

Л. Н. БЛОК, А. А. КРАСНИЦКАЯ, Г. А. АНОХИНА,
академик АН УССР В. Н. НИКИТИН

СИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ МИКРОСОМАМИ И РИБОСОМАМИ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Можно считать установленным, что в ходе индивидуального развития млекопитающих интенсивность белкового синтеза снижается практически во всех тканях (¹⁻²). Конкретные механизмы этого снижения остаются невыясненными. Данные многих авторов позволяют заключить, что с возрастом в разной степени изменяются свойства всех систем, участвующих в синтезе белка, а именно — активность микросом и рибосом (^{3, 4}), матричная активность мРНК (³), активность различных аминоксил — тРНК — синтез (⁵). По-видимому, ни один из этих компонентов не может считаться полностью ответственным за возрастное снижение белкового синтеза в тканях и ни один из них нельзя считать совершенно неменяющимся в онтогенезе.

Цель настоящей работы — сравнение способности микросом и рибосом печени крыс разного возраста к синтезу белка *in vitro* на эндогенной матрице — молекулах мРНК, выделенных из печени вместе с микросомами. Преинкубация частиц в средах разного состава позволила сравнивать синтез белка *in vitro* на молекулах мРНК с разными сроками жизни. Сопоставление синтетических возможностей микросом и рибосом, полученных путем обработки микросом дезоксихолатом натрия, дает косвенные указания на участие эндоплазматической сети в синтезе белка рибосомами крыс разного возраста.

Подопытными животными были белые крысы линии Вистар возраста 1, 3, 12 и 24 мес. Микросомы и рибосомы печени выделяли по методу Шапота и Родионовой (⁶), состав инкубационной среды и условия инкубации по Гапоза и Вильямс (⁷) с использованием печеночного ингибитора РНКазы (⁸). Ингибитор всегда получали из печени крыс того же возраста, что инкубируемые частицы.

Уровень белкового синтеза *in vitro* оценивался по включению в кислотонерастворимый осадок меченых ¹⁴C — валина (150,0 мС/ммол), глутаминовой кислоты (150,0 мС/ммол), серина (75,0 мС/ммол); способность частиц к использованию экзогенной матрицы — по включению тех же аминокислот в условиях двойной (ДНК — направляемой) бесклеточной бактериальной системы в присутствии ДНК Т2 (детали метода по (¹⁵)). Радиоактивность кислотонерастворимых осадков определяли с применением жидкого сцинтиллятора ЖС-7, а также с применением бумажных фильтров и жидкого сцинтиллятора толуол — РРО — РОРОР на сцинтилляционном счетчике СБС-1, при точности радиометрии 1—2% и эффективности счета 60—80%.

Для каждого сочетания экспериментальных условий инкубировали параллельно две пробы, средняя для которых принималась за отдельный результат в дальнейших расчетах. Параллельное определение в каждом опыте всех сравниваемых величин позволило вычислять для каждого опыта их отношения, а также производить вариационно-статистическую обработку серии экспериментов (¹¹). Непосредственные результаты отдельных экспериментов приведены в табл. 1, 2. Как видно из табл. 1, микросомы и рибосомы печени крыс всех исследованных возрастов, инкубированные в бесклеточной системе в присутствии печеночного ингибитора РНКазы, осуществ-

влияют синтез белка *in vitro* на эндогенных матрицах. Кратковременная (2–7 мин.) преинкубация частиц снижает уровень синтеза.

В бактериальной бесклеточной системе микросомы и рибосомы печени сохраняли способность к эндогенному синтезу белка *in vitro* после 20-минутной преинкубации (табл. 2). Добавление ДНК Т2 не стимулировало синтеза белка микросомами и рибосомами крыс в условиях двойной бесклеточной бактериальной системы, хотя синтез РНК в системе осуществлялся, судя по включению ¹⁴С-урацила в параллельно инкубируемых пробах (табл. 2).

Ранее было показано (¹²), что добавление ДНК Т2 стимулировало синтез белка рибосомами *E. coli* в идентичных условиях. В литературе описан син-

Т а б л и ц а 1

Синтез белка (включение ¹⁴С — валина, имп/мин.) в бесклеточной системе микросомами и рибосомами печени крыс разного возраста

№ опыта	Возраст крыс, мес.	Микросомы		Рибосомы		Контрольные «без частиц»
		без преинкубации	преинкубированные	без преинкубации	преинкубированные	
1. Преинкубация 7 мин.	1	2870	600	1375	660	360
	3	3240	735	1670	595	
	12	6740	600	2190	570	
	24	5020	635	1460	654	
2. Преинкубация 2,5 мин.	1	2700	534	1300	366	147
	3	1360	420	1040	270	
	12	2770	1053	911	300	
	24	2080	444	985	252	

тез полифенилаланина микросомами печени крыс на матрице полиуридиловой кислоты (⁴). Отсутствие стимуляции в настоящих экспериментах объясняется, по-видимому, использованием гетерологической естественной экзогенной мРНК — РНК, синтезированной в бактериальной бесклеточной системе на матрице фаговой ДНК.

Средние из относительных величин, характеризующих синтез белка в расчете на 1 мг РНК частиц микросомами и рибосомами печени крыс сравнимых возрастов для серии из 12 опытов показаны на рис. 1. В наших экспериментах не наблюдалось непрерывного возрастного снижения синтеза белка микросомами *in vitro* (рис. 1). После заметного снижения к 3 мес. ($P < 0,01$) синтез возвращался к уровню 1-месячных крыс. Синтез белка микросомами, подвергнутыми преинкубации, т. е. синтез на относительно долгоживущих молекулах мРНК, еще заметнее повышается к 12 мес. Уровень синтеза белка преинкубированными микросомами старых (12 и 24 мес.) крыс увеличен даже в сравнении с 1-месячными. Это соответствует сохранению у старых крыс после преинкубации более высокого уровня синтеза белка *in vitro* в сравнении с исходным, чем у молодых животных ($P < 0,05$). Можно заключить, что отношение интенсивности синтеза белка на коротко- и долгоживущих молекулах мРНК с возрастом изменяется в пользу долгоживущих. Синтез белка микросомами, преинкубированными и инкубированными в бактериальной бесклеточной системе, претерпевает с возрастом аналогичные, хотя и менее четко выраженные, изменения.

Обработка микросом дезоксихолатом натрия, освобождающая их от обрывков эндоплазматической сети, снижает уровень белкового синтеза *in vitro* в 2–4 раза. Разница уровней синтеза на микросомах и рибосомах увеличивается к старости. Обработка дезоксихолатом натрия меняет характер зависимости интенсивности белкового синтеза *in vitro* от возраста (рис. 1).

Синтез снижается ($P < 0,05$) к старости в сравнении с 3-месячными животными. Та же закономерность наблюдается у рибосом печени, преинкубированных и инкубированных в бактериальном экстракте ($P < 0,05$). Рибосомы, преинкубированные с печеночным ингибитором РНКазы, обнаруживают за-

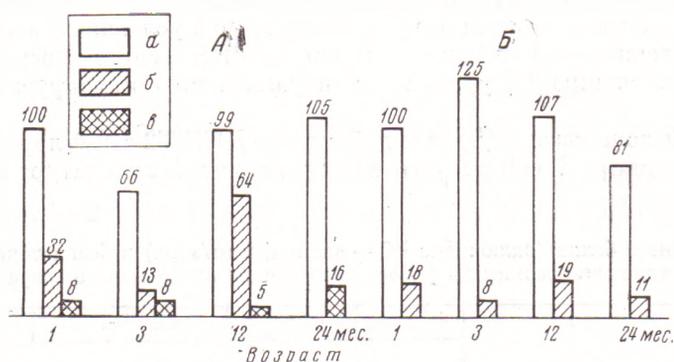


Рис. 1. Синтез белка *in vitro* микросомами (А) и рибосомами (Б) печени крыс (% от уровня синтеза непринкубированными частицами 1-месячных крыс). а — непринкубированные частицы, б — преинкубация 2,5 мин., в — преинкубация 7 мин.

кономерность, аналогичную наблюдаемой у микросом, — уровень белкового синтеза *in vitro* повышается к 12 мес. ($P < 0,01$).

Таким образом, согласно нашим данным, синтетические возможности микросом и рибосом меняются с возрастом по-разному. Естественно предположить, что обработка дезоксирибонуклеатом натрия, освобождающая связанные с мембранами рибосомы от обрывков мембран, в большей степени нарушает

Таблица 2

Синтез белка преинкубированными микросомами и рибосомами печени крыс разного возраста в ДНК — направляемой бактериальной бесклеточной системе и синтез РНК в этой системе

Возраст крыс, мес.	Включение ^{14}C — глутаминовой кислоты, имп/мин					Включение ^{14}C — урацила, имп/мин			
	микросомы		рибосомы		контроль «без частиц»	микросомы		рибосомы	
	—	+ДНКТ2	—	+ДНКТ2		—	+ДНКТ2	—	+ДНКТ2
1	204	225	252	295	66	300	14280	270	
3	180	180	279	270			14850		14400
12	204	201	249	198			13300		16080
24	180	174	204	240			12200		14280

синтетические возможности этой рибосомальной фракции в сравнении со свободными рибосомами ($^{13-15}$). Можно заключить, что синтез белка прикрепленными к мембранам и свободными рибосомами печени меняется с возрастом по-разному.

Наши данные свидетельствуют о том, что к старости не наблюдается непрерывного катастрофического падения синтетических возможностей рибосом. Возрастное снижение белкового синтеза связано, по-видимому, с перестройкой других компонентов (интра- и экстрацеллюлярных) кле-

точного аппарата синтеза и регулирующих систем, определяющих уровень
белкового синтеза.

Харьковский государственный университет
им. А. М. Горького

Поступило
25 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Н. Буланкин, Е. В. Парина, Тр. н.-и. инст. биол. и биол. ф-та Харь-
ковск. гос. унив., т. 29, 7 (1960). ² О. П. Силлин, там же, т. 29, 53 (1960). ³ W. J. Ma-
inwaring, Biochem. J., v. 110, № 1, 79 (1968). ⁴ W. J. Mainwaring, Biochem. J., v. 113,
№ 5, 869 (1969). ⁵ Г. И. Деревянко, там же, стр. 69. ⁶ В. С. Шанор, Н. П. Родионова,
Молек. биол., т. 3, № 5, 785 (1969). ⁷ M. C. Ganoza, C. A. Williams, Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, v. 63, № 4, 1370 (1969). ⁸ G. Blobel, V. R. Potter, J. Mol. Biol., v. 28, № 3, 539
(1967). ⁹ M. Lederman, G. Zubay, Biochim. et Biophys. Acta, v. 149, № 1, 253 (1967).
¹⁰ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951).
¹¹ Дж. И. Снедекор, Статистические методы в применении к исследованиям в сель-
ском хозяйстве и биологии, М., 1961. ¹² Л. М. Блок, В. Д. Розенберг и др., Укр.
биохим. журн., т. 45, № 2, 136 (1973). ¹³ C. M. Redman, J. Biol. Chem., v. 244, № 16,
4308 (1969). ¹⁴ M. S. C. Birbeck, D. E. H. Mercer, Nature, v. 189, № 4764, 558 (1961).
¹⁵ T. Peters, J. Biol. Chem, v. 237, 1186 (1962).