

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

На правах рукопису

БОЖЮВ Анатолій Іванович

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ
АДАПТАЦІЇ ТА ГЕТЕРОЗИС

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеню
доктора біологічних наук

Харків - 1992

ДТБ 26, 738

Робота виконана в НДІ біології Харківського державного
університету

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00825666 (X)

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ: чл.-кор. АН України
доктор медичних наук,
професор А. М. Білоус

доктор біологічних наук,
професор О. В. Четкін

доктор біологічних наук,
професор Н. І. Панченко

ВЕДУЧА ОРГАНІЗАЦІЯ: Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
АН України

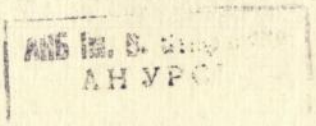
Захист видбудеться "11" Лютого 1993 р. о 14 год.
на засіданні спеціалізованої ради Д 088.23.04 при Харківському
медичному інституті за адресов: 310022, Харків-22, пр. Леніна,
4, ауд. 1.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці інституту.

Автореферат розіслан "6" січня 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук

Л. О. Жубрикова



Актуальність теми. В процесі життєдіяльності організми безперервно пристосовуються до навколишнього середовища. Це середовище увесь час змінюється не тільки у зв'язку з геологічними та кліматичними умовами, а і внаслідок змін у співвідносинах між різними організмами /у біоценозах та внаслідок зміни самих організмів, для яких тоді і середовище стає іншим /Шмальгаузен, 1982/. Безперервно змінюються взаємодії організму з різноманітними факторами середовища і це є джерелом єдності та боротьби таких протилежних процесів як стійкість та змінність. Адаптація виступає мірою єдності цих протилежностей, результатом та засобом розв'язання внутрішніх та зовнішніх суперечностей життя, і тим самим є одним з універсальних її властивостей /Шмальгаузен, 1982/. Проблема адаптації є однією з найбільш загальних проблем біології, над якою працюють спеціалісти різних напрямків та дослідження її охоплюють від молекулярного до популяційного і навіть біосферного рівня.

Динаміка змін екологічної обстановки нашої планети визиває тривогу у багатьох спеціалістів, так як середовище проживання у широкому сенсі слова усе більше і більше поповнюється шкідливими факторами фізичної, хімічної та біологічної природи /Бочков, 1989; Дубінін, 1982/. Далеко не всі можливі наслідки нових факторів середовища вивчені і особливу тривогу в цьому відношенні подають генетичні зміни, які виявляються не зразу і які не мають порогових дій /Бочков, 1989/. Дослідження молекулярно-генетичних механізмів взаємодії генома з різноманітними факторами середовища мають велике теоретичне та практичне значення.

Вивчення молекулярних механізмів адаптації пов'язано з великими методичними труднощами. Як загальнобіологічна проблема адаптація пов'язана з багатьма біологічними проблемами, зокрема проблемою гетерозису, проблемою вікового розвитку та ін. Так, показано, що у процесі індивідуального розвитку організму змінюються його спроможності адаптуватися до умов середовища /Тролькіс, 1977; Еутенко та ін., 1983/, що у великій мірі залежить від генотипу організму /Даскалов, 1968; Хаджинов, 1980/. Більші адаптивні спроможності гібридних організмів у порівнянні з чистолінійними організмами до екстремальних факторів середовища, вказують на безпосередній зв'язок ефекту гетерозиса з механізмами адаптації.

В останні роки було виявлено, що у відповідь на дію таких факторів як температура, важкі метали, голодування та ін. стрес-фактори у клітинах тварин та рослин індуктується транскрипція ряду генів, контролюючих синтез білків /Adams et al. , 1989; Steinert, 1968/, що є доказом участі генетичної системи у механізмах адаптації організму. Однак, як передаються сигнали від зовнішнього середовища на геном, що є передавачем цих сигналів, як змінюється функціональна активність геному у тварин з різними генотипами на дію факторів середовища та цілий ряд інших важливих питань молекулярно-генетичних механізмів адаптації залишаються невирішеними.

було дослідження
Мета і задачі дослідження. Метою роботи причин, які лежать в основі різної адаптації ліній та гібридів до різноманітних факторів середовища у рамках вивчення молекулярно-генетичних механізмів адаптації.

В задачі дослідження входило:

1. Дослідити відповідну реакцію системи реалізації генетичної інформації лінійних та гібридних тварин на дію екзогенних факторів - радіації, гіпертермії, важких металів, ксенобіотиків.
2. Дослідити взаємовідносини між елементами системи реалізації генетичної інформації /транскрипції, процесінгу, транспорту РНК/ на фоні дії стрес-факторів.
3. Виявити ендогенні фактори, які впливають на відповідну реакцію системи реалізації генетичної інформації при дії різноманітних екзогенних факторів.
4. Дослідити пов'язані з часом характеристики системи реалізації генетичної інформації при зміні функціональної активності органу.
5. Дослідити мембранний механізм регуляції системи реалізації генетичної інформації на фоні дії різноманітних екзогенних факторів /гіпертермія, ксенобіотики, часткова гепатектомія, важкі метали/.
6. Дослідити особливості структурно-функціональної організації мембран у тварин з різним генотипом.

Наукова новизна результатів.

1. Показано, що система реалізації генетичної інформації, яка вміщує такі елементи як транскрипція, процесінг та транспорт РНК, трансляція, реагує на різноманітні екзогенні дії як єдине

як
ціле і може розглядатися центральне кільце переробки екзогенної інформації.

2. Показан структурно-функціональний зв'язок мембран ендоплазматичного ретикулуму з функціональною активністю системи реалізації генетичної інформації в процесі адаптації.

3. Запропоновано гіпотезу мембрано-генетичного механізму адаптації клітини до екстремальних факторів середовища.

4. Виявлено, що у відповідь на дію різноманітних факторів середовища /радіації, локальної гіпертермії печінки, важких металів та деяких ксенобіотиків/ система реалізації генетичної інформації функціонує у ритмічному режимі, на пов'язаний з часом характер якого впливають не тільки зовнішні фактори, але і генотип організму.

5. Показано, що в інтактних клітинах печінки система реалізації генетичної інформації функціонує у режимі навкологодинного ритму. Функціональні зміни активності органу приводять до модифікації пов'язаної з часом організації цих ендогенних ритмів.

6. Висловлена гіпотеза згідно з якою відмінність лінійних та гібридних організмів в адаптивності до факторів середовища обумовлені у них відмінністю структурно-часовою та функціональною організацією системи реалізації генетичної інформації та внутрішніх мембран клітини.

7. Показано, що важкі метали впливають на функціональну активність системи реалізації генетичної інформації, яка має трифазний характер: фазу стимуляції, скриту фазу та фазу інгібування. Висловлено положення, що дія металів на систему реалізації генетичної інформації виявляється через їх дію на мембранну систему клітини.

8. Обґрунтовано положення про те, що відповідь системи реалізації генетичної інформації на екзогенне діяння визначається структурно-часовим та функціональним станом системи реалізації генетичної інформації в момент діяння.

Теоретичне значення роботи. Результати роботи вказують на необхідність та перспективність досліджень, спрямованих на пізнання механізмів взаємодії системи реалізації генетичної інформації /а не окремих її елементів/ з різноманітними факторами середовища на основі структурно-часової організації генетичних систем. Цей напрямок наукових досліджень об'єднує молекулярну генетику, біохімічну екологію та біоритмологію на рішення проблеми динамічної взаємодії системи реалізації генетичної інформації з фак-

торами середовища, взаємодія яких і визначає виявлення біологічних явищ що характеризуються безперервною мінливістю.

Практичне значення результатів роботи.

1. Розроблена експериментальна модель гепатиту на основі короточасної дії локальної гіпертермії печінки /А. с. 1411804, ССРСР, МКІ⁴ С 09 В 23/28/, яка використовується у фундаментальних дослідженнях дії гіпертермії на клітини у системі *in vivo*, а також у скринінгу та випробуванні нових гепатозахисних препаратів, які проводились разом з Державним науковим центром лікарських засобів та Харківським підприємством по виробництву бактерійних препаратів

2. Розроблен спосіб оцінки мембранотропності ксенобіотиків, заснований на оцінці структурно-функціональних змін мембран у системі *in vitro* /А. с. 1749835 ССРСР, МКІ⁵ G 01 M 39/68 /.

3. Розроблен спосіб оцінки активності протизапальних засобів на основі їх дії на структурно-функціональні характеристики лізосомальних мембран, яких вживається як при оцінці активності ксенобіотиків, так і у порівняннях дослідженнях структури лізосом.

4. Розроблен спосіб оцінки генотоксичності важких металів, заснований на оцінці активності системи реалізації генетичної інформації інфузорій та водоростей, який вживається при оцінці токсичності стічних вод /А. с. ССРСР 1755194, МКІ⁵ G 01 M 33/48/.

5. Виконані методичні розробки оцінки функціонального стану системи реалізації генетичної інформації та положення мембрано-генетичної гіпотези адаптації знайшли широке застосування при дослідженні механізмів дії нових медичних препаратів у сумісних роботах виконаних разом з Державним науковим центром лікарських засобів, Харківським підприємством по виробу бактерійних препаратів, а також Харківським фармацевтичним інститутом.

Основні положення, які вносяться на захист.

1. Система реалізації генетичної інформації є центром обробки екзогенної інформації про стан середовища, зміна системи РГІ корелює з перебудовою структурно-функціонального стану внутрішніх клітинних мембран.

2. Відмінність лінійних та гібридних організмів у адаптації до різноманітних факторів середовища обумовлена відмінністю у структурно-часовій та функціональній організації системи реалізації генетичної інформації і мембран клітини.

3. Функціонування системи реалізації генетичної інформації здійснюється у навколородинному ритмі, який є ендогенним ритмом біологічних систем, впливаючий на результат взаємодії факторів

середовища з метаболічною системою клітини.

4. Відповідь системи реалізації генетичної інформації на екзогенні дії визначається її структурно-часовим станом в момент дії.

Апробація та публікації матеріалів дисертації. Матеріали дисертації докладались та обговорювались на IV з'їзді генетиків та селекціонерів України /Київ, 1981/; XI з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова /Київ, 1982/; IV з'їзді Всесоюзного товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І.Вавилова /Кишинів, 1982/; IV Всесоюзному з'їзді геронтологів та геріатрів /Київ, 1982/; Всесоюзній науковій конференції по допоміжним фармацевтичним речовинам /Харків, 1982/; Республіканському симпозиумі "Ядерні білки та експресія генома" /Київ, 1983/; XII з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова /Львів, 1986/; V з'їзді генетиків та селекціонерів України /Київ, 1986/; IX Всесоюзному симпозиумі "Структура і функція ядра клітини" /Черноголовка, 1987/; V з'їзді Всесоюзного товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І.Вавилова /Москва, 1987/; Всесоюзному симпозиумі "Молекулярні і функціональні механізми онтогенезу" /Харків, 1987/; V Всесоюзному з'їзді геронтологів та геріатрів /Тбілісі, 1988/; Всесоюзному симпозиумі Екологія морських та прісноводних найпростіших" /Ярославль, 1989 /; Всесоюзній конференції "Методологія екологічного нормування" /Харків, 1990 /; X Всесоюзному симпозиумі "Структура і функція ядра клітини" /Гродно, 1990/; II Всесоюзній конференції по рибогосподарській токсикології /Санкт-Петербург, 1991/; VI з'їзді Українського товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І.Вавилова /Полтава, 1992/.

По матеріалам дисертації надруковано 41 роботу.

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 321 сторінки машинописного тексту. Складається із вступу, опису об'єктів та методів дослідження і 6 глав власних досліджень, закінчення та висновків, списку літератури, який вміщує 403 назви, а також огляду літератури.

СКЛАД РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження здійснювались на щурах, мишах, інфузоріях та водоростях. Щури ліній Вістар, Август та їх гібриди /♀ В х ♂ А/ та миші ліній АКР, С57BL та їх гібриди /С57BL х ♂ АКР / утримувались у стандартних умовах вива-

рію на повноцінному раціоні. Інфузорії *Tetrahymena pyriformis* штам w вирощувались у термостаті при 28 °С на середовищі наступного складу: пептон - 20; глюкоза - 5,0; дріждйовий екстракт - 1,0; NaCl - 1,0 г; вода dist. до 1,0 л, pH 7,1. Водорості *Chlorella vulgaris* Beijer вирощували на середовищі Успенського у лемніостаті з освітлюванням 2 000 лк.

Для мітки РНК тваринам вводили по 1,1 МБк ¹⁴С-оротової кислоти на 100 г маси тіла. Ядра із клітин печінки виділяли по методу /Globel et al., 1968/ Екстракцію яРНК-часток із ядер проводили по методу /Самарина и др., 1967/. Розділення рибосом на мембранозв'язані і вільні проводили як описано /Арбузов, 1979/. Із хроматину, РНК-часток та рибосом екстрагували РНК /Трудольбова, 1974/, концентрацію визначали на спектрофотометрі /Спирин, 1958/, а радіоактивність на сцинтиляційному лічильнику "Beckman", USA.

При визначенні швидкості обміну раніш існуючих та новоутворених РНК у хроматині РНК мітили подвійною міткою - ³Н-оротовою кислотою /1,1 МБк/100 г маси тіла/ на протязі 12 годин та ¹⁴С-оротовою кислотою /1,1 МБк/100 г маси тіла/ на протязі 40 хвилин, і визначали співвідношення РНК-³Н/РНК-¹⁴С у РНК хроматину.

ДНК мітили ³Н-тимідіном /3 МБк/100 г маси/ на протязі 45 хвилин. Ядра виділяли як описано і після екстракції яРНК-часток і РНК хроматину, ДНК гідролізували 5 % хлорною кислотою при 90 °С протягом 20 хвилин. Концентрацію визначали /Спирин, 1958/ і радіоактивність так, як і РНК.

Мікосоми із клітин печінки виділяли диференціальним центрифугуванням. Ліпіди екстрагували як описано /Грибанов и др., 1975/. Розподіл їх на фракції здійснювали методом тонкошарової хроматографії. При визначенні швидкості синтезу та обміну ліпіди мітили ¹⁴С-оцетокислим натрієм /5,55 МБк/100 г/ протягом 30 та 90 хвилин.

Спектри флуоресценції зондів записували на спектрофлуориметрі MRF-2A "Hitachi", Японія при швидкості розгортки спектру 120 нм/хвилину и та щільні 2 нм.

Активність глюкозо-6-фосфатази визначали як описано /Alvarez, 1977/.

Для визначення швидкості синтезу ДНК, РНК та білка у клітинах інфузорій та водоростей у 150 мл культури вносили по 2,97 МБк ³Н-тимідіна, ³Н-УТФ і ¹⁴С-гідролізата білка і інкубували при 28 °С на протязі години. Синтез нуклеїнових кислот та білків зупиняли охолодженням та додаванням у культури хлорної кислоти до 5 % концентрації. ДНК, РНК та білки виділяли як описано /Кенел,

1970/. Концентрацію та радіоактивність визначали як і у випадку РНК хроматину.

Усі результати оброблялись статистично з використанням параметричних та непараметричних методів аналізу /Урбах, 1964; Гублер, 1978/.

Глава 1. Стійкість та адаптивність до екстремальних факторів середовища лінійних та гібридних організмів

Молекулярно-генетичні аспекти виявлення гетерозису. Структурні основи ефекту гетерозиса, який виявляється у перевазі гібридів над лініями по масі тіла, репродуктивним та адаптивним спроможностям, формується як специфічний результат генетичної різноякісності з'єднуваних батьківських гамет /Шевцов, 1984/. Зрозуміти механізми взаємодії наслідуваних факторів /домінування, зверхдомінування, епістаз та ін./ які лежать в основі багатьох біологічних явищ та гетерозису в тому числі, неможливо без знання механізмів регуляції активності генів і процесу реалізації генетичної інформації /РГІ/ схематично відображених у центральній догмі молекулярної біології: ДНК→РНК→Білок.

Дослідження вмісту і метаболізму нуклеїнових кислот в клітинах лінійних та гібридних організмів /Шерешевская, 1965; Четкин, 1968 и др./ дозволили сформулювати положення про зв'язок гетерозису із збільшенням вмісту РНК і на основі цього була висловлена дерепресорна гіпотеза /Бердышев, 1971/. Подальше глибоке та всебічне вивчення цього питання показало протирічність і неоднозначність одержуваних результатів. Так, здійснені нами дослідження швидкості синтезу РНК у клітинах печінки лінійних та гібридних щурів показали, що гібриди займали проміжне положення серед щурів ліній Вістар і Август. Питома радіоактивність /пит. рад/ попередників мРНК у печінці гібридів була нижче ніж у лінійних форм, а тРНК та низькомолекулярні РНК цитоплазми перевершували батьківські форми.

На проміжне положення гібридів кукурузи у порівнянні з батьківськими формами по синтезу рРНК, мРНК та тРНК вказували /Кондрез и др., 1971/.

Здійснені нами дослідження вмісту і метаболізму нуклеїнових кислот у гібридних тварин з використанням різних методів аналізу в різних тканинах та органідах клітин дозволило прийти до висновку про залежність цих показників від методів виділення нуклеїнових кислот, досліджуваної тканини, методів розділення клітин-

них структур. Крім цих методичних причин в основі знайдених різними авторами відмінностей лежать різноманітні механізми регуляції процесів РГІ та їх специфіка у лінійних та гібридних організмів, і зокрема, вплив на них факторів середовища.

Проявлення ефекту гетерозиса є результат взаємодії генома з різними факторами середовища і ця взаємодія непостійна протягом онтогенезу індивідууму. *Міадакова/1978/* помічає, що домінування – це результат історичного процесу адаптації генома до конкретних факторів середовища і ступінь цього залежить не тільки від самого алелю, але й цілого ряду факторів середовища, які можуть змінити цей ефект. Саме через вплив середовища на функціональні системи метаболізму клітини і може регулюватися генна взаємодія. В цьому відношенні є доцільним дослідження впливу різноманітних факторів середовища на систему РГІ у лінійних та гібридних організмів.

Вплив γ -променів на швидкість синтезу ДНК у кроветворних органах інбредних та гібридних мишей

Відомо, що ступінь променевого ураження та процеси репарації пов'язані з генетичними особливостями організму /*Нуждин и др., 1965/*. Одним із умов процесу відновлення після променевої поразки є репопуляція клітин та репарація пошкоджень ДНК. Так як фізіологічний стан тварин після променевої поразки визначається в найбільшій мірі радіовразливістю кроветворних органів – кісткового мозку, селезінки, тимуса /*Тарахтий, 1968/*, нами досліджен вплив γ -променів ⁶⁰Co на динаміку синтезу ДНК у ліній та гібридів миші. Показано, що гібриди мають найбільшу в порівнянні з лінійними формами вразливість /по ефекту інгібування синтезу ДНК через 19 годин після дії та найбільшою швидкістю відновлення синтезу ДНК у клітинах селезінки, кісткового мозку і тимуса через 360 годин після променевої поразки /рис. 1/.

Виявлені часові відмінності у динаміці питомою радіоактивності ДНК гібридів у порівнянні з лінійними формами дозволяють вказати два прилучення. По-перше, процес інгібування зв'язан з вихідним рівнем синтезу ДНК, по-друге, у гібридів спостерігається більша у порівнянні з лініями варіабельність зміни швидкості синтезу ДНК, тобто найбільше інгібування цього показника у гібридів супроводжується максимальним його посиленням.

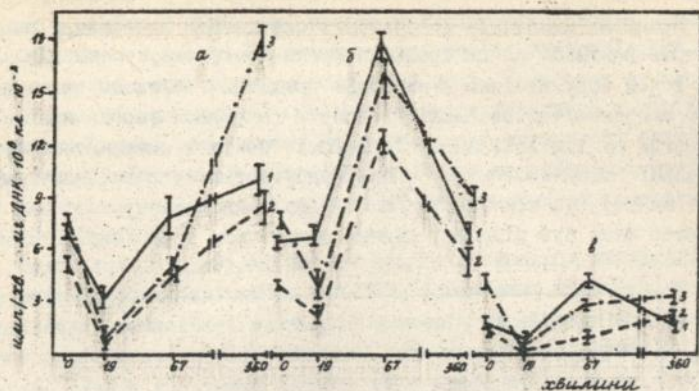
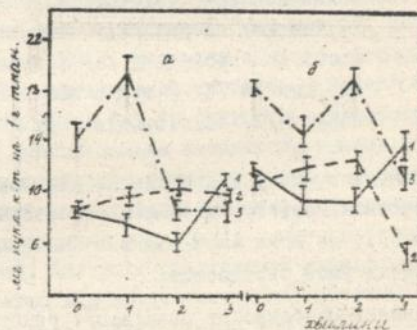


Рис. 1. Динаміка пит. рад. ДНК у клітинах селезінки /а/, кісткового мозку /б/ та тимусу /в/ після -поразки мивей ліній 057Bb /1/, ΔKr /2/ та їхніх гібридів /3/.

Вплив локальної гіпертермії печінки на вміст та синтез нуклеїнових кислот у тканинах лінійних та гібридних щурів

У відповідь на дію локальної гіпертермії печінки у клітинах селезінки і тимуса на протязі 3 годин після дії спостерігаються періодичні зміни вмісту нуклеїнових кислот /рис. 2/.

Рис. 2. Вплив гіпертермії на вміст РНК /а/ та ДНК /б/ у тимусі щурів Вістар /1/, Август /2/ та їхніх гібридів /3/.



Виявлені ритмічні зміни цих показників були різні у лінійних та гібридних організмів. Можна гадати, що часові зміни особливостей формування процесу лімфопоєзу у тварин з різними генотипами лежать в основі різної чутливості лінійних та гібридних тварин до стресових факторів середовища.

У процесах адаптації до факторів середовища найважливу роль відіграє печінка, як центральний орган гомеостазу у ссавців. З цієї точки зору печінка є найбільш придатним об'єктом при вивченні особливостей взаємодії геному з факторами середовища. У відповідь на дію локальної гіпертермії печінки виявляються функціональні зміни системи РГІ, які відбуваються у ритмічному змінненні синтезу та транспорту РНК з ядра в цитоплазму, часовий характер яких був різним у різних генетичних форм /рис. 3/.

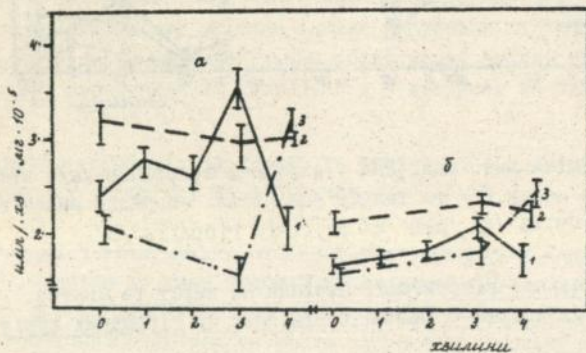


Рис. 3. Зплив локальної гіпертермії печінки /45 °С, 10 хвилин/ на динаміку питомої радіоактивності РНК хроматину /а/ і пула мічних попередників /б/ у щурів ліній Вістар /1/, Август /2/ та гібридів /3/.

Виявлено, що у відповідь на дію локальної гіпертермії встановлюються нові функціональні співвідношення між елементами системи РГІ, що може мати важливе значення при адаптації клітин до мінливих умов середовища.

Часові особливості реалізації генетичної інформації у клітинах печінки лінійних та гібридних щурів після часткової гепатектомії

На підставі одержаних результатів можна виказати припущення про те, що генетична обумовленість стійкості та адаптивності реалізується через часовий контроль метаболічних кільців, які приймають безпосередню участь у адаптації.

Часові процеси в біологічних системах виявляються у формі ритмів. Одним з основних ритмічних процесів в клітині є часова організація клітинного циклу. Часткова гепатектомія, синхронізуюча проходження гепатоцитів через клітинний цикл, приводила до часових відмінностей проходження циклу у гібридів порівняно з лінійними формами. Часові відмінності функціональної активності системи реалізації генетичної інформації лінійних та гібридних щурів після часткової гепатектомії підтверджують генетичний контроль клітинних ритмів.

Отже, якщо структурні основи ефекту гетерозиса закладені у механізмах взаємодії генів, то його проявлення відображається в результаті динамічної взаємодії факторів середовища з системою реалізації генетичної інформації, яка може розглядатися як центральне кільце у системі метаболічної адаптації клітини.

Глава 2. Вплив важких металів на функціональну активність генетичного апарату представників різних таксономічних груп

Вплив іонів важких металів на деякі процеси реалізації генетичної інформації у клітинах водоростей

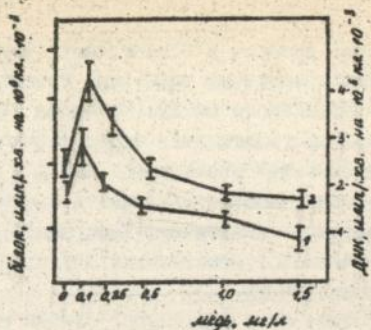
Під генетичною адаптацією, як правило, розуміють структурні зміни, які відбуваються в геномі при дії факторів середовища.

Однак, відомо, що структурні зміни геному у відповідь на дію радіації залежать від його функціональної активності /Тайси, 1990/. Показано, що активно транскрибуючі гени мутують частіш, ніж неактивні /Мільна и др., 1987/. Виходячи з цього, формування генетичної адаптації складається з двох етапів – функціонального та структурного. У відповідь на дію факторів середовища, що змінилися, може змінитися функціональна активність генетичного апарату, яка може бути передпоилкою його структурних змін.

Важкі метали /мідь, цинк, ртуть, кадмій/ роблять істотний вплив на основні показники системи реалізації генетичної інформації у клітинах водоростей. Для усіх досліджених металів був характерен трифазний характер відповіді генетичної системи: фаза стимуляції, скрита фаза та фаза інгібування /рис. 4/.

Виявлені видові відмінності у відповіді системи реалізації генетичної інформації на дію іонів міді у водоростей роду *Diplorella* теод., які відбиваються у змінненні вмісту РНК та білка.

Рис. 4. Вплив іонів міді /0,1 мг/л / на пит. рад. ДНК /1/ та білка /2/ у клітинах *Chlorella vulgaris*

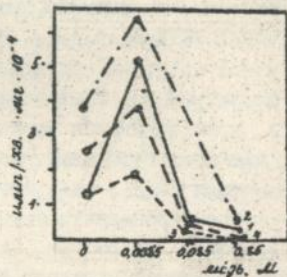


Вплив іонів міді на процеси реалізації генетичної інформації у клітинах інфузорій та ссавців

Іони міді /0,1-1,0 мг/л/ пригнічували інтенсивність реплікації, транскрипції та трансляції у клітинах інфузорій, яка корелювала з численністю клітин в культурі.

Дослідження дії іонів міді в системі виділених ядер печінки щурів дозволило виявити такий же трифазний характер їхньої дії на активність РНК-полімераз, як і для клітин водоростей. Однак, якщо ефект інгібування у клітинах водоростей та інфузорій не перевищував 50-60 % навіть при великих концентраціях міді, то у системі виділених ядер спостерігалось практично повне інгібування активності РНК-полімераз, тобто у системі виділених ядер не проявляються адаптивні реакції, характерні для водоростей та інфузорій /рис. 5/.

Рис. 5. Вплив іонів міді на активність РНК-пол. II в інтактній та регенеруючій печінці /1/, /2/ відповідно і активність РНК-пол. I+III у інтактної /3/ та регенеруючої /4/ печінці щурів.



Генетична система ссавців захищена від дії металів у більшій мірі, ніж у одноклітинних еукаріот. Однак, великі дози іонів міді в організмі щурів /0,625-3,15 мг/100 г/ також впливають на систему РНІ, яке виявляється в установленні нових відносин між синтезом, процесінгом та транспортом РНК. Очевидно, структура одноклітинного організму не забезпечує надійного захисту при іс-

тотних змінних факторів середовища і це порушує функціональні характеристики генома, тобто вони адаптуються за рахунок зміння своєї індивідуальності. Навпаки, у вищих організмів збереження генетичної індивідуальності забезпечується спеціальними захисними механізмами, що відповідає принципу збереження гомеостазу.

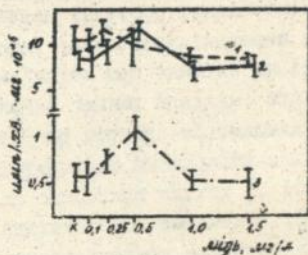
Отже, всі досліджені нами фактори /радіація, локальна гіпертермія, часткова гепатектомія, важкі метали/ впливають на функціональні характеристики системи реалізації генетичної інформації, що є першим етапом у генетичній адаптації.

Фактори, які визначають чутливість генетичної системи до екстремальних факторів середовища

Відповідь біологічної системи визначається не тільки фактором, діючим на систему, але й особливостями метаболізму біологічної системи у момент дії. Дослідження відповіді системи реалізації генетичної інформації на різноманітні фактори дозволило прийти до висновку, що відповідь цієї системи на дію екзогенних факторів визначається функціональним станом системи РГІ у момент дії.

Змінення функціональної активності системи реалізації генетичної інформації інфузорія температурним шоком і наступне внесення в цю культуру іонів міді показало, що мідь у цьому випадку не пригнічувала функціональну активність цієї системи як це було при вирощуванні клітин у стандартних умовах, а навпаки, підсилювала швидкість синтезу РНК та білка при концентрації міді 0,5 мг/л /рис. 6/.

Рис. 6. Вплив іонів міді на питому радіоактивність ДНК /1/, РНК /2/ та білка /3/ у клітинах *T. rugiflagis* після шістьох температурних шоків.



Виявлений ефект може бути пов'язан з тим, що збільшення кількості білків теплового шоку і можливо інших стрес-білків приводить до зв'язування іонів міді і при певній концентрації металу відбувається нова індукція подібних білків, що може відбиватися у посиленні синтезу РНК та білка. Незалежно від механізму цього явища одержані резуль-

тати вказують на те, що відповідь на рівні системи РГІ визначається її станом в момент дії. На користь цього свідчать і дані одержані по сумісній дії інсуліну та міді на систему РГІ у інфузорій.

Інсулін $/26 \cdot 10^{-6} \text{ M}/$ посилює швидкість синтезу нуклеїнових кислот та білка у клітинах інфузорій. Біологічний ефект інсуліну на функціональну активність системи РГІ залежить від стадії культивування інфузорій. Сумісне внесення в культуру міді та інсуліну приводить у випадку трьохдобової культури до прояви дії інсуліну /стимуляція системи РГІ/, а у випадку сьомидобової культури до прояви дії міді /інгібірування системи РГІ/.

Отож, система РГІ відповідаюча на різноманітні екзогенні дії як єдине ціле, є центральним кільцем метаболічної адаптації і дослідження особливостей регуляції її функціонування є необхідним етапом дослідження проблеми адаптації.

Глава 3. Система реалізації генетичної інформації як центральне кільце при метаболічній адаптації

Змінення інтенсивності реплікації у відповідь на клітинний стрес

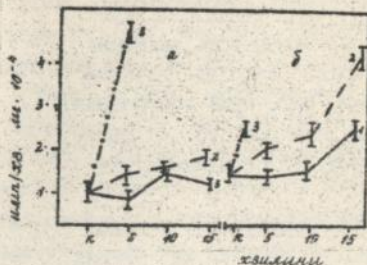
Спроможність клітин підтримувати високу упорядоченість своєї організації /гомеостаз/ залежить від генетичної інформації, котра реалізується, зберігається, відтворюється, а інколи і досконалюється у чотирьох генетичних процесах – реплікації, транскрипції, трансляції та генетичної рекомбінації /Албертс и др., 1986/. Центральний постулат молекулярної біології вказує тільки напрямок передачі генетичної інформації у клітині, але не дає відповіді на питання про механізми регуляції цих процесів між якими існує складний ланцюг регуляторних взаємодій. Мало дослідженими залишаються процеси регуляції системи РГІ у ході адаптації.

Локальне збільшення температури у частині печінки до $41-45^{\circ} \text{C}$ на протязі 10 хвилин приводило до розвитку гепатиту /Божков и др., 1988/. Виявлено, що локальна гіпертермія печінки індукірує систему адаптивних компенсаторних реакцій, порушуючих РГІ, що відбувається на посиленні швидкості синтезу РНК через 3 години після дії, переходу новосинтезованої РНК у склад яРНК-часток, що корелює із збільшенням швидкості транспорту РНК у цитоплазму.

В основі принципів структурної забезпеченості реакцій адаптації та компенсації порушених функцій лежить передусім, збіль-

шення кількості активно функціонуючих робочих одиниць, їхня репарація та гіперплазія /Саркисов, 1977/. Регенерацію печінки встановлювали по інтенсивності синтезу ДНК. Виявлено, що гепатит, який індукований гіпертермією, супроводжується регенерацією частини печінки, причому, чим більше пошкоджена паренхіма печінки, тим більший ефект посилення проліферації спостерігається у не-пошкодженій частині печінки /рис. 7/.

Рис. 7. Зміння пит. рад. ДНК в інтактній зоні печінки /а/ і у зоні печінки, яка була під дією локальної температури /б/, 40-42 /1/, 43-44 /2/ і 47-48 °С /3/.

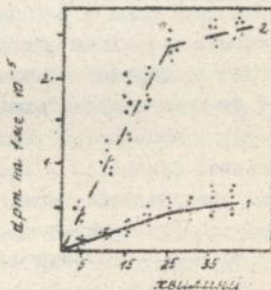


Таким чином, компенсаторні реакції клітини, які виникають у відповідь на стресову дію, складаються із зміння метаболізму РНК та, якщо ці зміння достатньо істотні, вони можуть супроводжуватися посиленням проліферації клітин.

Динаміка синтезу РНК у клітинах регенеруючої печінки щурів

Дослідження динаміки питомої радіоактивності РНК хроматину /РНК_{хр}/ в інтактній та регенеруючій печінці дозволило виявити істотні відмінності цього показника /рис. 8/.

Рис. 8. Динаміка пит. рад. РНК хроматину в інтактній /1/ та регенеруючій /2/ печінці щурів.



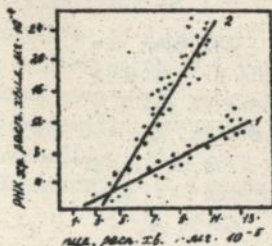
Аналіз причин, які визначають питому радіоактивність РНК хроматину показав, що вона залежить від:

1 - рівня мічення пула попередників РНК; 2 - активності РНК-пол. та 3 - швидкості обміну раніш існуючих РНК /непомічених/ та но-

восинтезованих РНК /мічених/.

Дослідження взаємовідносин між питомою радіоактивністю пула попередників і питомою радіоактивністю РНК_{хр} у інтактної та регенеруючої печінки /13 годин після операції/ показало, що криві регресії істотно відрізняються між собою по тангенсу кута нахилу кривої та по відрізку, який відсікається на осі абсцис /рис. 9/.

Рис. 9. Залежність змінення пит. рад. РНК_{хр} від змінення пит. рад. пула попередників РНК у інтактної /1/ та регенеруючої /2/ печінки щурів



Рівняння регресії у випадку

інтактної печінки має вигляд: $Y = 7,27X + 160,4$, а для регенеруючої - $Y = 2,11X + 316,1$. Одержані результати вказують на більший вплив неврахованих факторів на результативну ознаку у регенеруючої печінки в порівнянні з інтактною.

Визначення динаміки змінення активності РНК-полімераз в ядрах інтактної та регенеруючої печінки показало, що активність РНК-пол. I+II та РНК-пол. II у ядрах регенеруючої печінки збільшена у 2,0-2,7 рази у порівнянні з інтактною печінкою. Ці результати свідчать про те, що через 13 годин після операції синтез рРНК та мРНК збільшується більш ніж у 2 рази, в той час як пит. рад. РНК_{хр} збільшена у 5-7 раз. Ці відмінності можуть бути зв'язані з різною швидкістю обміну РНК. Було виявлено, що швидкість обміну раніш існуючої та новосинтезованої РНК у клітинах регенеруючої печінки щурів відзначалась від такової інтактної. Якщо $\frac{U}{I}$ - відносний "вклад" кожного із трьох факторів з використанням цільової функції: $F = w_1u_1 + w_2u_2 + w_3u_3$ де w_1u_1 - ваговий множник, який визначається характеристикою пула мічених попередників, w_2u_2 - ваговий множник, який визначається активністю РНК-полімераз та w_3u_3 - ваговий множник, який визначається швидкістю обміну РНК, то при умові нормування: $\sum_{i=1}^3 w_i = 1$, отримаємо: $F = /0,4-0,5/ + /0,3-0,4/ + /0,1-0,2/$.

Таким чином, у клітинах, індуктованих до проліферації встановлюються нові відносини між факторами, які впливають на питому радіоактивність РНК хроматину. Можна гадати, що різні стрес-фак-

тори впливають на різні метаболічні кільця, які забезпечують транскрипцію, однак результовуючою ознакою у всіх випадках буде змінення пнт. рад. РНК, тобто система РГІ є центральним кільцем метаболічної адаптації.

Процесінг та транспорт РНК у цитоплазму регенеруючої печінки щурів

У процесі синтезу РНК зв'язується з комплексом білків, форму ядерні РНП-частки /яРНП-частки/. Синтезований транскрипт зазнає серію ковалентних модифікацій. Так, 5-кінець молекули кепірується, а до 3-кінця приєднується від 100 до 200 залишків аденілової кислоти /Humphrey, 1988/, і далі здійснюється процесінг РНК /Sattler, 1987/. Сплайсинг РНК – це не просто особливість визрівання еукаріотичної РНК, а новий рівень регуляції реалізації генетичної інформації у клітинах еукаріот. Аналіз долі яРНП-часток несе в собі інформацію про посттрансляційну регуляцію РГІ. Однак, питання динаміки змінення новосинтезованої РНК у складі яРНП-часток у відповідь на дію стрес-факторів не досліджувалось.

Дослідження динаміки пнт. рад. РНК в яРНП-частках показало, що у ядрах регенеруючої печінки вона нища у порівнянні з інтактною печінкою через 5 та 15 хвилин, а через 45 та 135 хвилин незначно її перебільшує. Співвідношення між пнт. рад. РНК_{хр} та РНК яРНП-часток не змінюються в інтактній печінці протягом 45 хвилин. В клітинах же регенеруючої печінки ці співвідношення змінюються протягом часу і значно перевершують інтактний рівень. Ці результати свідчать про відносну автономність регуляції на рівні синтезу РНК та її посттранскрипційних модифікацій. Низький рівень пнт. рад. РНК яРНП-часток при високій швидкості синтезу РНК у клітинах регенеруючої печінки може бути пов'язан не тільки з високою швидкістю процесінгу РНК, але й з високою швидкістю транспорту з ядра у цитоплазму.

Про швидкість транспорту РНК з ядра у цитоплазму гадали по зміненню пнт. рад. РНК мембранозв'язаних рибосом клітин печінки. Було виявлено, що швидкість транспорту РНК у рибосоми регенеруючої печінки значно перевершує такову інтактної печінки.

Таким чином, співвідношення між показниками процесінга та транспорту РНК достатньо лабільні, що вказує на можливість відносної автономності регуляції цих процесів у відповідь на функціональні змінення клітини, викликані дією стрес-факторів.

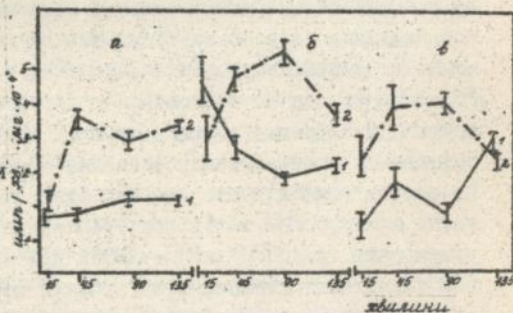
Вплив актиноміцина Д на процеси реалізації генетичної інформації у клітинах регенеруючої печінки щурів

При визначенні долі новосинтезованої РНК здійснювали її мічення протягом 15 хвилин, після чого інтактним та оперованим тваринам вводили сублетальну дозу актиноміцина Д, яка приводить до інгібування синтезу РНК на 94–97 % та визначали динаміку пит. рад. РНК, яка входить до складу хроматину, яРНК-часток та рибосом цитоплазми.

Виявлено, що пит. рад. РНК_{хр} у інтактної та регенеруючої печінки зменшується, однак, це відбувається в більшій мірі у регенеруючої печінки. Визначення пит. рад. РНК яРНК-часток показало, що вона у регенеруючої печінки була в 2,5 рази нижче, ніж у інтактному органі через 15 хвилин після початку експерименту та й надалі цей показник зменшувався з однаковою швидкістю у інтактної та регенеруючої печінки.

Визначення динаміки пит. рад. РНК рибосом показало, що якщо в інтактних клітинах печінки РНК не транспортувалось у цитоплазму і не включалася у склад рибосом, то у клітинах регенеруючої печінки транспорт РНК продовжувався і на фоні інгібування синтезу РНК /рис. 10/.

Рис. 10. Динаміка пит. рад. РНК мембранних рибосом /а/, вільних рибосом /б/ та низькомолекулярної РНК цитоплазми /в/ в інтактній /1/ та регенеруючій /2/ печінці щурів при інгібуванні синтезу актиноміцином Д



Ці результати доводять варіабельність регуляції РГІ на рівні процесінга та транспорту РНК. В клітинах регенеруючої печінки з ядра може транспортуватися очевидно та РНК, яка у нормі не переходить у цитоплазму, і це має важливе значення у механізмах адаптації клітини. Крім того, це підтверджує положення про те, що відповідь на стрес залежить від вихідного рівня стану системи РГІ.

Наявність зв'язку типу попередник продукт між елементами сис-

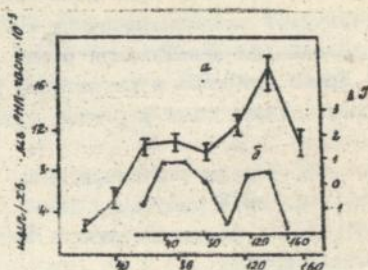
теми РГІ та достатньо велика лабільність у співвідношеннях між транскрипцією, процесінгом і транспортом РНК свідчать про існування автономних кільців регуляції цих елементів, що і пояснює високу чутливість системи РГІ на дію різноманітних факторів середовища.

Глава 4. Часова характеристика системи реалізації генетичної інформації та адаптивність організму

Дослідження адаптивних можливостей організму, які надають специфіку живому, пов'язано з вивченням організації біологічних систем у просторі і на протязі часу. Основою часової організації біосистем є упорядність біологічних процесів протягом часу. До закономірностей часу у живих системах безпосередньо відношення мають періодичні змінення діяльності та поведінки цих систем, названих біологічними ритмами /Романов, 1989/.

Аналіз часової характеристики пит. рад. РНК яРНК-комплексів при рівномірних коротких інтервалах дискретизації дозволив виявити ритмічні змінення цього показника /рис. 11/.

Рис. 11. Часовий характер змінення пит. рад. РНК яРНК-часток, середня крива з 8-ми експериментів /а/ і швидкість змінення / / пит. рад. /б/.



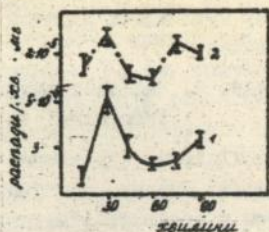
Визначення пит. рад. РНК яРНК-комплексів при 5 хвилинном інтервалі дозволило виявити ритмічні змінення цього показника з періодом 15-25 хвилин. Ритм пит. рад. РНК яРНК-часток регенеруючої печінки дещо відрізнявся від такового інтактною печінки.

Отож, змінення пит. рад. РНК яРНК-часток здійснюється у ритмічному режимі з періодом 15-25 хвилин, які очевидно формують 40-80 хвилинний ритм, тобто функціонування процесінгу РНК здійснюється у навколорідинному ритмі.

Аналіз динаміки синтезу РНК не дозволив виявити виразних ритмічних змінень, характерних для яРНК-часток. Однак, відхилення зміненнь пит. рад. РНКхр від лінійності дозволяє вказати припущення про наявність прихованих ритмів. На користь цього свідчать

дані про динаміку синтезу мРНК та тРНК при інгібуванні синтезу рРНК, які дозволили виявити ритмічність синтезу цих типів РНК з періодом навколо години./рис. 12/.

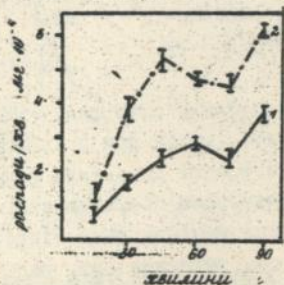
Рис. 12. Часова характеристика пит. рад. новосинтезованих мРНК та тРНК у складі хроматина інтактної /1/ та регенеруючої /2/ печінки щурів при інгібуванні синтезу рРНК.



Згладжування навкологодинного ритму синтезу РНК може бути обумовлено накладком часових характеристик ендогенних факторів, впливаючих на процес синтезу РНК і передусім таких як рівень міченого пула, активність РНК-полімераз та швидкість обміну РНК. Проведені нами дослідження часових характеристик цих факторів показали наявність ритмічних змінень цих процесів та виявили, що ритмічні змінєння пула попередників РНК та швидкості обміну раніш існуючих і новосинтезованих РНК знаходяться у протифазі, що й приводить до згладжування ритму результативної ознаки /синтезу РНК/.

Транспорт мРНК в цитоплазму при інгібуванні синтезу рРНК також здійснюється у режимі навкологодинного ритму /рис. 13/.

Рис. 13. Часова характеристика пит. рад. мРНК рибосом у інтактної /1/ та регенеруючої /2/ печінки щурів.



Таким чином, синтез, процесінг та транспорт РНК з ядра в цитоплазмі здійснюється в навкологодинному ритмі. Проведені нами дослідження функціонування системи РГІ у відповідь на дію різноманітних стрес-факторів є ще одним доказом функціонування системи РГІ у ритмічному режимі. Виявлена відмінність часових процесів на ці дії у лінійних та гібридних організмів свідчить про важливу роль організації часових процесів функціонування системи РГІ для стійкості та адаптивності організмів до факторів середовища.

Глава 5. Мембранний механізм регуляції реалізації генетичної інформації у процесі адаптації клітин до екстремальних факторів середовища

Синтез та обмін ліпідів мембран ендоплазматичного ретикулуму клітин печінки при регенерації та локальній гіпертермії

Спроможність клітин чи організму до адаптації можлива завдяки їхньої спроможності перероблять інформацію, яка поступає зовні. Процес переробки інформації у клітині може бути розподілен на три стадії: 1 - одержання інформації рецепторами /у широкому сенсі/; 2 - передача інформації у центр переробки; 3 - передавання обробленої інформації до устроїв, які формують відповідь - ефекторам /Кагава, 1985/. Як було нами показано, центром переробки є система РГІ.

Існування багаторівневої регуляції процесу РГІ може здійснюватися завдяки розвитку клітинних мембран. Якщо припустити, що координатія елементів РГІ та їх регуляція в процесі адаптації забезпечується внутріклітинними мембранами і передусім мембраною ендоплазматичного ретикулуму, то можна виказати уявлення про мембрано-генетичний механізм адаптації. Суть якого міститься у тому, що система РГІ є центром переробки екзогенної інформації, а клітинна мембрана - приймачем, передавачем та ефектором цієї інформації. Якщо це так, то можна чекати, що: 1 - як приймач інформації ендоплазматичний ретикулум /ЕПР/ буде змінювати свій структурно-функціональний стан у відповідь на змінення екзогенних факторів; 2 - змінення структурно-функціональних якостей мембран ЕПР буде супроводжуватися зміненням функціональної активності системи РГІ; 3 - в процесі адаптації клітин буде здійснюватися змінення у біогенезі мембран, що і лежить в основі стійкості клітин у нових умовах.

Визначення кількості ліпідів у мікросомах регенеруючої печінки щурів показало, що через 13 годин після операції їхня кількість збільшується у порівнянні з інтактним органом, за рахунок збільшення нейтральних ліпідів /НЖЛ на 39 %, а триацилгліцериди - 28 %/. Виявлено, що збільшення вмісту ліпідів у мікросомах обумовлено зміненнями у співвідношенні швидкості синтезу та їх обміну з іншими структурами клітини. Швидкість обміну новосинтезованих ліпідів в мікросомах регенеруючої печінки з цитозолем була значно вище контрольного рівня. Проведений аналіз синтезу та обміну окремих фракцій ліпідів у клітинах печінки показав,

що швидкість обміну ліпідів впливає на швидкість синтезу і як результат цього на вміст ліпідів в мікросомах. Однак, ці взаємозв'язані процеси мають і автономні кільця регуляції, які регулюються незалежними факторами, що може бути в основі ліпідної саморегуляції структури мембран ЕПР.

Вміст ліпідів в мікросомах через 96 годин після локальної гіпертермії печінки /45 °С, 10 хвилин/, збільшувався у порівнянні з інтактною печінкою, але в меншій мірі, ніж при регенерації. Однак, це було обумовлено змінням у вмісті фосфоліпідів, а не нейтральних ліпідів як у випадку регенерації. При гіпертермії посилюється швидкість синтезу НАК, які включаються до складу новосинтезованих фракцій ліпідів, а "старі молекули" ліпідів залишають мембрану та накоплюються в цитозолі, тобто у випадку гіпертермії здійснюється заміна ліпідів у складі мембран на ліпідів із змінним жирнокислотним складом.

Структурно-функціональні змінення мембран ЕПР при регенерації печінки, локальній гіпертермії та дії амніоцена
Відомо, що змінення вмісту та складу ліпідів мікросом повинно супроводжуватися структурно-функціональними зміненнями мембран. Визначення деяких характеристик, які відображують структурно-функціональні властивості мембран, показало, що ступінь ексимеризації пірена у мікросомах регенеруючої печінки /13 годин після операції/ зменшується у порівнянні з контролем, що вказує на змінення мікрів'язкості мембран у місці локалізації зонда. Інтенсивність флуоресценції 1,8-АНС у мембранах регенеруючої печінки зменшується. Виявлені структурні змінення супроводжувалися зниженням активності глюкозо-6-фосфатази, що відтворює функціональні змінення цих мембран.

Локальна гіпертермія печінки приводила ще к більшому зменшуванню ступеню ексимеризації пірену, ніж у випадку регенерації, що супроводжувалось і більшим зниженням активності глюкозо-6-фосфатази.

Введення експериментальним тваринам препарату амніоцен також приводило до зниження ступеню ексимеризації пірену та зниженню активності глюкозо-6-фосфатази.

Таким чином, усі досліджені дії, які приводять до змінення метаболізму ліпідів, в тій чи іншій мірі приводят до структурно-функціональних зміненнь мембран ЕПР.

Вплив іонів міді та магнію на структурно-функціональні характеристики клітинних мембран

Як було показано, ряд важких металів породжує функціональні змінення системи РГІ, які можуть бути обумовлені їхньою дією на структуру мембран. Виявлено, що внесення іонів міді в систему мікросом супроводжується істотним збільшенням ступеню агрегації мембранних везикул, зміненням активності маркерного ферменту — глюкозо-6-фосфатази, що супроводжувалося індукцією перекисного окислення ліпідів мембран. Про дію іонів міді на структурно-функціональні характеристики мембран свідчать і дані про їхній вплив на інтенсивність екскреції білків у культуральне середовище клітин водоростей.

Виявлено, що іони магнію впливають на біогенез мембран ЕПР, що може бути свідченням опосередованої дії іонів магнію на нуклеїновий обмін.

Передача інформації про стан середовища на геном може здійснюватися кількома способами: 1 — структурні змінення ЕПР на основі кооперативності передаються на інші типи мембран і зокрема ядерну мембрану, що безпосередньо впливає на систему РГІ; 2 — структурні змінення ЕПР зв'язані із зміненням синтезу "сигнальних" молекул; 3 — структурні змінення мембран впливають на їхню проникливість. Виходячи з цього, можна чекати, по-перше, змінення у мембрані ЕПР, індуктовані різноманітними екзогенними діями, будуть супроводжуватися зміненням характеристик білоксинтезуючого апарату та, по-друге, ці змінення мають бути пов'язаними із зміненням у синтезі та транспорті РНК у цитоплазму.

Характеристика білоксинтезуючого апарату регенеруючої печінки щурів

Визначення кількості новоутворених рибосом показало, що при регенерації кількість зв'язаних з мембраною рибосом більше у порівнянні з інтактною печінкою /рис. 14/. Розділення новоутворених рибосом на вільні, неміцно зв'язані та міцно зв'язані із мембраною дозволило виявити, що через 13 годин після операції, зменшується кількість вільних та збільшується кількість неміцно і міцно зв'язаних рибосом /рис. 14/.

Питома радіоактивність білків, синтезованих на зв'язаних з мембраною рибосомах, у клітинах регенеруючої печінки перебільшувала інтактну у 4, 3, 2 та 1,4 раза через 5, 15, 45 та 135 хви-

лин після початку мічення білків, а у фракції вільних рибосом у 1,6, 1,6 1,5 та 8,5 раза /рис. 1b/.

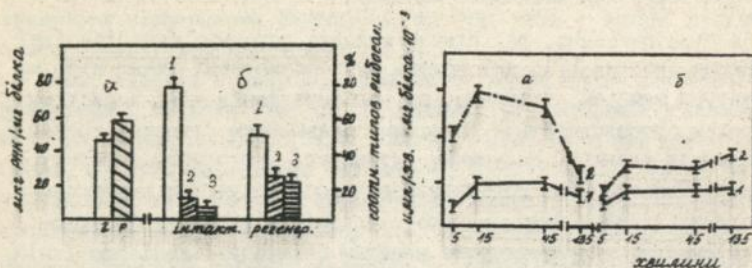


Рис. 14. Кількість РНК рибосом на мг білка мікросом /а/ в інтактній /1/ та регенеруючої /Р/ печінки та співвідношення між різними фракціями новоутворених рибосом /б/; вільних рибосом /1/, неміцно зв'язаних з мембраною /2/ та міцно зв'язаних з мембраною рибосом /3/.

Рис. 15. Динаміка пит. рад. білків, які синтезовані на зв'язаних з мембраною /а/ та вільних /б/ рибосомах в інтактній /1/ та регенеруючій печінці /2/.

Можна гадати, що саме структурно-функціональні змінення мембран ЕПР у регенеруючій печінки і приводять до посилення швидкості транспорту РНК з ядра у цитоплазму на фоні інгібування синтезу РНК актиноміцином Д. Очевидно, РНК, яка транспортується в цитоплазму, бере участь у синтезі білків, пов'язаних із стійкістю клітин до екстремальних умов середовища. Було виявлено, що при інгібуванні синтезу РНК у клітинах регенеруючої печінки спостерігається посилений транспорт новосинтезованих білків у ядерні структури клітини. Ці змінення супроводжуються зміненням структурно-функціональних характеристик ЕПР.

Взаємозв'язок активності білоксинтезуючого апарата клітин печінки з транспортом та синтезом РНК у ядрі

Якщо виходити із багаторівневої регуляції РГІ у клітинах еукаріот і того, що вони взаємозв'язані, то інгібування синтезу білка буде відбиватися на кількості РНК в цитоплазмі, а змень-

шення швидкості транспорту РНК з ядра у цитоплазму може приводити до "блокування" транскрипції і як слідство, інгібуванню синтезу РНК. Виходячи з цього, можна гадати, що змінення швидкості транспорту РНК з ядра у цитоплазму, може регулюватися активністю білоксинтезуючої системи, модулятором якої є структурний стан мембран ЕПР. Дослідження таких складних функціональних систем пов'язано з великими труднощами, тому ми використали інгібітор синтезу білка - циклогексїмїд /5 мг/100 г маси тіла/. Було виявлено, що інгібування синтезу білка у клітинах регенеруючої печінки приводило до "згладжування" чи до значного зменшування відмінностей у швидкості транспорту РНК із ядра в цитоплазму у порівнянні з вихідним рівнем. Ці результати, хоч і не прямо, але підтверджують положення про те, що активність білоксинтезуючого апарату клітин регенеруючої печінки визначає інтенсивність транспорту РНК у цитоплазму.

Визначення пит. рад. РНК яРНК-часток, мічених протягом 15 хв, на фоні дії ЦГІ показало, що пит. рад. їх збільшувалась в інтактній печінці, що свідчить про накоплення РНК у ядрі. Швидкість синтезу РНК в цих умовах у клітинах інтактної печінки збільшувалась через 45 хвилин у порівнянні з 15 хв та надалі не змінювалась. У клітинах же регенеруючої печінки пит. рад. РНК яРНК-часток збільшувалась у меншій мірі в порівнянні з інтактною печінкою, що може бути пов'язано з більшою швидкістю транспорту РНК в них. Швидкість синтезу РНК в цих умовах не змінювалась у регенеруючої печінки.

Таким чином, ЦГІ пригнічує синтез білка, приводив до значного сповільнювання швидкості транспорту РНК у цитоплазму, накопленню РНК у складі яРНК-часток та пригніченню швидкості синтезу РНК. Виходячи з цього, можна гадати, що структурні змінення мембран ЕПР, породжувані різноманітними причинами, змінюють активність білоксинтезуючого апарату будуть приводити до зміненні усієї системи РГІ і як наслідок, до формування нових мембран. Отже, внутріклітинна мембрана - ЕПР сприймає інформацію про стан зовнішнього середовища /змінюючи свій структурно-функціональний стан/, передає цю інформацію до центру переробки - РГІ. В цих умовах здійснюваний біогенез мембран приводить до формування мембран із зміненим складом, тобто мембрана є ефектором - устроєм, який формує відповідь. У випадку повторної дії цих факторів не буде траплятися істотних змінень у структурі мембран, що і є одним з

молекулярних механізмів адаптації.

Глава 6. Генотип організму та структурно-функціональна організація мембран клітин печінки

Як уже відзначалось, відповідь організму чи клітини на стресову дію визначається станом метаболічних систем, формуючих цю відповідь, у момент дії. Мембрана, яка є приймачем та передавачем інформації про стан зовнішнього середовища грає важливу роль у стійкості та адаптивності клітини. Ендогенні фактори, які впливають на структурно-функціональний стан мембран, будуть впливати і на адаптивність організму. Дослідження впливу генотипу на структуру мембран, з одного боку, дозволить одержати додаткову інформацію у відношенні мембрано-генетичної гіпотези, а з іншого боку, пояснити відмінності у адаптивності у тварин з різними генотипами.

Проведені нами дослідження показали, що лінійні та гібридні тварини відрізняються між собою по вмісту і швидкості обміну ліпідних компонентів мікросом печінки. Зокрема, мікросоми гібридних щурів мали найменший вміст фосфатиділхоліна та фосфатиділетанолаїна, а також НЖК у порівнянні з лінійними формами. Швидкість обміну ліпідів у них також була менш ніж у щурів ліній Вістар та Август.

У лінійних тварин вміст ліпідів в мікросомах був однаковим, але швидкість обміну їх у лінії Август була вищою у порівнянні з лінією Вістар. Відсутність прямої кореляції між активністю глікозо-6-фосфатази та вмістом ліпідів у мембранах печінки щурів різних генотипов може бути пов'язано з тим, що на цей показник впливає і швидкість обміну ліпідів. Вміст і швидкість обміну фракцій ліпідів формують генетично обумовлений "ліпідний малюнок" мембран, визначаючий функціональну активність цих мембран і зокрема активність ферментів, і впливаючий на адаптивність організму.

На користь цього свідчать дані по впливу препарату амніоцен на ліпідний обмін мікросом у щурів ліній Вістар та Август. Введення щурам цього препарату приводило до помітних генетичних змінювань вмісту НЖК та окремих фракцій фосфоліпідів, а також їхньої питомої радіоактивності. Виявлені генетичні відмінності у відповідь на дію препарату обумовлені використанням у щурів ліній Вістар і Август різних метаболічних шляхів формування ліпідного складу

мікросом.

Найвні результати показують, що структура мембрани як ефektor екзогенної інформації формується в результаті взаємодії системи реалізації генетичної інформації з факторами середовища.

ВИСНОВКИ

1. У відповідь на дію різних факторів середовища /радіації, локальної гіпертермії печінки, важких металів та деяких ксенобіотиків/ система реалізації генетичної інформації функціонує у ритмічному режимі, на часовий характер якого впливають не тільки зовнішні фактори, але й генотип організму.

2. В інтактних клітинах печінки система реалізації генетичної інформації функціонує в режимі навколорічного ритму. Функціональні змінення активності органа, зокрема часткова гепатектомія, приводять до модифікації часової організації цих ендогенних ритмів.

3. Відповідна реакція системи реалізації генетичної інформації на екзогенні дії визначається структурно-часовим та функціональним станом самої системи реалізації генетичної інформації у момент дії.

4. Система реалізації генетичної інформації, яка включає такі елементи як транскрипція, процесінг, транспорт РНК та трансляція, реагує на різноманітні екзогенні дії як єдине ціле і може розглядатися як центральне кільце переробки екзогенної інформації у клітині.

5. У відповідь на дію екзогенних факторів середовища /локальна гіпертермія, часткова гепатектомія, важкі метали, ксенобіотиків/ змінюються структурно-функціональні властивості мембран ендоплазматичного ретикулуму клітин печінки.

6. Змінення структурно-функціональних характеристик мембран ендоплазматичного ретикулуму у відповідь на дію екзогенних факторів узгоджені із зміненням функціональної активності системи реалізації генетичної інформації.

7. Важкі метали впливають на функціональну активність системи реалізації генетичної інформації, яка має трифазний характер: фазу стимуляції, скриту фазу та фазу інгібування. Дія металів на систему реалізації генетичної інформації може бути опосередкованим через їхню дію на мембранну систему клітини.

8. Лізосомальні мембрани та мембрани ендоплазматичного рети-

кулуму у щурів з різними генотипами відрізняються між собою по структурно-функціональним характеристикам.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Божков А.И., Шерешевская Ц.М., Мартынюк Н.М., Щукин А.Р. Реализация генетической информации при гетерозисе // Тез. докл. IV съезда генетиков и селекционеров Украины. - Киев: Наукова думка, 1981. - Ч. I. - С. 84-86.
2. Шерешевская Ц.М., Божков А.И., Ходорова Н.В., Яковлева А.Н. Активность некоторых ферментов и содержание АТФ в ядрышко-хроматиново-мембранном комплексе при гетерозисе // Тез. докл. IV съезда генетиков и селекционеров Украины. - Киев: Наукова думка, 1981. - Ч. I. - С. 138-139.
3. Шерешевская Ц.М., Божков А.И., Мартынюк Н.М. Редупликация, транскрипция и транспорт РНК и негистоновых белков в органоидах клеток при гетерозисе // Тез. докл. IV съезда Всесоюз. об-ва генетиков и селекционеров. - Казань, 1982. - Ч. 4. - С. 290.
4. Шерешевская Ц.М., Божков А.И. Редупликация, транскрипция и транспорт РНК в клетках печени животных разного возраста и генотипа. - // Тез. докл. IV Всесоюз. съезда геронтологов и гериатров. - Киев. - 1982. - С. 432.
5. Boshkov A.I., Shereshevskaya Ts.M. Synthesis of nucleic acids in the fraction of chromatin of the normal and regenerating liver of animals of different ages and genotype // Rejuvenation. - 1982-1983. - Vol. 10-11. - NN 4-1. - P. 22-23.
6. Шерешевская Ц.М., Божков А.И. Функциональная активность ядерного аппарата клеток печени и ее регуляция при гетерозисе // Ядерные белки и экспрессия генома: Тез. докл. республ. симпоз. - Киев. - 1983. - С. 146-147.
7. Шерешевская Ц.М., Божков А.И. Молекулярно-генетические особенности эффекта гетерозиса // Биохимия животных и человека: Респ. межвед. сб. научных трудов. - Киев. - 1984. - Вып. 8. - С. 30-39.
8. Шерешевская Ц.М., Божков А.И. Активность генома и его регуляция в интактных и регенерирующих клетках печени // Тез. докл. У съезда генетиков и селекционеров Украины. - Киев. - 1986. - С. 95-96.

9. Шахбазов В.Г., Григорьева Н.Н., Божков А.И. Об изменении некоторых цитологических и биохимических показателей в мезистеме корней бобов под действием постоянного электрического тока // Вестник Харьк. ун-та. - Харьков: Вища школа, 1986. - № 288. - С. 37-38.
10. Шерешевская Ц.М., Божков А.И. Онтогенетические особенности нуклеинового обмена у животных разного генотипа // Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. - Харьков. - 1987. - С. 210-211.
11. Божков А.И., Шерешевская Ц.М., Скляр А.И., Шахбазов В.Г. Кинетика транспорта РНК из ядер в цитоплазму в клетках с разной функциональной активностью // Структура и функция клеточного ядра: Тез. докл. IX Всесоюз. симпозиума. - Черноголовка. - 1987. - С. 257.
12. Шерешевская Ц.М., Божков А.И., Ходорова Н.В. Генетические и возрастные особенности транспорта вновь синтезированной РНК в полисомы клеток печени // Тез. докл. У Всесоюз. об-ва генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова. - М. - 1987. - Т. I. - С. 307.
13. Шерешевская Ц.М., Шахбазов В.Г., Божков А.И. Влияние гамма-лучей на скорость синтеза ДНК в кроветворных органах инбредных и гибридных мышей // Вестник Харьк. ун-та. - Харьков. - 1988. - № 313. - С. 43-46.
14. Шерешевская Ц.М., Божков А.И., Ходорова Н.В. Молекулярные механизмы старения организмов с разными генотипами // Тез. докл. У Всесоюз. съезда геронтологов и гериатров. - Тбилиси. - Киев. - 1988. - Ч. I. - С. 731.
15. Загоруйко Г.Е., Божков А.И. Сравнительный анализ кинетики старения и постнатального развития кардиомиоцитов крыс линии Вистар и Август // Тез. докл. У Всесоюз. съезда геронтологов и гериатров, Тбилиси 1988. - Киев. - 1988. - Ч. I. - С. 239-240.
16. Длубовская Б.Л., Божков А.И., Асадова М.К. Внутриклеточный транспорт липидов в регенерирующей печени крыс / Харьк. ун-т. - Деп. в ВИНТИ II.09.89, № 5759-В89.
17. Длубовская Б.Л., Божков А.И. Динамика удельной радиоактивности липидов субклеточных фракций клеток регенерирующей печени крыс / Харьк. ун-т. - 9 с. - Деп. в ВИНТИ 15.II.89, № 6904-В89.

18. Усенко Е.В., Божков А.И. факторы, влияющие на чувствительность *Tetrahymena pyriformis* к ионам меди // Тез. докл. Всесоюзн. конференции: Методология экологического нормирования, Харьков, 16-20 апр. 1990г.-Харьков.-1990.-С. 153-154.
19. Божков А.И., Длубовская В.Л., Шерешевская Ц.М., Мензянова Н.Г. Генетические различия в активности микросом у крыс // Цитология и генетика.-1990.-Т. 24.-I 2.-С. 5-10.
20. Божков А.И., Гопкалов В.Г., Скляр А.И., Шерешевская Ц.М., Асадова М.К. Влияние препарата амниоцена на метаболизм нуклеиновых кислот в клетках печени крыс // Вопр. мед. химии.-1990.-Т. 36.-№ 2.-С. 39-41.
21. Божков А.И., Длубовская В.Л., Никитин В.Н. Соотношение синтеза и обмена липидов микросом как фактор, изменяющий структурное состояние мембран // Докл. АН СССР.-1990.-Т. 315.-№ 5.-С. I 260-I 263.
22. Божков А.И., Скляр А.И., Шерешевская Ц.М. Ритмические изменения удельной радиоактивности РНК РНП-частиц ядер интактной и регенерирующей печени // Структура и функция клеточного ядра: Тез. докл. X Всесоюзн. симпоз., 10-14 октября 1990 г.-Гродно.-1990.-С. 77.
23. Калиман П.А., Усенко Е.В., Божков А.И., Абу-Бакари А. Возможный механизм действия ионов меди на процессы реализации генетической информации в клетках эукариот // Там же.-С. 94.
24. Божков А.И., Абу-Бакари А., Калиман П.А. Динамика транспорта РНК в цитоплазму интактной и регенерирующей печени крыс на фоне действия сублетальных доз актиномицина Д // Там же.-С. 156.
25. Bozhkov A.I., Dogadina T.V., Lyashenko T.E., Usenko E.V. Effect of copper ions on the content of nucleic acids and proteins in green algae //Альгология.-1991.-Т. I.-№ I.-С. 76-82.
26. Усенко Е.В., Божков А.И. Влияние тяжелых металлов на динамику роста и функциональную активность генетического аппарата *Chlorella vulgaris* Биологические науки.-1991.-№ 3.-С. 69-76.
27. Ляшенко Т.Е., Божков А.И., Дсгадина Т.В. Влияние ионов меди на содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках водорослей рода *Dunaliella* Teod.// Биологические науки.-1991.-№ 7.-С. 103-108.
28. Божков А.И., Длубовская В.Л., Шерешевская Ц.М. Изменения в микросомах печени крыс, индуцируемые препаратом амниоцен

/Ред. журн. "Вопр. мед. химии".-М., 1991.-Т. 37.-№ 2.-С. 94.-Деп. в ВИНТИ 07.06.90, № 3156-В.

29. Божков А.И., Усенко Е.В. Проявление генотоксичности металлов в клетках водорослей и инфузорий // Тез. докл. Второй всесоюзн. конф. по рыбохозяйственной токсикол., посвящ. 100-летию проблеме качества воды в России, нояб. 1991 г. - Санкт-Петербург.-1991.-Т. I.-С. 54-55.
30. Догадина Т.В., Божков А.И. Использование функциональных тестов в биоиндикации // Там же.-С. 159-160.
31. Божков А.И., Абу-Бакари А., Богданов Ю.Д., Калиман П.А. Динамика синтеза и транспорта РНК в интактной и регенерирующей печени на фоне действия сублетальных доз актиномицина Д // Укр. биохим. журн.-1991.-Т. 63.-№ 5.-С. 33-39.
32. Божков А.И., Длубовская В.Л. Влияние гипертермии и частичной гепатэктомии печени на структурно-функциональные характеристики мембран эндоплазматической сети /Ред. журн. "Бюлл. эксперим. биол. и мед."-М., 1991.-№ 7.-С. III.-Деп. в ВИНТИ 23.10.90, № 5451-В.
33. Божков А.И., Шерешевская Ц.М., Скляр А.И. Динамика синтеза различных типов РНК в клетках печени линейных и гибридных крыс на фоне гипертермии // Природа, проявление и прогнозирование гетерозиса: Сб. науч. тр.-Киев: Наукова думка, 1992.-С. 62-67.
34. Усенко Е.В., Божков А.И., Калиман П.А. Влияние меди и инсулина на синтез нуклеиновых кислот и белка в клетках *Tetrahymena pyriformis*, находящихся в различных функциональных состояниях // Биологич. науки.-1991.-№ 12.-С. 34-42.
35. Божков А.И., Длубовская В.Л. Липидный обмен и структурно-функциональные особенности мембран эндоплазматического ретикулаума регенерирующей печени крыс //Биохимия.-1992.-Т. 57.-Вып. I.-С. 8-15.
36. Шерешевская Ц.М., Ходорова Н.В., Божков А.И. Действие локальной гипертермии печени на содержание РНК в иммунокомпетентных клетках линейных и гибридных крыс // Тез. докл. VII съезда Укр. об-ва генетиков и селекционеров, Полтава-1992.-Киев.-1992.-Т. I.-С. 40-41.
37. Божков А.И., Длубовская В.Л., Асадова М.К., Скляр А.И., Шерешевская Ц.М. Генетические особенности липидного обмена и адаптация к гипертермии при гетерозисе // Там же.-С. 150-151.

38. Божков А.И., Ляшенко Т.Е., Догадина Т.В. Влияние ионов меди на интенсивность выделения белков и фенолов в среду двумя видами водорослей рода *Dunaliella* Teod. // Биологические науки. -1992. -# 1. -С. 126-132.
39. А. с. 1411804 СССР, МКИ⁴ G 09 В 23/28. Способ моделирования гепатита /Божков А.И., Шахбазов В.Г., Гопкалов В.Г., Скляр А.И., Шерешевская Ц.М., Длубовская В.Л., Асадова М.К., Набоков А.Л. (СССР). -Опубл. - 1988. -Бул. # 27.
40. А. с. 1749835 СССР, МКИ⁵ G 01 N 39/68. Способ оценки мембранотропности ксенобиотиков /Божков А.И., Длубовская В.Л. (СССР). -Опубл. -1992. -Бул. # 27.
41. А. с. 1755194 СССР, МКИ⁵ G 01 N 33/48. Способ определения генотоксичности водорастворимых веществ /Усенко Е.В., Божков А.И., Калиман П.А. (СССР). -Опубл. -1992. -Бул. # 30.

А.Божков

Підписано до друку 28.12.92 р. формат 60x84
I/16, папір для розмножувальних апаратів,
друк офсетний, ротаринт, ВД ХОУС, зам. 2283,
тир. 30 прим. ЗІ0002, м. Ларків, вул. Марша-
ла Бажанова, № 28.

AB 26.435

AB 26.435