

УДК 576. 858. 6.006. 094/097

БИОХИМИЯ

А. С. Агабалян, О. Я. Давтян, А. А. Багдасарян, Р. А. Захарян, Л. А. Рухкян

Биологическая активность ДНК из опухоли человека

(Представлено академиком АН Армянской ССР А. А. Галояном 19/І 1987)

Известно, что попытки обнаружить вирус в опухолевой клетке до настоящего времени были безуспешны. Предполагалось, что вирус, вызвав опухоль, в дальнейшем не участвует в злокачественном процессе, а потому и не обнаруживается в ней^(1,2). Дальнейший подход к этой проблеме был связан с поиском вирусных нуклеиновых кислот, способных вызывать злокачественную трансформацию клетки.

При изучении биологической активности ДНК опухолеродных вирусов было показано, что ДНК, выделенная из экспериментальной опухоли животных, предварительно инфицированных опухолевым вирусом, обладает способностью вызывать у животных развитие опухоли⁽³⁻⁵⁾. Однако не имеется никаких данных о биологической активности ДНК, полученных непосредственно из опухолей человека. В 1969 г. Хюбнером и Тодаро⁽⁶⁾ была выдвинута гипотеза о вертикальной (наследственной) передаче информации РНК-содержащего вируса С-типа (вируген). Последний служит, по предположению авторов, эндогенным источником онкогенной информации и трансформирует нормальную клетку в опухолевую, при этом фенотипическое выявление вирусной трансформации может происходить или не происходить.

В связи с вышесказанным представляло интерес изучить биологические и физико-химические свойства ДНК, выделенных из опухолей толстой кишки человека, и исследовать морфогистологическую картину толстой кишки животных после введения им опухолевой ДНК.

Опухоль получали после резекции толстой кишки по поводу аденокарциномы. ДНК из опухоли получали двумя методами: по Мармуру и по Хирту^(7,8).

Количественную и качественную характеристику ДНК проводили на спектрофотометре СФ—46 (ЛОМО). Физико-химическую характеристику ДНК проводили при помощи горизонтального электрофореза в 1%-ном геле агарозы. Электронно-микроскопическую визуализацию опухолевой ДНК осуществляли в электронном микроскопе (в S—613). Препараты для электронной микроскопии готовили по способу Кляйншмидта⁽⁹⁾.

ДНК, полученную из опухолей и полипов толстой кишки человека, вводили экспериментальным животным (крысам) массой 180—200 г внутрибрюшинно в количестве 100 мкг/крысу. Контрольные (интактные) животные получали ДНК из селезенки крупного рогатого скота в тех же дозах. После гибели животных толстую кишку отбирали на гистоморфологическое исследование. ДНК из печени экспериментальных животных выделяли по методу Хирта⁽⁸⁾.

При изучении биологических свойств ДНК, выделенных из опухолей и полипов толстой кишки, было установлено, что введение этих ДНК экспериментальным животным в количестве 100 мкг/крысу приводило к гибели животных через 3—4 недели после инъекции. В то же время животные контрольной группы, получившие ДНК из селезенки крупного рогатого скота, сохраняли 100%-ную жизнеспособность (рис. 1). Эти данные с убедительностью свидетельствуют о выражен-

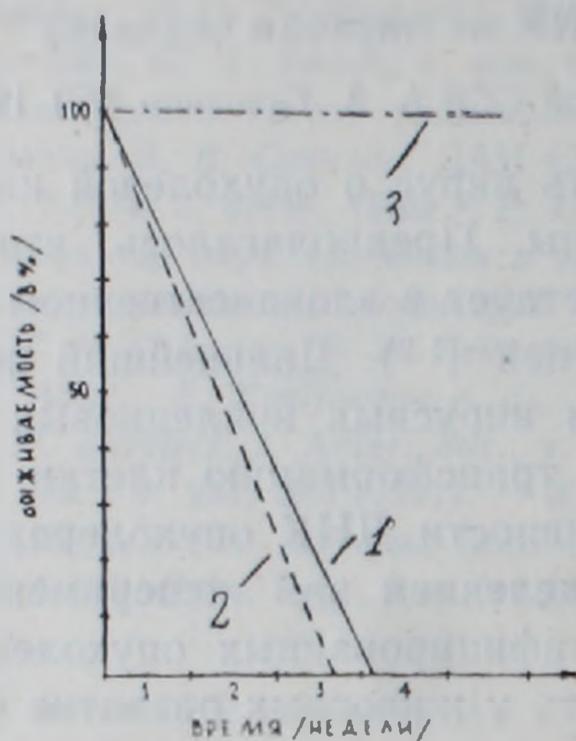


Рис. 1. Биологическое действие ДНК из опухолей и полипов толстой кишки человека. 1—выживаемость животных после введения ДНК из полипов; 2—выживаемость животных после введения ДНК из опухолей; 3—выживаемость животных после введения ДНК из селезенки крупного рогатого скота (контроль)

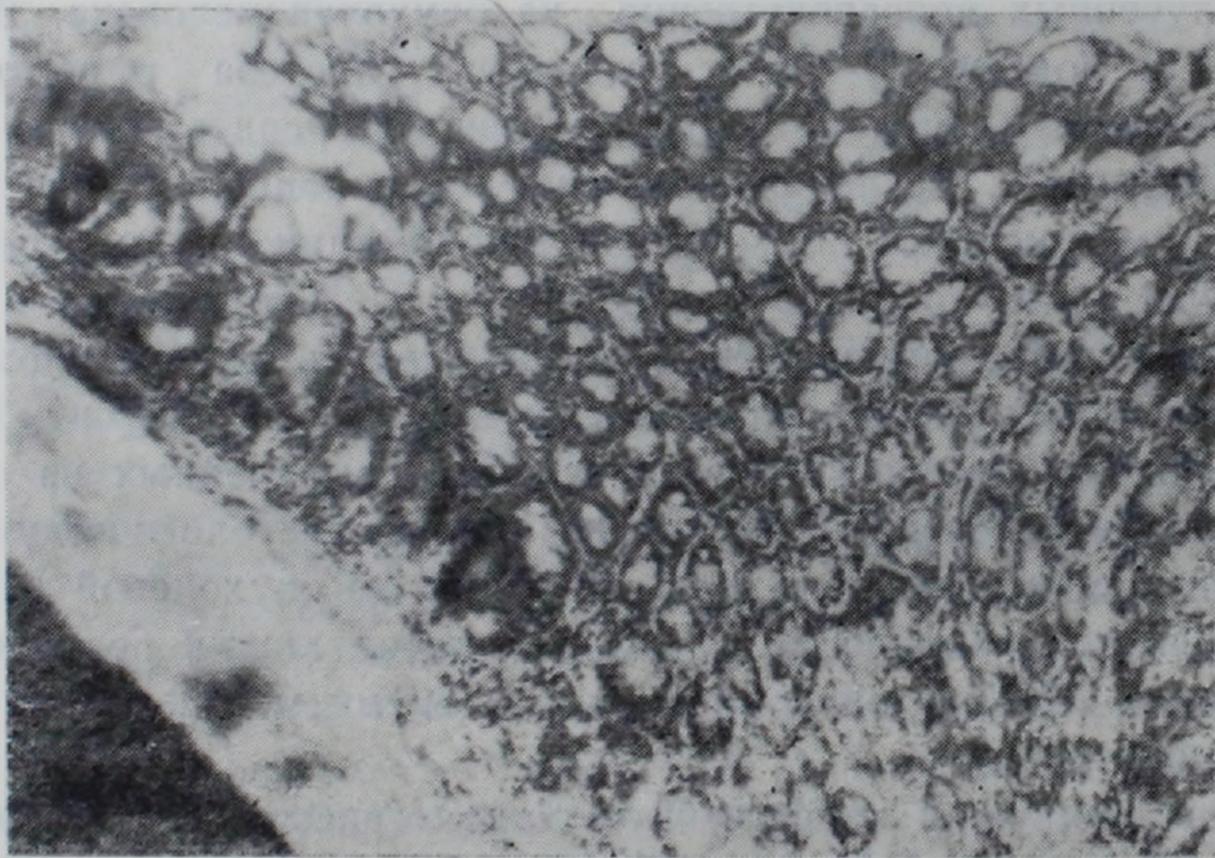


Рис. 2. Утолщение слизистой оболочки толстой кишки с аденоматозным разрастанием и признаками выраженной атипии. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение в 100 раз

ной биологической активности ДНК, выделенной из опухолей и полипов толстой кишки человека. Наши результаты имеют аналогию с данными, полученными при изучении биологической активности ДНК, выделенных из ДНК-содержащих онкогенных вирусов, и ДНК из опухолей, индуцированных онкогенными вирусами (¹⁰⁻¹²). В то же время в доступной литературе нам не удалось обнаружить аналогичных результатов в отношении биологической активности ДНК, непосредственно выделенных из опухолей различных органов человека.

Морфологическое исследование препаратов толстой кишки экспе-

риментальных животных установило, что опухолевая ДНК, в отличие от неопухолевой, контрольной ДНК из селезенки крупного рогатого скота, вызывает очаговое развитие опухолевого процесса.

Выявлена картина плоской тубулярной аденомы с признаками выраженной атипии. В соседних участках вблизи аденомы обнаруживается гиперплазия желез с умеренной пролиферацией эпителия (рис. 2). Данные морфологических исследований препаратов толстой кишки экспериментальных животных наглядно показывают развитие опухолевого процесса у крыс после однократного введения 100 мкг опухолевой ДНК. Эти результаты с убедительностью демонстрируют наличие биологически активного фактора в тотальном пуле опухолевой ДНК.

При изучении физико-химических свойств опухолевой ДНК последнюю вместе с ДНК, выделенной из печени опытных и контрольных животных, подвергали электрофорезу в 1%-ном геле агарозы. Как видно из рис. 3, в гелевых дорожках с ДНК из опухоли и ДНК из печени экспериментальных животных выявляется четкая, окрашенная этидиум бромидом полоса внехромосомной ДНК, мигрирующая медленнее хромосомной ДНК с ориентировочным молекулярным весом около $40-50 \times 10^6$ дальтон. Ранее нами при исследовании физико-химических свойств ДНК экспериментальной опухоли саркомы-45 крыс, индуцированной химическим канцерогеном, были обнаружены две внехромосомные молекулы ДНК с молекулярной массой 3 и 5×10^6 дальтон, обладающие выраженной биологической активностью (¹³⁻¹¹). Опухолоподобные образования, наблюдаемые после введения этих ДНК крысам, позволили судить об ответственности этих внехромосомных молекул ДНК в развитии опухоли саркомы-45. Аналогичная ситуация, связанная с активностью внехромосомной ДНК, имеет место и в нашем случае с использованием ДНК, выделенной из опухолевой ткани человека. Обнаружение этих добавочных, внехромосомных молекул ДНК в тотальном пуле ДНК, полученной из печени экспериментальных животных, говорит об активном транспорте фактора (внехромосомной ДНК), ответственного за индукцию пролиферации и трансформации, что по видимому, является причиной возникновения последующих метастазов в различных органах.

Электронно-микроскопическая визуализация препаратов опухолевых ДНК выявила две формы нуклеиновых кислот в общем пуле ДНК:



Рис. 3. Электрофоретическая характеристика, ДНК: 1-я дорожка—ДНК, выделенная из опухоли толстой кишки по Мармуру; 2-я дорожка—ДНК, выделенная из полипов толстой кишки по Хирту; 3-я дорожка—ДНК, выделенная из печени опытных животных по Хирту; 4-я дорожка—ДНК, выделенная из печени контрольных животных; 5-я дорожка—ДНК, выделенная из печени интактной крысы

линейные двухспиральные молекулы хромосомной ДНК и суперспирализованные внехромосомные ДНК, описанные выше.

Таким образом, полученные данные демонстрируют выраженную биологическую активность опухолевой ДНК. Такая активность, приводящая к образованию аденом в толстой кишке экспериментальных животных с последующей их гибелью, связана с наличием в тотальном пуле опухолевой ДНК добавочной, внехромосомной, суперспирализованной формы ДНК с молекулярной массой в пределах $40-50 \times 10^6$ дальтон. Аналогичные результаты в отношении внехромосомных ДНК с относительно высоким молекулярным весом, ответственных за опухолевый рост, были получены на примере октопиновой плазмиды *Agrobacter tumefaciens*, вызывающей опухоли у растений (15).

НИИ проктологии Министерства здравоохранения Армянской ССР
Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ս. Ս. ԱՂԱԲԱՅԱՆ, Օ. Յա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Ա. Ս. ՐԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ
Թ. Ա. ԶԱՔՍՐՅԱՆ, Լ. Ս. ՌՈՒԽԿՅԱՆ

Մարդու ուռուցքային ԴՆԹ-ի բիոլոգիական ակտիվությունը

Ուսումնասիրված է ԴՆԹ-ի բիոլոգիական ակտիվությունը, ստացված մարդու հաստ աղու ուռուցքից: Ցույց է տրված, որ մարդու ուռուցքային ԴՆԹ-ի միանվազ ներմուծման ժամանակ փորձարկվող կենդանիներին, վերջինները ոչնչանում են 3—4 շաբաթվա ընթացքում: Հաստ աղու պրուպարատների մորֆոլոգիական ուսումնասիրությունները փորձարկվող կենդանիների մոտ հայտնաբերել է աղենամատող աճ, բջիջների արտահայտված ձևով: Ուռուցքային ԴՆԹ-ի ֆիզիկաքիմիական հատկանիշների էլեկտրաֆորետիկ ուսումնասիրությունը 1% ազարոզ գելում ի հայտ բերեց հավելյալ արտաբրոմոսոմային ԴՆԹ $40-50 \times 10^6$ դալտոն մոտավոր մոլ. կշռով:

Ուռուցքային ԴՆԹ-ի էլեկտրոնոմիկրոսկոպիկ նկարագրումը ցույց է տվել երկու տեսակի ԴՆԹ-ի առկայություն. դժաբրոմոսոմային ԴՆԹ-ներ, որոնցից վերջինի՝ արտաբրոմոսոմային ԴՆԹ-ի մասնակցությունն էլ հենց վերադրվում է ուռուցքի զարգացումը կենդանիներին մոտ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 Л. А. Зильбер, в кн.: Вирусогенетическая теория возникновения опухолей, Медицина М., 1968.
- 2 Д. Б. Голубев, Шлякевич, в кн.: Современные аспекты вирусной теории происхождения злокачественных новообразований, Медицина, М., 1972.
- 3 Y. Ito, C. A. Evans, J. Exp. Med., v. 114, p. 485—500 (1961).
- 4 J. P. Butnett, J. A. Harrington, Proc. Nat. Acad. Sci., v. 60, p. 1023—1029, (1968).
- 5 N. Mayne, J. P. Burnett, L. K. Butler, Nature New Biol, v. 232, p. 182—183 (1971).
- 6 R. J. Hubner, G. J. Todaro, Proc. Nat. Acad. Sci., v. 64, p. 1087—1094 (1969).
- 7 J. A. Marmur, J. Mol. Biol., v. 12, p. 468—487 (1961).
- 8 B. Hirt, J. Mol. Biol., v. 26, p. 365—369 (1967).
- 9 A. Kleinschmidt, Methods in Enzymology, v. 12, p. 361—368 (1968).
- 10 V. C. Chambers, Y. Ito, Virology, v. 23, p. 434—436 (1964).
- 11 C. Orth, P. Atanasium, M. Balron e. a., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 115, p. 1090—1095 (1964).
- 12 F. L. Graham, Adv. Cancer Res., v. 25, p. 20—22 (1977).
- 13 А. С. Агабалян, Р. Г. Погосян, Г. М. Степанян, Биол. журн. Армении, т. 4, с. 320—324 (1979).
- 14 А. С. Агабалян, Ю. А. Израелян, Г. М. Степанян, Вопр. онкологии, т. 1, с. 97—98 (1980).
- 15 M. Chilton, M. Dremond, D. Mirle, J. sell., v. 11, p. 263—267 (1977).