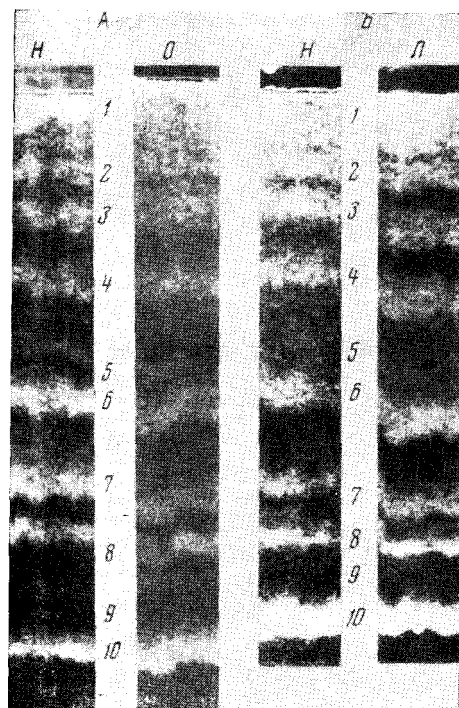


Рис. 1. Хроматография на бумаге пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК (95% этанол, *n*-бутанол и 1M ацетат-аммиачный буфер pH 3,7—3,8 (4:1:2)). Растворитель пропускали 4—5 раз. А — костный мозг крысы, норма и лучевое поражение; В — селезенка мыши, норма и лейкоз. П — норма, О — облучение, Л — лейкоз

комплексобразование ДНК с РНК, а также уменьшалось относительное содержание высокополимерной фракции ДНК.

Сравнительные исследования генетических изменений кода нуклеиновых кислот клеток при лучевом поражении и при лейкозах, по-видимому, в некоторой мере могут объяснить увеличение частоты опухолевых заболеваний и, в частности, лейкозов после воздействия ионизирующей радиации на животный организм. Повреждение некоторых нуклеотидных блоков ДНК при лучевом поражении и в процессе малигнизации, вероятно, соответствует изменению изозимного спектра, которое наблюдалось рядом авторов как при лучевом поражении, так и в злокачественных клетках.

Как в опытах с облучением, так и в опытах с лейкозом наблюдали достоверное увеличение относительного содержания материала пятна 10 по сравнению с общим содержанием материала всех пятен и, в особенности, по сравнению с содержанием материала пятна 7 (табл. 2).

При лучевом поражении и при лейкозе в наибольшей мере уменьшаются те нуклеотидные блоки, которые соответствуют хроматографическому пятну 7. Разрушение этих участков ДНК сопровождается увеличением количества материала, соответствующего пятнам 8 и 10.

Сходство некоторых изменений в нуклеиновых кислотах и их обмене после воздействия ионизирующей радиации на организм и при лейкозе были нами отмечены и ранее по другим критериям (¹⁵, ¹⁶). В частности, как в период острого лучевого поражения (двое суток после рентгеновского облучения), так и при лейкозе наблюдали торможение распада нуклеиновых кислот при автолизе гомогенатов тканей. Параллельно увеличивалось

Таблица 1

Относительные количества пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК кроветворных тканей животных в норме, после рентгеновского облучения и при лейкозе

Источник ДНК	Условия опытов	ММ пятен						
		1+2+3	4	5+6	7	8	9	10
Костный мозг кролика (по работе (3))	Норма	24,7±1,10	13,6±0,25	20,5±0,42	18,3±0,96		1,6±0,21	21,2±0,35 *
	2 суток после 200р	26,5±1,96	13,8±0,57	18,7±1,14	17,2±0,49		1,4±0,70	22,3±0,41 *
Костный мозг крыс	Норма	27,35	12,9	18,68	12,70	6,83	1,20	20,37
	2 суток после 500р	25,37	14,29	18,61	11,19	7,89	1,02	21,60
Селезенка мышей С ₅₇ В ₁	Норма	31,94±1,07	12,27±0,20	17,81±0,52	10,13*±0,34	7,61±0,28	1,39±0,32	18,84±0,43 *
	6 суток после прививки лейкоза	30,28±2,18	11,52±0,46	18,60±0,95	8,97*±0,50	8,97±0,60	1,33±0,22	20,36±0,76 *

* Различия между величинами статистически достоверны (см. статистическую обработку в табл. 2)

Таблица

Относительное содержание материала некоторых пиримидиновых нуклеотидных блоков в ДНК кроветворной системы животных в норме, при лучевом поражении и при лейкозе. Статистическая обработка по методу парных сравнений

№ опыта	Содержание хроматографического пятна 10 в % от общей суммы блоков						Отношение количеств материала пятен 10 и 7					
	костный мозг кролика, 2 суток после облуч. 200 р			селезенка мышей, 6 суток после прививки лейкоза			костный мозг крыс, 2 суток после облучен. 500 р			селезенка мышей, 6 суток после прививки лейкоза		
	норма (а)	облуч. (б)	$\frac{б}{а}$, %	норма (а)	лейкоз (б)	$\frac{б}{а}$, %	норма $\frac{10}{7}$ (А)	облуч. $\frac{10}{7}$ (Б)	$\frac{Б}{А}$	норма $\frac{10}{7}$ (А)	лейкоз $\frac{10}{7}$ (Б)	$\frac{Б}{А}$
1	21,00	21,45	102,1	19,88	20,09	101,1	1,44	1,91	1,33	1,86	2,43	1,30
2	19,15	21,40	111,7	17,6	18,70	106,2	1,57	1,90	1,20	1,83	2,40	1,31
3	19,25	22,37	116,0	19,40	22,20	114,4	1,49	1,83	1,23	1,98	2,55	1,29
4	21,15	22,35	105,0	18,80	21,10	112,2	—	—	—	1,73	2,10	1,22
5	21,30	24,10	113,0	19,80	22,15	111,8	—	—	—	1,81	2,05	1,13
6	21,30	22,10	104,0	17,53	17,86	101,9	—	—	—	1,98	2,17	1,0
			108,7±2,3 P < 0,05			108,0±2,3 P < 0,05			1,25±0,04 P < 1,05			1,22±0,04 P < 0,001

Таким образом, на основании проведенного исследования впервые показано, что изменение в соотношении определенных нуклеотидных блоков в ДНК кроветворной системы животных при лучевом поражении и при лейкозе La имеет сходный характер. Как при лучевом поражении, так и при лейкозе в ДНК имеет место разрушение части нуклеотидных блоков, тогда как относительное содержание одиночного тимидилового нуклеотидного остатка достоверно увеличивается. Предполагается, что возникновение в облученном организме ДНК с качественными особенностями, характерными для злокачественной ткани, может быть причиной возникновения злокачественных опухолей или лейкозов в отдаленные сроки после воздействия ионизирующей радиации на организм. Поскольку известно, что различные виды злокачественного роста имеют различную этиологию и природу, то повреждение нуклеотидных блоков ДНК при некоторых видах злокачественного роста, очевидно, может иметь другой характер, чем при лейкозе La.

Приносим благодарность Р. В. Цодиковой за ценную помощь в работе.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
21 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. А. Критский, Т. Я. Сурина, Биохимия, **33**, в. 4, 706 (1968). ² Г. А. Критский, А. А. Абидов, Т. Я. Сурина, Радиобиология, **9**, 5, 675 (1969).
- ³ Г. А. Критский, А. А. Абидов и др., Радиобиология, **10**, 6, 803 (1970). ⁴ И. Б. Збарский, Вopr. мед. хим., **4**, 3, 199 (1958). ⁵ E. Chargaff, Chemistry and Biology, № 4, 1, 307 (1955). ⁶ E. Chargaff, Federat. Proc., **10**, 654 (1951).
- ⁷ S. Kit, Nature, **184**, 4673, 36 (1959). ⁸ S. Kit, In: Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry, 1960, p. 147. ⁹ E. Chargaff, J. Gen. Physiol., **38**, 1 (1951). ¹⁰ L. I. Uzman, C. Desoez, Arch. Biochem. and Biophys., **48**, 63 (1954). ¹¹ J. S. Salscr, M. E. Balis, Cancer Res., **28**, 595 (1968). ¹² С. В. Кузмина, Н. Б. Стражевская, Биофизика, **15**, 6, 1133 (1970). ¹³ Н. А. Федоров, Т. В. Боровкова, Р. Э. Кимерал, В кн. Патогенез, лечение и эпидемиология лейкозов, Рига, 1971, стр. 25. ¹⁴ Г. А. Критский, А. А. Абидов и др., Радиобиология, **11**, № 5 (1971). ¹⁵ Г. А. Критский, Влияние ионизирующей радиации на обмен нуклеиновых кислот в животном организме, Докторская диссертация, М., 1968.
- ¹⁶ Г. А. Критский, Матер. симпозиума: Нуклеиновые кислоты и биологическое действие ионизирующей радиации, 1965, «Наука», 1967, стр. 50.