

В. А. КУЗЬМИЧЕВ, Г. А. КРИТСКИЙ, Т. В. БОРОВКОВА, Н. А. ФЕДОРОВ

**О РАЗЛИЧИИ В СОДЕРЖАНИИ И БИОСИНТЕЗЕ
ПИРИМИДИНОВЫХ ИЗОПЛИТ ДНК ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 14 XI 1973)

Согласно современным представлениям о механизмах возникновения лейкозов (мутационная и вирусная концепции) предполагается, что повреждения структуры ДНК клетки имеют весьма существенное значение в этиологии и патогенезе данного заболевания (^{1, 2}). Однако в экспериментальных исследованиях ряда авторов не удалось обнаружить каких-либо особенностей в структуре ДНК лейкозной клетки по сравнению с нормой. Одним из перспективных подходов для выявления характерных особенностей ДНК при различных повреждениях служит блочный метод ее анализа. В предыдущем нашем исследовании было впервые выявлено различие в содержании некоторых пиримидиновых нуклеотидных блоков ДНК в норме и при лейкозе La у мышей (³). Ввиду большой актуальности вопроса об особенностях структуры ДНК при лейкозе мы продолжили свои исследования в данном направлении.

Задачей настоящего исследования было выяснение различий в содержании и биосинтезе изоплит ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при хроническом лимфолейкозе (х.л.л.). В литературе данные по этому вопросу отсутствуют. Лимфоциты были выбраны нами в качестве объекта для изучения, во-первых, потому, что они в отсутствие митогенов являются покоящимися клетками, во-вторых, известно, что в них происходит синтез «внерепликативной» ДНК (^{4, 5}). Лимфоциты выделяли из периферической крови по методу Рабиновича в некоторой модификации (⁶). Выделенные клетки суспендировали в инкубационной среде Игла с добавлением инактивированной 20% сыворотки АВ(IV) группы крови, антибиотиков (стрептомицин, пенициллин) и глутамина. На 1 мл инкубационной среды, содержащей $2 \cdot 10^7$ клеток, вносили 0,5 мС равномерно меченого C^{14} -дезоксцитидина (уд. акт. 495 мС/ммоль, «Amersham», Англия). Инкубацию проводили при 37° в течение 18 час. Ядра изолировали из лимфоцитов, используя Твин-80 и дезоксихолат натрия в изотоническом буфере (⁷). ДНК выделяли по методу Мармура в модификации Кашлера (⁸), гидролизировали по методу Бартона до пиримидиновых последовательностей в 66% муравьиной кислоте, содержащей 2% дифениламина (⁹). Пуриновые основания удаляли на колонке (0,9×20 см) с Дауэкс-50×8 (H⁺, 200—400 меш, Швеция). Пиримидиновые изоплиты разделяли на ДЭАЭ-целлюлозе (ДЕ-32, 1 меш/г, Англия) (ацетатная форма) в 0,05 М растворе ацетата лития, рН 5,2 с использованием линейного градиента хлористого лития (0,0—0,5 М) (¹⁰). Выделенные изоплиты высушивали, растворяли в дистиллированной воде и измеряли C^{14} -радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе на счетчике «Марк II» (Nuclear Chicago). Расчет содержания изоплит в микромолях производили по методу Спенсера (¹¹). В качестве носителя в случае донорских лимфоцитов использовали ДНК из лейкоцитарной массы.

Результаты проведенных нами исследований представлены на рис. 1 и в табл. 1, 2. Профиль элюции свидетельствовал о хорошем разделении

Различия в содержании пиримидиновых изоплит ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при хроническом лимфолейкозе

	№ опытов	Изоплиты					
		I	II	III	IV	V	VI
Лимфоциты доноров	1	21,8	24,7	16,3	15,5	10,2	6,9
	2	20,4	27,0	21,6	14,2	9,8	4,8
	3	22,2	24,0	17,1	18,8	9,4	5,0
	$M \pm m$	$21,46 \pm 0,55$	$25,23 \pm 0,91$	$18,33 \pm 1,65$	$16,16 \pm 1,37$	$9,81 \pm 0,23$	$5,56 \pm 0,67$
Лимфоциты больных х.лл.	1	21,7	20,0	13,8	14,0	11,7	8,6
	2	23,8	16,1	18,1	14,6	9,0	5,6
	3	21,6	21,6	17,3	15,1	9,9	6,4
	$M \pm m$	$22,36 \pm 0,72$	$19,23 \pm 1,63$	$16,40 \pm 1,32$	$14,56 \pm 0,32$	$10,20 \pm 0,79$	$6,88 \pm 0,89$
	P	$<0,2$	$<0,02$	$<0,2$	$<0,2$	$<0,5$	$<0,2$

Примечание. Данные выражены в %; 100% соответствует сумме μ мол. I—VI изоплит.

смеси пиримидиновых изоплит до гексануклеотидов (I—VI пик). В табл. 1 приведены данные о различии в содержании пиримидиновых изоплит суммарной ядерной ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при х.лл. Видно, что относительное содержание второго изоплита (динуклеотидные фрагменты ДНК) при лейкозе ниже, чем в норме. Это различие статистически достоверно ($P < 0,02$).

Результаты, полученные нами по распределению C^{14} -радиоактивности в пиримидиновых изоплитах вновь синтезированной внерепликативной ДНК лимфоцитов крови человека, показали статистически достоверные различия по интенсивности включения C^{14} -дезоксцитидина в I, II, IV и VI изоплиты в норме и при х.лл. (рис. 1). Значительное отклонение от нормы выражается в резком усилении включения C^{14} -дезоксцитидина в VI изо-

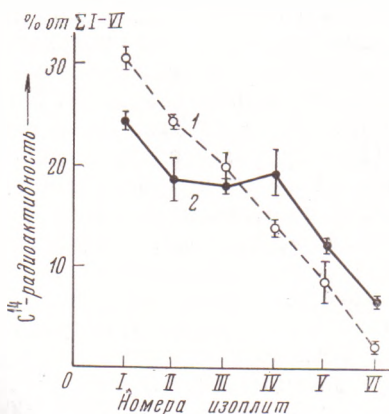


Рис. 1. Распределение C^{14} -радиоактивности в пиримидиновых изоплитах ДНК лимфоцитов крови человека. 1 — норма; 2 — хронический лимфолейкоз; средние данные по 3 опытов. Различия между нормой и лейкозом статистически достоверны по изоплитам № I, II, IV, VI ($P < 0,05$)

плит ($P < 0,001$). Эти различия в биосинтезе изоплит в норме и при х.лл. особенно хорошо видны при сопоставлении удельных радиоактивностей изоплит ДНК (табл. 2). В норме (табл. 2, C) материал коротких изоплит (I—III) синтезируется быстрее, чем материал относительно более длинных изоплит (IV—VI). При х.лл. материал всех изоплит синтезируется примерно с одинаковой скоростью (величина C для всех изоплит практически одинакова).

Вновь синтезированная внерепликативная ДНК может быть репарационной или синтезированной в виде низкомолекулярных фрагментов — предшественников ДНК, фрагментов Оказаки (¹²). Аномальность структу-

Таблица 2

Удельная радиоактивность пиримидиновых изоплит ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при х.лл.

	Показатели	Изоплиты					
		I	II	III	IV	V	VI
Норма	Суммарная радиоактивность, % (А)	30,31	24,29	20,30	13,98	8,88	2,19
	Количество материала изоплит, % (Б)	21,46	25,23	18,33	16,16	9,81	5,56
	$C = A/B$	1,41	0,96	1,10	0,86	0,91	0,39
Х.лл.	Суммарная радиоактивность (А ₁)	24,26	18,60	18,16	19,96	12,30	6,70
	Количество материала изоплит (Б ₁)	22,36	19,23	16,40	14,56	10,20	6,88
	$C_1 = A_1/B_1$	1,08	0,96	1,11	1,37	1,20	0,97
	C_1/C	0,76	1,00	1,01	1,59	1,31	2,48

Примечание. В расчет взяты 3 опыта в норме и 3 опыта при х.лл. Корреляция между номером изоплиты и величиной отношения C_1/C статистически достоверна.

ры ДНК лейкозной клетки может быть обусловлена изменением количественного соотношения различных генов под воздействием физических или вирусных факторов (¹, ², ¹³). В данном случае, возможно, что обнаруженное нами различие в составе изоплит вновь синтезированной ДНК следует связать с хромосомными аномалиями при лейкозах. Как известно, особенностью хромосомных наборов лейкозных клеток является их анеуплоидность, т.е. числовые нарушения хромосом: гипер- и гиподиплоидные типы, а также делеции и др. (¹⁴). ДНК различных хромосом клетки, по-видимому, имеет несколько различную первичную структуру (последовательность нуклеотидных остатков). Поэтому числовые нарушения хромосом и их различные аномалии могут явиться причиной обнаруженных нами различий в содержании различных изоплит ДНК. Первичные изменения структуры ДНК клетки при воздействии различных лейкозогенных факторов (вирусы, ионизирующая радиация, химические канцерогены), вероятно, не могут обусловить таких отклонений от нормы, которые могли бы быть обнаружены с помощью существенных методов определения состава ДНК. Однако в результате этой первичной трансформации возникает нестабильность генома клетки. Известно, что лейкозам свойственна прогрессия, нарастание малигнизации, в основе которой лежит нестабильность генома лейкозной клетки и возникновение повторных мутаций. Сочетание мутагенеза и отбора все более злокачественных клеток ведет к резкому усилению первичного изменения кариотипа клетки и соответственно может приводить к значительным различиям в содержании и биосинтезе изоплит ДНК в норме и при лейкозе.

В связи с изложенным представляют интерес также данные о том, что особенности свойств ДНК-полимеразы лейкозной клетки могут быть одной из причин повышенного мутагенеза, аномальности первичной структуры и обмена ДНК при лейкозе (¹⁵, ¹⁶). Таким образом, нами установлено, что относительное содержание второго изоплита (динуклеотидные фрагменты суммарной ядерной ДНК) при лейкозе достоверно выше, чем в норме; в опытах с ¹⁴C-дезоксцитидином показано: а) что, судя по удельной радиоактивности, в норме материал коротких изоплит (I—III) синтезируется быстрее, чем материал относительно более длинных изоплит (IV—VI); при х.лл. материал всех изоплит синтезируется примерно с одинаковой скоростью; б) при лейкозе резко повышено содержание радиоактивности в VI изоплите пиримидинов вновь синтезированной внедрепликативной ДНК. Это различие статистически достоверно. Следовательно, в данной работе

нами впервые показаны различия в содержании и биосинтезе пиримидиновых изоэпит ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при х.л.л. Дано возможное объяснение полученных данных с учетом существующих теорий лейкоза.

Институт гематологии и переливания крови

Поступило
14 XI 1973

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. M. Temin, S. Mizutani, *Nature*, 226, 1211 (1970). ² W. G. Вахт, S. Spiegelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 69, № 12, 3737 (1972). ³ Г. А. Критский, А. И. Батищев и др., *ДАН*, 203, № 1 (1972). ⁴ Т. В. Боровкова, Н. А. Федоров, Г. А. Калошина, *Бюлл. эксп. биол.*, № 9, 40 (1973). ⁵ А. Р. Akifiji, E. D. Aingorn, *Exp. Cell. Res.*, 75, 369 (1972). ⁶ Г. И. Козинец, В. В. Альперович, Н. Н. Талеленова, *Лаб. дело*, № 7, 387 (1971). ⁷ T. Wogum, M. Scharff, E. Robbins, *Biochim. et biophys. acta*, 149, 302 (1967). ⁸ J. W. Kappler, *J. Cell. Physiol.*, 75, № 1, 21 (1970). ⁹ K. Burton, *Biochem. J.*, 77, 547 (1960). ¹⁰ J. H. Spencer, R. E. Cape, A. Marks, W. E. Mushynski, *Canad. J. Biochem.*, 47, 329 (1969). ¹¹ J. H. Spencer, R. E. Cape et al., *Canad. J. Biochem.*, 46 (6), 627 (1968). ¹² R. Okazaki, T. Okazaki et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 33, 129 (1968). ¹³ T. Yamamoto, Z. Rabinowitz, L. Sachs, *Nature New Biol.*, 243, 129, 247 (1970). ¹⁴ Е. Ф. Давиденкова, С. И. Шерман, Н. Н. Колосова, *Клиника и генетика лейкозов*, Л., 1973. ¹⁵ S. Clark, L. Lawrence, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 1, 245 (1973). ¹⁶ R. McCaffrey, S. Donna, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 2, 521 (1973).