

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

**СООТНОШЕНИЕ ПИРИМИДИНОВЫХ ИЗОПЛИТОВ ДНК
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ
И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 II 1975)

В последнее время появились работы, в которых авторы приходят к заключению, что опухолевая и лейкозная трансформация обусловлена изменениями генома трансформированных клеток (¹⁻⁵).

Не исключена возможность, что и нормальная дифференцировка некоторых соматических клеток также сопровождается изменениями первичной структуры ДНК (⁶). Сравнительное исследование нуклеотидного состава ДНК опухолевых и нормальных клеток до сих пор не позволило выявить достоверных различий в первичной структуре ДНК, по-видимому, вследствие того, что «опухолевые гены» составляют малую долю суммарной ДНК, а определение нуклеотидного состава ведется с довольно большой ошибкой. Блочный метод анализа ДНК представляет собой более чувствительный метод выявления различий в первичной структуре ДНК нормальных и опухолевых клеток.

Применение такого метода позволило нам ранее впервые выявить достоверные различия в относительном содержании некоторых пиримидиновых изоплитов ДНК периферической крови человека в норме и при лейкозе (⁴). Задачей настоящего исследования являлось определение изоплитного состава и неизомерных компонентов изоплитов ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при хроническом лимфолейкозе (х.л.л.). Лимфоциты выделяли из периферической крови при помощи фикола и верографина по методу Бёума (⁷). Выделенные клетки гомогенизировали в буферном растворе, содержащем 0,1 М NaCl и 0,05 М цитрат натрия, из расчета на $1 \cdot 10^9$ клеток 40–50 мл раствора. К гомогенату добавляли равный объем водонасыщенного фенола pH 8,3 (2 мл 5N NaOH на 100 мл водонасыщенного фенола). Дальнейшую обработку производили по ранее описанному методу с использованием щелочной обработки для очистки ДНК от примеси РНК (⁸).

20–30 мг ДНК гидролизовали по методу Бартон до пиримидиновых последовательностей в 20–30 мл 66% перегнанной муравьиной кислоты, содержащей 2% перекристаллизованного дифениламина (⁹). После обработки гидролизата эфиром его упаривали в вакуумном роторном испарителе при температуре 30° до небольшого объема (~1,0 мл), прибавляли 2 мл 0,05 М раствора ацетата лития pH 5,6. Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку (0,9×29 см) с ДЭАЭ-целлюлозой в ацетатной форме (ДЕ-32, емкость 1 экв/г, Англия). Пуриновые основания и другие примеси удаляли пропусканием через колонку 0,05 М раствора ацетата лития pH 5,6 до полного исчезновения поглощения элюата при 260 нм.

Хроматографическое разделение пиримидиновых изоплитов производили в 0,05 М растворе ацетата лития pH 5,6 с использованием линейного градиента хлористого лития (0,00–0,35 М) (¹⁰). Общий объем градиента 1 л, скорость элюции 0,7 мл/мин, объем фракций 10 мл. В этих условиях происходило разделение олигонуклеотидов в соответствии с числом нуклеотидных остатков. Всего выявлялось, как правило, 8–9 изоплитов (рис. 1). Профиль элюции свидетельствовал о хорошем разделении смеси пиримидиновых изоплитов. Расчет содержания изоплитов в ммольях производили по Спенсеру (¹¹).

Для разделения полученных изоплитов на компоненты по составу ~~фрагментов~~ соответствующих изоплитов 5 опытов объединяли и полученные ~~4—10~~ единиц суммарной оптической плотности при 270 нм разбавляли ~~разным~~ объемом дистиллированной воды и пропускали через колонки ~~0,9 × 29 см~~ с ДЭАЭ-целлюлозой в форматной форме (ДЕ-32, Англия). Хроматографию и количественное определение осуществляли по методу Спентера ~~и~~. Скорость элюции 0,7 мл/мин, объем фракций 3 мл.

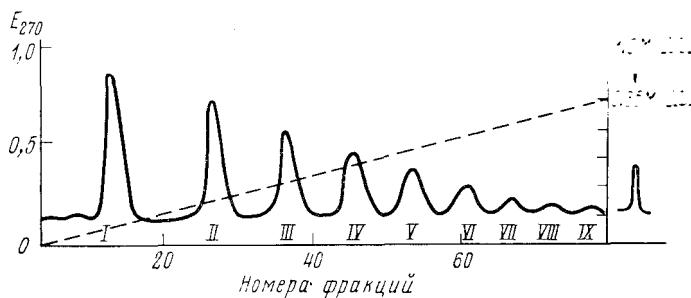


Рис. 1. Профиль элюции пиримидиновых нуклеотидных изоплитов ДНК лимфоцитов крови человека (норма). Хроматография на колонке (0,9×29 см) с ДЭАЭ-целлюлозой в ацетатной форме в 0,05 *M* растворе ацетата лития pH 5,6 с градиентом LiCl от 0,00 до 0,35 *M*. Запись кривой осуществлена на «Увикорде II» при $\lambda 254$ нм. I–IX — номера изоплитов

Основные результаты проведенных нами экспериментов представлены в табл. 1—2. Из табл. 1 видно, что относительное содержание I и II изоплитов при х.л.л. ниже, чем в норме, тогда как относительное содержание V и VI изоплитов достоверно выше, чем в норме. Отношение количества материала изоплитов при х.л.л. к количеству материала в норме возрастает пропорционально полимерности изоплита.

В табл. 2 приведены результаты хроматографического разделения изоплитов на компоненты по составу оснований. Видно, что при х.л.л. по сравнению с нормой во всех изоплитах имеется однообразная тенденция: уменьшение относительного содержания тех компонентов, в которых преобладает цитозин, и увеличение содержания компонентов, в которых преобладает тимин. В соответствии с этим можно ожидать, что при лейкозе отношение Т/Ц в ДНК должно быть увеличено по сравнению с нормой. Однако ввиду того, что наибольшее изменение величины Т/Ц касается относительно крупных блоков, т. е. V–VI изоплитов, содержание которых невелико, различия нуклеотидного состава ДНК между нормой и лейкозом должны быть небольшие или на грани ошибки определения. В частности, обнаружено ⁽¹³⁾, что при разных типах лейкозов мышей отношение Т/Ц завышено по сравнению с нормой ($T/C_{\text{лейкоз}}=1,42$; $T/C_{\text{норма}}=1,38$). Эти различия носили лишь характер тенденции, а не статистической достоверности. Приводим расчеты соотношений оснований в ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при лейкозе, сделанные по нашим данным, которые получены Т. В. Боровковой. (В скобках — число опытов. Величины отношений Т/Ц и А/Г были усреднены, исходя из правил Чаргаффа о равенстве этих отношений.)

Для ДНК лимфоцитов больных х.л.л. отношение Т/Ц и А/Г статистически достоверно больше, чем для ДНК лимфоцитов здорового человека.

	В норме (доноры)	При х.л.л.
Отношения Т/Ц и А/Г ($M \pm m$)	$1,42 \pm 0,02$ (10)	$1,51 \pm 0,01$ (11)
Достоверность различия между лейкозной и нормальной ДНК (<i>P</i>)	—	$P < 0,001$

Таблица 1

Различия в содержании пиримидиновых изоплитов ДНК лимфоцитов крови человека в норме и при хроническом лимфолейкозе (%).
100% соответствует сумме материала I-VI изоплитов

Лимфоциты	№ опытов	Изоплиты					
		I	II	III	IV	V	VI
Доноры	1	27,48	24,21	16,49	13,52	11,29	6,98
	2	29,06	26,06	18,79	12,00	8,68	5,37
	3	27,16	24,07	19,75	16,17	7,77	5,06
	4	30,35	24,57	18,79	14,45	7,48	4,33
	5	24,60	22,98	19,64	16,82	9,19	6,73
	$M \pm m$	$27,74 \pm 0,98$	$24,38 \pm 0,51$	$18,70 \pm 0,58$	$14,60 \pm 0,83$	$8,88 \pm 0,67$	$5,69 \pm 0,51$
Больные х.л.л.	1	26,20	21,55	18,04	14,04	12,89	7,26
	2	27,12	21,29	16,11	15,89	11,22	8,34
	3	23,59	21,48	19,08	15,80	11,41	8,60
	4	23,08	21,35	18,39	15,86	11,98	9,32
	5	23,56	21,90	18,76	15,40	11,56	8,79
	$M \pm m$	$24,72 \pm 0,79$	$21,52 \pm 0,11$	$18,08 \pm 0,52$	$15,40 \pm 0,35$	$11,81 \pm 0,29$	$8,47 \pm 0,42$
	P	<0,05	<0,001	>0,1	>0,1	<0,01	<0,01
	Лейкоз						
	Норма	0,89	0,88	0,97	1,05	1,33	1,47

Таблица 2

Содержание пиримидиновых олигонуклеотидов разного состава в ДНК лимфоцитов в норме (н.) и при хроническом лимфолейкозе (х.л.л.)

№ изоплита	Состав олигонуклеотидов	Содержание олигонуклеотидов (н), %	Содержание олигонуклеотидов (х.л.л.), %	х.л.л./н, % *	Содержание олигонуклеотидов в ДНК гепатомы Новикова, % (¹⁴)	№ изоплита	Состав олигонуклеотидов	Содержание олигонуклеотидов (н), %	Содержание олигонуклеотидов (х.л.л.), %	х.л.л./н, % *	Содержание олигонуклеотидов в ДНК гепатомы Новикова, % (¹⁴)
I	pЦp	42,42	38,00	80,00	43,9	V	Ц ₅ p ₆	8,80	7,65	115,62	—
	pTp	57,58	62,00	96,10	56,1		Ц ₄ Tp ₆	14,95	12,75	113,43	9,3
II	Ц ₂ p ₃	27,50	26,90	86,08	20,3	VI	Ц ₃ T ₂ p ₆	29,05	25,25	115,60	27,0
	ЦTp ₃	45,60	43,90	85,28	51,1		Ц ₂ T ₃ p ₆	29,65	31,45	141,07	34,3
	T ₂ p ₃	26,90	29,20	95,52	28,6		ЦT ₄ p ₆	10,95	14,55	176,73	22,4
III	Ц ₃ p ₄	24,18	11,73	47,06	3,8		T ₅ p ₆	6,60	8,35	168,26	7,0
	Ц ₂ Tp ₄	23,52	36,17	149,17	33,9		Ц ₆ p ₇	4,55	2,53	81,74	—
	ЦT ₂ p ₄	37,00	33,47	87,75	41,8		Ц ₅ Tp ₇	16,35	10,55	94,85	4,2
	T ₃ p ₄	15,0	18,63	120,47	20,5		Ц ₄ T ₂ p ₇	25,82	17,55	99,92	17,2
IV	Ц ₄ p ₅	9,25	5,97	67,76	1,9		Ц ₃ T ₃ p ₇	29,08	25,45	128,65	30,3
	Ц ₃ Tp ₅	16,80	19,00	118,75	20,6		Ц ₂ T ₄ p ₇	15,10	24,70	240,46	29,0
	Ц ₂ T ₂ p ₅	41,20	34,78	88,64	36,8		ЦT ₅ p ₇	7,20	13,60	277,67	15,6
	ЦT ₃ p ₅	27,60	28,31	107,70	28,4		T ₆ p ₇	2,70	5,62	305,98	3,5
	T ₄ p ₅	5,15	11,94	243,44	12,2						

* Различие в содержании компонентов с учетом различия в содержании изоплитов см. табл. 1.

Приведенные в табл. 2 данные работы (¹⁴) по содержанию олигонуклеотидов ДНК гепатомы Новикова больше приближаются к соответствующим данным при лейкозе, чем к норме.

Таким образом, относительно более высокое содержание тимпновых олигонуклеотидов в ДНК лимфоцитов больных х.л.л. сопровождается досто-

верным увеличением отношения Т/Ц по сравнению с ДНК лимфоцитов здоровых людей. Такие различия между лейкозными или опухолевыми клетками, с одной стороны, и соответствующими нормальными клетками, с другой стороны, демонстрируются впервые.

Ранее (⁴) нами было установлено достоверное уменьшение материала во II изоплите при х.л.л. по сравнению с нормой. Однако в этих опытах мы не могли исключить небольшую примесь РНК в препаратах ДНК, поскольку обработку их производили только РНКазой, которая не гидролизует РНК, находящуюся в гибридном комплексе с ДНК. Кроме того, ранее (¹) донорскую ДНК получали из лейкоцитарной массы периферической крови человека, в которой гранулоциты составляют около 60–70%, в данном же исследовании ДНК выделяли только из лимфоцитов с чистотой 99%.

Теперь установлено, что тимические лимфоциты содержат терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу — фермент, катализирующий перенос любого дезоксирибонуклеотида на любой 3-ОН-конец цепи ДНК (¹⁵). Высокая активность этого фермента обнаружена в лейкозных клетках Т-типа лимфобластов больного острым лимфолейкозом. Для лимфоцитов В-типа, не содержащих терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, характерно присутствие репликативной ДНК-полимеразы, которая также делает «ошибки». При этом следует также иметь в виду изменение количественных соотношений клеток крови при лейкозе: периферические лимфоциты больных х.л.л. более чем на 90% состоят из В-клеток, тогда как лимфоциты здоровых людей содержат Т-клетки в значительно большем количестве, чем при лейкозе. Таким образом, выявляемое нами различие первичной структуры ДНК в норме и при лейкозе может быть объяснено наличием в лимфоцитах вышеуказанных ферментов, вызывающих изменения ДНК, а также частично связанным с этим изменением соотношения фракций ДНК при лейкозе по сравнению с нормой.

Итак, нами установлено, что относительное содержание I и II изоплитов (моно- и динуклеотидные фрагменты ДНК) при лейкозе достоверно ниже, чем в норме, тогда как относительное содержание V и VI изоплитов (пента- и гексануклеотидные фрагменты ДНК) достоверно выше, чем в норме. Отношение количества материала изоплитов при лейкозе к количеству материала в норме возрастает пропорционально полимерности изоплита. При лейкозе по сравнению с нормой во всех изоплитах имеется однообразная тенденция — уменьшение относительного содержания тех компонентов, в которых преобладает цитозин, и увеличение содержания компонентов, в которых преобладает тимин.

При хроническом лимфолейкозе по сравнению с нормой в IV–VI изоплитах относительное содержание T₄, T₅ и T₆ резко завышено, особенно по T₆-компоненту (в 3 раза).

Институт гематологии и
переливания крови

Поступило
19 II 1975

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. R. Durand, T. Smalley. The Chronic Leukemias Chemistry, Pathophysiology and Treatment. U.S.A., Illinois, 1972. ² H. M. Temin. J. Nat. Cancer Inst., v. 46, № 2, 3–7 (1971). ³ Г. А. Кривский, А. Н. Батуцес и др., ДАН, т. 203, № 1, 233 (1972). ⁴ В. А. Кузьмичев, Г. А. Кривский и др., ДАН, т. 214, № 5, 1195 (1974). ⁵ W. Bart, J. W. Yates, H. J. Wallace et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, № 9, 2629 (1973). ⁶ D. Baltimore, Nature, v. 248, 409 (1974). ⁷ A. Böyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest., v. 21, Suppl. 97, 77 (1968). ⁸ Г. А. Кривский, А. А. Абулов и др., Радиобиология, т. 11, № 5, 660 (1971). ⁹ K. Burton, G. B. Petersen, Biochem. J., v. 75, 17 (1960). ¹⁰ J. H. Spencer, R. E. Cape et al., Canad. J. Biochem., v. 47, 329 (1969). ¹¹ J. H. Spencer, R. E. Cape et al., Canad. J. Biochem., v. 46, № 6, 627 (1968). ¹² R. Gerny, W. E. Mushynski, J. H. Spencer. Biochim. et biophys. acta, v. 169, 439 (1968). ¹³ H. Bielka, L. Venker, J. Schneiders, Zs. Krebsforsch., B. 64, 478 (1962). ¹⁴ T. W. Sneider, J. Biol. Chem., v. 246, № 15, 4774 (1971). ¹⁵ M. S. Coleman, J. J. Hutton, F. J. Bollum, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 58, № 4, 1104 (1974).