

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА РНК-СИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ бМРНК В СПЛЕНОЦИТАХ КРЫС

Количество новосинтезированной РНК в клетках зависит не только от скорости синтеза, но и от равновесия этого процесса со скоростью распада и стабильностью новосинтезированных молекул РНК, поэтому, наблюдаемое на начальном этапе культивирования клеток увеличение включения ^3H -уридина в РНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками [5] может быть обусловлено как стимуляцией синтеза РНК, так и уменьшением скорости распада новосинтезированной РНК в результате стабилизирующего эффекта ионов свинца на структуру макромолекулы [8,11], и /или угнетения активности рибонуклеаз [1,4].

Снижение включения ^3H -уридина в РНК спленоцитов при более длительном культивировании с ацетатом свинца (до 10 часов) [5] может быть обусловлено, с одной стороны, угнетением синтеза РНК, а с другой – увеличением скорости распада новосинтезированной РНК в результате специфичной реакции деполимеризации полинуклеотида под влиянием ионов свинца [2,10].

Для проверки приведенных выше предположений о возможных механизмах влияния ацетата свинца на количество включенного ^3H -уридина в РНК спленоцитов крыс были проведены эксперименты по определению РНК-синтетической активности, оцениваемой по включению радиоактивного предшественника в кислотоосаждаемый материал клеток, меченых в течение 15 минут и стабильности новосинтезированной РНК. Следует отметить, что в зависимости от времени инкубации клеток с меченым предшественником удается обнаружить либо новосинтезированные предшественники РНК (инкубация 5 – 30 мин), либо зрелые РНК (инкубация 1 – 6 час). Типы РНК, которые метятся за короткие времена инкубации, обычно называются быстрометящимися – бМРНК [7]. Количество включенного радиоактивного предшественника в короткомеченую РНК является мерой РНК-синтетической активности клеток, так как распад РНК за счет процессинга и выход в цитоплазму зрелых молекул всех типов РНК еще не вносит существенный вклад в этот показатель [3,9].

Для изучения стабильности бМРНК обычно используют в качестве методического приема кратковременную инкубацию клеток с ^3H -уридином и последующая экспозиция их с актиномицином D в концентрации, полностью подавляющей синтез РНК (5 – 10 мкг/мл) [12].

В литературе отсутствуют какие-либо сведения о влиянии ионов свинца на РНК-синтетическую активность и стабильность бМРНК в иммунокомпетентных клетках. Поэтому было проведено изучение РНК-синтетической активности и стабильности суммарных бМРНК в спленоцитах крыс, пульс-меченых в течение 15 минут и чейз-инкубированных в течение 9 часов. Пульс-

* Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь.

чейз эксперименты проводили на свежеизолированных интактных спленоцитах и спленоцитах, предварительно обработанных ацетатом свинца в концентрации 10 мкМ в течение 1 часа. Чейз-эксперимент проводили с использованием актиномицина Д (10 мкг/мл).

При анализе данных по включению ^3H -уридина в кислотоосаждаемый материал спленоцитов крыс, пульс-меченых в течение 15 минут (таблица), видно, что интенсивность синтеза бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах не отличается от таковой в интактных клетках. Поскольку актиномицин Д немедленно вызывает высокоэффективный чейз, то разрушения суммарной бмРНК следует ожидать фактически от нулевого времени после добавления актиномицина Д [6]. Действительно, как в интактных, так и в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах наблюдается выраженное в равной степени уменьшение количества включенного ^3H -уридина («» на 60%) в кислотоосаждаемый материал спленоцитов уже после часового актиномицинового чейза по сравнению с таковым в нулевое время, что несомненно является отражением распада лабильного пула новосинтезированных бмРНК. Через 3 часа актиномицинового чейза в интактных спленоцитах наблюдается дальнейшее уменьшение количества включенного ^3H -уридина в кислотоосаждаемый материал клеток, а в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах количество включенного радиоактивного предшественника не изменяется через 3 часа актиномицинового блока по сравнению с часовым актиномициновым чейзом. Такой характер изменений приводит к достоверному увеличению количества включенного ^3H -уридина в бмРНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов по сравнению с интактными клетками, обусловленному резким замедлением распада новосинтезированной бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах. При продолжительности актиномицинового чейза в течение 9 часов наблюдается достоверное уменьшение количества включенного ^3H -уридина в бмРНК как интактных, так и Pb^{2+} -обработанных спленоцитов. Однако, если в интактных спленоцитах снижение количества включенного ^3H -уридина бмРНК происходит на 19%, то в Pb^{2+} -обработанных клетках – на 37% по отношению к 3-х часовому чейзу, что свидетельствует о двукратном увеличении интенсивности распада бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах по сравнению с интактными клетками. Этот эффект, вероятно, обусловлен РНК-деполимеризирующим действием ионов свинца.

Таблица

Влияние ацетата свинца на включение ^3H -уридина (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток) в бмРНК и их стабильность в спленоцитах крыс

| Продолжительность актиномицинового блока, час | Условия | |
|---|-----------|--|
| | Контроль | Клетки + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 мкМ |
| 0 | 12144±585 | 13436±670 |
| 1 | 4608±176 | 4753±115 |
| 3 | 3522±143 | 4914±169* |
| 9 | 2849±126 | 3135±151 |

Примечание: * – различия по сравнению с контролем достоверны ($P < 0,05$).

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы: ионы свинца не оказывают влияния на РНК-синтетическую активность спленоцитов; новосинтезированные бмРНК представляют собой относительно лабильный пул, подвергающийся деградации на 60% уже после часового актиномицинового чейза; достоверное увеличение количества включенного ^3H -уридина в бмРНК Pb^{2+} -обработанных спленоцитов к 3-му часу актиномицинового блока обусловлено стабилизирующим действием ионов свинца на структуру РНК и (или) угнетением ими активности рибонуклеаз и, как следствие, меньшей интенсивностью распада; двукратное усиление интенсивности распада бмРНК в Pb^{2+} -обработанных спленоцитах по сравнению с контролем, вероятно, обусловлено деполимеризирующим влиянием ионов свинца на структуру РНК при более длительном (до 10 часов) культивировании клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубович Е.Я., Орлянская Р.Л. Влияние свинца на интенсивность обмена РНК в клеточных фракциях семенников белых крыс//Токсикология новых промышленных химических веществ, вып.14, М., "Медицина".-1975.-С.22-25.
2. Неорганическая биохимия.-М "Мир".-1978.-Т.2.-С.736 .
3. Пospelova T.B. Действие актиномицина D на клеточную пролиферацию, индуцированную в лимфоцитах человека фитогемагглютинином// Цитология.- 1975.- Т.17, №6.- С.660-666.
4. Срочинский Я. Цитохимические исследования базофильной зернистости эритроцитов при отравлении свинцом//Тиг. труда и проф. заболеваний.-1966.-№4.-С.41.
5. Цыганков В.Г., Латушко Т.В., Барковский Е.В. Изменение синтеза РНК под влиянием ионов свинца в иммунокомпетентных клетках//Здоровье и окружающая среда. Сб. научных трудов, Минск.-2001.-С.393-397.
6. Berger S.L., Birkenmeier C.S. Studies on rRNA in resting and growing lymphocytes//Cell Biology and Immunology of Leucocyte Function (Ed. Quastel M.R.) Academic Press.-1979.-P.121-127.
7. Brandhorst B.P., McCoukey E.H. Stability of nuclear RNA in mammalian cells//J.Mol.Biol.-1974.-Vol.85.-P451.
8. Brown R.S., Dewan J.C., Klug A. Crystallographic and biochemical investigation of the lead (II)-catalyzed hydrolyses of yeast phenylalanine tRNA//Biochemistry.-1985.-Vol.24.-P.4785-4801.
9. Cooper H.L. Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation//Transplant. Rev.-1972.-Vol.11.-P.3-8.
10. Farkas W.R. Depolymerization of ribonucleic acid by plumbous ion//Biochim. Biophys. Acta.-1968.-Vol.155, N2.-P.401-409.
11. Rubin J/R/, Sundaralingman M. RNA chain hydrolysis in phenylalanine t-RNA//J.Biol. Str. Dyn.-1983.-N1.-P.639-646.
12. Stern R., Friedman R. Double-stranded RNA synthesized in animal cells in the presence of actinomycin D//Nature.-1970.-Vol.226, N 5246.- P.612-616.