

Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский,
В. Н. Чабанный, Г. Л. Волков, С. Н. Новикова

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАКЦИЙ ТРАНСКРИПЦИОННО АКТИВНОГО И РЕПРЕССИРОВАННОГО ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС

*Охарактеризованы фракции транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени интактных крыс. Разница в транскрипционной активности между фракциями обусловлена, по всей вероятности, различиями в белковом компоненте хроматина, а именно: повышенной концентрацией РНК-полимераз в активном хроматине. Показатели уровня синтеза ДНК *in vivo* и *in vitro*, процесс термоденатурации, чувствительности фракций и экзо- и эндогенным ДНКазам разнятся незначительно, что позволяет предполагать сходство упаковки ДНК в транскрипционно активном и репрессированном хроматине. Кроме того, возможно, что отличия в фосфолипидном и жирнокислотном составе между фракциями могут обуславливать участие липидов хроматина в реализации его генетической активности.*

Введение. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в изучении структурно-функциональной организации ядерного хроматина в интактных клетках, многие аспекты этой проблемы остаются неясными. Один из них — функционирование молекулярных механизмов, определяющих структурные и функциональные различия между активными и низкоактивными в отношении матричных синтезов участками ядерного хроматина. О действии механизмов активации хроматина в интактных клетках известно, что функциональные различия между активно транскрибирующимися последовательностями и низкоактивными участками в геноме обусловлены в основном высшими порядками структурной организации хроматина [1—3]. Однако при этом остается невыясненным вклад отдельных компонентов хроматина в механизмы его активации.

В соответствии с этим в настоящей работе определены некоторые биохимические различия между фракциями транскрипционно активного (ТАХ) и репрессированного (РХ) хроматина печени интактных крыс.

Материалы и методы. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар 3-месячного возраста (150—200 г). Животных декапитировали в утренние часы под легким эфирным наркозом, учитывая периодичность митотического цикла. Фракции РХ и ТАХ выделяли, как правило, по методу [4]. Структурно-функциональное состояние фракций хроматина анализировали, как описано нами ранее [5—7]. Полученные данные обрабатывали с помощью методов непараметрической статистики [8].

Результаты и обсуждение. Структурно-функциональную организацию фракций ядерного хроматина печени интактных животных исследовали с помощью биохимических методов. Известно, что важнейшими функциями ядерного хроматина являются процессы репликации и транскрипции. Для выяснения интенсивности этих процессов в хроматине оценивали активности эндогенных ДНК- и РНК-полимераз во фракциях РХ и ТАХ. В некоторых экспериментах параллельно регистрировали включение ³H-тимидина в ДНК фракций ядерного хроматина. Методы определения ферментативной чувствительности РХ и ТАХ, процентного соотношения между фракциями, отношения белок/ДНК, содержания ионов металлов дают возможность в значительной степени установить структурную организацию фракций. Анализ изменения содержания сАМР и активности АТРаза во фракциях позволяет судить о звеньях регуляции активности ядерного генома [9].

Результаты определения доли каждой фракции в препаратах ядерного хроматина свидетельствуют о том, что соотношение (%) между фракциями, различающимися по уровню транскрипционной активности

($n=32$), составляет для РХ 91,7; ТАХ — 8,3 ($p < 0,01$ по сравнению с РХ). В хроматине печени интактных крыс на долю ТАХ приходится незначительная часть ядерного генома. Это соответствует данным литературы о том, что длина активно транскрибируемых генов равняется приблизительно 10 % длины генома [10, 11]. Авторы указанного метода получения фракционированного хроматина показали, что данные фракции хроматина обладают различной степенью транскрипционной активности: включение ^{14}C -оротовой кислоты в РНК ТАХ печени крыс было в 6—10 раз выше относительно РХ [4]. Логично предположить, что неодинаковая транскрипционная активность фракций ядерного хроматина обусловлена различной активностью эндогенных РНК-полимераз. Результаты определения их активности во фракциях РХ и ТАХ печени интактных крыс приведены в табл. 1. Активность эндогенных РНК-полимераз в ТАХ выше по сравнению с РХ: тотальная — в 6,2; фракции, обогащенной РНК-полимеразой I, — в 11,3; фракции, обогащенной РНК-полимеразой II, — в 4,6 раза. Эта разница в активности ключевых ферментов синтеза РНК соответствует приведенным выше показателям уровня включения ^{14}C -оротовой кислоты во фракциях ядерного хроматина. В РХ доля фракции, обогащенной РНК-полимеразой I, составляет 24,0 %, а РНК-полимеразой II — 76,0 %, в ТАХ — соответственно 43,7 и 56,3 % от общей РНК-полимеразной активности. Таким образом, значительные различия в уровне транскрипционной активности данных фракций ядерного хроматина, проявившиеся в условиях *in vivo* и *in vitro*, обусловлены неодинаковой активностью эндогенных РНК-полимераз.

Авторы оригинальной методики показали, что через 20 ч после частичной гепатэктомии включение ^3H -тимидина происходит приблизительно в 3 раза интенсивнее в ДНК фракции ТАХ по сравнению с РХ [4]. В наших экспериментах уровень эндогенной ДНК-полимеразной активности определяли во фракциях ядерного хроматина печени интактных крыс. Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Различия между активностями эндогенных ДНК-полимераз во фракциях РХ и ТАХ незначительны. В целом ДНК-полимеразная активность несколько выше во фракции ТАХ: тотальная — на 15 %; ДНК-полимеразы α — на 7,0 %; ДНК-полимеразы β — на 28,0 %. Повышение активности ДНК-полимеразы β в ТАХ по сравнению с РХ может быть связано с защитной реакцией клетки, обусловленной большей «открытостью» структуры ТАХ относительно РХ и, следовательно, большей вероятностью повреждения ТАХ.

Для сопоставления уровня синтеза ДНК во фракциях хроматина в условиях *in vivo* и *in vitro* проведены эксперименты, в которых определяли интенсивность включения ^3H -тимидина в ДНК РХ и ТАХ печени интактных крыс. Уровень синтеза ДНК (удельная радиоактивность, расп/мин на 1 мг ДНК) ($n=5$) во фракции РХ — 29682; ТАХ — 30912. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что по уровню синтеза ДНК в условиях *in vivo* данные фракции хроматина практически не различаются. Эти данные соответствуют примерно одинаковому

Таблица 1
Эндогенная РНК-полимеразная активность фракционированного хроматина печени интактных крыс (расп/мин на 1 мг ДНК) ($n=28$)

Фракция хроматина	Активность РНК-полимеразы		
	Тотальная	I	II
РХ	370875	88958	282047
ТАХ	2295728*	1003124*	1292711*

* $p < 0,01$ (по сравнению с РХ).

Таблица 2
Эндогенная ДНК-полимеразная активность фракционированного хроматина печени интактных крыс (расп/мин на 1 мг ДНК) ($n=28$)

Фракция хроматина	Активность ДНК-полимеразы		
	Тотальная	α	β
РХ	1590792	988712	600184
ТАХ	1828161	1061777	795487*

* $p < 0,01$ (по сравнению с РХ).

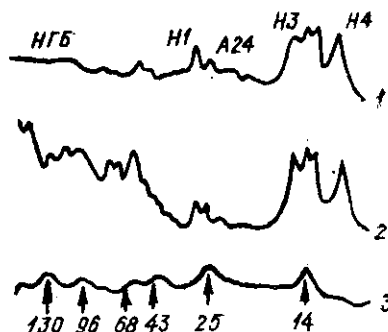
уровню тотальной ДНК-полимеразной активности в анализируемых фракциях (см. табл. 2).

Итак, изложенное выше подтверждает существование определенных различий в функциональной активности исследованных фракций хроматина. Прежде всего, они касаются уровня транскрипционной активности РХ и ТАХ. По всей вероятности, в основе специфики функциональной активности этих фракций лежат особенности их структурной организации. В данном случае структурную организацию фракционированного хроматина анализировали, основываясь на чувствительности ДНК к перевариванию эндо- и экзогенными ДНКазами (табл. 3). Из приведен-

Таблица 3
Нуклеолитическое расщепление (%) ^3H -ДНК фракций хроматина печени интактных крыс ($n=3$)

Обработка	РХ	ТАХ
Эндогенное самопереваривание	78,5	32,9*
ДНКаза I:		
5 мин, 21 °С	16,7	20,4
15 мин, 37 °С	76,4	80,2
S_1 -нуклеаза:		
без денатурации	0	32,7*
денатурация	15,2	79,7*

* $p < 0,05$ (по сравнению с РХ).



Электрофореграмма белков фракционированного хроматина печени интактных крыс: 1 — фракция РХ; 2 — фракция ТАХ; 3 — маркеры молекулярной массы белков ($\cdot 10^3$); НГБ — негистоновые белки, остальные обозначения — гистоновые белки хроматина

ных данных видно, что ДНК РХ обладает большей чувствительностью к перевариванию эндогенными нуклеазами по сравнению с ТАХ. Это может быть обусловлено либо особенностями структуры ДНК этих фракций, либо различиями в концентрации экзогенных нуклеаз. Результаты расщепления ДНК обеих фракций хроматина эндогенными нуклеазами показывают, что по чувствительности к ДНКазе I (переваривающей как одно-, так и двунитчатые участки ДНК) данные фракции хроматина не различаются. Это касается и щадящего (5 мин, 21 °С), и более жесткого (15 мин, 37 °С) переваривания. Интактная структура РХ не содержит однонитчатых последовательностей ДНК, чувствительных и к S_1 -нуклеазе. В ДНК ТАХ обнаружено определенное количество таких последовательностей. При денатурации изменение структуры обеих фракций хроматина приводит к открытию однонитчатых последовательностей, чувствительных к этому ферменту. Однако их количество больше в ТАХ по сравнению с РХ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о незначительности отличий интактной структуры ДНК между РХ и ТАХ. Это предположение подтверждается одинаковой степенью переваривания ДНК этих фракций экзогенными нуклеазами. Дифференциальная чувствительность ДНК РХ и ТАХ к экзогенным нуклеазам может быть обусловлена действием на ДНК хроматина других видов нуклеаз, отличных от ДНКазы I. Нельзя также исключить возможности влияния большей концентрации этих нуклеаз в структуре РХ по сравнению с ТАХ. Различия в интактной структуре ДНК РХ и ТАХ, по всей вероятности, не приводят к заметной разнице во включении ^3H -тимидина в ДНК этих фракций. Однако увеличенное количество однонитчатых последовательностей в интактной структуре ДНК ТАХ и еще большее их содержание в этой фракции по сравнению с РХ после денатурации могут иметь важное значение, например, определять дифференциальную чувствительность этих фракций к повреждающим факторам [5—7].

Для анализа белковой составляющей хроматина использовали несколько подходов. Важнейшей характеристикой структуры хроматина является соотношение белок/ДНК. Анализируемые фракции ядерного хроматина печени интактных крыс резко различаются по этому показателю ($n=32$): в РХ он равен 1,4; в ТАХ — 9,7 ($p < 0,01$ по сравнению с РХ). В обеих фракциях хроматина содержание белка превышает таковое ДНК, однако в РХ — в 1,4 раза; в ТАХ — в 9,7 раза. Фракция РХ содержит гораздо больше ДНК (1,0—1,5 мг/мл), чем ТАХ (0,2—0,4 мг/мл).

Известно, что в активно транскрибируемом хроматине основную массу белков составляют негистоновые белки, многие из которых являются либо непосредственными участниками процесса транскрипции (ферменты транскрипции) и репликации, либо их регуляторами, в то время как в репрессированном хроматине главной составной частью белкового компонента служат гистоны, молекулы которых наряду с нитями ДНК представляют собой основные компоненты, формирующие структуру нуклеосом [12—14]. В целом ТАХ, где процесс транскрипции протекает более интенсивно, чем в РХ, вероятно, содержит намного больше белков, требующихся для осуществления и регуляции этого процесса.

Можно ожидать, что различная структурная упаковка РХ и ТАХ будет оказывать влияние на процесс термоденатурации фракций хроматина. Структура РХ должна быть более конденсированной, в то время как ТАХ — более релаксированной (ввиду большей интенсивности процесса транскрипции). Отличия в белковом компоненте и спиральности этих фракций хроматина [12—14] также должны определенным образом сказываться на протекании процесса термоденатурации.

Явление термоденатурации хроматина основано на том, что с повышением температуры начинают денатурировать различные его компоненты, составляющие спиральную белково-нуклеиновую структуру. Это отражается величиной гиперхромного эффекта, регистрируемого спектрофотометрически. Анализ кривых термоденатурации позволяет также установить вклад различных ДНК-белковых взаимодействий в исследованных фракциях ядерного хроматина. Результаты такого анализа приведены в табл. 4, откуда следует, что имеются (хотя и не очень значительные) различия в характере процесса термоденатурации анализируемых фракций ядерного хроматина. Интегральная температура плавления несколько выше для фракции РХ, что в какой-то мере отражает более конденсированный характер упаковки этой фракции [12—14]. Тем не менее, величины подобного показателя достаточно близки для обеих фракций. Что касается вклада различных ДНК-белковых взаимодействий и плавления «чистой» ДНК в суммарный процесс термоденатурации, то здесь имеются существенные отличия меж-

Таблица 4

Параметры термоденатурации фракций РХ и ТАХ из печени интактных крыс (результаты типичного эксперимента)

Фракция хроматина	Интегральная температура плавления, °С	Температурные переходы ДНК (относительно общего гиперхромизма, %)					
		I	II	III	IV	V	VI
РХ	79,1	—	5	11	28	24	16
ТАХ	78,6	5	3	12	24	28	10

Примечание. I (50—60 °С) — плавление дестабилизированной ДНК; II (65—70 °С) — плавление свободной ДНК; III (71—75 °С) — плавление линкерной ДНК, умеренно стабилизированной ДНК-белковыми взаимодействиями с гистонами H1 и H3; IV (76—80 °С) — плавление коровой ДНК нуклеосом; V (81—85 °С) — плавление ДНК в участках интенсивного ДНК-гистонового взаимодействия; VI (85—98 °С) — плавление ДНК, стабилизированной структурными негистоновыми белками.

ду РХ и ТАХ. Это прежде всего относится к вкладу плавления дестабилизированной ДНК в общий гиперхромизм. Если в РХ вклад такого типа плавления в общий гиперхромизм отсутствует, то в ТАХ он составляет 5 %, что означает наличие ДНК указанного типа в ТАХ и отсутствие ее в РХ. Присутствие дестабилизированной ДНК является, по-видимому, важным фактором, определяющим повышенный уровень транскрипции в ТАХ. В РХ содержится несколько больше свободной ДНК, чем в ТАХ (II переход). Это соответствует данным о более упорядоченной нуклеосомной организации транскрипционно менее активной фракции ядерного хроматина [15]. Структура ДНК ТАХ тесно связана взаимодействиями с регуляторными негистоновыми белками, что приводит к снижению доли свободной ДНК. Вклад линкерной ДНК (III переход) в процесс плавления хроматина примерно одинаков в обеих фракциях. В отношении плавления тугоплавких компонентов хроматина (переходы IV—VI) показано, что суммарный их вклад в общий гиперхромизм составляет в РХ 68 %, в ТАХ — 62 %, т. е. первая фракция является несколько более тугоплавкой, чем вторая. Особенно существенные различия отмечаются в случае самого тугоплавкого компонента, связанного с плавлением ДНК, стабилизированной структурными негистоновыми белками. Вклад этого компонента в общий гиперхромизм составляет в РХ 16 %, в то время как в ТАХ — 10 %.

В целом фракция РХ — более тугоплавкая по сравнению с ТАХ, что, по всей вероятности, является одной из причин большей транскрибируемости последней. Однако в основном характер термоденатурации изученных фракций хроматина довольно сходен. Это может свидетельствовать о том, что упаковка структурных компонентов данных фракций хроматина имеет подобную природу, и за различный уровень транскрипции могут быть ответственными другие факторы, в частности, неодинаковые соотношения между различными типами и группами белков в изученных фракциях ядерного хроматина.

Выраженные отличия, наблюдающиеся между величинами соотношения белок/ДНК в анализируемых фракциях ядерного хроматина (см. выше), позволяют предположить наличие существенной разницы в электрофоретических спектрах белков между РХ и ТАХ. Результаты электрофоретического исследования компонентов фракционированного хроматина печени интактных животных приведены на рисунке, откуда вытекают следующие положения. Фракция РХ содержит типичный набор коровых гистонов и гистон H1, являющийся важнейшим структурным компонентом массы хроматина и препятствующий процессу транскрипции [16, 17]. В состав этой фракции хроматина входит малое количество негистоновых белков. Фракция ТАХ, полученная с помощью дополнительного озвучивания, значительно обогащена негистоновыми белками (ряд белков присутствует в эквимолярных с гистонами количествах), содержит структуры ядерного матрикса с зонами присоединения петель ДНК и ламино-поровый комплекс. В ее состав входят также ферменты — ДНК- и РНК-полимеразы, связанные с элементами ядерного матрикса [16, 17]. Обогащенность этой фракции негистоновыми белками и низкое содержание ДНК приводят к повышению (по сравнению с РХ) соотношения белок/ДНК.

Таким образом, анализ белкового состава фракций ядерного хроматина печени интактных крыс позволил выявить существенные отличия этого показателя в РХ и ТАХ, которые определяют, в основном, их различную функциональную активность.

Ионы металлов, содержащиеся в ядерном хроматине, являются важными составляющими генетического аппарата клетки, обеспечивающими структурную специфичность и различную функциональную активность его компонентов [18]. Общеизвестно значение ионов кальция как универсальных регуляторов клеточных функций [19], в том числе и генетической активности [20]. Кроме того, они принимают участие в структурной упаковке хроматина [21, 22]. Ионы переменной валентности (железа, меди, никеля, цинка), входящие в состав хроматина, иг-

рают важную роль в реакциях, протекающих с участием кислорода [23]. В настоящей работе определяли содержание ионов некоторых из этих металлов во фракциях РХ и ТАХ печени интактных крыс. Результаты этих исследований приведены в табл. 5, откуда следует, что количество ионов кальция приблизительно одинаково в обеих фракциях хроматина. Что касается ионов металлов переменной валентности, то их количество существенно выше во фракции ТАХ. Это подтверждает обнаруженные нами ранее различия в интенсивности и характере окислительно-восстановительных процессов во фракциях ядерного хроматина [24].

Известно, что в хроматине выявлена значительная АТРазная активность [10], коррелирующая с содержанием ионов Са и Mg как составных частей генетического аппарата клетки, а также с наличием системы местной энергообеспеченности репликации и транскрипции [17]. По-видимому, подобный факт может быть связан с известными энергозатратами, требующимися для протекания этих процессов в хроматине. Показана также роль циклических нуклеотидов в регуляции функциональной активности хроматина [9, 19]. Однако что касается их содержания в хроматине, то данные подобного рода в литературе отсутствуют, вероятно, ввиду чрезвычайно малых количеств этих внутриклеточных регуляторов в генетической субстанции клетки.

В табл. 6 приведены сведения об активности АТРаЗ и содержания сАМР в препаратах фракций хроматина. Видно, что по указанным параметрам фракции существенно не различаются. Тем не менее несколько меньшее содержание сАМР и сниженная активность Mg-АТРаЗы в ТАХ могут иметь важное функциональное значение. Однако для подтверждения этого предположения необходимы специальные исследования.

Ранее нами были получены данные, указывающие на существование липидного бислоя во фракциях РХ и ТАХ печени интактных крыс [25]. Для анализа составных частей липидного компонента фракционированного хроматина проведено исследование его фосфолипидного состава и входящих в фосфолипиды жирнокислотных остатков, что необходимо для выяснения действия механизмов липопереокисления в хроматине [26]. Результаты подобного исследования свидетельствуют о том, что общее содержание фосфолипидов во фракциях хроматина печени интактных крыс (нмоль/мг белка, $n=4$) составляет в РХ — 28,0; в ТАХ — 68,0 ($p < 0,05$ по сравнению с РХ). Из этого следует, что фракция ТАХ включает несколько большее количество фосфолипидов по сравнению с РХ. Входящие в состав фосфолипидов остатки ненасыщенных жирных кислот являются субстратами для реакций липопереокисления, в результате которых наблюдается образование свободных радикалов и повреждение хроматина [9, 26].

Результаты определения жирнокислотного состава фракций РХ и ТАХ в печени интактных крыс (табл. 7, 8) подтверждают тот факт, что в состав обеих фракций хроматина входят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, причем относительное количество последних вы-

Таблица 5
Содержание ионов металлов во фракциях хроматина печени интактных крыс (мкг/мг белка) ($n=6$)

Фракция хроматина	Ca	Fe	Cu
РХ	52,2	1,3	2,5
ТАХ	61,8	2,5*	4,9*

* $p < 0,05$ (по сравнению с РХ).

Таблица 6
АТРазная активность (мкмоль Φ_n /мг белка) и содержание сАМР (нмоль/мг белка) во фракциях хроматина печени интактных крыс ($n=9$)

Фракция хроматина	АТРазная активность			Содержание сАМР
	Общая	Mg-зависимая	Ca-зависимая	
РХ	1,415	1,310	0,105	0,0751
ТАХ	1,216	1,100	0,116	0,0591

ше во фракции ТАХ. Эта разница обусловлена повышенным содержанием линолевой и арахидоновой кислот, являющихся, как известно, основными субстратами липопереокисления [26]. Возможно, что различия в жирнокислотном составе РХ и ТАХ могут быть связаны с уровнями их транскрипционной активности.

Следовательно, исследованные фракции ядерного хроматина содержат определенное количество фосфолипидов и их ненасыщенных жирнокислотных остатков. Количество этих структурных компонентов генетического аппарата и субстратов реакций липопереокисления несколько выше во фракции ТАХ, что согласуется с обнаруженным ранее более высоким уровнем реакций ПОЛ в этой фракции хроматина [24].

Таким образом, представленные в настоящей работе сведения позволяют заключить следующее. Использован набор тестов, с помощью которых можно оценить в первом приближении структурно-функциональное состояние фракций РХ и ТАХ. В результате показано существование принципиальных различий в функциональной активности и структурной организации исследованных фракций ядерного хроматина. Прежде всего это касается уровня транскрипционной активности [5]. Уровень эндогенного синтеза РНК, измеренный в условиях *in vitro*, свидетельствует о том, что этот процесс протекает намного интенсивнее во фракции ТАХ. Возможно, это обусловлено обнаруженными нами существенными различиями в белковом и липидном составе и структурной организации этих компонентов хроматина. По ряду характеристик (уровень синтеза ДНК, характер процесса термоденатурации, чувствительность ДНК к эндонуклеолитическому расщеплению) отличия между фракциями носят более умеренный характер. То есть эти данные показывают, что, очевидно, разный уровень транскрипционной активности исследованных фракций хроматина печени интактных крыс обусловлен, в основном, изменениями белкового и липидного компонентов хроматина (прежде всего, концентрацией РНК-полимераз). Тем не менее, нельзя исключить вероятности того, что различия в показателях, характеризующих состояние ДНК во фракциях, вносят заметный вклад в уровень их транскрипционной активности.

Приведенные данные о состоянии липидного компонента хроматина во фракциях РХ и ТАХ указывают также на принципиальную возможность протекания реакций ПОЛ в изученных фракциях ядерного хроматина печени [24], являющихся одним из возможных механизмов повреждения генетического аппарата клетки и основных его компонентов [5—7, 9]. Существует также вероятность того, что уровень реакций ПОЛ в хроматине может определенным образом влиять на его транскрипционную активность по аналогии с обнаруженным ранее нами влиянием этих реакций на ДНК-полимеразную активность РХ и ТАХ [27].

Таблица 7
Относительное содержание жирных кислот (%) во фракциях хроматина печени интактных крыс (n=8)

Жиры кислоты	РХ	ТАХ
Насыщенные	54,4	40,9*
Ненасыщенные	45,6	59,1*

* $p < 0,05$ (по сравнению с РХ).

Таблица 8
Содержание ацильных остатков липидов (%) во фракциях хроматина печени интактных крыс (n=4)

Ацильные остатки липидов	РХ	ТАХ
12:0	—	0,2
14:0	1,2	0,9
15:0	—	0,1
16:0	49,6	33,7
16:1; 7**	1,4	0,9
18:0	17,5	15,1
18:1; 9**	18,9	10,9
18:2; 6**	8,5	30,4*
20:4; 6**	2,8	7,4*

* $p < 0,05$ (по сравнению с РХ); ** положение атома углерода с первой двойной связью.

Резюме. Охарактеризовано фракції транскрипційно активного та репресованого хроматину печінки інтактних щурів. Різницю у транскрипційній активності між фракціями обумовлено, скоріш за все, розбіжностями у білковому компоненті хроматину, а саме: збільшеною концентрацією РНК-полімераз в активному хроматині. Показники синтезу ДНК *in vivo* та *in vitro*, процесу термоденатурації, чутливості фракцій до ендотекзогенних ДНКаз різняться незначно, що дозволяє припустити подібність укладання структури ДНК у транскрипційно активному та репресованому хроматині. Крім того, можливо, що розбіжності у фосфоліпідному та жирнокислотному складі між фракціями здатні зумовити участь ліпідів хроматину у реалізації його генетичної активності.

Summary. The intact rat liver transcriptionally active and repressed chromatin fractions have been characterized. The transcriptionally activity differences between the fractions may be conditioned by distinctions in the chromatin protein component, that is increased RNA-polymerases concentration in active chromatin. Differences between *in vivo* and *in vitro* DNA synthesis, thermodenaturation process and susceptibility to endo- and exogenous DNA-ases are insignificant and so it may be thought the DNA structure similarity in active and repressed chromatin. Moreover it may be thought that differences between phospholipid and fatty acids fractions compositions may be a cause of the chromatin realization of its genetic activity.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Студитский В. М., Белявский А. В., Мельников А. Ф. и др. Структура минимальных нуклеосом, расположенных на транскрибируемых участках генома // Молекуляр. биология.— 1988.— 22, № 3.— С. 706—717.
2. Reeves R. Transcriptionally active chromatin // Biochim. et biophys. acta.— 1984.— 782, N 2.— P. 343—393.
3. Reeves R., Jones A. Genomic transcriptional activity and the structure of chromatin // Nature.— 1976.— 260, N 5551.— P. 495—500.
4. Чихиржина Г. И., Домкина Л. К., Чигарева Н. Г. и др. Солюбилизация хроматина эндогенным Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимым фактором. Активность труднорастворимого хроматина // Молекуляр. биология.— 1976.— 10, № 6.— С. 1303—1310.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабаный В. Н. и др. Перекисное окисление липидов и параметры термоденатурации фракций хроматина печени крыс // Укр. биохим. журн.— 1990.— 62, № 2.— С. 76—82.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Волков Г. Л. Жирнокислотный состав фракций хроматина печени крыс в условиях стимуляции перекисного окисления липидов // Там же.— 1991.— 63, № 1.— С. 87—91.
7. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Жила В. А. и др. Молекулярные механизмы повреждения фракционированного хроматина печени тетрахлорметаном // Вопр. мед. химии.— 1992.— 38, № 3.— С. 54—58.
8. Аншарин И. П., Васильев Н. Н., Албросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.— 78 с.
9. Левицкий Е. Л., Губский Ю. И. Регуляторное влияние ионов кальция и циклических нуклеотидов на синтез ДНК в клетках млекопитающих // Биохимия животных и человека.— 1990.— № 14.— С. 33—44.
10. Збарский И. Б. Организация клеточного ядра.— М.: Медицина, 1988.— 368 с.
11. Храпунов С. Н., Драган А. И., Бердышев Г. Д. Структура и функции хроматина.— Киев: Вища шк., 1987.— 167 с.
12. Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки.— М.: Мир, 1981.— 600 с.
13. Кучеренко Н. Е., Цудзевич Б. А., Блюм Я. Б. Биохимическая модель регуляции активности хроматина.— Киев: Наук. думка, 1983.— 248 с.
14. Льюин Б. Гены.— М.: Мир, 1987.— 544 с.
15. Elgin S. C. Workshop on chromosome structure and gene expression // Meeting Rev.— 1990.— P. 2—12.
16. Elgin S. C. Chromatin structure and gene activity // Curr. opinion in cell biol.— 1990.— 2.— P. 437—445.
17. Корнберг А. Синтез ДНК.— М.: Мир, 1977.— 359 с.
18. Иванов В. И. О роли металлов в дезоксирибонуклеиновой кислоте // Биофизика.— 1965.— 10, № 1.— С. 11—16.
19. Whitfield J. F., Boynton A. L., MacManus J. P. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP // Mol. and Cell. Biochem.— 1979.— 27, N 3.— P. 155—179.
20. Sikorska M., Belle I., Whitfield J. F. et al. Regulation of the synthesis of DNA polymerase α in regenerating liver by calcium and 1,2,5-dihydroxy vitamin D_3 // Biochem. and Cell. Biol.— 1989.— 67, N 7.— P. 345—351.
21. Lebkowsky J. S., Laemmli U. K. Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei // J. Mol. Biol.— 1982.— 156, N 2.— P. 309—324.

22. Lebkowsky J. S., Laemmli U. K. Non-histone proteins and long-range organization of HeLa interphase DNA // *Ibid.*— P. 325—344.
23. Shires T. K. Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei // *Biochem. J.*—1982.—205, N 2.— P. 321—329.
24. 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.
25. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // *Укр. биохим. журн.*—1991.—63, № 2.— С. 83—89.
26. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.—252 с.
27. 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.

Ин-т фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев
 Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев
 НИИ геронтологии АМН Украины, Киев

Получено 30.03.93

УДК 577.161.2:577.112.828

Л. Б. Бондаренко

СВОЕОБРАЗИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ВИТАМИНА D₃

В обзоре обобщены экспериментальные результаты изучения своеобразия биологических эффектов основных метаболитов витамина D₃ — 1,25-диоксивитамина D₃ и 24,25-диоксивитамина D₃. Рассмотрены вопросы синергизма и антагонизма их действия в организме и в отдельных клетках-мишенях. Проанализированы данные о зависимости характера биологического эффекта каждого из производных от его дозы и физиологического состояния клетки.

Открытие и изучение метаболитов витамина D₃ коренным образом изменило научные представления о его действии на организм. Выяснилось, что 1,25-диоксивитамин D₃ (1,25(OH)₂D₃) и 24,25-диоксивитамин D₃ (24,25(OH)₂D₃) — основные активные формы витамина, в виде которых проявляется его биологический эффект [1]. Дальнейшее исследование их антирахитической активности выявило ключевую роль 1,25(OH)₂D₃ в регуляции гомеостаза Ca.

Традиционно эффект соединений D-витаминного ряда связывали исключительно с обеспечением минерального обмена и формированием скелета. В связи с этим внимание исследователей вначале было сконцентрировано на участии основных метаболитов витамина D в регуляции обмена кальция. Однако в последующем изучение данных соединений показало, что в организме они способны регулировать пролиферацию и дифференциацию самых различных клеток (в том числе клеток иммунной системы) и совершенно необходимы для нормального течения процессов эмбриогенеза, цитодифференцировки, гемопоэза, формирования иммунной системы и скелета организма, поддержания его гормонального статуса [1].

С развитием представлений о значении соединений D-витаминной природы в организме эволюционировали и взгляды исследователей на биологическую роль его основных метаболитов — 1,25(OH)₂D₃ и 24,25(OH)₂D₃. Пока изучение ограничивалось областью кальциевого обмена, преобладало мнение, что 24,25(OH)₂D₃ не присуща самостоятельная биологическая функция и он может рассматриваться как первый

© Л. Б. Бондаренко, 1993