

9. Базанова Н. У., Ташенов К. Т., Файтельберг Р. О. Закономерности всасывательной деятельности желудочно-кишечного тракта. — Алма-Ата: Наука, 1985. — 223 с.

10. Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. — Л.: Наука, 1972. — 358 с.

11. Влияние растительных экстрактов на транспорт глицина акку-

мулирующими препаратами слизистой тонкой кишки крыс / О. В. Сторчило, В. К. Напханюк, Е. А. Багирова, А. Г. Васильева // Вісник мор. медицини. — 2004. — № 2. — С. 68-72.

УДК 616.411:612.014.482

В. М. Цвіговський

ВПЛИВ ТРИВАЛОГО γ -ОПРОМІНЕННЯ В СУМАРНІЙ ДОЗІ 1,0 ГР НА АЦЕТИЛЮВАННЯ БІЛКІВ ХРОМАТИНУ КЛІТИН СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ

Одеський державний медичний університет

Вступ

В основі оцінки генетичного ризику опромінення в малих дозах лежать результати патофізіологічних експериментів. Проте через достатньо високий ризик виникнення генетичних пошкоджень є проблематичним отримання коректної їх оцінки [1]. Згідно з існуючими уявленнями, теоретичне підґрунтя оцінки генетичного ризику [2] повинно базуватися на концепції біологічної дії іонізуючого випромінювання, що дозволяє з єдиних позицій описати існуючу емпіричну інформацію про генетичні наслідки опромінення в усьому діапазоні доз.

Сьогодні найбільшого поширення набула лінійна безпорогова концепція, що постулює безумовну загрозу будь-яких рівнів опромінення, у тому числі і таких, що не перевершують природний радіаційний фон [3]. Згідно з цією концепцією, іонізуюча радіація в низьких дозах індукує первинні пошкодження молекул ДНК і геномних структур клітини. Незважаючи на численні дослідження в цьому напрямку, ціла

низка питань залишається нез'ясованою. Зокрема, в доступній літературі майже відсутні дані стосовно дослідження впливу іонізуючої радіації в низьких дозах на активність реакцій посттрансляційної модифікації білків хроматину в органах імуногенезу, які, як відомо, відіграють важливу роль в експресії початкових етапів геному [4].

Мета дослідження — з'ясувати особливості впливу загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр на активність реакцій ацетилювання білків хроматину ядер клітин селезінки.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проведені на 36 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г, які утримувалися в стандартних умовах віварію Одеського державного медичного університету. У відповідності до мети дослідження усіх тварин було розподілено на дві групи: 1) інтактні тварини (контроль); 2) тварини після тривалого впливу загального γ -опромінення в

сумарній дозі 1,0 Гр. Опромінення експериментальних тварин проводили у спеціально виготовлених клітках-фіксаторах на гамма-терапевтичній установці АГАТ-Р № 83 за таких технічних умов: потужність дози 1,07 Гр/хв, розмір поля 20×20 см, відстань джерело — поле 75 см, одноразова доза 0,1 Гр, час експозиції 5,6 с, кількість повторів — 10, сумарна доза 1,0 Гр. До експерименту тварин брали через 24, 48, 72, 99 і 120 год після завершення дії іонізуючого фактора.

Експериментальних тварин забивали під ефірним наркозом. Як об'єкт дослідження було обрано селезінку щурів, з клітин якої виділяли ядра за методом Ф. О. Рого і співавторів [5]. За методом С. С. Теня і співавторів з ядер клітин селезінки вилучали хроматин [6]. Шляхом обробки очищеного хроматину 0,35 М NaCl рН 7,5 отримували лабільно зв'язані з ДНК негістонові білки [7]. Гістони екстрагували 0,25 N H₂SO₄, осаджували ацетоном, після чого промивали етанолом і ліофілізували. Індивідуальні гістони от-



римували фракціонуванням сумарних гістонів шляхом гел'єфільтрації на біогелі Р-60 і сефадексі G-100 [8]. Фракцію міцно зв'язаних з ДНК негістонових білків отримували (після екстракції гістонів) шляхом обробки хроматину 0,5 N HClO₄ при 100 °С протягом 20 хв. Для дослідження активності реакцій ацетилювання експериментальним тваринам внутрішньочеревинно (із розрахунку на 100 г маси) вводили 6,0 МБк ¹⁴СН₃СООНа за 1,5 год до декапітації. Підрахунок радіоактивності проводили методом V. J. Aloyo [9]. Отримані результати опрацьовані методом варіаційної статистики.

Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що через 24 год після тривалого загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр активність ацетилювання сумарних гістонів ядер клітин селезінки переважала рівень у інтактних тварин на 20,3 % (таблиця). Водночас також посилювалась і активність процесів ацетилювання міцно зв'язаних з ДНК негістонових білків хроматину ядер клітин селезінки, переважаючи при цьому рівень одновікового контролю на 21,3 %. Що стосується активності реакцій ацетилювання індивідуальних гістонів, то на да-

ному етапі дослідження вона була нижчою за рівень контролю: у Н1 — на 43,2 %, Н2А — на 35,3 %, Н2В — на 26,8 %, Н3 — на 24,4 %, Н4 — на 29,8 %.

Паралельно з означеними змінами на цей час спостерігалось і зниження активності ацетилювання лабільно зв'язаних з ДНК негістонових білків хроматину ядер клітин селезінки, і порівняно з показником в інтактних тварин активність становила 75,7 %. Через 48 год після завершення γ -опромінення активність ацетилювання сумарних гістонів ядер клітин селезінки пригнічувалась як щодо показників на 24-ту годину, так і контролю і стосовно останнього вона була нижчою на 18,7 %. Встановлено, що на даному етапі досліджень активність реакцій ацетилювання гістонів Н1 і Н2А вірогідно посилювалась порівняно з показниками у тварин на 24-ту годину, але стосовно контролю вона була нижчою відповідно на 21,4 і 22,1 %. Одночасно також спостерігалось посилення активності ацетилювання лабільно зв'язаних із ДНК негістонових білків, рівень якої переважав контроль на 131,7 %. Проведені дослідження показали, що за 48 год після завершення γ -опромінення активність ацетилювання індивідуальних гістонів Н2В, Н3, Н4 і міцно зв'язаних з ДНК негістонових

білків хроматину ядер клітин сповільнювалася як щодо її значень на 24-ту годину, так і контролю і стосовно останнього дорівнювала відповідно 53,1; 51,3; 38,6 і 60,1 %.

На третю добу після γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр активність ацетилювання сумарних гістонів продовжувала знижуватись як щодо її показників на 48-му годину, так і контролю і стосовно останнього була нижчою на 56,7 %. Активність реакцій ацетилювання індивідуальних гістонів Н1, Н3, Н4 у цей час посилювалась порівняно з показниками попереднього терміну, але стосовно контролю залишалася нижчою відповідно на 11,1; 10,3 та 42,2 %. Дослідження особливостей активності реакцій ацетилювання гістону Н2А і лабільно зв'язаних з ДНК негістонових білків показало, що в обох випадках вона була вірогідно вищою за значення другої доби і контролю і переважала останній відповідно на 35,6 і 211,3 %. Паралельно з цим на даному етапі дослідження спостерігалось і посилення активності ацетилювання гістону Н2В і міцно зв'язаних з ДНК негістонових білків порівняно з показниками другої доби і в обох випадках вона майже досягала рівня контролю.

Через 4 доби після завершення дії радіаційного факто-

Таблиця

Вплив γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр на ацетилювання білків хроматину ядер клітин селезінки щурів, $M \pm m$; n=6; імп/хв на 1 мг білка

Умови досліджу	Сумарні гістони	Індивідуальні гістони					Негістонові білки	
		Н1	Н2А	Н2В	Н3	Н4	лзНГБ	мзНГБ
Контроль	1820±35	1285±46	1340±33	2610±58	1630±72	1710±45	1460±54	2720±76
Після γ -опромінення								
24 год	2189±28*	730±10*	867±9*	2178±25*	1232±43*	1200±15*	1105±*	3299±34*
48 год	1480±41*	1010±12*	1044±11*	1386±17*	836±18*	660±11*	3383±29*	1635±37*
72 год	788±18*	1142±11*	1817±18*	2806±71	1462±28*	988±19*	4545±36*	2647±51
96 год	1196±12*	1271±13*	568±10*	4069±26*	657±17*	1705±22	1689±27*	4415±48*
120 год	1405±15*	858±15*	721±14*	1856±20*	582±19*	686±13*	3073±30*	1722±32*

Примітка. * — P<0,05 стосовно контролю.



ра активність процесів ацетилювання сумарних гістонів вірогідно зростала порівняно з її значеннями на 3-тю добу і щодо показників інтактних тварин дорівнювала 65,7 %. Вірогідно збільшувалася порівняно з показниками 3-ї доби на даному етапі й активність ацетилювання гістонів H1 і H4, при цьому досягаючи практично рівня контролю, а існуючі відхилення від нього мали невірогідний характер. Тим же часом активність ацетилювання гістонів H2A і H3 різко знижувалася як щодо показників 3-ї доби, так і контролю і стосовно нього відповідно дорівнювала 42,4 і 40,3 %. Щодо активності ацетилювання на даному етапі гістону H2B, лабільно та міцно зв'язаних з ДНК негістонових білків, то вона у всіх трьох випадках була вірогідно вищою за рівень контролю.

На 5-ту добу після завершення дії загального γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр активність ацетилювання сумарних гістонів вірогідно посилювалася порівняно з показниками попереднього терміну, але щодо її значень в інтактних тварин була нижчою на 22,8 %. Проведені дослідження також дозволили встановити, що активність ацетилювання індивідуальних гістонів H1, H2B, H4 і міцно зв'язаних з ДНК негістонових білків через 5 днів після дії іонізуючої радіації була вірогідно нижчою як за показники 4-ї доби, так і контролю і стосовно останнього відповідно дорівнювала 66,8; 71,1; 40,1 та 63,3 %. Активність ацетилювання гістону H2A вірогідно збільшувалася відносно попередніх даних, а гістону H3 практично не відрізнялася від них, але в обох випадках вона була на дуже низькому рівні порівняно з контролем.

Активність ацетилювання лабільно зв'язаних з ДНК негістонових білків на даному етапі дослідження вдвічі переважала рівень контролю.

Таким чином, отримані результати дослідження свідчать про те, що тривале загальне γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр спричинило дезорганізацію процесів ацетилювання білків хроматину ядер клітин селезінки. Порівнюючи отримані результати з даними літератури [10], можна зробити узагальнення, що наслідком таких зрушень може бути зниження щільності заряду на білковій молекулі, ослаблення взаємозв'язку ДНК — білок і порушення активності початкових етапів експресії геному.

Висновки

1. Тривале загальне γ -опромінення в сумарній дозі 1,0 Гр призводило до стійкої дезорганізації реакцій ацетилювання як гістонових, так і негістонових білків хроматину ядер клітин селезінки. Глибина та напрямок виявлених зрушень цілковито залежала від терміну після радіаційного ураження та різновиду білка.

2. Встановлено, що більше змінювалася активність ацетилювання індивідуальних гістонів, які формують серцевину кора нуклеосом, та лабільно зв'язаних із ДНК негістонових білків, що свідчить про порушення взаємодії ДНК — білок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гераськин С. А., Севаньяев А. В. Универсальный характер закономерностей индукции цитогенетических повреждений низкодозовым облучением и проблема оценки генетического риска // Радиационная биология. Радиозэкология. — 1999. — Т. 39, № 1. — С. 35-40.

2. Зміни в імунній системі експериментальних тварин внаслідок по-

стійного опромінювання кількох поколінь у зоні відчуження ЧАЕС / З. Д. Савцова, І. М. Воейкова, В. М. Індик та ін. // Укр. радіол. журнал. — 2000. — № 1. — С. 71-76.

3. *Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека* / Под ред. Е. Б. Бурлановой. — М.: Центр эколог. полит. России, 1996. — 289 с.

4. Жижина Г. П. Связь структурных характеристик ДНК эукариот и ее чувствительности к действию малых доз ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиозэкология. — 1999. — Т. 39, № 1. — С. 41-48.

5. *Modification of ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated from normal and regenerating liver: some effect of salt and specific divalent cations* / F. O. Pogo, V. C. Littan, V. C. Allfrey, A. E. Mirsky // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1967. — Vol. 53, N 3. — P. 743-750.

6. Tenq C. S., Andrews G. K., Tenq C. T. Studies on the high-mobility group nonhistone proteins from hen oviduct // Biochem J. — 1979. — Vol. 181, N 3. — P. 585-591.

7. Уманский С. Р., Ковалев Ю. И., Пикер Е. Г. Взаимодействие негистоновых белков хроматина с гомологичной и гетерологичной ДНК // Молекул. биология. — 1975. — Вып. 5. — С. 683-690.

8. Bohm E. L., Strickland W. N., Von Holt C. Purification of the liver main calf thymus histone fractions by gel exclusion chromatography // FEBS Lett. — 1973. — N 2. — P. 217-221.

9. Aloyo V. J. Scintillation counting of ^3H - and ^{14}C -containing gel slices: a one-step method // Anal. Biochem. — 1979. — Vol. 99, N 1. — P. 161-164.

10. Засухина Г. Д. Радиоадаптивный ответ в клетках человека, различающихся по репарации ДНК // Радиационная биология. Радиозэкология. — 1999. — Т. 39, № 1. — С. 58-63.

