

Г. П. ЖИЖИНА, С. И. БОБОВИЧ, А. В. АЛЕСЕНКО, О. Е. ПЕТРОВ,
К. Е. КРУТЛЯКОВА

К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИНАХ ИЗМЕНЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 6 III 1975)

Ранее с помощью кинетического формальдегидного метода ⁽¹⁾ нами обнаружено повышенное количество дефектов вторичной структуры ДНК перевиваемых опухолей (лейкоза La и асцитного рака Эрлиха ⁽²⁾) по сравнению с количеством дефектов в ДНК селезенки интактных мышей.

Одной из возможных причин возникновения дефектов вторичной структуры ДНК может быть, по-видимому, измененная функциональная активность генома активно пролиферирующих опухолевых клеток. По-видимому, дефекты могут появляться в процессе репликации ДНК.

Известно, что печень на ранних стадиях регенерации после гепатэктомии представляет собой частично синхронизированную популяцию быстро пролиферирующих клеток. Поэтому она является удобной моделью для проверки предположения о возможной связи дефектов вторичной структуры ДНК с процессом репликации ДНК. Действительно, из клеток регенерирующей печени крыс в момент максимального синтеза ДНК была выделена фракция неполностью денатурированной ДНК ⁽³⁾.

В связи с этим нами было проведено изучение содержания дефектов вторичной структуры ДНК в регенерирующей печени мышей на начальных этапах регенерации.

Частичную гепатэктомию проводили на мышах-самцах линии СВА по методу Хиггинса ⁽⁴⁾. Для сравнительных исследований свойств ДНК нормальных и опухолевых тканей необходимо соблюдать строго стандартные условия. ДНК выделяли с помощью модифицированного метода Мармура ⁽⁵⁾, обрабатывали РНКазой, затем проназой (по 30 мин., 100 мкг на 1 мг ДНК). Очищенные образцы ДНК имели следующие характеристики: содержание белка 1%, содержание РНК 1–2%, коэффициент экстинкции по фосфору 5400–6000, молекулярный вес $(8–14) \cdot 10^6$ дальтон. Реакцию с формальдегидом проводили при 54°, концентрация ДНК 25 мкг/мл, концентрация формальдегида 2,2%, pH 8,75. При построении линейных анаморфоз использовали метод наименьших квадратов.

На рис. 1, 1 приведены результаты измерения концентрации дефектов вторичной структуры ДНК регенерирующей печени мышей в течение первых 50 час. после частичной гепатэктомии. Тот же рисунок (кривая 2) показывает включение меченого тимидина в клетки регенерирующей печени ⁽⁶⁾. Оно пропорционально числу клеток, находящихся в S-фазе в тот же период времени. Из сопоставления кривых 1 и 2 можно видеть, что ДНК клеток печени, находящихся в пресинтетической фазе (20–25 час.), как и ДНК нормальных тканей, не содержит дефектов вторичной структуры. Через 38–40 час. после гепатэктомии, когда около 50% клеток вступают в фазу синтеза ДНК, в ДНК появляются дефекты вторичной структуры, однако количество их незначительно, $0,5 \cdot 10^{-4}$. По мере прохождения клеток через S-фазу количество дефектов увеличивается незначительно, не превышая $1 \cdot 10^{-4}$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синхро-

низированный процесс репликации ДНК может обуславливать образование дефектов вторичной структуры ДНК в значительно меньшей концентрации, чем обнаружено ранее в ДНК опухолевых клеток ($1,5 \cdot 10^{-4}$ — $3,3 \cdot 10^{-4}$).

Как известно, асцитный рак Эрлиха (а.р.Э.) является одной из хорошо исследованных и удобных кинетических моделей развития опухолевого

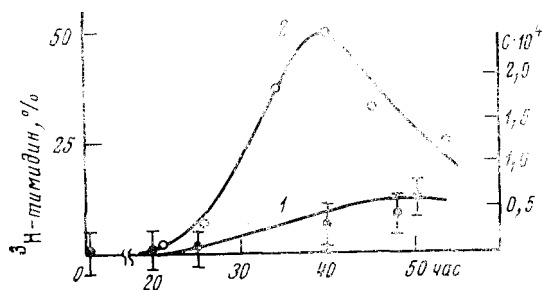


Рис. 1. Кинетические кривые изменения концентрации (C) дефектов вторичной структуры ДНК (1) и включения меченого тимидина (2) в клетки регенерирующей печени мышей в начальный период после частичной гепатэктомии

процесса. Изучены кинетические параметры роста популяции асцитных клеток (7), изменение продолжительности клеточного цикла и фазы синтеза ДНК (S-фазы) (8). В связи с изложенным выше интересно было бы сопоставить изменение этих величин с изменением количества дефектов вторичной структуры ДНК в процессе развития а.р.Э. Опыт проводили на беспородных мышах-самцах весом 20–22 г, перевивая внутривенно 10^6 клеток.

Исследованное нами изменение содержания дефектов вторичной структуры ДНК асцитных клеток при развитии а.р.Э. представлено на рис. 2а. Видно, что на 5-е сутки после перевивки концентрация дефектов ДНК незначительна ($1 \cdot 10^{-4}$), а затем она быстро возрастает, превышая $4 \cdot 10^{-4}$ на 8–9 сутки. Это увеличение содержания дефектов ДНК коррелирует с увеличением продолжительности

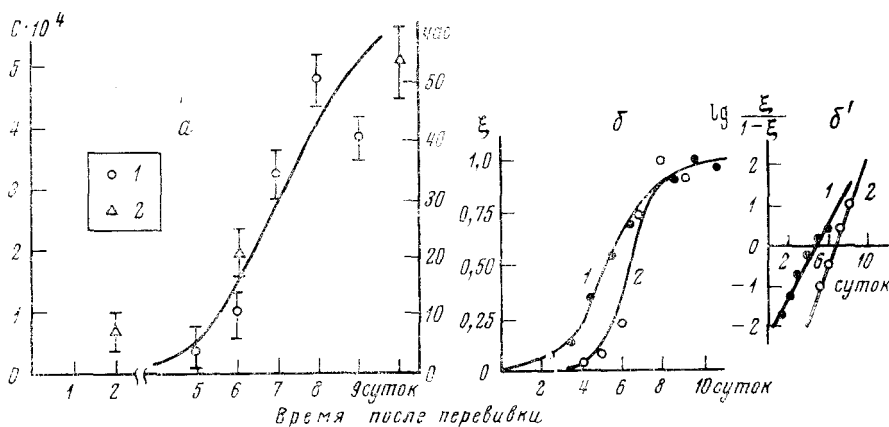


Рис. 2. а — кинетическая кривая изменения концентрации (C) дефектов вторичной структуры ДНК (1) и изменение продолжительности S-фазы асцитных клеток (2) (6) при развитии а.р.Э; б — кинетические кривые и их анаморфозы (б') роста популяции асцитных клеток (1) и изменения концентрации дефектов асцитной ДНК (2) при развитии а.р.Э.

S-фазы асцитных клеток, т. е. соответствует замедлению процесса репликации ДНК. Действительно, согласно данным (8), продолжительность S-фазы клеток а.р.Э (при перевивке 10^7 клеток) возрастает от 6–8 час. на 2-е сутки до ~50 час. на 10-е сутки (рис. 2а).

На рис. 2б приведены кривые изменения дефектов (2) и роста популяции клеток (1) а.р.Э. в координатах: $\xi - t$, где ξ — относительная величина ($y/y_{\max}$), а t — время (в сутках) развития опухолевого процесса.

Видно, что кривые имеют S-образный характер, описываются уравнением автокатализа первого порядка и хорошо спрямляются в координатах

$$\lg \frac{\xi}{1-\xi} - t.$$

Значение константы скорости для роста популяции асцитных клеток составляет $0,4 \text{ суток}^{-1}$, а для роста концентрации дефектов ДНК $0,84 \text{ суток}^{-1}$, т. е. вторая кривая имеет вдвое большую константу скорости. Из рисунка видно также, что дефекты вторичной структуры ДНК а.р.Э. появляются тогда, когда скорость роста популяции клеток уменьшается вследствие увеличения продолжительности клеточного цикла, и в том числе S-фазы.

Таким образом, согласно полученным данным, накопление дефектов вторичной структуры ДНК в процессе развития а.р.Э. происходит в период, соответствующий замедлению роста популяции асцитных клеток. Это также подтверждает вывод о незначительном вкладе процесса репликации ДНК в образование дефектов вторичной структуры ДНК опухолевых клеток.

Интересно отметить динамичный характер изменения дефектов вторичной структуры ДНК а.р.Э. На 7-е сутки после перевивки опухолевых клеток количество дефектов в молекуле ДНК равно $3,2 \cdot 10^{-4}$. После повторной перевивки этих клеток мышам количество дефектов ДНК на 5-е сутки развития опухоли равно всего лишь $0,5 \cdot 10^{-4}$. Причина этого явления пока не ясна. Очевидно, что дестабилизация вторичной структуры ДНК а.р.Э. имеет обратимый характер. Возможно, стабильность ДНК зависит от взаимоотношения опухоль — организм.

Авторы выражают признательность академику Н. М. Эмануэлю за внимание к работе и Э. В. Соколовой за практическую помощь.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Н. Трифонов, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, В сб.: Структура и генетические функции биополимеров, Тр. II конф. радиобиол. отд. Ин-та атомн. энергии им. Курчатова, М., 1969, стр. 306. ² Г. П. Жижина, С. И. Бобович и др., ДАН, т. 217, № 3, 722 (1974). ³ В. С. Дашкевич, Г. М. Дымин и др., Молекулярная биол., т. 6, в. 5, 689 (1972). ⁴ G. M. Higgins, R. M. Anderson, Arch. Biochem. and Biophys., v. 35, 340 (1952). ⁵ I. J. Marmur, Mol. Biol., v. 3, 208 (1961). ⁶ А. В. Алексенко, Е. Б. Бурлакова, ДАН, т. 207, № 6, 1471 (1972). ⁷ Н. М. Эмануэль, ДАН, т. 217, № 1 (1974). ⁸ I. F. Tannock, Cancer Res., v. 29, 1527 (1969).