



УДК 612. 44. 312

СИНТЕЗ ДНК В НЕОКОРТЕКСЕ РАЗВИВАЮЩИХСЯ КРЫС

ИВАНОВ В. А.

Институт биологической физики АН СССР, Пуцзино

Исследовали синтез ДНК в неокортексе новорожденных, 14-суточных и 60-суточных крыс, используя *in vitro* изолированные срезы и определяя включение меченого предшественника в ДНК. Суммарный синтез ДНК в тотальных клетках неокортекса резко падает в первые 2 недели постнатального развития, затем постепенно уменьшается. Синтез ДНК в этих же клетках в присутствии оксимочевинки характеризуется низким уровнем, но в клетках 60-суточных крыс его величина на 70% выше, чем в таких же клетках новорожденных животных. Синтез ДНК в нейронах всех исследованных возрастных групп крыс в присутствии оксимочевинки не изменяется. Обсуждаются особенности синтеза ДНК в клетках неокортекса.

Уровень синтеза ДНК в коре головного мозга в постнатальный период онтогенеза строго зависит от вида и возраста животных и обусловлен, в основном, двумя биологическими процессами: репликацией и репарацией ДНК [1, 2]. В первые недели после рождения крыс в неокортексе происходит интенсивное деление и формирование популяций ганглиальных клеток—астроцитов и олигодендроцитов, что сопровождается активным репликативным синтезом ДНК. В этот период при использовании различных экспериментальных моделей наблюдается высокий уровень включения меченого предшественника в ДНК клеток мозга [3—5]. В то же время сохранение функциональной целостности генома обеспечивает репаративный синтез ДНК [6]. Этот процесс, очевидно, имеет особое значение для нейронов неокортекса, которые не способны к редупликативному синтезу ядерной ДНК, связанному с делением клетки, после рождения животного [7]. Более того, репарация ДНК, по-видимому, функционально вписана в сложнейший механизм ДНК-координации клеточных процессов и может принимать участие в обеспечении высших функций головного мозга [8, 9].

Немногочисленные данные о синтезе ДНК в клетках головного мозга получены большей частью в экспериментах *in vivo* [3, 5]. Однако использование такой экспериментальной модели затрудняет определение природы синтеза ДНК и делает безуспешным и неадекватным изучение влияния биологически активных веществ—модификаторов этого

процесса. Указанные трудности могут быть преодолены благодаря применению метода переживающих срезов [10].

Недавно был обнаружен репаративный синтез ДНК *in vivo* в неокортексе после γ -облучения крыс и найдены некоторые, по-видимому, тканеспецифические особенности этого процесса [11]. В данной работе представлены результаты исследований синтеза ДНК в клетках неокортекса *in vitro*, которые получены при использовании метода переживающих срезов.

Материалы и методы

Использовали крыс-самцов линии *Wistar* трех возрастных групп: новорожденных, 14- и 60-суточных. Срезы неокортекса толщиной 0,2—0,3 мм препарировали и инкубировали по стандартной методике [12]. Для одного определения 0,5 г (новорожденные), 1,0 г (14-суточные) или 7—8 г (60-суточные животные) ткани неокортекса, приготовленной в виде срезов, делили на две порции и преникубировали 20 мин в бикарбонатном (рН 7,4) буфере Кребса-Рингера (4 мл/г ткани) при 37° в присутствии 10 мМ оксимочевины («Sigma», США) для ингибирования репликативного синтеза ДНК или без нее. Препарат метил- ^3H тимидина («Изотоп», СССР) добавляли из расчета 200 КБк на 1 мл среды и инкубировали в течение 2 ч. Реакцию останавливали, добавляя инкубационную смесь холодным раствором 1 мМ фосфата калия (рН 6,5) с 2 мМ MgCl_2 , 0,32 М сахарозы и центрифугировали. Затем дважды промывали ткань в этом же растворе, собирая осадок центрифугированием. Для определения удельной радиоактивности ДНК тотальных клеток неокортекса из каждой порции отбирали по ~ 20 , ~ 50 или ~ 100 мг ткани новорожденных, 14- или 60-суточных животных соответственно, в зависимости от установленного содержания ДНК [5]. Из оставшейся ткани выделяли ядра нейронов по методу Knüsel и соавт. [12] с небольшими модификациями, как описано ранее [13]. Количество ядер нейронов во фракциях, определенное методом фазово-контрастной микроскопии, превышало 90%. Чтобы дополнительно оценить чистоту нейрональных ядер, использовали известный факт, что нуклеосомная единица хроматина кортикальных нейронов в течение первой недели постнатального развития крыс сокращается до 160—170 пар оснований ДНК по сравнению с неизменными 200 парами оснований ДНК, характерными для нуклеосомы глиальных клеток [14]. В результате анализа нейрональных фракций 14- и 60-суточных животных была получена величина 166 ± 6 , которая позволила оценить чистоту этих фракций также выше 90%. ДНК из тотальных клеток или ядер нейронов выделяли по методу Шмидта-Танигаузера в известной модификации [15]. Удельную радиоактивность (в имп/мин \cdot мг $^{-1}$ ДНК) определяли в 1 мл гидролизата ДНК на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция) в 10 мл сцинтилляционной жидкости («Unisolve—Koch Light LTD», Англия). Концентрацию

ДНК в гидролизате определяли спектрофотометрически [16]. Чтобы определить общую радиоактивность пула предшественников ДНК в ядрах клеток инкубированных срезов, тотальные ядра выделяли методом Austoker и соавт., как описано ранее [17], гидролизовали в 0,5 н. HClO_4 и после центрифугирования измеряли радиоактивность в супернатанте, как описано выше. Для контроля условий эксперимента использовали печень 60-суточных животных. Срезы ткани печени инкубировали так же, как срезы неокортекса; ядра выделяли, как описано ранее [17], радиоактивность ДНК или общую радиоактивность пула предшественников ДНК в ядрах определяли так же, как в клетках неокортекса.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по включению [^3H]тимидина в ДНК неокортекса животных трех возрастных групп. Суммарный синтез ДНК в клетках 14-суточных животных резко уменьшается (в 4—5 раз) по сравнению с новорожденными. Этот результат находится в соответствии с данными, полученными другими авторами при изучении синтеза ДНК *in vitro* в клетках головного мозга [4].

Таблица 1

Синтез ДНК в тотальных клетках неокортекса			
Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность ДНК (имп./мин. мг ⁻¹ ДНК) · 10 ⁻³		
	возраст животных (сутки)		
	0	14	60
—	331 ± 13,0	77,7 ± 3,4	31,1 ± 1,2
+	13,5 ± 0,8	18,2 ± 0,7 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	22,7 ± 0,9 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Ингибирование синтеза в присутствии оксимочевины (%)	96	77	23

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние данные из 4-х независимых экспериментов: p_1 —достоверность различия данных по сравнению с отмеченными¹, p_2 —достоверность различия данных по сравнению с отмеченными².

Уменьшение включения меченого предшественника в ДНК мозга в экспериментах *in vivo* в процессе развития животных является установленным фактом, который объясняется падением митотического индекса клеток [3, 5]. Несмотря на принципиальное различие экспериментальных моделей, следует заметить, что в эксперименте *in vivo*, с учетом кинетики включения [^3H] тимидина после внутривенной инъекции предшественника, удельная радиоактивность тотальной ДНК неокортекса 14-суточных крыс была также ~ в 2 раза выше по сравнению с

60-суточными животными [11], как и в описываемых здесь экспериментах *in vitro*. Такие результаты предполагают хорошее соответствие модели «переживающий срез» процессам синтеза ДНК *in vivo*. Синтез ДНК в этих же клетках в присутствии оксимочевинной—избирательного ингибитора, репликации—характеризуется невысоким уровнем (табл. 1). Этот синтез можно назвать репаративным спонтанным синтезом ДНК в противоположность репаративному индуцированному синтезу. Последний, как известно, инициируется, в основном, экзогенными физическими или химическими факторами, повреждающими ДНК [6]. Репаративный спонтанный синтез обусловлен, по-видимому, рядом причин: а) репарацией спонтанных повреждений ДНК, уровень которых *in vivo* достаточно высок [18]; б) репарацией радиационных повреждений ДНК, вызванных действием изотопа, носителем которого является меченый предшественник [19]; в) дополнительным репаративным синтезом, который может быть индуцирован процедурами приготовления и «переживания» изолированных срезов. Последний имеет место, например, в процессе получения ядер клеток и зависит от процедур их выделения и сохранения [20]. Оценивая долю репаративного спонтанного синтеза в общем синтезе ДНК в процессе онтогенеза, естественно наблюдать ее увеличение, обусловленное падением митотического индекса клеток неокортекса: 4% (новорожденные), 23% (14-суточные) и 77% (60-суточные животные). Иными словами, оксимочевина ингибирует общий синтез ДНК *in vitro* в клетках неокортекса новорожденных крыс на 96%, а 60-суточных животных—на 23% (табл. 1). Здесь также можно привести данные литературы, которые позволяют оценить адекватность используемой экспериментальной модели. Так, в экспериментах *in vivo* показано, что в первые дни постнатального развития оксимочевина, введенная внутривентриально, ингибирует общий синтез ДНК в клетках мозга более чем на 90% [21].

Чтобы проверить, не обусловлена ли возрастная зависимость включения тимидина в ДНК различиями в доступной концентрации предшественника, измеряли радиоактивность пула кислоторастворимых предшественников ДНК во фракциях общих ядер (табл. 2). В указанных фракциях заметных различий между необработанными и обработанными оксимочевинной срезами не обнаружено. Можно лишь указать на слабое уменьшение проницаемости ядерной мембраны для меченого предшественника, сопровождающее процесс развития. Результат говорит о том, что выявленные различия в синтезе ДНК не являются следствием нарушения проницаемости мембран клеток для [³H] тимидина в процессе развития или под действием оксимочевин.

Поскольку в коре головного мозга представлены популяции нескольких классов клеток, различающихся уровнем или типом синтеза ДНК, представлялось целесообразным изучение общего и репаративного синтеза ДНК в клетках отдельного класса. При исследовании отдельных клеток неокортекса было обнаружено, что синтез ядерной

ДНК в нейронах характеризуется низким уровнем и небольшими вариациями абсолютных величин в процессе развития животных (табл. 3). Следует подчеркнуть, что этот процесс в нейронах всех исследованных возрастных групп крыс и клетках печени 60-суточных животных не изменялся в присутствии оксимочевины. Такой результат соответствует известному представлению об отсутствии репликативного синтеза ядерной ДНК в постнатальных нейронах неокортекса крыс [1]. В нормальной печени взрослого животного митотический индекс клеток, как известно, гораздо меньше 0,01 [22]. Даже если митотический индекс клеток печени 60-суточных крыс больше этой величины в несколько раз, общий синтез ядерной ДНК таких клеток в условиях эксперимента будет практически полностью обусловлен репаративным спонтанным син-

Табл. 2

Концентрация [³H]меченых предшественников ДНК в ядерных фракциях неокортекса и печени крыс

Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность (имп./мин. · мг ⁻¹ ДНК) · 10 ⁻³			
	Неокортекс		Печень	
	возраст животных (сутки)			
	0	14	60	60
-	72,33 ± 2,84	68,77 ± 5,46	59,86 ± 2,30	65,10 ± 1,89
+	71,63 ± 2,81	70,96 ± 3,28 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	60,59 ± 1,86 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01	64,25 ± 1,93

тезом. Такое объяснение, по-видимому, находится в соответствии с полученным результатом. Здесь следует заметить, что в тотальных клетках неокортекса 60-суточных крыс репликативный (чувствительный к оксимочевине) синтез составляет 23% от общего синтеза ДНК (табл. 1). Поэтому можно предполагать, что средний митотический индекс клеток неокортекса 2-месячных крыс выше, чем клеток печени. Такой факт косвенно подтверждают данные, полученные при анализе электрофоретических наборов клеточных белков в процессе развития крыс, которые показывают, что изменения в метаболизме ядерных белков мозга могут продолжаться до 3-месячного возраста животных [23]. В соответствии с этим можно предполагать, что развитие интегративной функции головного мозга в онтогенезе обуславливает более продолжительный (по сравнению с временем созревания клеток других тканей) процесс формирования функционирующих популяций клеток неокортекса.

Интересно отметить некоторое увеличение репаративного спонтанного синтеза ДНК в процессе развития животного: в тотальных клетках неокортекса на 68% в течение 60 суток постнатального онтогенеза (табл. 1), в нейронах — на 48 и 60% (в присутствии оксимочевины и

Синтез ДНК в ядрах нейронов неокортекса и клеток печени крыс

Оксимочевина (10 мМ)	Радиоактивность ДНК (имп/мин·мг ⁻¹ ДНК)·10 ⁻³			
	Нейроны		Гепатоциты	
	возраст животных (сутки)			
	порожденные	14	60	60
—	1.19±0.08	1.52±0.07	1.90±0.10	14.6±0.6
+	*1.28±0.06	1.40±0.08 p>0,5	1.90±0.09 p<0.001	14.0±0,5

Примечание. Представлены средние данные из 4-х независимых экспериментов. Приведена достоверность различия данных по сравнению с отмеченными*. Различия данных, полученных в присутствии оксимочевины и без нее статистически не достоверны.

без нее соответственно) в этот же период развития (табл. 3). Такой факт, по-видимому, может отражать известное очень интенсивное накопление повреждений ДНК в клетках головного мозга в процессе онтогенеза [24], которое обусловлено, как можно предполагать, тканеспецифическими особенностями структуры хроматина [16] и систем репарации ДНК [1, 25].

Автор выражает благодарность Тирасу Х. П. и Сельвян А. М. (Институт биологической физики АН СССР), а также Мельникову А. А. и Швецову Ю. П. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР) за участие в постановке экспериментов и техническое обеспечение данной работы.

DNA SYNTHESIS IN NEOCORTEX OF DEVELOPING RATS

IVANOV V. A.

Institute of Biological Physics, Academy of Science of the USSR,
Poustchino

DNA biosynthesis was studied in vitro in neocortex of newborn (0-day), 14-day and 60-day old rats using isolated slices and determining the incorporation of ³H-thymidine into DNA. DNA biosynthesis in total cells of neocortex declines drastically till the 2nd week of post-natal development and then plateaus gradually. In the presence of hydroxyurea the level of DNA synthesis in these cells is low, but in 60-day old rats is 70% higher than in newborn rats. Biosynthesis of neuronal DNA in the presence of hydroxyurea in all age groups studied is not changed. Specificities of DNA biosynthesis in neocortex are discussed.

1. Иванов В. А., Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол., т. 101, с. 174—187, 1986.
2. Ресаников К. Ю. Пролиферация клонков головного мозга позвоночных в условиях экспериментального развития мозга и при его травме, М., Наука, 1981.
3. Третьяк Т. М., Виленичк М. М., Терпиловская О. Н., Тирас Н. Ф. Докл. АН СССР, т. 228, с. 749—751, 1976.
4. Surakar P. C., Kaulingo M. S. Biochem Int., v. 5, p. 381—388, 1982.
5. Витвицкая А. В., Бикбулатова А. С., Яблочков А. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 20, с. 614—616, 1984
6. Жестяников В. А. Репарация ДНК и ее биологическое значение, Л., Наука, 1979.
7. Altman J.—In: Handbook of neurochemistry, v. 2, p. 137—182, Plenum Press N. Y., 1969.
8. Ашапкин В. В., Романов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, т. 48, с. 355—362, 1983.
9. Васильев В. К., Месерсон Ф. Э. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 63—64, 1982.
10. Переживающий срез мозга (под ред. М. И. Митюшов), Л., Наука, 1986.
11. Иванов В. А., Терпиловская О. Н., Куликов А. В., Третьяк Т. М. Цитология, т. 29, с. 73—78, 1987.
12. Knüsel A., Lehner B., Kuenzle C. S., Kister G. S. J. Cell Biol., v. 59, p. 762—765, 1973.
13. Иванов В. А., Мельников А. А. FEBS Lett., v. 177, p. 300—304, 1984.
14. Molecular approaches of neurobiology (ed. I. R. Brown). N. Y.—L.—Toronto—Sydney—San Francisco, Acad. Press, 1982.
15. Орлов А. С., Орлова Е. И. Биохимия, т. 26, с. 834—838, 1961.
16. Спиринов А. С. Биохимия, т. 23, с. 656—660, 1958.
17. Иванов В. А., Газиев А. И., Третьяк Т. М. Eur. J. Biochem., v. 133, p. 517—522, 1983.
18. Lindahl T., Nyberg B. Biochemistry, v. 11, p. 3610—3618, 1972.
19. Hobi R., Kuenzle C. Neurosci. Lett., v. 58, p. 311—314, 1985.
20. Inoue N., Ono T., Kato T. Biochem. J., v. 180, p. 471—480, 1979.
21. Vilenchik M. M., Tretiyak T. M. J. Neurochem., v. 29, p. 1159—1161, 1977.
22. Бродский В. Я., Уривасва И. В. Клеточная поликлонация. Пролиферация и дифференцировка, М., Наука, 1981.
23. Терпиловская О. Н., Иванов В. А., Абрамова Э. И., Бслова М. М. Нейрохимия, т. 2, с. 164—173, 1983.
24. Inoue N., Kato T. J. Neurochem., v. 34, p. 1574—1583, 1980.
25. Heyting C., Veer L. Carcinogenesis, v. 2, p. 1173—1180, 1981.

Поступила 19. III 1987