

11. Виноградова Е. И., Фэйгина М. Ю., Алданова Н. А. и др. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата // Биохимия.— 1973.— 38, № 1.— С. 3—21.
12. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. Хроматография в тонких пленках полиамида // Химия природ, соединений.— 1971.— № 1.— С. 66—68.
13. Easley C. W. Combination of specific colour reactions usefullin the peptide mapping technique // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 3.— P. 386—388.
14. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромцианового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 3.— С. 304—314.
15. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Серебряный С. Б. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдроа и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Биополимеры и клетка.— 1985.— I, № 3.— С. 121—124.
16. Левитина Т. Л., Серебряный С. Б., Роднин Н. В., Козлов Э. А. Строение некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Там же.— 1986.— 2, № 1.— С. 30—35.
17. Левитина Т. Л., Роднин Н. В., Серебряный С. Б., Козлов Э. А. Строение некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Там же.— № 2.— С. 73—81.
18. Роднин Н. В., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Козлов Э. А. Реконструкция полипептидной цепи гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum*. Полная аминокислотная последовательность // Там же.— 1991.— 7, № 1.— С. 87—93.
19. Epstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Communs.— 1975.— 62, N 2.— P. 478—484.
20. Гусак Н. М., Козлов Э. А., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроа большой вошинной моли, *Galleria mellonella* // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 996—1007.
21. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроа тутового и непарного шелкопряда и большой вошинной моли // Там же.— С. 1008—1015.
22. Kozlov E. A., Rodnin N. V., Levitina T. L. et al. The amino acid sequence determination of a granulin and polyhedrin from two baculoviruses infecting *Agrotis segetum* // Virology.— 1992.— 189.— P. 320—323.
23. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроа // Биохимия.— 1978.— 43, № 12.— С. 2189—2195.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев

Получено 18.03.93

УДК 615.357.631:577.157

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий

МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ФРАКЦИЙ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС

Показана способность к переоислению липидов, входящих в состав фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени интактных крыс. По ряду характеристик (отношение к индукторам и ингибиторам, временная кинетика накопления конечных продуктов) процессы липопероисления в хроматине отличаются от таковых, происходящих в мембранах эндоплазматического ретикулума печени. Процессы липопероисления более лабильны и протекают с большей интенсивностью в активной фракции хроматина, что может иметь решающее значение в механизмах повреждения ядерной ДНК. Если аскорбат-зависимое переоисление протекает исключительно с участием липидов хроматина, то остающаяся после липидной экстракции значительная интенсивность НАДФН-зависимого переоисления позволяет предположить участие в последнем процессе протяженных молекул нуклеиновых кислот и белков. Перекисное окисление липидов в хроматине рассматривается в качестве одного из ведущих механизмов повреждения ядерного генетического аппарата клетки.

Введение. Входящие в состав хроматина липиды обладают ярко выраженной специфичностью состава в интактных клетках и под действием повреждающих факторов [1, 2]. Ранее нами показана способность ли-

© Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, 1993

пидов, входящих в состав фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина (ТАХ и РХ соответственно) печени крыс, к спонтанному и индуцированному НАДФН и аскорбатом перекислению (ПОЛ) [3, 4]. Интенсивность реакций ПОЛ в РХ и ТАХ может изменяться при повреждении хроматина химическими соединениями [5—7]. Показано также неслучайное распределение молекул липидов во фракциях хроматина с образованием мицеллярных либо бислойных структур, подобных компонентам биомембран [8]. Структура таких комплексов может изменяться в условиях индукции ПОЛ [9].

В настоящей работе описаны результаты исследований, характеризующих процессы ПОЛ во фракциях ядерного хроматина, различающихся по уровню транскрипционной активности.

Материалы и методы. В работе использовали крыс-самок линии Вистар 3-месячного возраста (150—200 г). Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом в утренние часы, учитывая периодичность митотического цикла. Выделение фракций РХ и ТАХ из печени, а так-

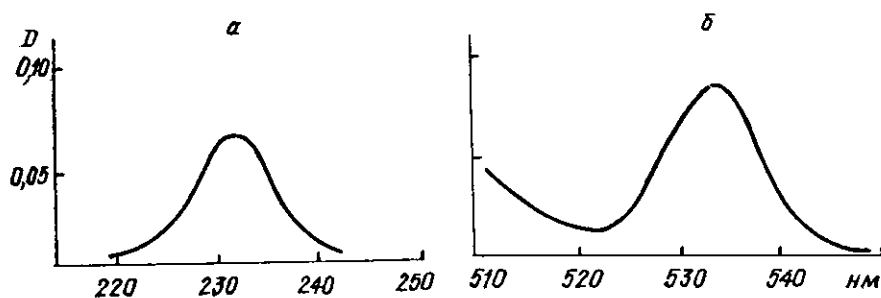


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов ПОЛ во фракциях хроматина печени интактных крыс: а — диеновые конъюгаты, РХ; б — малоновый диальдегид, АЗП, ТАХ.

же анализ процессов ПОЛ проводили, как описано ранее [3—9]. Экстракцию липидов из фракций хроматина осуществляли смесью «хлороформ — метанол». Полученные данные обрабатывали с помощью методов непараметрической статистики [10].

Результаты и обсуждение. Липиды, входящие в состав исследованных фракций хроматина, способны к перекислению как без предварительной индукции, так и в условиях активации процессов ПОЛ в НАДФН- и аскорбат-зависимых системах липоперекисления. При этом образуются типичные продукты перекисления липидов — диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид (МДА) и его производные, — аналогичные образующимся продуктам в мембранных структурах [11]. Эти данные представлены на рис. 1.

Без предварительной индукции накопление малонового диальдегида (нмоль МДА/мг белка за 2 ч) ($n=4-5$) составляло: во фракции РХ — 156,0; ТАХ — 87,1 ($p < 0,05$ по сравнению с РХ); микросом — 2280,2 ($p < 0,05$ относительно РХ). Из этого следует, что интенсивность липоперекисления в хроматине мала и в пересчете на единицу белка составляет 3,8—6,8 % от аналогичной величины в микросомах. При индукции процессов ПОЛ в условиях *in vitro* посредством добавления прооксидантов — НАДФН и аскорбата — интенсивность ПОЛ во фракциях хроматина возрастает (табл. 1 и 2), причем абсолютные величины зависят от использованных препаратов НАДФН и аскорбиновой кислоты. Величины индуцированного ПОЛ заметно выше во фракции ТАХ по сравнению с РХ (см. табл. 1), в особенности в пересчете на единицу ДНК (см. табл. 2). Заметное расхождение в абсолютных величинах индуцированного ПОЛ в исследованных фракциях хроматина (см. табл. 1 и 2), по-видимому, обусловлено различиями в чистоте препаратов прооксидантов. Однако в целом изменение величин наведенного ПОЛ гораздо больше выражено в ТАХ, что может быть связано с

большей лабильностью процессов липопероокисления в этой фракции хроматина.

В целом интенсивность этих процессов заметно ниже в обеих фракциях хроматина по сравнению с микросомами (табл. 2). Во фракциях хроматина также заметно изменено относительно микросом соотношение между величинами НАДФН-зависимого ПОЛ, его термола-

Таблица 1

Накопление малонового диальдегида и его производных в присутствии прооксидантов во фракциях хроматина печени интактных крыс (нмоль МДА/мг белка за 2 ч), n = 20

Показатель ПОЛ	РХ	ТАХ
НЗП	1895,0	3260,3*
НЗП, Δ	290,6	832,8**
АЗП	552,5	1288,2**

Примечание. Здесь и в табл. 2—8: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (по сравнению с РХ); НЗП—ПОЛ, зависимое от присутствия НАДФН; НЗП, Δ — его составляющая, зависящая от нагревания; АЗП — аскорбат-зависимое ПОЛ.

бильной составляющей, а также аскорбат-зависимого ПОЛ. Если в микросомах величины аскорбат-зависимого ПОЛ (АЗП) и термолабильной составляющей НАДФН-зависимого ПОЛ (НЗП, Δ) равны 90,4 и 57,3 % от величины НЗП, то во фракциях хроматина они значительно ниже и составляют 67,5 и 9,3 % для РХ и 40,5 и 8,1 % для ТАХ (в пересчете на единицу белка). Обращает на себя внимание факт гораздо большей концентрации продуктов ПОЛ в пересчете на единицу ДНК во фракции ТАХ по сравнению с РХ. Возможно, он имеет решающее значение для дифференциальной чувствительности исследованных фракций хроматина к повреждающим воздействиям [5—7].

При анализе величин содержания диеновых конъюгатов в пересчете на единицу белка во фракциях хроматина, а также в микросомах и тканевых гомогенатах печени интактных крыс (табл. 3) выявлено несколько большее их количество в гептановом экстракте микросом относительно фракций хроматина. Однако в изопропанольном экстракте (где их количество больше по сравнению с гептановым экстрактом во всех исследованных субклеточных фракциях) концентрация их в микросомах, РХ и ТАХ приблизительно одинакова и выше аналогичной величины в гомогенате. Также отмечается гораздо большая концентрация диеновых конъюгатов в пересчете на единицу ДНК в ТАХ по сравнению с РХ как в гептановой, так и в изопропанольной частях липидного экстракта. Для всех исследованных субклеточных фракций характерна большая концентрация диеновых конъюгатов в изопропанольном экстракте относительно гептанового. Этот факт можно объяснить тем, что фосфолипиды, являющиеся основным субстратом ПОЛ, экстрагируются в изопропанольную фазу липидного экстракта, в то время как в гептановую — нейтральные липиды и триглицериды. Для всех исследованных субклеточных фракций характерна довольно низкая величина содержания промежуточных продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (спонтанное ПОЛ).

В целом выявлена гораздо меньшая способность к индукции ПОЛ во фракциях хроматина по сравнению с микросомами на фоне небольшой разницы в содержании продуктов спонтанного ПОЛ (диеновых конъюгатов).

В пределах исследованных колебаний концентрации белка (на пробу) и величин индуцированного ПОЛ во фракциях хроматина, оцениваемого по накоплению МДА, не выявлено корреляции между этими двумя показателями за исключением АЗП во фракции ТАХ, где коэффициент корреляции является значимым и свидетельствует о том, что с ростом концентрации белка в исследованных пределах наблюдается увеличение величины АЗП в этой фракции хроматина. Это, по-видимому, подтверждает большую лабильность процессов ПОЛ во фракции ТАХ по сравнению с РХ (табл. 4).

На рис. 2 приведены результаты определения накопления продуктов ПОЛ во фракциях изолированного хроматина в зависимости от вре-

мени инкубации проб. В НАДФН-зависимой системе ПОЛ накопление МДА и его производных завершается раньше во фракции ТАХ (приблизительно 60 мин инкубации) относительно РХ (120 мин). Та же закономерность наблюдается и в случае АЗП. В ТАХ этот процесс завершается в пределах 60 мин инкубации проб при 37 °С, в то время как в РХ накопление МДА и его производных отмечается и после 180 мин

Таблица 2

Скорость накопления малонового диальдегида во фракциях изолированного хроматина и микросомах печени интактных крыс ($n=4-12$)

Показатель ПОЛ	Микросомы	РХ	ТАХ
НЗП	14279,8* (100)	711,4 (100)	642,5 (100)
	—	931,5 (100)	5787,2* (100)
НЗП, Δ	8178,2* (57,3)	65,9 (9,3)	52,2 (8,1)
	—	82,9 (8,9)	422,2* (7,3)
АЗП	12912,5* (90,4)	479,9 (67,5)	260,4 (40,5)
	—	614,8 (66,0)	2144,6* (37,1)

Примечание. Цифры в скобках — доля (%) НЗП, Δ и АЗП от НЗП; первая и вторая строка — нмоль на мг белка и ДНК за 2 ч соответственно.

Таблица 3

Содержание диеновых конъюгатов во фракциях хроматина, микросомах и тканевых гомогенатах печени интактных крыс ($n=14-28$)

Слой липидного экстракта	Гомогенат	Микросомы	РХ	ТАХ
Гептановый	55,4*	87,1*	18,4	29,9*
	—	—	24,4	259,4*
Изопропанольный	81,2*	170,0	193,1	105,8
	—	—	260,7	957,5**

Примечание. Первая и вторая строка — нмоль на мг белка и ДНК соответственно.

инкубации. С учетом этих данных в дальнейшем пробы фракций хроматина инкубировали в течение 120 мин при 37 °С, так как этот временной промежуток наиболее информативно отражает прохождение процессов ПОЛ в хроматине.

По сравнению с классическим объектом ПОЛ — микросомами — скорость накопления МДА во фракциях хроматина заметно ниже [12] и, видимо, определяется структурными ограничениями (присутствие спирали ДНК и нуклеосом), а также, вероятно, более низкими концентрациями ферментов и субстратов в хроматине относительно микросом. Факт большей скорости накопления МДА в ТАХ по сравнению с РХ, очевидно, имеет сходную природу предположительно вследствие большей «открытости» структуры ТАХ в сравнении с РХ.

Для анализа влияния прооксидантов на интенсивность процессов ПОЛ во фракциях хроматина изучали эффект присутствия аскорбиновой кислоты и пирофосфата натрия на интенсивность накопления МДА и его производных во фракциях РХ и ТАХ. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 5. Величины ПОЛ в полной системе, содержащей ионы двухвалентного железа, пирофосфат натрия, аскорбиновую кислоту и хроматин, были приняты за 100 %. Отсутствие в среде инкубации пирофосфата натрия снижает интенсивность накопления МДА в обеих фракциях хроматина практически на одну и ту же величину — приблизительно на 45 %. Отсутствие аскорбиновой кислоты в среде инкубации оказывает гораздо более заметный ингибирующий эффект на величину ПОЛ в хроматине — в РХ она снижается на 82,7 %,

а в ТАХ — на 94,3 %. Отсутствие же обоих компонентов (аскорбата и пирофосфата) практически полностью ингибирует ПОЛ в РХ. В то же время в ТАХ величина ПОЛ составляет 38,6 % от величины в полной системе (рост на 32,9 % по сравнению с системой без экзогенного аскорбата, но с пирофосфатом). Учитывая факт присутствия эндогенного аскорбата в ДНК клеток печени [13, 14], можно предположить его участие в исследованных процессах ПОЛ в хроматине.

Таблица 4
Степень корреляции между изменениями концентрации белка и количеством образующегося малонового диальдегида во фракциях хроматина печени интактных крыс (n=68—81)

Показатель ПОЛ	РХ	ТАХ
НЗП	0,2586	0,2153
НЗП, Δ	0,2574	0,0257
АЗП	0,3642	0,6749*

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции. Концентрации белка колебались в пределах 0,099—1,5 мг/мл реакционной смеси; количество МДА в реакции 0,002—0,360 ОД₅₃₅ им.

концентрации ионов Fe²⁺, при котором скорость накопления МДА в микросомах максимальна [11, 12]. Для исследования влияния ионов Fe²⁺ на скорость накопления МДА во фракциях изолированного хроматина образцы РХ и ТАХ инкубировали в течение 120 мин при 37 °С в присутствии различных концентраций Fe²⁺ в НАДФН- и аскорбат-зависимых системах перекисления. Параллельно сопоставляли процессы ПОЛ в хроматине с аналогичными процессами в микросомах. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 3, откуда следует, что при отсутствии в среде инкубации ионов Fe²⁺ наблюдается фоновый уровень НЗП и АЗП как в микросомах, так и во фракциях хроматина, однако в микросомах он значительно выше. Вероятно, наличие определенной величины ПОЛ при нулевом уровне экзогенного железа в среде инкубации обусловлено присутствием эндогенного железа в микросомах и во фракциях хроматина. При добавлении в среду инкубации ионов Fe²⁺ в концентрации 10⁻⁴ М отмечается максимальная величина ПОЛ в микросомах, после чего с дальнейшим ростом концентрации железа наблюдается резкое снижение уровня ПОЛ. В данном случае оптимум концентрации Fe²⁺ для процессов ПОЛ в микросомах соответствует данным литературы [11, 12]. Что касается влияния ионов Fe²⁺ на процессы ПОЛ во фракциях изолированного хроматина, то как в случае РХ, так и ТАХ происходит линейный рост НЗП и АЗП (более резкий в случае АЗП) при увеличении концентрации Fe²⁺. Отсутствие оптимума концентрации Fe²⁺, стимулирующей ПОЛ в хроматине, может быть связано с повреждением ДНК в присутствии ионов железа [16], с возможной последующей инициацией ПОЛ либо из продуктов распада, либо высвобождением эндогенных липидов в результате подобного распада, ранее недоступных для перекисного окисления.

Известно, что ЭДТА связывает ионы двухвалентного железа, тем самым подавляя процессы ПОЛ в микросомах [11, 15]. В то же время в некоторых случаях описаны комплексы ЭДТА с ионами железа, которые стимулируют ПОЛ в этом типе биомембран [17]. В табл. 6 представлены результаты экспериментов по исследованию эффектов трех концентраций ЭДТА (10⁻³, 10⁻⁴ и 10⁻⁵ М) на скорость накопления МДА во фракциях изолированного хроматина. В случае НЗП отсут-

Большая доступность компонентов ТАХ по сравнению с РХ для прохождения реакций ПОЛ (вследствие более конденсированной структуры последнего) обуславливает большую доступность эндогенного аскорбата во фракции ТАХ по сравнению с фракцией РХ. Возможно, что пирофосфат натрия в данной концентрации без экзогенного аскорбата тормозит ПОЛ с участием эндогенного аскорбата во фракции ТАХ. Отсутствие пирофосфата снимает ингибирующий эффект, что приводит к росту ПОЛ в этой фракции хроматина.

Известно, то ионы двухвалентного железа являются инициаторами ПОЛ в мембранных структурах клетки [11, 15]. Существует оптимум

ствуется сколько-нибудь заметное влияние как в РХ, так и в ТАХ. Чувствительный к нагреванию компонент НЗП, Δ практически полностью подавляется при концентрации ЭДТА 10^{-3} М во фракции РХ. Две другие концентрации оказывают слабый ингибирующий эффект. В ТАХ ЭДТА, наоборот, вызывает зависимый от концентрации рост уровня НЗП, Δ . Вероятно, это связано с принципиальным различием в меха-

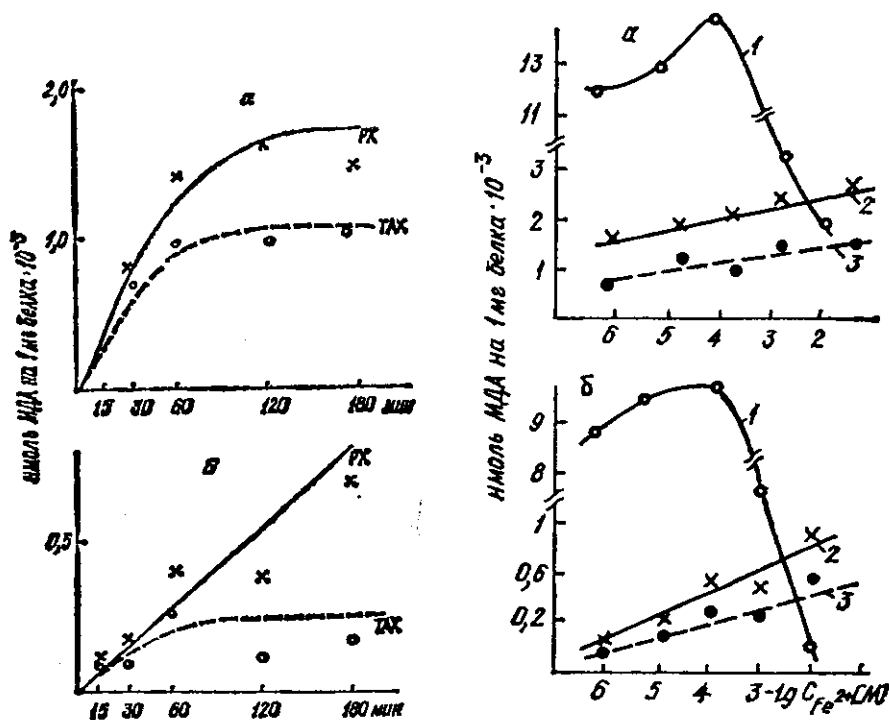


Рис. 2. Скорость накопления МДА и его производных во фракциях хроматина печени крыс при активации ПОЛ НАДФН и аскорбатом: а — НЗП; б — АЗП

Рис. 3. Влияние различных концентраций Fe^{2+} на скорость накопления МДА и его производных во фракциях хроматина и микросомах печени крыс: 1 — микросомы; 2 — РХ; 3 — ТАХ (а — НЗП; б — АЗП)

лизмах процессов НЗП в исследованных фракциях хроматина. В случае АЗП наблюдается увеличение уровня перекисления как в РХ, так и в ТАХ с возрастанием концентрации ЭДТА, более выраженное в РХ. Вероятно, наличие ЭДТА наряду с ионами Fe^{2+} , аскорбатом и субстратом перекисления создает условия для возникновения комплексов ЭДТА с ионами железа, являющимися мощными стимуляторами ПОЛ в хроматине.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить определенную специфику процессов ПОЛ во фракциях хроматина относительно аналогичных процессов в мембранах эндоплазматического ретикулула. Аномальное поведение процессов ПОЛ в хроматине по сравнению с биомембранами, по-видимому, связано с особым устройством системы липоперекисления, существующей в компонентах ядерного генома.

Известно, что липиды — основной субстрат перекисления в биологических объектах. При окислении их ненасыщенных жирнокислотных остатков образуются перекиси, из которых на начальных этапах цепной реакции формируются диеновые конъюгаты и другие промежуточные продукты липоперекисления, а одним из конечных продуктов являются МДА и его производные. Хроматин, в отличие от биомембран, содержит относительно малое количество липидов и много белка. Кроме того, в состав хроматина входят протяженные нити ДНК, определяющие его структуру и функции. Все изложенное выше подтверждает специфич-

ность процессов ПОЛ во фракциях хроматина. Для дальнейшего исследования процессов ПОЛ в хроматине были проведены эксперименты по их моделированию во фракциях изолированного хроматина путем включения в реакции ПОЛ коммерческих препаратов ДНК тимуса теленка, БСА и искусственных смесей ДНК тимуса+БСА (отношение ДНК/белок=1,5). При этом в препаратах фракций хроматина и модельных системах определяли скорость накопления МДА в НАДФН- и аскор-

Таблица 5

Влияние прооксидантов на скорость накопления малонового диальдегида во фракциях изолированного хроматина печени интактных крыс (% от контроля, n=4)

Условия эксперимента	РХ	ТАХ
Полная система (Fe ²⁺ , пирофосфат натрия, аскорбиновая кислота, хроматин) — контроль	100,0	100,0
Без пирофосфата натрия	54,7	54,8
Без аскорбиновой кислоты	17,8	5,7*
Без аскорбиновой кислоты и пирофосфата натрия	0	38,6*

Примечание. Контрольные значения АЗП для РХ: 387,9—507,0; для ТАХ: 54,9—396,7 нмоль МДА/мг белка за 2 ч.

Таблица 6

Влияние различных концентраций ЭДТА на скорость накопления малонового диальдегида во фракциях изолированного хроматина печени интактных крыс (% от контроля, n=3)

Показатель ПОЛ	Концентрация ЭДТА, М					
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
НЗП	105,3	86,3	85,8	133,3	98,1	104,8
НЗП, Δ	71,4	65,3	0*	114,0	153,3	200,4*
АЗП	162,3	411,2*	476,3*	134,3	199,0	328,6*

Примечание. *p<0,05 (по сравнению с контролем); контрольные значения ПОЛ: НЗП, РХ — 702,7—1900,2; НЗП, ТАХ — 905,8—1262,1; НЗП, Δ, РХ — 112,2—572,4; НЗП, Δ, ТАХ — 41,8—110,1; АЗП, РХ — 61,7—641,0; АЗП, ТАХ — 110,9—111,5 нмоль МДА/мг белка за 2 ч.

бат-зависимых системах ПОЛ, а также содержание диеновых конъюгатов. Для установления роли липидного компонента в процессах перекисления в хроматине осуществляли липидную экстракцию фракций РХ и ТАХ, а также искусственной смеси ДНК тимуса+белок. Скорость накопления МДА регистрировали до и после липидной экстракции.

Результаты экспериментов представлены в табл. 7 и 8. Из приведенных данных видно, что ДНК, белок и искусственная смесь ДНК+БСА обладают первоначальным уровнем НЗП, сравнимым с таковым во фракциях хроматина. Кроме того, из искусственной смеси экстрагируется определенное количество диеновых конъюгатов, правда, оно существенно меньше, чем из препаратов РХ и ТАХ. По всей вероятности, этот факт может быть связан с наличием примесей в виде прочносвязанных липидов в коммерческих препаратах ДНК и белка. При этом нельзя исключить и участия протяженных заряженных цепей биополимеров в процессах переноса зарядов при НЗП. Гипотезы подобного рода высказывались также в ранних работах [18]. Однако следует обратить внимание на то, что в данных коммерческих препаратах ДНК, белка, а также в искусственных смесях ДНК+белок отсутствует чувствительная к нагреванию составляющая НЗП, Δ (см. табл. 7), хотя в других подобных препаратах она обнаруживается (см. табл. 8). Вероятно, природу НЗП составляют как неидентифицированный фермент

(или комплекс ферментов), так и структурное сочетание ДНК с белками, составляющее комплекс, участвующий в процессах НЗП в ядерном хроматине.

Экстракция липидов не приводит к существенному изменению величины НЗП в искусственной смеси ДНК+БСА и во фракциях хроматина (см. табл. 8). Одной из причин такого явления может быть наличие прочносвязанных липидов в этих модельных системах липоперекисления [19]. Однако липидная экстракция вызывает существенное

Таблица 7

Моделирование перекисления различных субстратов в хроматине (n=5)

Субстрат перекисления	МДА			Диевые конъюгаты	
	НЗП	НЗП, Δ	АЗП	Гептановый слой	Изопропанольный слой
ДНК тимуса	—	—	—	—	—
теленка	1652,5	0*	510,2	—	—
БСА	1050,0	0*	223,3*	—	—
ДНК тимуса теленка+БСА	744,7*	0*	195,4*	9,6*	107,7*
	738,6*	0*	200,5*	14,4	161,6*
РХ	1590,5	249,8	661,1	20,6	265,0
	1918,4	295,9	795,5	24,7	318,0
ТАХ	581,3*	51,5*	935,1	19,3	175,0
	4711,5*	407,2*	7410,7*	187,2*	1697,5*

Примечание. Первая и вторая строка — нмоль на мг белка и ДНК за 2 ч соответственно.

Таблица 8

Влияние липидной экстракции на степень перекисления фракций хроматина и искусственной смеси ДНК+БСА (n=5)

Субстрат перекисления	Без экстракции			Экстракция		
	НЗП	НЗП, Δ	АЗП	НЗП	НЗП, Δ	АЗП
ДНК+БСА	1261,0	217,6*	300,5	2029,7 (161)	46,3* (21,3)	105,6 (35,0)
	1635,2	372,2*	251,0*	1068,9 (65)	176,9* (48)	191,7 (76)
РХ	1494,2	87,2	298,1	1178,8 (79)	0 (0)	149,0 (50)
	1515,6	118,7	477,1	892,0 (59)	0 (0)	168 (2) (35)
ТАХ	1212,4	151,5	759,5*	971,3 (80)	16,2* (11)	132,6 (20)
	7682,2*	844,1*	5306,8*	6875,5* (90)	191,4* (23)	638,0* (12)

Примечание. Цифры в скобках — доля ПОЛ (%) от контроля; первая и вторая строка — нмоль МДА на мг белка и ДНК за 2 ч соответственно.

снижение величины НЗП, Δ в смеси ДНК+белок и во фракциях хроматина, особенно резко выраженное во фракции РХ. Эти данные позволяют предположить определяющее влияние липидного компонента хроматина на формирование величины чувствительного к нагреванию компонента НЗП. Кроме того, они показывают различие в молекулярных механизмах, формирующих процессы ПОЛ в исследуемых фракциях хроматина. Что касается АЗП, то липидная экстракция приводит к существенному снижению этого показателя во всех исследованных системах ПОЛ, причем наибольшее снижение наблюдается во фракции ТАХ.

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод о решающем значении липидного компонента хроматина в процессах АЗП и чувствительных к нагреванию процессах НЗП. При этом они дают возможность предположить участие протяженных нуклеосомных

группировок хроматина в процессах переноса зарядов, происходящих при НЗП, и подтверждают различия в действии механизмов ПОЛ в исследуемых фракциях хроматина.

В данной работе изложены результаты экспериментов, свидетельствующие о возможности протекания процессов ПОЛ во фракциях РХ и ТАХ и впервые приведена характеристика этих процессов. По некоторым показателям (индукция ПОЛ при добавлении в среду инкубации прооксидантов — ионов Fe^{2+} , пирофосфата натрия, аскорбата, НАДФН) процессы ПОЛ во фракциях хроматина сходны с аналогичными процессами в классическом объекте изучения ПОЛ — микросомах. Прежде всего это касается природы образующихся продуктов ПОЛ. Однако по целому ряду признаков эти процессы существенно различаются. В первую очередь, это относится к уровню ПОЛ: он намного ниже в хроматине по сравнению с микросомами. Накопление МДА и его производных во времени также происходит медленнее в хроматине. Уровни НЗП и АЗП в микросомах заметно не отличаются, в то время как в хроматине интенсивность НЗП гораздо выше, чем АЗП. При этом НЗП, Δ составляет основную долю НЗП в микросомах, в хроматине же она существенно ниже. Различие в уровне ПОЛ в хроматине и микросомах особенно резко выражено при индукции ПОЛ прооксидантами. В микросомах существует четко обозначенный оптимум концентрации Fe^{2+} , при котором наблюдается максимум индукции ПОЛ. В хроматине уровень ПОЛ линейно возрастает с увеличением концентрации этих ионов в среде инкубации. Добавление ЭДТА к изолированным микросомам приводит к ингибированию процессов ПОЛ. В хроматине же, наоборот, это соединение вызывает стимуляцию некоторых реакций липопереокисления.

Возможно, различие между процессами ПОЛ в микросомах и хроматине обусловлено присутствием специфических структурных элементов (ДНК, РНК) и особенностями структурной упаковки хроматина (нуклеосомный уровень организации). Вполне вероятно, что липидный компонент в хроматине, являющийся субстратом ПОЛ, структурно организован иначе по сравнению с микросомами. В самом хроматине реакции ПОЛ различаются в зависимости от структурно-функциональной организации последнего. В ТАХ, где уровень транскрипционной активности выше, чем в РХ, их интенсивность также несколько выше (в особенности в пересчете на единицу ДНК). Этот факт имеет важное значение для дифференциальной чувствительности фракций хроматина к действию повреждающих агентов [5—7]. Отличие процессов ПОЛ во фракциях хроматина, различающихся по уровню транскрипционной активности, по целому ряду других характеристик позволяет предположить их неодинаковую защищенность по отношению к эндогенным свободным радикалам, которые накапливаются в хроматине при его повреждении. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, показывающие связь между интенсивностью процессов ПОЛ во фракциях хроматина и их эндогенной ДНК-полимеразной активностью, где установлено ее снижение при активации ПОЛ [20].

Резюме. Показано здатність до переокислення ліпідів, що входять до складу фракцій транскрипційно активного та репресованого хроматину печінки інтактних щурів. За рядом ознак (відношення до індукторів та інгібіторів, кінетика накопичення у часі кінцевих продуктів) процеси ліпопереокислення у хроматині відрізняються від таких, що відбуваються у мембранах ендоплазматичного ретикулуму печінки. Процеси ліпопереокислення лабільніші та проходять з більшою інтенсивністю в активній фракції хроматину, що може мати вирішальне значення у механізмах пошкодження ядерної ДНК. Якщо аскорбат-залежне переокислення відбувається за участю виключно ліпідів хроматину, то значна частка НАДФН-залежного переокислення, що залишається після ліпідної екстракції, дозволяє припустити участь в останньому процесі подовжених молекул нуклеїнових кислот та білків. Перекисне окислення ліпідів у хроматині розглядається як один з головних механізмів пошкодження ядерного генетичного апарату клітини.

S u m m a r y. Ability for peroxidation of lipids of transcriptionally and repressed chromatin fractions of intact rat livers was shown. According to some features (the relation to inductors and inhibitors, the time's kinetics of the terminal products accumulation) chromatin's lipids peroxidation processes distinguish from ones in the liver endoplasmatic reticulum membranes. The lipid peroxidation processes are more labiled and intensified in the active chromatin fraction. This may be important for the nuclear DNA damage mechanisms. The ascorbate-dependent lipid peroxidation processes are determined only by the chromatin lipids just as NADPH-dependent ones are related to stretched nucleic acids and proteins molecules. This suggestion is proved by the fact of the rather considerable resting of NADPH-dependent lipid peroxidation after lipid extraction in the chromatin. The chromatin lipid peroxidation processes are considered as important mechanism of the nuclear genetic apparatus damages.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казначеев Ю. С., Кулагина Т. П., Маркевич Л. Н. и др. О метаболизме липидов хроматина печени и тимуса крыс // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 3.— С. 607—612.
2. Казначеев Ю. С., Коломийцева И. К., Кулагина Т. П. и др. Обновление хроматин связанных и мембранных липидов печени и тимуса γ -облученных крыс // Биохимия.— 1984.— 49, № 12.— С. 2008—2011.
3. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1989.— № 2.— С. 70—72.
4. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабанный В. Н. и др. Перекисное окисление липидов и параметры термоденатурации фракций хроматина печени крыс // Укр. биохим журн.— 1990.— 62, № 2.— С. 76—82.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлорметана // Вопр. мед. химии.— 1989.— 35, № 4.— С. 119—124.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. ДНК- и РНК-полимеразные активности фракций хроматина печени крыс при химическом повреждении мембран гепатоцитов // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1988.— № 3.— С. 75—77.
7. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Изменение структуры и реакций перекисления хроматина печени под влиянием О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфата // Укр. биохим. журн.— 1992.— 64, № 5.— С. 89—91.
8. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Там же.— 1991.— 63, № 2.— С. 83—89.
9. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 3.— С. 89—94.
10. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.— 78 с.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
12. Губский Ю. И. Регуляция перекисного окисления липидов в биологических мембранах // Биохимия животных и человека.— Киев: Наук. думка, 1978.— Т. 2.— С. 72—84.
13. Гольдштейн Б. И. Клеточный митоз и регуляция биосинтеза ДНК в клетке // Вопр. биосинтеза, структуры и функций биополимеров.— Киев: Наук. думка, 1967.— С. 84—105.
14. Гольдштейн Б. И., Герасимова В. В., Рудь С. Г. и др. О денатурации и фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетках с интенсивной митотической активностью в зависимости от возраста // Механизмы старения.— Киев: Медгиз, 1963.— С. 31—42.
15. Губский Ю. И. Коррекция химического поражения печени.— Киев: Здоров'я, 1989.— 168 с.
16. Shires T. K. Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei // Biochem. J.— 1982.— 205, N 2.— P. 321—329.
17. Tien M., Morehouse M. A., Bucher J. K. et al. The multiple effects of ethylenediamine tetraacetate in several models lipid peroxidation systems // Arch. Biochem. and Biophys.— 1982.— 218, N 2.— P. 450—458.
18. Гайцхоки В. С., Киселев О. И., Кузьмина С. И. и др. О цепи переноса электронов в изолированных ядрах и в ядерных оболочках печени крысы // Биохимия.— 1973.— 38, № 5.— С. 909—914.
19. Збарский И. Б. Организация клеточного ядра.— М.: Медицина, 1988.— 368 с.
20. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1989.— 57, № 3.— С. 296—298.

Укр. НИИ фармакологии и токсикологии
МЗ Украины, Киев

Получено 12.03.93