

УДК 577.17+547.963.3

БИОХИМИЯ

Академик АН ГрузССР Э. Л. АНДРОНИКАШВИЛИ, А. И. БЕЛОКОБЫЛЬСКИЙ,
Л. М. МОСУЛИШВИЛИ, Н. Е. ХАРАБАДЗЕ, Н. И. ШОНИЯ

О ТКАНЕВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ С ДНК IN VIVO

В настоящее время имеется цикл исследований, посвященных содержанию следовых количеств различных элементов в нуклеиновых кислотах. В работе (1) указывается на содержание Mg, Fe и Cu в коммерческих препаратах дрожжевой РНК. Работа выполнена с использованием колориметрического метода определения элементов. В 1957 г. сообщалось о наличии Mg, Ca, Fe и Cu в РНК вируса табачной мозаики. В этой работе для элементного анализа использовалась эмиссионная спектроскопия (2). В дальнейшем была опубликована работа (3), посвященная исследованию содержания Mg, Ca, Sr, Ba, Pb, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn и Cd в РНК тимуса теленка, почек лошади, ретикулоцитов кролика, печени крыс и простейших (*Euglena gracilis*). Указанные элементы определены и в ДНК печени коровы. Mg, Cr, Ca, Sr, Ba, Al, Mn, Fe, Ni и Cu определены в РНК вируса табачной мозаики (4). Эти исследования проводились эмиссионно-спектральным анализом. В 1963 г. опубликована работа (5), посвященная определению содержания Na, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn и Cd в коммерческих препаратах дрожжевой РНК и ДНК спермы сельди и лосося. Кроме того, авторами этой работы в РНК вируса табачной мозаики определено содержание Na, Mn, Cu, Zn и Au. Для элементного анализа использовался метод нейтронной активации.

В работе (7) методом нейтронного активационного анализа исследовалось содержание Zn, Cu, Mn и Au в ДНК и РНК поджелудочной железы кроликов. О результатах активационного анализа Zn, Fe, Ag, Sc, Co и Sb в ДНК и РНК, выделенных из крысиной саркомы М-1, карциносаркомы Walker-256 и печени здоровых крыс, сообщалось в работе (7). Обнаружено, что нуклеиновые кислоты, выделенные из саркоматозных опухолей, отличаются по микроэлементному составу от ДНК, выделенных из печени здоровых крыс. Кроме того, в работе (8) показано, что содержание различных микроэлементов в ДНК, полученной из саркомы М-1, в процессе роста опухоли может меняться по-разному: содержание одних элементов меняется незначительно, как это имеет место для Zn, а содержание Fe, Cr и Sb колеблется заметно по мере роста саркомы М-1.

Анализ полученных разными авторами результатов относительно содержания микроэлементов в нуклеиновых кислотах, выделенных из различных биологических источников, свидетельствует о том, что микроэлементный состав нуклеиновых кислот в значительной степени зависит от специфики самого биологического объекта. Вместе с тем возникает вопрос, в какой степени нуклеиновые кислоты могут отличаться по содержанию в них микроэлементов, если они получены из разных органов одних и тех же животных.

В представленной работе даются результаты исследования содержания Zn, Co, Cr, Sc, Sb, Fe и Hg в препаратах ДНК, выделенных из печени, почек и селезенки здоровых белых крыс. Проведение этой работы было обусловлено необходимостью установить на статистическом материале, в какой степени в наших исследованиях микроэлементного состава ДНК из различных органов одних и тех же животных имеет место разброс концентраций, обусловленный биологическими причинами.

Таблица 1

Содержание металлов в препаратах ДНК, выделенных из печени, почек и селезенки здоровых крыс

Элемент	Содержание элементов, мкг на 1 г сухого препарата ДНК ($M \pm \Delta m$)			Статистические параметры					
	1. Печень	2. Почки	3. Селезенка	t_{12}	P_{12}	t_{13}	P_{13}	t_{23}	P_{23}
Цинк	$1,58 \pm 0,28$	$1,64 \pm 0,26$	$7,85 \pm 2,05$	0,15	*	3,1	0,02	3,2	0,02
Кобальт	$0,072 \pm 0,0118$	$0,038 \pm 0,0079$	$0,083 \pm 0,0078$	2,4	0,05	0,5	*	3,6	0,01
Хром	$1,93 \pm 0,29$	$2,08 \pm 0,31$	$5,68 \pm 1,14$	0,5	*	3,2	0,01	3,1	0,02
Скандий	$0,028 \pm 0,006$	$0,022 \pm 0,002$	$0,032 \pm 0,007$	0,9	*	0,9	*	1,4	*
Сурьма	$0,50 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,05$	$1,12 \pm 0,3$	0,8	*	2,1	0,10	2,2	0,10
Железо	$16,1 \pm 1,9$	$8,1 \pm 1,4$	55 ± 16	3,4	0,01	2,4	0,03	2,9	0,02
Ртуть	$0,65 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,15$	$1,58 \pm 0,17$	0,7	*	4,9	0,001	4,8	0,001
Число опытов**	6	5	6						

* Различия статистически недостоверны.

** В каждом опыте было использовано 8—10 животных; M — среднее арифметическое; m — средняя ошибка среднего арифметического $\sigma/\sqrt{n}$; P — уровень значимости; $t_{ik} = (M_i - M_k) / \sqrt{\Delta M_i^2 + \Delta M_k^2}$.

Препараты ДНК из печени, почек и селезенки здоровых крыс получали по методу ⁽⁹⁾ с некоторыми отклонениями, связанными со специфической экспериментов при проведении микроэлементного анализа биообъектов. Органы декапитированных животных (в каждом опыте использовали 8—10 крыс) незамедлительно помещали в полиэтиленовые флаконы и сохраняли в жидком азоте. Измельчение замороженных органов производили в тефлоновой ступке. Гомогенизация измельченных и оттаявших в растворе 0,15 M NaCl — 0,004 M Na₂ЭДТА органов производилась в стеклянном цилиндре с тефлоновым поршнем. Следует особо подчеркнуть наличие в этом растворе Na₂ЭДТА, образующего комплексные соединения с металлами, загрязняющими гомогенат. Дальнейшие процедуры проводили в соответствии с рекомендациями оригинальной методики ⁽⁹⁾, за исключением дополнительной депротеинизации конечного препарата ДНК хлороформом в присутствии Na₂ЭДТА. Эта методика позволяет получить нативные и чистые препараты ДНК (содержание примесного белка составляет 1% и меньше, а РНК меньше 0,5%) из различных органов с хорошим выходом.

Количественное определение содержания Zn, Co, Cr, Sc, Sb, Fe и Hg проводили методом нейтронного активационного анализа. С этой целью сухие препараты нуклеиновых кислот облучали в низкотемпературном канале ядерного реактора ИРТ-М Института физики АН ГрузССР. В качестве охлаждающего агента использовался газообразный гелий при температуре жидкого азота. Интегральный поток тепловых нейтронов составлял $2 \cdot 10^{19}$ нейтр/см². Заметим, что облучение биологических материалов с низкотемпературным охлаждением позволяет предохранить образцы от радиационного нагревания, приводящего к неконтролируемым потерям определяемых элементов.

γ -Спектрометрические измерения проводили на полупроводниковом Ge(Li)-детекторе высокого разрешения. Для снятия γ -спектров и обработки результатов использовали мини-ЭВМ типа «Plurimat 20/16 К» производства французской фирмы «Intertechnique», снабженную специальной программой РР М-01 С для обработки ядерных спектров. Результаты активационного анализа семи элементов после статистической обработки приведены в табл. 1.

Результаты показывают, что, во-первых, содержания цинка, хрома, скандия, сурьмы и ртути в печеночной и почечной ДНК практически оди-

наковы; во-вторых, содержание железа в селезеночной ДНК более чем в два раза выше по сравнению с ДНК печени и почек соответственно; в-третьих, с вероятностью не менее 95% можно утверждать, что уровень содержания цинка, кобальта, хрома и ртути в селезеночной ДНК в три раза больше, чем в печеночной и почечной ДНК.

Возникает вопрос, существует ли прямая корреляция между содержанием тяжелых элементов в цельной ткани и ДНК, выделенной из этой же ткани. Можно утверждать, что такая корреляция не существует. При сравнении содержания цинка в цельной ткани печени и селезенки, имеющего значение 146 ± 13 мкг на 1 г сухой ткани и 84 ± 4 мкг на 1 г сухой ткани соответственно, с содержанием цинка в ДНК, выделенных из этих же тканей, $1,58 \pm 0,28$ мкг и $7,85 \pm 2,05$ мкг соответственно становится очевидным, что в печеночной ткани содержание цинка выше, чем в селезенке, тогда как содержание этого элемента в ДНК селезенки выше, чем в ДНК печени. Подобные сведения для железа, содержащегося в количестве 509 ± 52 мкг и 710 ± 51 мкг на 1 г сухой ткани для печени и селезенки соответственно, подтверждают эти выводы.

Геномные наборы клеток разных тканей одного организма одинаковы, однако существуют значительные морфологические и биохимические различия между клетками разных тканей и обусловлены они функционированием разных участков генома в клетках различных тканей. Существование органной и тканевой специфичности ДНК у эукариот проявляется в количественном содержании прочно связанных аминокислот⁽¹⁰⁾ и в уровне метилирования⁽¹¹⁾.

Обнаруживаемые в составе нуклеиновых кислот металлы, по всей видимости, образуют прочный комплекс, так как в процессе получения препаратов ДНК используется натриевая соль ЭДТА, способная связывать свободные и слабосвязанные с ДНК ионы металлов.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение о том, что связывание некоторых тяжелых металлов с молекулами РНК в разных органах происходит по-разному.

Институт физики
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
16 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Jungar, Science, v. 113, 378 (1951). ² U. S. Loring, R. S. Waritz, Science, v. 125, 646 (1957). ³ W. E. C. Wacker, B. L. Vallee, J. Biol. Chem., v. 234, № 12, 3257 (1959). ⁴ W. E. C. Wacker, M. P. Gordon, J. W. Huff, Biochem., v. 2, № 4, 716 (1963). ⁵ G. Stechlik, H. Altmann, Monatsch. Chem., v. 94, № 6, 1163 (1963). ⁶ А. И. Белокобыльский, Э. Н. Гинтури и др., Биофизика, т. 13, в. 6, 951 (1968). ⁷ Э. Л. Андроникашвили, Л. М. Мосулишвили и др., ДАН, т. 195, № 4, 979 (1970). ⁸ E. L. Andronikashvili, L. M. Mosulishvili et al., Cancer Res., v. 34, № 2, 345 (1974). ⁹ E. Okuhara, Anal. Biochem., v. 37, 175 (1970). ¹⁰ T. S. Salter, M. E. Balis, Biochim. et biophys. acta, v. 149, 220 (1967). ¹¹ B. F. Vanyushin, A. N. Belozersky et al., Nature, v. 218, 1066 (1968).