

УДК 547.963.3:577.391

БИОХИМИЯ

И. Ф. ПАСКЕВИЧ

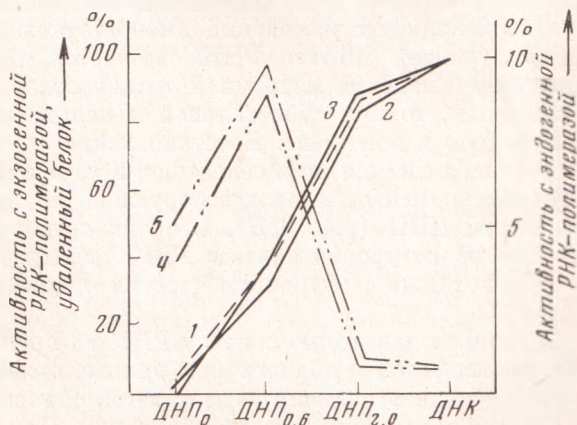
МАТРИЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ ХРОМАТИНА ИЗ ОРГАНОВ ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 1 II 1973)

Ранее нами было показано (¹⁻³), что синтез РНК, ядерных белков и состояние ДНП претерпевают существенные изменения при воздействии ионизирующей радиации, причем эти нарушения во многом зависели от дозы и времени после облучения. Было высказано предположение, что одной из основных причин изменения транскрипции является нарушение физико-химического состояния ДНП-комплекса и что важную роль в этих процессах играет активность РНК-полимеразы. Известно также, что ДНП, в различной степени обедненные белками, могут быть использованы в качестве матрицы для синтеза РНК как с экзогенной, так и с эндогенной РНК-полимеразами (⁴). Использование этого методического подхода в радиобиологическом эксперименте позволит одновременно (с известным приближением) решить вопрос о вкладе в нарушение синтеза РНК состояния собственно матрицы и состояния РНК-полимеразы в матричном комплексе ДНП. Кроме того, для выяснения механизмов пострадиационного восстановления ДНК и ДНП представляет интерес исследование их в зависимости от дозы и времени после облучения.

Опыты проведены на белых крысах весом 150–160 г через 24, 48 и 120 час. после облучения в дозах 400, 600 и 800 р. Выделение ядер, хроматина и ДНП, в различной степени обедненных белками возрастающими концентрациями NaCl, проводили как описано в (^{1, 2}). В качестве матриц для синтеза РНК использовали ДНП₀, ДНП_{0,6}, ДНП_{2,0} и ДНК, которую выделяли из печени и селезенки крыс по (⁵). Инкубационная проба для определения матричной активности содержала: по 0,4 μ мол АТФ, ГТФ, ЦТФ и C¹⁴-УТФ; 20 μ мол трис-буфера, рН 8,0; 2 μ мол MgCl₂; 0,5 μ мол MnCl₂; 6 μ мол β -меркаптоэтанола, 50 μ г ДНК или ДНП, объем пробы 1 мл. При проведении опытов с экзогенной РНК-полимеразой в пробу вносили 20 ед. фермента, выделенного из *E. coli* по (⁶). Опыты с эндогенной РНК-полимеразой проводили на ДНП₀ и ДНП_{0,6}, состав ингредиентов в пробе тот же, однако реакционная смесь не содержала РНК-полимеразы *E. coli* и синтез РНК осуществлялся исключительно за счет фермента, содержащегося в препаратах ДНП. Кроме того, в пробу вносили фосфоенолпируват (2 μ мол/мл) и пируваткиназу (300 μ г/мл). Инкубацию проводили 20 мин.

Рис. 1. Характеристика ДНП, полученных при обработке растворами различной ионной силы. 1 — удаление белка, 2, 3 — матричная активность ДНП печени и селезенки с экзогенной РНК-полимеразой *E. coli*, 4, 5 — матричная активность ДНП с эндогенной РНК-полимеразой (матричная активность свободной ДНК с РНК-полимеразой *E. coli* принята за 100%)



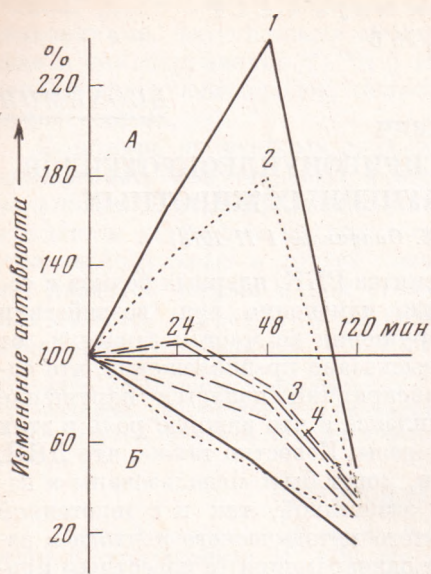


Рис. 2. Влияние облучения (800 р) на матричную активность ДНП и ДНК печени (А) и селезенки (Б) в присутствии РНК-полимеразы *E. coli*. 1 — ДНП₀, 2 — ДНП_{0,6}, 3 — ДНП_{2,0}, 4 — ДНК

чески не отличается от контроля (рис. 2, А). Однако через 120 час. после облучения синтез РНК на ДНП и ДНК значительно падает как по сравнению с нормой, так и по сравнению с предыдущими сроками. В селезенке падение синтеза РНК наблюдается во все сроки облучения на матрицах ДНП и ДНК (рис. 2, Б). Приведенные результаты по матричной активности фракций ДНП обоих органов при использовании в качестве фермента экзогенной РНК-полимеразы могут частично свидетельствовать в пользу предположения о дерепрессии матрицы в печени в ранние сроки лучевого поражения и косвенно — о нарушении макромолекулярной структуры ДНП в селезенке и в печени (в отдаленные сроки после облучения). Однако эти опыты не дают информации о возможном изменении состояния РНК-полимеразы и, следовательно, делают указанные предположения односторонними. Чтобы выяснить вопрос об активности эндогенной РНК-полимеразы в комплексе ДНП проводили опыты по синтезу РНК на ДНП₀ и ДНП_{0,6} без экзогенной РНК-полимеразы *E. coli*.

Как видно (рис. 3, А), матричная активность фракций ДНП из печени возрастает через 48 и 24 часа независимо от дозы облучения, однако степень выраженности изменений имеет четкую дозную зависимость. Через 120 час. уровень синтеза РНК снижается, однако если при облучении в дозе 800 р падение матричной активности резко снижено по сравнению с контролем, то при сублетальной и нелетальной дозах уровень синтеза РНК близок к контролю. Восстановление синтеза РНК при дозах 400 и 600 р наблюдается и в селезенке, в то время как при летальной дозе облучения отмечается прогрессирующее во времени падение матричной активности ДНП (рис. 3, Б). В обоих органах максимально выраженное восстановление уровня синтеза РНК наблюдается при дозе 400 р, что согласуется также с изучением других показателей в аналогичных условиях (⁷).

Сравнивая данные по синтезу РНК на препаратах ДНП с экзогенной РНК-полимеразой и аналогичные данные с собственным ферментом, можно предположить наличие двух причин, объясняющих увеличение синтеза РНК в печени в ранние сроки облучения. По всей вероятности, облучение приводит к дерепрессии ДНК-матрицы и, следовательно, к увеличению

при 37°, после инкубации пробы промывали ТХУ, этанолом, растворяли в муравьиной кислоте и радиоактивность определяли на счетчике УСС-1 в сцинтилляторе ЖС-7.

Как видно из рис. 1, по мере обеднения ДНП белками возрастающими концентрациями NaCl матричная активность в присутствии экзогенной РНК-полимеразы возрастает примерно пропорционально количеству удаленного белка. В то же время, если синтез РНК осуществляется исключительно за счет РНК-полимеразы, содержащейся в ДНП, матричная активность последнего резко падает при полной силе выше 0,6 М, что косвенно свидетельствует о степени связывания РНК-полимеразы с ДНП.

В печени матричная активность ДНП₀ и ДНП_{0,6} существенно увеличивается через 24 и 48 час. после облучения в дозе 800 р, а уровень синтеза РНК при использовании в качестве матрицы ДНП_{2,0} и ДНК, выделенных в указанные сроки, практи-

синтеза РНК за счет увеличения точек считывания (что вытекает также и из других экспериментальных результатов⁽¹⁻³⁾). Однако дерепрессия матрицы сопряжена не только с количественным увеличением точек считывания, но и с изменением активности фермента, осуществляющего синтез РНК, т. е. РНК-полимеразы. Увеличение матричной активности за счет эндогенной РНК-полимеразы может быть связано как с увеличением количества фермента в ДНП, так и с изменением его активности. В последующие сроки развития лучевого поражения наблюдается распад комплекса ДНП и нарушение его физико-химического состояния⁽⁸⁾, т. е. ДНП становится либо недоступным для считывания в силу конформационных сдвигов, либо же наблюдается потеря фермента. Нам кажется, что первое предположение более правомерно, так как подтверждается данными по синтезу РНК с экзогенной РНК-полимеразой. По всей вероятности, высказанный выше механизм характерен и для селезенки, где, как видно из приведенных данных, происходит существенное снижение уровня синтеза РНК на ДНП как с экзогенной, так и с эндогенной РНК-полимеразой.

Что касается выравнивания синтеза РНК на матрицах ДНП в обоих органах при дозах 400 и 600 р, то, очевидно, в отдаленные сроки лучевого поражения наблюдается восстановление ДНП-комплекса за счет репарации повреждений на клеточном⁽⁹⁾ или молекулярном⁽¹⁰⁾ уровнях.

Научно-исследовательский институт медицинской радиологии
Харьков

Поступило
23 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Н. Тодоров, И. Ф. Паскевич, ДАН, 186, 219 (1969). ² И. Ф. Паскевич, М. А. Ишханова, В. С. Лиходед, Радиобиология, 11, 673 (1971). ³ И. Ф. Паскевич, И. В. Столяров, В. С. Лиходед, Радиобиология, 12, 649 (1972).
- ⁴ П. Юхас, С. А. Лимборская и др., Мол. биол., 5, 586 (1971). ⁵ И. Ф. Паскевич, В. И. Шантырь, И. Н. Тодоров, Док. АН УРСР, 10, 923 (1969).
- ⁶ M. Chamberlin, P. Berg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 81 (1962). ⁷ И. Ф. Паскевич, В. С. Лиходед и др., ДАН, 208, № 3 (1973). ⁸ И. Ф. Паскевич, И. В. Столяров и др., Радиобиология, 12, 820 (1972). ⁹ А. М. Кузин, Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии, «Наука», 1970. ¹⁰ А. И. Газиев, Д. Т. Закржевская и др., IV Международн. биофиз. конгр., 1, 1972, стр. 262.

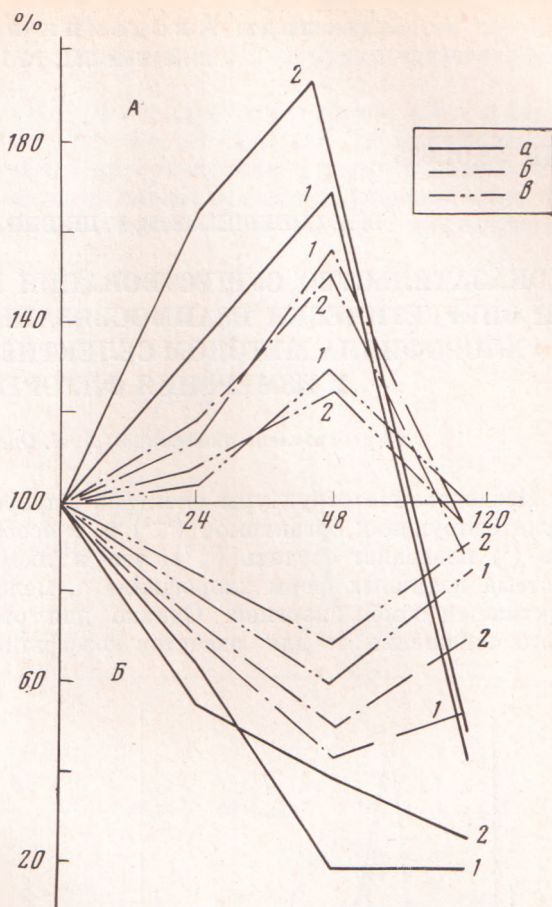


Рис. 3. Влияние облучения на матричную активность ДНП₀ (1) и ДНП_{0,6} (2) печени (А) и селезенки (Б) в присутствии эндогенной РНК-полимеразы. а — 800, б — 600, в — 400 р