

Г. П. ЖИЖИНА, С. И. БОБОВИЧ, О. Е. ПЕТРОВ, К. Е. КРУГЛЯКОВА

## О КИНЕТИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК НОРМЫ И ОПУХОЛИ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 15 IV 1974)

В литературе сведения о физико-химических и биохимических особенностях ДНК опухолей по сравнению с ДНК нормы весьма противоречивы (<sup>1</sup>). Однако в последние годы получены более убедительные доказательства отличия опухолевой ДНК от ДНК нормальных клеток по ряду физико-химических свойств: молекулярному весу и конформации макромолекул (<sup>2, 3</sup>), эластовязкости (<sup>4</sup>), температуре плавления (<sup>5</sup>) и адсорбции воды (<sup>6</sup>).

Особенно плодотворными в исследованиях особенностей опухолевой ДНК могут оказаться кинетические методы, успешно применяемые для анализа физико-химических изменений в биологических системах (<sup>7</sup>). Кипетический подход позволил обнаружить снижение скоростей распада ДНК и РНК при автолизе гомогенатов селезенки мышей с перевивным лейкозом La в сравнении с интактными животными (<sup>8</sup>). В последнее время разработана чувствительный кинетический формальдегидный метод (к.ф.) обнаружения дефектов вторичной структуры ДНК, позволяющий фиксировать один дефект на  $10^4$  пар нуклеотидов (<sup>9, 10</sup>).

В настоящей работе с помощью этого метода проведено сравнительное изучение стабильности вторичной структуры ДНК нормальных и опухолевых тканей, исходя из предположения о возможности наличия повреждений во вторичной структуре ДНК опухолей.

В работе исследовали образцы ДНК, выделенные методом Мармура (<sup>11</sup>) из селезенки интактных мышей, селезенки мышей с перевивным лейкозом La (на 7-е сутки); из клеток асцитного рака Эрлиха (на 7-е сутки после перевивки) выделили 2 образца ДНК, соответствующие двум перевивкам. Все образцы ДНК обрабатывали панкреатической РНКазой (предварительно прогретой при  $80^\circ$ , рН 4) в концентрации 75 мкг на 1 мг ДНК и переосадили изопропанолом. Один из образцов ДНК асцитных клеток (ДНК<sub>а</sub> № 2) был обработан проназой (фирма «Serva», 70 мкг на 1 мг ДНК). Содержание белка (по Лоури) в образцах ДНК не превышало 1%, содержание РНК по (<sup>11</sup>) 6%. Коэффициент молярной экстинкции по фосфору  $\epsilon_p$  имел значение  $6400 \div 6650$ . Молекулярный вес, определенный методом седиментации, составлял  $10 \cdot 10^6$  дальтон для ДНК селезенки интактных мышей (ДНК<sub>н</sub>),  $14 \cdot 10^6$  — для ДНК селезенки лейкозных мышей (ДНК<sub>л</sub>) и  $8 \cdot 10^6$  (образец № 1) и  $9 \cdot 10^6$  (образец № 2) — для ДНК<sub>а</sub>.

Реакцию ДНК с формальдегидом проводили в следующих условиях: температура  $54^\circ$ ; рН 8,7; 25–30 мкг/мл ДНК; 2,5% формальдегид; 0,03 M NaCl; 0,003 M цитрат Na; 0,006 M триэтаноламин. Возрастающие оптической плотности во времени регистрировали на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 255 нм. Каждую кривую воспроизводили 3–4 раза. Градуировку к.ф. метода для данных условий проводили согласно (<sup>10</sup>) по ДНК<sub>н</sub>, фрагментированной ультразвуком в атмосфере азота. Образцы ДНК в ряде случаев подвергали облучению рентгеновскими лучами в дозе 5 крад на установке РУТ-200–20 (мощность 3,4 крад/мин.). При облучении использовали растворы ДНК с концентрацией 300 мкг/мл в 0,1 M NaCl, 0,005 M цитрате Na, рН 7,2.

На рис. 1 представлены кинетические кривые деспирализации ДНК в присутствии формальдегида и их анаморфозы в координатах  $-(\ln V)/t-t$ , полученные при обработке исходных экспериментальных данных в соответствии с теорией метода (9), по формулам

$$V = \exp[-(pvt + 2Cv)t], \quad (1)$$

$$-(\ln V)/t = pvt + 2Cv, \quad (2)$$

где  $V$  — степень спиральности ДНК в момент времени  $t$ , равная  $V = (D_{\max} - D_t) / (D_{\max} - D_0)$ ,  $p$  — константа скорости образования зародышей

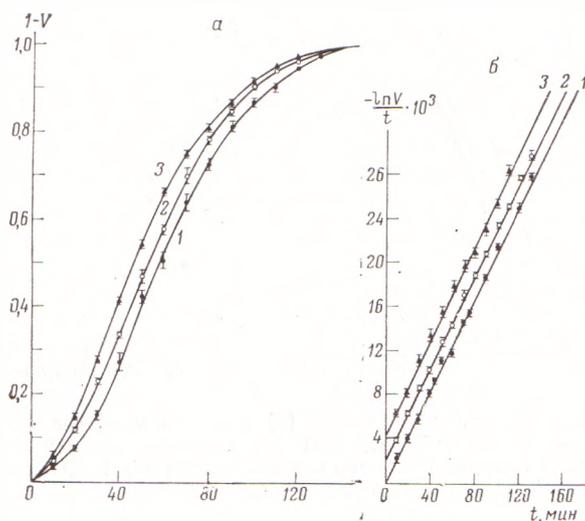


Рис. 1. Кинетические кривые деспирализации ДНК в присутствии формальдегида (а) и их линейные анаморфозы (б) для ДНК селезенки intactных мышей (1), ДНК селезенки мышей с лейкозом La (2), ДНК асцитного рака Эрлиха (3)

деспирализации,  $\text{мин}^{-1}$ :  $v$  — константа скорости деспирализации,  $\text{мин}^{-1}$ ;  $C$  — концентрация дефектов (локально денатурированных участков) в расчете на пару нуклеотидов спирального участка.

В соответствии с формулой (2), при  $t=0$  ордината линейной анаморфозы (1) равна начальной скорости деспирализации ДНК и пропорциональна исходной концентрации дефектов вторичной структуры ДНК:  $I = 2Cv$ . Значение  $v$ , определенное экспериментально, как указано выше, составляет  $6 \pm 1 \text{ мин}^{-1}$ .

Как видно из рис. 1б, начальные ординаты анаморфоз опухолевых ДНК выше, чем начальная ордината ДНК<sub>н</sub>. Это означает, что концентрация локально денатурированных участков в ДНК<sub>н</sub> и особенно в ДНК<sub>а</sub> выше, чем в ДНК нормы. Вычисленные значения концентрации дефектов вторичной структуры  $C$  и обратной ей величины  $\bar{n}$  для всех исследованных образцов ДНК приведены в табл. 1. Следует отметить, что для обоих образцов ДНК асцитных клеток получена хорошая воспроизводимость результатов. Обработка проназой одного из образцов ДНК<sub>а</sub> (№ 2) в процессе выделения показывает, что обнаруженные дефекты не являются следствием действия дезоксирибонуклеаз. Различия в величинах молекулярного веса исследованных образцов ДНК может дать вклад в величину  $C$ , равный  $\pm 0,25 \cdot 10^{-4}$ , что не превышает ошибки.

Одной из причин дестабилизации вторичной структуры ДНК может быть ее функциональная роль в клетках с повышенной митотической активностью, к которым можно отнести и опухолевые клетки. Другой возможной причиной локальной денатурации ДНК могут быть повреждения ее

первичной структуры, в том числе избыточное метилирование оснований, одиночные разрывы цепей и др. Дальнейшие исследования позволят вскрыть истинную причину наблюдаемых дефектов.

Наличие дефектов вторичной структуры опухолевых ДНК, выявленное к.ф. методом, позволяет предположить, что воздействие различных физиче-

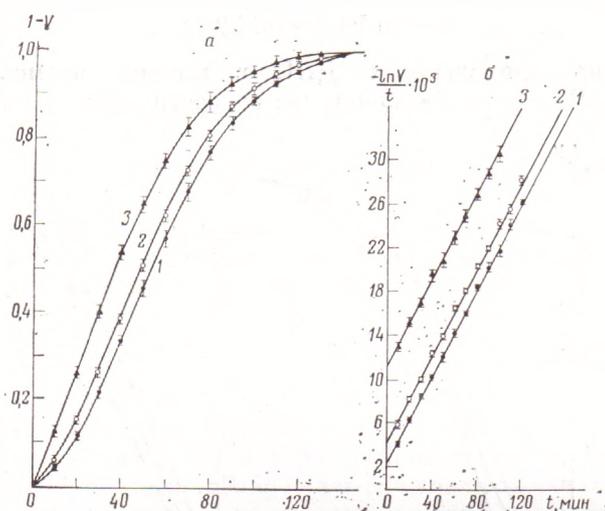


Рис. 2. Кинетические кривые (а) и их анаморфозы (б) для облученных дозой 5 крад ДНК селезенки интактных мышей (1), ДНК селезенки мышей с лейкозом La (2) и ДНК асцитного рака Эрлиха (3)

ских или химических факторов может вызвать большее повреждение ДНК опухолевых тканей в сравнении с ДНК нормы. В связи с этим была проведена серия экспериментов, в которых исследуемые образцы ДНК облучали рентгеновскими лучами *in vitro* дозой 5 крад и после этого анализировали кривые их деспирализации в присутствии формальдегида (рис. 2). Сравне-

Таблица 1

Концентрация дефектов вторичной структуры ДНК, определенная к.ф. методом

Образец	Без облучения		После облучения	
	$C \cdot 10^4$	$\bar{n}^*$	$C \cdot 10^4$	$\bar{n}$
ДНК <sub>н</sub> № 1	$0 \pm 0,3$	15000	—	—
ДНК <sub>н</sub> № 2	$0 \pm 0,3$	15000	$2,0 \pm 0,4$	5000
ДНК <sub>л</sub>	$1,5 \pm 0,3$	7000	$3,5 \pm 0,4$	3000
ДНК <sub>а</sub> № 1	$3,2 \pm 0,3$	3100	$9,5 \pm 0,5$	1100
ДНК <sub>а</sub> № 2	$3,3 \pm 0,2$	3000	—	—

\*  $\bar{n}$  — среднее число пар нуклеотидов в спиральном участке, на которое приходится один локально денатурированный участок; для необлученной ДНК<sub>н</sub> — среднее число пар нуклеотидов в молекуле.

ние этих кривых с аналогичными кривыми, полученными в эксперименте без облучения (рис. 1), свидетельствует о примерно одинаковом повреждении ДНК<sub>н</sub> и ДНК<sub>л</sub> и существенно более глубоком повреждении ДНК<sub>а</sub> (см. табл. 1).

Таким образом, в настоящей работе обнаружено повышенное содержание дефектов вторичной структуры в ДНК опухолевых тканей по сравне-

нию с ДНК нормы и высокая радиочувствительность ДНК асцитных клеток. Различие в стабильности вторичной структуры ДНК нормы и опухоли может иметь существенное значение при подборе физических и химиотерапевтических средств для воздействия на опухоли.

Авторы выражают глубокую признательность акад. Н. М. Эмануэлю за постоянный интерес и внимание к работе.

Институт химической физики  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
15 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. В. Николаева, К. Е. Круглякова, В кн. Химия и биохимия нуклеиновых кислот, Л., 1968, стр. 361. <sup>2</sup> R. Tiel, T. Bardos et al., Cancer. Res., v. 25, 1244 (1965).  
<sup>3</sup> Е. М. Миль, С. К. Завериев и др. ДАН, т. 209, 217 (1973). <sup>4</sup> С. В. Кузьмина, Н. Б. Стражевская, Биофизика, т. 15, 1133 (1970). <sup>5</sup> D. Suci, D. Postescu, Stud. Biophys., v. 35, 89 (1973). <sup>6</sup> S. J. Webb, R. Bather, Phys Med. Biol., v. 15, 271 (1970).  
<sup>7</sup> Н. М. Эмануэль, В кн. Химическая кинетика и ценные реакции, М., 1966, стр. 531.  
<sup>8</sup> Ю. Т. Ковтун, Г. Н. Богданов, Изв. АН СССР, сер. биол., т. 2, 269 (1968).  
<sup>9</sup> Э. Н. Трифонов, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, В сборн. Структура и генетические функции биополимеров, тр. II конфер. РБО Инст. атомн. энергии им. Курчатова, М., 1969, стр. 306. <sup>10</sup> Э. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская и др., Молекулярная биология, т. 2, 887 (1968). <sup>11</sup> I. J. Margur, Mol. Biol., v. 3, 208 (1961).  
<sup>12</sup> В. С. Тонгур, Н. С. Владыченская и др., Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 2, 65 (1964).  
<sup>13</sup> Г. С. Комолова, Э. Н. Трифонов, И. А. Егоров, ДАН, т. 207, № 1, 222 (1972).