

## ТЕПЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХРОМАТИНА, ЯДЕР И ДНК МЫШЕЙ ВАЛВ И СЗНА, ПОЛУЧИВШИХ ИОНЫ $Ni^{2+}$ \*

Л. Д. Патишвили, Д. Р. Монаселидзе, З. И. Чанчалашвили,  
Г. Ш. Читадзе, Г. В. Маджагаладзе, Э. М. Ломидзе

**Введение.** За последнее время получены убедительные доказательства того, что главной причиной опухолевой трансформации клеток являются такие стойкие и неспецифические перестройки генома, индуцируемые физическими, химическими и биологическими агентами, которые вызывают избыточную экспрессию потенциального онкогена, имеющего вирусное или клеточное происхождение [1—3].

Установлено, что около 90 % опухолей и лейкозов человека и животных обусловлены химическими веществами [4]. В связи с этим пристальное внимание ученых обращено, с одной стороны, на выяснение молекулярных механизмов действия различных канцерогенов на ДНК эукариот, а с другой — на создание новейших методов, дающих возможность обнаружить тончайшие изменения, которые наблюдаются в опухолевых объектах по сравнению с нормой.

Данные о повреждении ДНК опухоли впервые были получены в работах [5—7] методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСМ) и кинетическим формальдегидным методом [8], а в дальнейшем подтверждены в работе [9].

В частности [5—7, 9] было показано, что температура плавления тотальной ДНК различных опухолей животных понижена относительно нормы на 1—0,7 °С, а ширина перехода ( $\Delta T_d$ ) увеличена на 0,5 °С. Эти изменения термодинамических параметров, непосредственно указывающие на возникновение дефектов в двойной спирали ДНК, были объяснены влиянием канцерогенных металлических ионов на ее структуру в процессе малигнизации [9].

Отметим что еще в 1970 г. в работе [10] было показано, что опухолевые объекты содержат избыточное количество эндогенно связанных ионов  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Sb^{2+}$ ,  $Sc^{2+}$ ,  $Ag^+$ , некоторые из которых весьма эффективно перераспределяются между субклеточными структурами в процессах пролиферации и злокачественного роста.

В данной работе делается попытка применить метод ДСМ для обнаружения тех тончайших изменений, которые возникают в ДНК активного хроматина, находящегося в составе опухолевых клеток и ядер, в результате проникновения в структуру ДНК ионов  $Ni^{2+}$ .

**Материалы и методы.** Измерения проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре с чувствительностью  $10^{-7}$  Вт [11]. Объем измерительных ячеек 0,04—0,2 см<sup>3</sup>, скорость нагрева 10÷15 К/ч, температурный интервал измерений 30—120 °С.

Абсолютную температуру измеряли с помощью платинового термометра ( $R=100$  Ом). Точность измерений не ниже 0,05 К. За температуру денатурации хроматина ( $T_d$ ) принимали ту температуру, которая соответствовала максимуму интенсивного пика теплопоглощения в области 70—95 °С. За  $T_d$  ДНК — температуру, соответствующую наиболее интенсивному пику в области денатурации. Как для хроматина, так и для ДНК значения термодинамических величин  $T_d$ ,  $\Delta T_d$  получали усреднением данных 10 экспериментов. Погрешность в определении  $T_d$  и  $\Delta T_d$  для хроматина не превышала 0,5 и 0,3 К соответственно;  $T_d$ ,  $\Delta T_d$  для растворов ДНК — 0,15 и 0,05 К соответственно.

Асцитным мышам линии СЗНА на 6-й день перевивки внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 0,1 мМ фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,65 мг  $NiCl_2$  (0,2 мг по Ni).

\* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

вес животных составлял 20—25 г. Через 24 ч собирали асцитную жидкость, фильтровали ее через нейлон и центрифугировали при 25000 об/мин.

Селезенку мышей *BALB* извлекали по истечении четырех дней после заражения вирусом лейкоза Раунера с интервалами в два дня в течение 40 дней. Клеточные ядра из асцитных клеток и селезенки, а также ДНК из очищенных ядер получали по методу [12]. Методика включала пропускание хроматина в 2 М растворе NaCl через сефадекс 4В, диализ отдельных фракций ДНК 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4, и осаждение одним объемом изопропанола. Полученный осадок растворяли в 0,1 М NaCl и обрабатывали протеникиназой *K* при 37 °С, депротенизировали смесью хлороформ—фенол и переосаждали этанолом. Содержание белка определяли по Лоури и экстинкции, исходя из соотношения  $A_{260}/A_{280}=1,85$ ;  $A_{260}/A_{230}=2,33$ , которое соответствует примеси белков  $\sim 0,5\%$ . Содержание ионов  $Ni^{2+}$  в ДНК определяли методом импульсного плазменного эмиссионного анализа. Результаты анализа следующие: для асцитных клеток 18 мкг/г ДНК; в ДНК, выделенной из асцитных клеток мышей, получивших ионы  $Ni^{2+}$ , 22 мкг/г ДНК; в ДНК селезенки мышей *BALB* 12,7 мкг/г ДНК; в ДНК селезенки мышей *BALB*, больных лейкозом, 16,9 мкг/г ДНК; в ДНК селезенки мышей, больных лейкозом и получивших ионы  $Ni^{2+}$ , 18 мкг/г ДНК.

Молекулярная масса ДНК составляла  $(4-6) \cdot 10^6$ .

**Результаты и обсуждение.** Из рис. 1 видно, что профили кривых теплопоглощения схожи, однако имеются и значительные различия. Сходство состоит в том, что температура острого пика (около 56 °С) и слабо выраженных максимумов около 64 и 71 °С на кривой теплопоглощения ткани печени совпадает с хорошей точностью ( $\pm 0,5$  °С) с этими же показателями для асцитных клеток. Различие заключается в сдвиге высокотемпературного максимума в сторону высоких температур относительно такого же максимума для нормы и в появлении на кривой асцитных клеток слабо выраженного пика в области температур 40—54 °С и четкого максимума около 67 °С.

Как показано в работах [13—15], высокотемпературный пик на кривой теплопоглощения соответствует денатурации хроматинового комплекса, а пики с  $T_d=45, 57$  и  $67$  °С — денатурации белков и РНП комплекса.

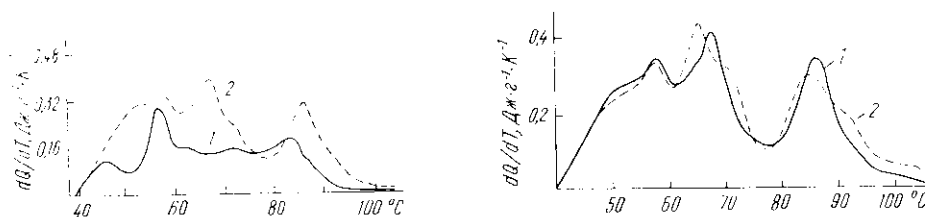


Рис. 1. Кривые теплопоглощения печеночной ткани мышей *СЗНА* (1) и суспензии асцитных клеток (2). Здесь и на рис. 2—5 пересчет на грамм сухого вещества

Fig. 1. Heat absorption curves of *СЗНА* mouse liver tissue (1) and suspension of ascitic cells (2). Here and in Figs 2-5 recalculation is made per gram of dry substance

Рис. 2. Кривые теплопоглощения суспензии асцитных клеток (1) и суспензии асцитных клеток мышей *СЗНА*, получивших  $NiCl_2$  (2)

Fig. 2. Heat absorption curves of ascitic cells suspension (1) and suspension of ascitic cells of *СЗНА* mice which were given  $NiCl_2$  (2)

Вышеприведенные данные наглядно указывают, что температура денатурации хроматина в составе асцитных клеток ( $T_d=84,0 \pm 0,5$  °С) повышена относительно таковой для нормального хроматина на 3 °С.

На рис. 2 приведены микрокалориметрические кривые теплопоглощения асцитных клеток гепатомы 22. Кривая 2 соответствует денатурации клеток, взятых у мышей линии *СЗНА* на 6-й день, по мышам предварительно (за 24 ч) в брюшную полость было введено 0,3 мл фосфатного буферного раствора, pH 7,0, содержащего 0,65 мг  $NiCl_2$ .

Сравнение профилей кривых теплопоглощения показывает, что значительные различия наблюдаются в температурных областях 60—70 °С

и 75—110 °С. Однако мы будем рассматривать лишь высокотемпературную область, отражающую денатурацию хроматина.

Как видно, пик теплопоглощения, соответствующий денатурации хроматина [13—15] в области температур 75—110 °С (кривая 2), сдвинут по температурной шкале к низким температурам на 1,5 °С, а ширина температурного интервала на его полувысоте ( $\Delta T_d$ ) увеличена на 4 °С. Такие изменения параметров денатурации хроматина, очевидно, указывают на то, что ионы  $Ni^{2+}$  повреждают ДНК в составе хроматина.

Действительно, сравнительный анализ процесса плавления ДНК, выделенной из асцитных клеток мышей линии СЗНА, получивших и не получивших ионы никеля, подтвердил это предположение.

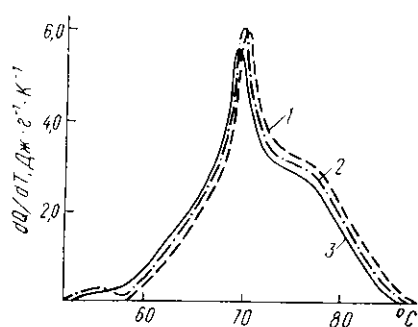


Рис. 3. Кривые теплопоглощения разбавленных растворов ДНК печени мышей СЗНА (1), асцитных клеток гепатомы 22 (2) и асцитных клеток мышей СЗНА, получивших  $NiCl_2$  (3)

Fig. 3. Heat absorption curves of DNA dilute solutions of СЗНА mouse liver (1), hepatoma 22 ascitic cells (2) and ascitic cells of СЗНА mice which were given  $NiCl_2$  (3)

Рис. 4. Кривые теплопоглощения ткани селезенки, взятой у мышей BALB в различные дни после заражения животного вирусом Раушера: 1 — ткань селезенки здоровой мыши; 2 — 4-й день после инъекции; 3 — 6-й день; 4 — 18-й; 5 — 27-й; 6 — 27-й день, за 24 ч до взятия селезенки в брюшную полость животного введено 0,3 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0), содержащего 0,65 мг  $NiCl_2$

Fig. 4. Heat absorption curves of spleen tissue isolated from BALB mice in different days after infection of animal with Rauscher virus: 1 — healthy mouse spleen tissue; 2 — the 4th day after infection; 3 — the 6th day; 4 — the 18th day; 5 — the 27th day; 6 — the 27th day; 24 h before isolation of spleen 0.3 ml of phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.65 mg  $NiCl_2$  was injected into abdominal cavity of the animal

Данные рис. 3 наглядно показывают, что  $T_{пл}$  ДНК, выделенной из асцитных клеток мышей, которым были введены ионы  $Ni^{2+}$ , ниже на 1 °С, чем для асцитной ДНК мышей, не получивших ионы  $Ni^{2+}$ , что непосредственно указывает на повреждение двойной спирали ДНК.

Различия в профилях кривых теплопоглощения наблюдаются и при сравнении процесса денатурации тканей селезенки мышей BALB здоровых и больных лейкозом Раушера (рис. 4). Однако существенные различия в процессе денатурации обнаруживаются только на 4—10-й день после заражения мышей вирусом. Мы здесь не будем обсуждать вопрос о перераспределении тепла между пиками с максимумами 73 и 57 °С в зависимости от длительности заражения животного вирусом, а обсудим лишь те изменения, которые касаются хроматинового комплекса (область температур 65—110 °С, рис. 4, кривые 2—4). Приведенные данные показывают, что термодинамические параметры ( $T_d$ ,  $\Delta T_d$ ,  $Q_d$ ) и профили пиков, соответствующие денатурации нормального и лейкозного хроматина, не отличаются друг от друга. Различие в процессах денатурации наблюдается только в том случае, когда сравниваются кривые теплопоглощения тканей селезенки мышей BALB, по-

лучивших и не получивших ионы  $Ni^{2+}$  (рис. 4, кривые 5, 6). Как видно, различие в  $T_d$  хроматина составляет  $0,8-1,0^\circ C$ .

Влияние ионов  $Ni^{2+}$  на структуру хроматина проявляется и на уровне ядер (рис. 5). Сдвиг кривой теплопоглощения суспензии лейкозных ядер мышей *BALB* к низким температурам явно заметен и составляет  $0,8^\circ C$ . Отсутствие четко выраженного пика теплопоглощения в области температур  $60-70^\circ C$  с  $T_d=68^\circ C$ , характерное для процесса денатурации нормального хроматина и обнаруженное нами с помощью калориметрических измерений, представляет самостоятельный интерес и обсуждается в работе [16].

Исследование процесса плавления ДНК при лейкозе Раушера (ДНК селезенки здоровых мышей

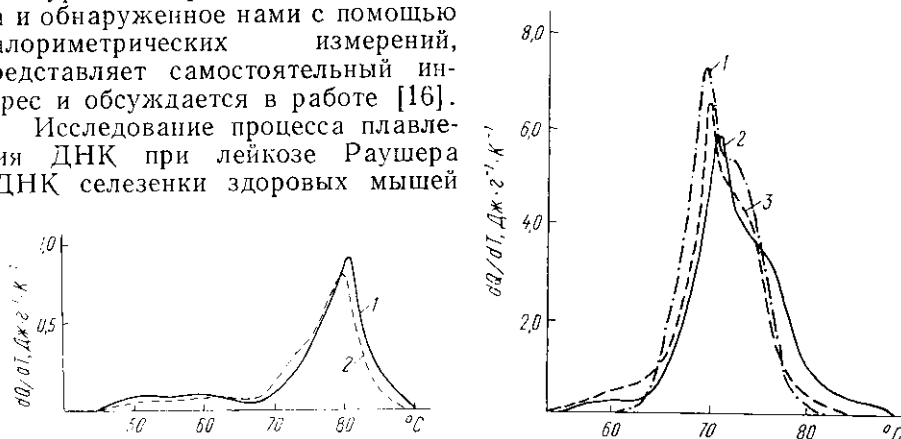


Рис. 5. Кривые теплопоглощения клеточных ядер селезенки мышей *BALB*, выделенных из здоровой селезенки (1) и из селезенки мышей, больных лейкозом Раушера (2). Буферный раствор: 10 мМ трис-НСl, рН 7,8, 250 мМ сахараза, 1 мМ  $MgCl_2$

Fig. 5. Heat absorption curves of cellular nuclei of the *BALB* mice spleen isolated from healthy spleen (1) and from spleen of mice with Rauscher leucosis (2). Buffer solution: tris-HCl 10 mM, pH 7.8, sucrose 250 mM,  $MgCl_2$  1 mM

Рис. 6. Кривые теплопоглощения разбавленных растворов ДНК, выделенной из селезенки здоровых мышей *BALB* (1), больных лейкозом Раушера (2) и из лейкозной селезенки мышей, получивших за 24 ч до взятия селезенки 0,3 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0), содержащего 0,65 мг  $NiCl_2$  (3)

Fig. 6. Heat absorption curves of DNA dilute solutions isolated from healthy *BALB* mouse spleen (1), from spleen of mice with Rauscher leucosis (2) and from spleen of leukemic mice which were given 0.3 ml of phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.65 mg  $NiCl_2$  24 h before spleen isolation

и мышей больных лейкозом) выявило весьма интересное явление, заключающееся в том, что  $T_{пл}$  ДНК из лейкозных животных не понижена относительно нормы, как это наблюдается в случае ДНК из сарком и асцитных клеток, а наоборот, повышена на  $1,1^\circ C$  (рис. 6). Однако ионы  $Ni^{2+}$ , инкорпорированные в двойную спираль *in vivo*, понижают  $T_{пл}$  на  $0,5^\circ C$  (рис. 6).

Таким образом, мы приходим к заключению, что ионы  $Ni^{2+}$  повреждают ДНК хроматина в составе клеток *in vivo* независимо от того, имеют опухоли вирусное или химическое происхождение.

Авторы выражают глубокую благодарность Э. Л. Андроникашвили за обсуждение результатов, В. Г. Брегадзе за измерение содержания ионов  $Ni^{2+}$  в ДНК.

THERMAL CHARACTERISTICS OF CHROMATIN, NUCLEI AND DNA  
OF BALB AND C3HA MICE WHICH WERE GIVEN Ni<sup>2+</sup> IONS

L. J. Paliashvili, J. R. Monaselidze, Z. I. Chanchalashvili,  
G. Sh. Chitadze, G. V. Majagaladze, E. M. Lomidze

Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

Summary

The method of differential scanning microcalorimetry (DSM) is used to find those minute changes which arise in active chromatin DNA of tumour cells and nuclei as a result of Ni<sup>2+</sup> ions penetration into the DNA structure. Chromatin native structure is established to be considerably destructed by the incorporation of Ni<sup>2+</sup> ions in chromatin DNA of cells. The comparative analysis of melting process of DNA isolated from tumour cells of mice which were given and not given Ni<sup>2+</sup> ions showed that the changes in the chromatin structure are closely related to the DNA double helix damage.

1. Георгиев Г. П. Три уровня структурной организации хромосом эукариот // Молекуляр. биология.— 1978.—12, № 6.— С. 1205—1230.
2. Brown W. M., George M., Wilson A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.—76, N 4.— P. 1967—1971.
3. Федоров Н. А. ДНК как главная мишень для канцерогенных, мутагенных и противоопухолевых веществ // Успехи соврем. биологии.— 1981.—91, № 1.— С. 61—73.
4. Федоров Н. А. Структура ДНК и трансформация клеток.— М.: Медицина, 1983.— 254 с.
5. Тепловые свойства растворимого хроматина и ДНК нормальных и опухолевых клеток / Э. Л. Андрионкашвили, З. И. Чанчалашвили, Г. В. Маджагаладзе, Д. Р. Монаселидзе // Материалы совещ. по конформ. изменениям биополимеров в растворах.— Тбилиси: Мецниереба, 1975.— Т. 2.— С. 161—171.
6. Микрокалориметрическое исследование разбавленных растворов ДНК, выделенных из нормальных и опухолевых тканей / З. И. Чанчалашвили, Г. В. Маджагаладзе, Г. Н. Мгеладзе, Д. Р. Монаселидзе // Там же.— Т. 3.— С. 84—85.
7. Микрокалориметрическое исследование ДНК нормальных и опухолевых тканей при высоких концентрациях солей Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Д. Р. Монаселидзе, З. И. Чанчалашвили, Г. Н. Мгеладзе и др. // VII Всесоюз. конф. по калориметрии: Тез. докл.— Черно-голова, 1977.— С. 415—419.
8. О кинетическом изучении физико-химических свойств ДНК нормы и опухоли / Г. П. Жижина, С. И. Бобович, О. Е. Петров, К. Е. Круглякова // Докл. АН СССР.— 1974.—217, № 3.— С. 722—725.
9. Andronikashvili E. L., Monaselidze J. R. Thermal properties of chromatin and DNA molecules isolated from normal and transformed cells // Symp. Genetique-Cancer-Environnement: Abstr.— Monaco, 1982.— P. 35.
10. Связывание следовых количеств некоторых элементов нуклеиновых кислот злокачественными опухолями / Э. Л. Андрионкашвили, Л. М. Мосулшвили В. П. Маджагаладзе и др. // Докл. АН СССР.— 1970.—145, № 4.— С. 979—982.
11. Монаселидзе Д. Р., Бакрадзе Н. Г. Адиабатный дифференциальный микрокалориметр // Конформ. изменения биополимеров в растворах.— М.: Наука, 1973.— С. 196—199.
12. Loeb J. E., Chauveau J. Preparation de DNA par filtration sur gel d'agarose // Biochim. et biophys. acta.— 1969.—182, N 1.— P. 225—234.
13. Тепловые свойства нитактных клеточных ядер / Д. Р. Монаселидзе, З. И. Чанчалашвили, Д. И. Джохадзе, Г. М. Мревлишвили // VI Всесоюз. конф. по калориметрии: Тез. докл.— Тбилиси, 1973.— С. 501—505.
14. Thermal properties of intact nucleoproteids / J. R. Monaselidze, G. N. Mgeladze, Z. I. Chanchalashvili, G. Sh. Chitadze // J. Polymer Sci.— 1981.—69.— P. 17—20.
15. Кооперативные тепловые переходы в нормальных и опухолевых клетках / Э. Л. Андрионкашвили, Д. Р. Монаселидзе, З. И. Чанчалашвили, Г. В. Маджагаладзе // Биофизика.— 1983.—28, № 3.— С. 528—537.
16. Андрионкашвили Э. Л. Изменения физико-химических свойств макромолекул белков и нуклеиновых кислот, извлеченных из нормальных и опухолевых тканей // IV Междунар. биофиз. конгр.— Пушкино, 1973.— Т. 4.— С. 152—175.

Ин-т физики АН ГССР, Тбилиси

Получено 15.12.86