

ДНКазна активність і ступінь фрагментації хроматину клітинних ядер у ході росту злоякісного новоутворення

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, І. О. Шмараков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича Міністерства освіти і науки України
Вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна

Вивчали ДНКазну активність і ступінь фрагментації хроматину ядер клітин карциноми Герена та печінки щурів-пухлиноносців у ході росту злоякісного новоутворення. Встановлено зниження ДНКазної активності ядер клітин печінки, що можна розглядати як результат депресивного впливу злоякісного росту на досліджуваній метаболічно активній орган. Отримані результати показують, що порушення реалізації програми клітинної загибелі, характерне для пухлинних клітин, поширюється і на клітини віддалених органів, про що свідчить пригнічення ДНКазної активності ядер клітин печінки.

Вступ. В основі пухлинного росту лежить порушення програми клітинної загибелі [1], активними учасниками реалізації якої є ДНКаз I і ДНКаз II [2—5]. Різні за функціональним навантаженням ці ферменти причетні до ключових процесів клітинного метаболізму, а саме — роль кислій ДНКаз (ДНКаз II) визначається, в першу чергу, участю у процесах синтезу ДНК [6—7], у той час як лужній ДНКазі (ДНКазі I) належить провідна роль у деградації ДНК [8—10].

Мета даної роботи полягала у визначенні ДНКазної активності та встановленні ступеня фрагментації ДНК ядер клітин печінки і пухлини щурів-пухлиноносців на різних стадіях росту новоутворення.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були самки білих безпородних щурів масою 110—130 г. Трансплантацію карциноми Герена проводили за попередньо опрацьованою методикою [11]. Евтаназію дослідних тварин здійснювали на 7, 14, та 21-шу добу після трансплантації пухлини.

Виділення ядер та визначення ендонуклеазної активності. Ядра клітин печінки та пухлини ви-

діляли за методом [12]. Чистоту ядерної фракції контролювали за співвідношенням білок/ДНК, яке складало близько 2. Ступінь гідролізу хроматину кислотою та лужною ендонуклеазами розраховували за кількістю полідезоксирибонуклеотидів кислоторозчинної фракції, отриманої після інкубації ядер у відповідних буферах протягом 10, 20 та 30 хв при температурі 37 °С і виражали у відсотках від тотальної ДНК ядер в інкубаційній суміші. Суспензію ядер з концентрацією ДНК 400 мкг/мл, визначеної спектрофотометрично, інкубували в буферах для визначення активностей ДНКаз, які містили відповідно 0,25 М сахарозу в ацетатному буфері, рН 5,0 — для кислій ДНКаз; 0,25 М сахарозу, 0,01 мМ MgCl₂ в 0,1 М буфері трис-НСІ, рН 7,5 — для лужної ДНКазі. Середній ступінь гідролізу хроматину і значимість різниці кривих виявляли за допомогою регресійного аналізу.

Електрофоретичне дослідження фрагментації хроматину. Виділені ядра розділяли на три групи. Ядра першої групи одразу заливали одним об'ємом буфера, що містив 0,1 М трис-НСІ, рН 7,5, 5 % ДСН, 0,1 М ЕДТА, та десятикратним об'ємом розчину, який містив 0,3 М ацетат натрію і 0,05 М ЕДТА, рН 7,5, обробляли ультразвуком на УЗДН 2Т при частоті 22 кГц і силі струму 0,4 А та

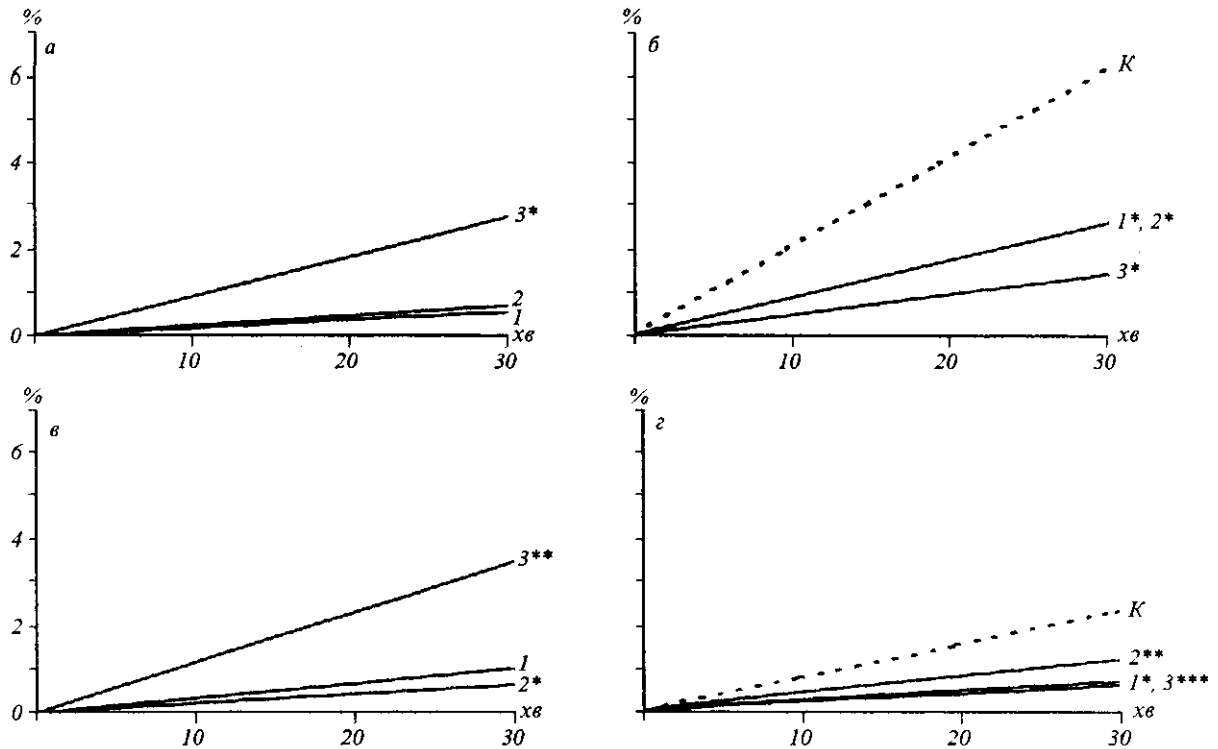


Рис. 1. Динаміка виходу полідезоксирибонуклеотидів з ядер клітин пухлини (а, в) та печінки (б, г) щурів-пухлиноносців на різних етапах росту карциноми Герена в умовах активації кислої (а, б) та лужної (в, г) ДНКаз (а: 1, 2, 3 — через 7, 14, 21 діб після трансплантації відповідно, *статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 7-му добу ($n = 6$, $p < 0,05$); б: 1, 2, 3 — через 7, 14, 21 діб після трансплантації відповідно, *статистично достовірна різниця у порівнянні з контролем (К), **статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 14-ту добу ($n = 6$, $p < 0,05$); в: 1, 2, 3 — через 7, 14, 21 діб після трансплантації відповідно, *статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 7-му добу ($n = 6$, $p < 0,05$), **статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 14-ту добу ($n = 6$, $p < 0,05$); г: 1, 2, 3 — через 7, 14, 21 діб після трансплантації відповідно, *статистично достовірна різниця у порівнянні з контролем (К) ($n = 6$, $p < 0,05$), **статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 7-му добу ($n = 6$, $p < 0,05$), ***статистично достовірна різниця у порівнянні з показником на 14-ту добу ($n = 6$, $p < 0,05$))

залишали для екстракції фрагментованої ДНК на 8—10 год при температурі 5 °С. Ядра другої та третьої груп інкубували протягом 1 год при 37 °С у відповідних буферах для активації кислої і лужної ДНКаз, після чого здійснювали ті ж самі процедури, що і з ядрами першої групи.

Розчинні фрагменти відділяли центрифугуванням при 10000 g протягом 30 хв. Фрагментовану ДНК з супернатанту виділяли стандартним фенольним методом [13] та піддавали електрофорезу в 1 %-му агарозному гелі [14].

Результати і обговорення. Результати досліджень ферментативної активності, яка відповідає кислотій ДНКазі, у пухлинних ядрах засвідчили зростання даного показника протягом усього експерименту (рис. 1, а), що, очевидно, зумовлене високою інтенсивністю проліферації пухлинних клітин. У той же час в ядрах клітин печінки

відбувалося зниження ферментативної активності кислотій ДНКазі (рис. 1, б).

Обернена направленість активностей кислотій ДНКаз ядер пухлини і печінки вказує на існування залежності між стадією росту пухлини та синтетичними процесами у печінці.

Отримані нами результати при використанні штаму недиференційованої карциноми Герена як моделі пухлинного росту та порівняння з даними літератури [15, 16], де як модель пухлинного росту використовували асцитичний рак Ерліха, дають підстави вважати, що тенденція до зниження ДНКазної активності ядер клітин печінки є загальною і, очевидно, не залежить від типу пухлини.

При дослідженні ферментативної активності, яка відповідає лужній ДНКазі, у пухлинних ядрах спостерігалось її зниження лише протягом першої половини експерименту (рис. 1, в), що, можливо,

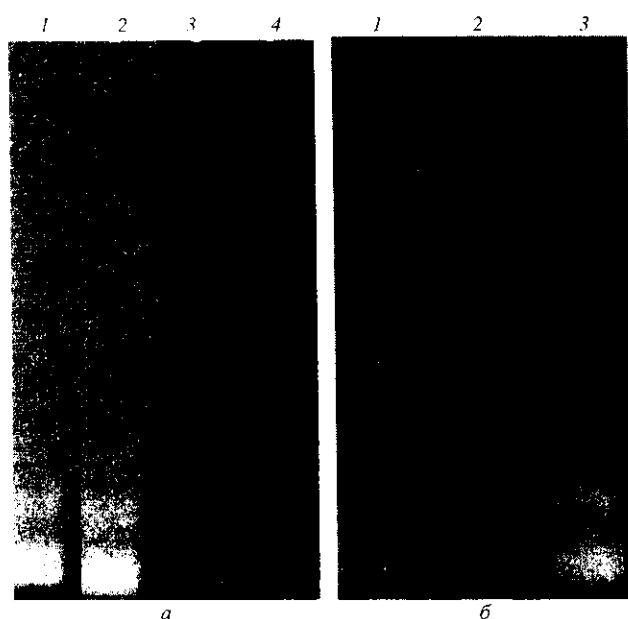


Рис. 2. Фрагментація ДНК ядер клітин карциноми Герена: *a* — на різних стадіях росту новоутворення (1, 2, 3 — препарати ДНК, отримані з ядер клітин карциноми Герена на 7, 14 та 21-шу добу відповідно; 4 — маркерний препарат Gene Ruler™); *б* — в умовах активування кислотої (2), лужної (3) ДНКаз та препарати фрагментованої ДНК інтактних ядер (1)

зумовлене пригніченням активності ферменту [17]. У подальшому відмічено підвищення показників активності ДНКаз I. Зафіксоване зростання ферментативної активності лужної ДНКаз можна пояснити тим, що на термінальних етапах росту пухлини більшість клітин гине в результаті процесів некрозу та автолизингу [17]. Аналіз електрофоретичних спектрів фрагментованої ДНК виявив незначний рівень фрагментації хроматину (рис. 2, *a*). Наявність слідових кількостей фрагментованої ДНК у латентній та логарифмічній фазах росту новоутворення можна пояснити зафіксованим зниженням активності лужної ДНКаз. На протигагу цьому, незначна кількість фрагментованої ДНК на термінальних етапах росту новоутворення зумовлена гідролізом наявних фрагментів ДНК кислотою ДНКазою. Це підтверджується як визначеним нами інтенсивним зростанням активності кислотої ДНКаз на термінальних етапах росту новоутворення (рис. 1, *б*), так і експериментами в системі *in vitro* по дослідженню фрагментації ДНК в умовах активування кислотої і лужної ДНКаз (рис. 2, *б*).

Результати цих експериментів показали, що в умовах активування лужної ДНКаз не відбувається повного гідролізу вже наявних фрагментів

ДНК, а, навпаки, спостерігається подальше накопичення фрагментів більшої молекулярної маси. Тоді як препарати, отримані з ядер, інкубованих в умовах активування кислотої ДНКаз, характеризувалися повною відсутністю фрагментованої ДНК, що свідчило про її повний гідроліз.

Пригнічення процесів деградації ДНК відмічено і в ядрах клітин печінки. Так, протягом усього експериментального періоду відбувалося зниження ферментативної активності, що відповідає лужній ДНКазі (рис. 1, *г*). Характер стрімкого зниження ферментативної активності лужної ДНКазі вже в перший тиждень після трансплантації вказує на чутливість даного показника до розвитку новоутворення. Крім цього, зниження інтенсивності процесів деградації ДНК, пов'язаних з функціонуванням лужної ДНКазі, можуть бути і компенсаторною реакцією організму-пухлиноносія на пригнічення синтетичних процесів.

Протягом експерименту не спостерігалось відновлення досліджуваних показників активності лужної ДНКазі в ядрах клітин печінки до контрольного рівня. У логарифмічній фазі росту карциноми Герена відбувалося статистично достовірне зростання показника ферментативної активності, але це не змінювало загальної картини зниженої

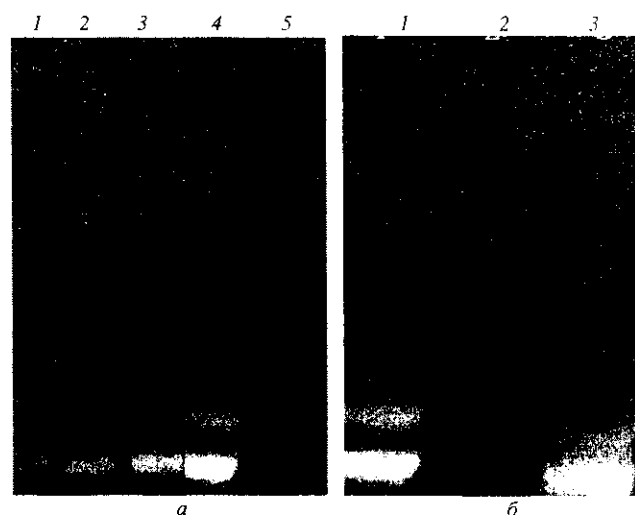


Рис. 3. Фрагментація ДНК ядер клітин печінки щурів-пухлиноносіїв на різних стадіях росту новоутворення, *a*: 1 — препарати ДНК, отримані з ядер клітин печінки щурів контрольної групи; 2, 3, 4 — препарати ДНК, отримані з ядер клітин печінки на 7, 14 та 21-шу добу росту новоутворення відповідно; 5 — маркерний препарат Gene Ruler™; *б* — в умовах активування кислотої (2), лужної (3) ДНКаз та препарати фрагментованої ДНК інтактних ядер (1)

активності ДНКаз і в ядрах клітин печінки (рис. 1, 2). Однак навіть занижений рівень активності лужної ДНКазі зумовлював незначну фрагментацію ДНК ядер клітин печінки, що підтверджується даними електрофорезу (рис. 3, а). Накопичення фрагментованої ДНК в ядрах клітин печінки, яке виявлялося на термінальних етапах росту карциноми Герена, можна пояснити поступовим зниженням активності кислої ДНКазі, оскільки в умовах активування даного ферменту гідроліз фрагментів відбувався повністю (рис. 3, б).

Висновки. Встановлене зниження ДНКазної активності клітинних ядер печінки внаслідок синергічної дії пухлини та компенсаторних механізмів організму можна розглядати як результат депресивного впливу злоякісного росту на досліджуваний метаболічно активний орган.

M. M. Marchenko, G. P. Kopyl'chuk, I. O. Shmarakov

DNase activity and chromatin fragmentation in cell nuclei in the process of tumor growth

Summary

The DNase activity and the level of chromatin fragmentation of the rat liver and Guerin's carcinoma nuclei were studied during tumor growth. The decrease in DNase activity of the liver cells nuclei was determined, that can be regarded as a result of the depressing influence of tumor growth on the metabolic active organ investigated. The obtained data show, that the violation of cell death program, characteristic for tumor cells, spreads on the cells of distant organs, which is testified by the suppressed DNase activity of liver cells nuclei.

M. M. Marchenko, G. P. Kopyl'chuk, I. A. Shmarakov

ДНКазная активность и степень фрагментации хроматина клеточных ядер в процессе роста злокачественного новообразования

Резюме

Изучали ДНКазную активность и степень фрагментации хроматина ядер клеток карциномы Герена и печени крыс-опухоленосителей в процессе роста злокачественного новообразования. Установлено снижение ДНКазной активности ядер клеток печени, что можно рассматривать как результат депресивного влияния злокачественного роста на исследованный метаболически активный орган. Полученные результаты указывают на то, что нарушение реализации программы клеточной гибели, характерное для опухолевых клеток, распространяется и на клетки отдаленных органов, о чем свидетельствует подавление ДНКазной активности ядер клеток печени.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз и рак.—К.: Морион, 1999.—184 с.
2. Peitsch M., Polzar B., Stephan H. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 371—377.
3. Enari M., Sakahira H. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis // *Nature.*—1998.—391.—P. 43—50.
4. Barry M., Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1993.— 300, N 1.—P. 440—450.
5. Vanderbilt J., Bloom K., Anderson J. Endogenous nuclease // *J. Biol. Chem.*—1982.—257.—P. 130109—130117.
6. Slor H., Lev T. Acid deoxyribonuclease activity in purified calf thymus nuclei // *Biochem. J.*—1971.—123.—P. 993—995.
7. Slor H., Bustan H. Deoxyribonuclease activity in relation to cell cycle in synchronized HeLa S3 cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1973.— 52, N 2.—P. 556—561.
8. Szabo G. 50 kb chromatin fragmentation in the absence of apoptosis // *Exp. Cell Res.*—1995.—N 2.—P. 320—325.
9. Staynov D. Z. DNase I digestion reveals alternating asymmetrical protection of the nucleosome by higher order chromatin structure // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28, N 28.—P. 3092—3099.
10. Samejima K., Tone S., Earnshaw W. CAD/DFP 40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis // *J. Biol. Chem.*—2001.—276, N 48.—P. 45427—45432.
11. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В. Активність цитоплазматичних протеаз пухлинної тканини щурів з трансплантованою карциномою Герена за дії лікувальних засобів різної природи // *Доп. НАН України.*—2000.—№ 3.—С. 192—195.
12. Мозжухина Т. Г., Литошенко А. Я. Влияние ионизирующего излучения на структурную организацию хроматина печени крыс разного возраста // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 4.—С. 65—72.
13. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги.—М.: Мир, 1999.—558 с.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
15. Рязанцева И. Н., Белаева М. И. Активность ДНКазы при опухолевом росте и действие на нее РНК асцитической жидкости опухоли Эрлиха // *Вопр. онкологии.*—1972.—18, № 9.—С. 33—37.
16. Винтер В. Г., Алимова Ф. К. Нейтральная ДНКаз хроматина печени при развитии опухоли у животных и участие РНК в регуляции ее активности // *Эксперим. онкология.*—1983.—5, № 3.—С. 29—32.
17. Jamison J., Gilloteraux J. Autoschizis: a novel cell death // *Biochem. Pharm.*—2002.—63.—P. 1773—1783.

УДК 577.152.314 + 616-006.6
Надійшла до редакції 04.11.03