

УДК 616—006.04—018.1—07/:615.272.6:547.963

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ
ЭКЗОГЕННЫХ ДНК

Р. А. ЗАХАРЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН, Г. С. БАХЧИЕВА, А. С. АГАБАЛЯН

Изучалась биологическая активность экзогенных ДНК, выделенных из разных источников, в культуре клеток фибробластов китайского хомяка В-6. Результаты показали, что обработка культуры клеток экзогенными ДНК способствует значительному продлению срока жизнедеятельности клеток без замены питательной среды. Предполагается, что экзогенная ДНК вовлекается в регуляцию гомеостатических свойств клеточной поверхностной мембраны.

Ключевые слова: экзогенная ДНК, культура клеток.

Как известно, нуклеиновые кислоты, выделенные из самых различных биологических объектов, в большинстве случаев при введении в клетки разных организмов, обнаруживают выраженную биологическую активность. Так, РНК и ДНК, выделенные из инфекционных вирусов, вызывают в культуре клеток и организме животного развитие соответствующей инфекции; плазмидные ДНК, введенные в бактерии, придают последним новые свойства, а ДНК, полученные из онкогенных вирусов, при взаимодействии с клетками наделяют их способностью к непрерывному росту и делению, т. е. вызывают трансформацию клеток.

Имеется множество экспериментальных данных о влиянии экзогенных нуклеиновых кислот на метаболические процессы в нормальных и патологически измененных популяциях клеток [5]. Направленное использование этих препаратов открывает перспективу для более устойчивого восстановления биосинтеза белка в пораженной и регенерирующей клетке по сравнению с другими биологически активными соединениями, кроме того, может оказаться эффективнее и в том случае, когда введение недостающих белков не дает положительных результатов.

В данной работе нам представлялось интересным изучить некоторые особенности взаимодействия экзогенных ДНК, выделенных из клеток опухоли саркомы 45 и клеток печени интактных животных, с клетками фибробластов китайского хомяка.

Материал и методика. Культура клеток фибробластов китайского хомяка В-6 получена из лаборатории генетики соматических клеток Института молекулярной генетики АН СССР и поддерживалась непрерывными пассажами в среде Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посева клеток составляла $2-5 \times 10^5$ клеток/мл. Опухоль, саркома-45, трансплантировалась крысам по общепринятому методу [3]. ДНК из опухолевых и печеночных клеток выделяли по методу, предложен-

лему Мармуром [12]. Количественные и качественные характеристики препаратов, полученных ДНК проводили спектрофотометрически. Отношение A_{260}/A_{280} в используемых препаратах во всех случаях было около 2. Электрофоретическую идентификацию изолированных препаратов ДНК проводили в 0,6%-ном геле агарозы. Режим электрофореза, окрашивание гелей, элюция ДНК с гелей описаны нами ранее [6]. Гидролиз РНК в суммарных препаратах ДНК осуществляли обработкой панкреатической РНК-азы (20 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°.

Внесение ДНК в клетки фибробластов китайского хомяка проводили двумя путями: 1) клетки предварительно обрабатывали 1 М раствором хлористого натрия в течение 10—15 мин при 20°, после чего на них наслаивали разведения ДНК, сделанные в среде 199, содержащей 500 мкг/мл ДЭАЭ-декстрана. Адсорбция ДНК на клетках проходила в течение 5—10 мин при комнатной температуре; 2) клетки обрабатывали ДЭАЭ-декстраном (500 мкг/мл) в течение 15 мин при 20°, затем на клетки наслаивали ДНК в буфере, содержащем 0,01 М, трис-НСl, 0,001 М ЭДТА, 0,1 М NaCl и 100 мМ хлористого кальция. Во всех случаях концентрация вносимой ДНК составляла 20—30 мкг/мл. Неадсорбированную ДНК удаляли, и клетки заливали свежей питательной средой Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота, инкубировали при 37°.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что в клетках опухоли саркомы-45 содержатся по крайней мере две добавочные, внехромосомные ДНК с молекулярными массами 3—5 МД. Электронномикроскопическая визуализация этих ДНК выявила их циркулярную, ковалентно-замкнутую конформацию. При внесении последних подопытным животным у них отмечалось опухолеподобное разрастание соединительной ткани [1—3].

Для изучения взаимодействия экзогенных ДНК с клетками фибробластов китайского хомяка нативные препараты ДНК, обработанные РНК-азой и элюированные с агарозных гелей, наслаивали на монослой клеток (см. материал и методика). При наблюдении за культурами клеток с инокулированными экзогенными ДНК было обнаружено, что под воздействием экзогенных ДНК они в определенной степени меняют свою морфологию и приобретают способность сохранять жизнедеятельность в течение довольно длительного времени, 1,5—2 месяца, без замены питательной среды, не отторгаясь от стенки флаконов. В то же время контрольные культуры, не содержащие экзогенных ДНК, без замены питательной среды погибают на 4—6-й день культивирования. Необходимо отметить, что приобретенное клетками новое свойство сохранять жизнедеятельность без замены питательной среды передается и при последующих пересевах культуры, что предполагает генетическую закрепленность признака. Аналогичные результаты были получены при внесении в монослой клеток фибробластов китайского хомяка препаратов ДНК, выделенной из клеток печени интактных крыс. Результаты этих экспериментов суммированы в табл. 1. Как видно из таблицы, экзогенные ДНК различного происхождения, внесенные в клетки фибробластов хомяка, значительно увеличивают срок жизнедеятельности клеток, создают возможность длительного культивирования культуры клеток без использования добавочных питательных сред, по-видимому, за счет индуцирующего влияния препаратов ДНК на синтез специфических белков, а также изменения гомеостатических свойств клеточной поверхно-

Выживаемость клеток фибробластов хомяка В-6 после внесения ДНК

Обработка	Время сохранения жизнедеятельности клеток (недели)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ДНК из опухолевых клеток	+	+	+	+	+	+	+	+
ДНК из клеток печени крыс	+	+	+	+	+	+	±	—
Контрольная культура без ДНК	+	—	—	—	—	—	—	—

+—полный монослой жизнедеятельных клеток.

— —отсутствие монослоя.

етной мембраны. Из литературы известно, что проникшие в клетки экзогенные нуклеиновые кислоты довольно долгое время находятся в клетке и оказывают эффект по крайней мере по двум каналам—через активацию генетического аппарата клетки и путем включения в процесс трансляции белкового синтеза непосредственно на полисомах. Предполагается, что нуклеиновые кислоты, проникая в клетки, вызывают в последних соответствующие индукционные явления, зависящие от внешних и внутренних условий. Способность нуклеиновых кислот проникать в клетки и стимулировать в них гомологичный синтез белков была показана рядом исследователей [4, 10, 11]. Использование экзогенного генетического материала оказывается весьма эффективным при восстановительных процессах, наступающих после различных патологических повреждений органов и тканей.

В серии экспериментов, поставленных для выявления оптимальных условий максимального эффекта экзогенных ДНК в клетках фибробластов хомяка, оказалось, что наиболее оптимальным путем является способ кальциевой обработки клеток, так называемая «кальциевая трансформация». Хотя использование хлористого натрия высокой ионной силы широко используется при внесении в клетки вирусных РНК [12], в данном случае эффективность подобной обработки была низкой. При внесении в клетки экзогенных нуклеиновых кислот и для защиты последних от действия клеточных нуклеаз с успехом используется ДЭАЭ—декстран, механизм защитного действия которого описан в ряде работ [7—9]. Использование нами последнего в качестве протектора способствовало более полному воспроизведению эффекта экзогенных ДНК в культуре клеток. Кроме того, рядом исследователей было установлено, что ДЭАЭ-декстран повышает проницаемость клеток для внедрения экзогенных нуклеиновых кислот [2, 13]. Данные наших экспериментов, приведенные в табл. 2, показывают, что наиболее оптимальным и щадящим способом сохранения нативности препаратов экзогенных ДНК при внесении их в клетки в наших условиях является предварительная обработка монослоя клеток ДЭАЭ-декстраном с последующей инокуляцией ДНК в присутствии хлористого кальция.

Зависимость эффекта ДНК от способа обработки монослоя клеток

Материал	Способ обработки монослоя					
	1М NaCl		100 мМ CaCl ₂		ДЭАЭ-декстран	
	с	без	с	без	с	без
ДНК из опухолевых клеток	+	—	+	—	+	—
	—	—	+	—	+	+
	—	—	+	—	+	—
ДНК из клеток печени крысы	+	—	+	—	+	—
	—	—	+	—	—	—
	—	—	—	—	+	—

+ — полный монослой жизнедеятельных клеток

— — отсутствие монослоя.

Таким образом, полученные нами результаты предполагают, что в результате внесения экзогенных ДНК в клетки, по-видимому, имеет место индукция синтеза специфических белков, вследствие чего наблюдается пролонгированная выживаемость клеток, без отторжения со стенок флаконов, без дополнительных использований питательной среды.

Описанный факт представляет несомненный интерес как в практическом, так и в теоретическом отношении, так как молекулярная биология стоит перед реальным фактом фенотипического влияния экзогенных нуклеиновых кислот на клетки животных тканей и реализации их генетической информации в клетках.

Институт экспериментальной биологии

АН Армянской ССР

Поступило 21.VII 1980 г.

ՕՏԱՐԱՄԻՆ ԴՆԹ-Ի ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Է. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Դ. Ա. ԲԱՆՉԻԿԱ, Ա. Մ. ԱՂԱԲԱԼՅԱՆ

Հոդվածը նվիրված է տարբեր աղբյուրներից անջատված օտարածին ԴՆԹ-ի կենսաբանական ակտիվության ուսումնասիրությանը՝ համաստերների ֆիբրոբլաստային (В—6) կուլտուրայում: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ օտարածին ԴՆԹ-ի ներմուծումը բջիջային կուլտուրայի մեջ զգալիորեն կրկարացնում է բջիջների կենսագործունեության ժամկետը, առանց սննդային միջավայրի փոփոխման:

Ենթադրվում է, որ օտարածին ԴՆԹ-ն մասնակցում է բջիջի մակերեսային թաղանթի համեստատիկ հատկությունների կարգավորմանը:

BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXOGENOUS DNA PREPARATIONS

R. A. ZAKHARIAN, E. T. GASPARIAN, G. S. BAKCHIEVA, A. S. AGABALIAN

The exogenous preparations of DNA (from rat liver, sarcoma 45) have intensive affect on the growth of hamsters fibroblasts cells line B 6 which has been revealed by cell morphology and rate of detachment from dish. The medium to maintain the culture in the medium is possible to change after a month.

The observation suggests, that the foreign DNA may be involved in the control of homeostatic properties of the cell surface.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабалян А. С., Израелян Ю. А., Степанян Г. М., Захарян Э. Г., Гарибджанян Б. Т., Пашинян С. А., Амирханова Л. М., Захарян Р. А. *Вопр. онкол.*, 1, 97, 1980.
2. Агабалян А. С., Меньших Л. К., Ершов Ф. И. *Вопр. вирусол.*, 5, 527, 1971.
3. Агабалян А. С., Погосян Р. Г., Степанян Г. М., Пашинян С. А., Израелян Ю. А., Захарян Р. А., Гарибджанян Б. Т. *Биолог. ж. Армении*, 4, 320, 1979.
4. Алексеев А. Б., Коньшев В. А. *Бюлл. exper. биол.*, 4, 101, 1969.
5. Белоус А. М., Годин В. П., Панков Е. Я. В кн.: *Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы*, 113, 1974.
6. Захарян Р. А., Израелян Ю. А., Агабалян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. *Микробиология*, 2, 226, 1979.
7. Booth J. C. *Arch. Virology*, 55, 251, 1977.
8. Gracham F. L., Van der Eb A. J. *Virology*, 52, 456, 1973.
9. Кеprтoвa J., Мinерoвa E. *Neoplasma*, 20, 679, 1973.
10. Lazda V. A., Starr J. L., Rachmeler M. J. *Immunol.*, 101, 349, 1968.
11. Leavitt J. C., Schechtman L. M., Ts'O. P. O., Borenfreund S., Bedich A. *Biochem Biophys. Acta*, 435, 167, 1976.
12. Marmur J. J. *Mol. Biol.*, 12, 468, 1961.
13. Pagano J. S., McCutchan J. H., Vaheri A. J. *Virology*, 1, 891, 1967.