

В. Я. БРОДСКИЙ, Н. В. НЕЧАЕВА

**СОХРАНЕНИЕ УСВОЕННОГО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ РИТМА
СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА КЛЕТКИ
АКТИНОМИЦИНА D**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 17 VII 1972)

В предыдущих наших исследованиях был обнаружен эндогенный ритм количественных изменений белков в ацинарных клетках околоушной слюнной железы крысы (¹⁻³). Ему соответствовал ритм синтеза белка в тех же клетках (^{3, 4}). Выяснилось также, что период этого ритма может быть изменен путем периодических воздействий на железу с частотой, отличной от естественной, синхронизирующей ритм у отдельных животных (²). В наших опытах это достигалось регулярными кормлениями крыс: синхронизирующий природный ритм были трехчасовые промежутки между кормлениями, тогда как после тренировки с двухчасовыми промежутками период ритма уменьшался. Было показано, что новая периодичность какое-то время сохраняется у животных после прекращения тренировки.

В настоящей работе выясняется возможность сохранения навязанного в эксперименте на крысах ритма синтеза клеточных белков в органной культуре околоушной железы. Другой задачей было исследование действия актиномицина D на ритм синтеза белка.

Крыс линии Вистар — самцов весом 120—150 г после 24-часового голодания кормили с двухчасовыми промежутками. Через 2,5 дня, т. е. после 30 сочетаний животных деканитировали, после чего быстро выделяли кусочки околоушной железы весом от 3 до 5 мг. Выделенные взвешенные кусочки измельчались до получения еще более мелких кусочков размером $1 \times 0,5 \times 0,5$ мм³ и помещались на мембранные фильтры HUFS в среду 199, к которой добавлялось 20% сыворотки крупного рогатого скота, 70 мкг витамина C и 4 мг глюкозы на 1 мл среды. Культивирование ткани на мембранных фильтрах проводилось в чашках Конвея. Детали методики культивирования околоушной слюнной железы были описаны ранее (⁵). Интенсивность синтеза белка оценивали по включению H³-лизина (фирма «Amersham», удельная активность 20 Ci/ммоль, доза 10 мкС на 1 мл среды) в белки железы после 15-минутной инкубации ткани с изотопом в среде 199 без немеченого лизина. Радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика SL-30 (эффективность счета составляла 25%). Для этого кусочки околоушной железы промывали средой 199 с избытком немеченого лизина, затем отмывали холодной 5% ТХУ и гидролизовали 5% ТХУ при 90° в течение 20 мин. с целью удаления нуклеиновых кислот. Надосадочную жидкость сливали, а осадок промывали 70% этанолом, заливали глицерин до полного растворения осадка, добавляли толуюловый сцинтиллятор и определяли радиоактивность. Радиоактивность пересчитывали на 1 г сырой ткани. Специфичность включения H³-лизина в белки проверяли добавлением в среду ингибиторов синтеза белка — пуромидина (доза 100 мкг/мл, фирма «Serva», Heidelberg) и актиномицина (доза 50 мкг/мл, «Serva»). Через 5 мин. после введения в среду ингибитора включение H³-лизина в ткань железы снижалось примерно в 10 раз (табл. 1). Следовательно, H³-лизин включается, преимущественно, если не исключительно, в белки железистых клеток. В течение 15-минутной инкубации с H³-лизи-

ном новообразованный белок не успевает выделиться из клетки (⁴), т. е. радиоактивность характеризует интенсивность синтеза белка.

Исследования синтеза белка проводились таким образом, что полный 2-часовой цикл изменений (промежуток между кормлениями при тренировке) определялся изучением кусочков железы одной и той же крысы. Часть кусочков инкубировали в нормальной среде 199, другую часть кусочков железы того же животного инкубировали в той же среде с добавлением актиномицина D (фирма «Serva», Heidelberg). Для выяснения

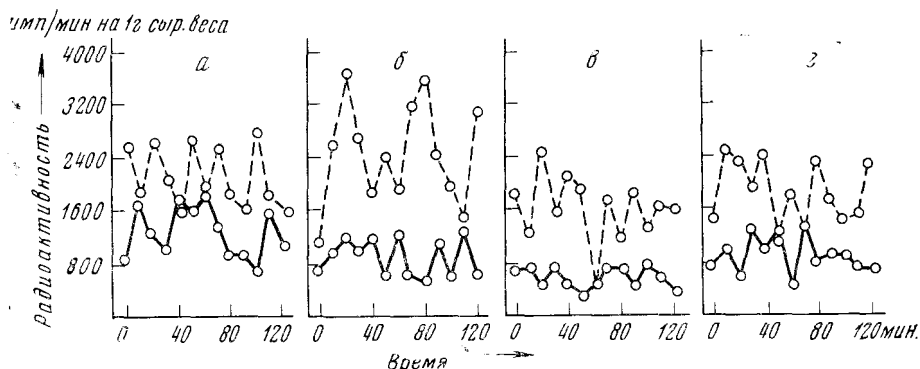


Рис. 1. Изменение синтеза белка в органной культуре околоушной железы крысы на разных сроках навязанного в эксперименте ритма при культивировании кусочков в нормальной среде 199 (пунктирная линия) и при добавлении актиномицина D (сплошная линия). а — крыса 1, норма, актиномицин D, б, в, г — крысы 2, 3, 4 соответственно

воспроизводимости измерений была определена радиоактивность кусочков одной и той же железы в одном фиксированном ее состоянии. Отличия вариантов от среднего были в несколько раз ниже полуамплитуды колебаний радиоактивности в изученном ритме.

Таблица 1

Влияние ингибиторов синтеза белка на специфичность включения H^3 -лизина в белки околоушной железы *in vitro*

Варианты опыта	Вес кусочка ткани, мг	Эффективная радиоактивность, имп/мин	Удельная * радиоактивность, имп/мин
Инкубация с H^3 -лизин	5,80	5458	919
Без инкубации с изотопом	3,95	85	22
Инкубация с ингибиторами белкового синтеза и H^3 -лизин			
Цуромидин **	4,2	452	76
	5,1	614	98
Актинидин	4,0	700	143
	4,5	675	128

* Радиоактивность на 1 г сырого веса железы (с учетом фона).

** Радиоактивность измерялась у животного под действием каждого из ингибиторов белкового синтеза дважды.

Через 14–16 час. после эксплантации в кусочках околоушной железы обнаружен достаточно интенсивный синтез белка (рис. 1). Изменения радиоактивности имеют периодический характер. Колебания не строго регулярны, что, по-видимому, обусловлено, как сложным характером процесса, так и погрешностями анализа. Однако средний период достаточно четко отличается от периодичности природного ритма. В случае навязанного в эксперименте ритма средний период колебаний интенсивности син-

теза белка равен 30–40 мин. (рис. 1) так же, как при исследовании этого ритма *in vivo* (^{2, 3}). Природный ритм характеризуется 50–60-минутным периодом (^{2, 3}). Следовательно, клетки помнят навязанный ритм работы и воспроизводят его какое-то время (в данном случае через 14–16 час. автоматически). Эти опыты показывают возможность следовых явлений, клеточной памяти, в кинетике синтеза белка.

Одновременно на том же материале изучался один из возможных путей регуляции усвоенного клетками ритма. Выясняли, необходим ли для сохранения ритма постоянный приток РНК. Предварительно определили,

Таблица 2

Влияние разных концентраций актиномицина D на включение H³-уридина в околоушную железу крысы *in vitro* (по данным двух опытов)

Варианты опыта	Концентрация актиномицина D, $\mu\text{г/мл}$	Вес кусочка ткани, мг	Эффективная радиоактивность, имп/мин	Удельная радиоактивность, имп/мин на 1 мг ткани	
				полная	минус фон
Культивирование без актиномицина плюс инкубация с H ³ -уридином *	—	3,65; 2,51	861; 1264	236; 504	220; 359
Культивирование с актиномицином плюс инкубация с H ³ -уридином	1	3,37—	204—	60—	44; —
	3	3,45; 2,52	162; 367	47; 146	31; 1
	5	2,95; 3,21	214; 673	72; 210	56, 65
Культивирование без актиномицина и без инкубации с H ³ -уридином	—	3,00; 2,65	50; 391	17; 147	
	—	4,30; 2,85	70; 143	16; 143	

* Время инкубации с H³-уридином во всех опытах 10 мин.; использованная доза 10 $\mu\text{С/мл}$.

что при пятикратном изменении дозы актиномицина D (1–5 $\mu\text{г/мл}$) степень торможения включения H³-уридина в ткань околоушной железы не изменяется (табл. 2). В изученном случае H³-уридин включается заведомо только в РНК: клетки околоушной железы взрослой крысы практически не синтезируют ДНК. Известно, что низкие дозы актиномицина D тормозят синтез рибосомной РНК, более высокие дозы всех форм РНК (^{6–9}). Характер включения H³-уридина в РНК железистых клеток, длительно, в течение 12–14 час. обработанных актиномицином D таков, что в этом случае можно говорить о почти полном синтезе РНК всеми использованными дозами ингибитора. В дальнейших исследованиях брали 3 $\mu\text{г/мл}$ актиномицина D — дозу, которая блокировала синтез всех форм РНК и в других культурах (^{7, 9}).

Блокирование синтеза РНК не прекращает синтеза белка (рис. 1), хотя существенно снижает его интенсивность. Подобный эффект актиномицина D был описан и ранее (^{10–13}). В такой же дозе на других клетках актиномицин D тормозил синтез РНК через 2–4 часа (^{8, 9}). В наших опытах клетки находились в среде с ингибитором 12 час. и более, т. е. транскрипция была нарушена примерно в течение 10–12 час. Интересно, что синтез белка на долгоживущих матрицах и рибосомах продолжался в том же навязанном ритме, как и в клетках железы того же животного, не обработанных актиномицином D. В обоих случаях средний период колебаний радиоактивности белков был 30–40 мин., что соответствует периодичности количественных изменений белков в железистых клетках животных, тренированных 2-часовыми воздействиями (²).

Таким образом, в органной культуре околоушной железы сохраняется ритм синтеза белков клетки, названный в эксперименте. Усвоенный клетками ритм не требует для своей реализации постоянного притока РНК. Это наблюдение делает сомнительной ядерную регуляцию клеточной памяти

в изученном нами случае. В дальнейшем, видимо, целесообразно исследовать регуляцию усвоенного ритма на уровне трансляции, мембранных процессов и других преимущественно цитоплазматических функций. Перспективно выяснение механизмов кооперативного функционирования клеток, что может дать новые сведения о приспособительных реакциях тканей в постнатальном онтогенезе.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Бродский, Н. В. Нечаева, Цитология, 13, 2, 221 (1971). ² В. Я. Бродский, Н. В. Нечаева, В. И. Прилущкий, Цитология, 15, 2, 177 (1973). ³ Н. В. Нечаева, В. И. Фатеева, Бюлл. эксп. биол. и мед., 75, 1, 66 (1973). ⁴ Н. В. Нечаева, В. Я. Бродский, Цитология, 15, 1, 52 (1973). ⁵ Н. В. Нечаева, Т. Б. Айзенштадт, Е. А. Лурия, Цитология, 12, 2, 4, 466 (1970). ⁶ М. И. Лерман, В. Л. Мантеева, Г. П. Георгиев, ДАН, 152, 3, 744 (1963). ⁷ R. P. Perry, Exp. Cell Res., 29, 3, 400 (1963). ⁸ A. B. Ricinso, P. P. Dendy, Experientia, 25, 12, 1251 (1969). ⁹ И. Н. Смоленская, Т. П. Мазнина, Цитология, 13, 11, 1347 (1971). ¹⁰ S. A. Armentrout, R. D. Schmickel, S. L. Simmons, Arch. Biochem. and Biophys., 112, 2, 304 (1965). ¹¹ M. Grabowska, Bull de l'acad. Polon Sci. (Ser. Sci. biol.), 13, 5, 265 (1965). ¹² К. Г. Газарян, А. С. Кульминская, ДАН, 166, № 2, 462 (1966). ¹³ N. H. Marsh, P. J. Fitzgerald, Am. J. Pathol., 64, 2, 357 (1971).