

УДК 547, 963.3.

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян,
Р. А. Захарян, Дж. В. Гарибян, В. Т. ГалфаянВлияние дексаметазона на уровень метилирования
ДНК разных отделов головного мозга

(Представлено 10/XI 1972)

Функциональное и биологическое значение метилирования ДНК на сегодня полностью не выяснено. Определенное таксономическое значение этого замещения установлено Белозерским А. Н. и Ванюшиным Б. Ф. (1). Ларк указывает на роль метилирования в механизме репликации и регуляции транскрипции. Тканевая специфичность ДНК по 5-СН₃-цитозину (Б. Ф. Ванюшин (1), В. К. Васильев и др. (2)) — также может трактоваться в пользу подобных представлений. Специфичность метилирования рассматривается и как основа некоторых механизмов узнавания, например, в случае рестрикционной модификации ДНК.

На изменение уровня метилирования ДНК в зависимости от функционального состояния клеток указывает уменьшение 5-СН₃-цитозина в ДНК соматических клеток по мере полового созревания и нерестовой миграции горбуши (3,4); уменьшение 5-СН₃-цитозина в ДНК тканей у крыс при старении; уменьшение уровня метилирования ДНК печени молодых крыс под влиянием хронического воздействия гидрокортизона (5).

Данное исследование посвящено изучению количественных сдвигов 5-СН₃-цитозина ДНК разных отделов мозга под влиянием аналога преднизолона, дексаметазона.

Как известно, дексаметазон ингибирует выход АКТГ из гипофиза в кровь, вероятно, задерживая поступление рилизинг гормона из гипоталамуса в аденогипофиз. Введение его животным различными путями: непосредственно в обе доли аденогипофиза по 1 мкг на долю, внутривенно и внутрикаротидно, внутривнутрибрюшинно, приводит к резкому снижению уровня АКТГ в плазме крови, аналогично изменению, наступающему у гипофизэктамированных животных.

Нейрохимические механизмы, осуществляющие это ингибирование, по всей вероятности, связаны с ингибирующим эффектом повышенных концентраций кортикостероидов на обменные процессы мозговой ткани.

В опыте использованы собаки 1—2 лет обоих полов. Суспензия дексаметазона, приготовленная на 0,9% NaCl, содержащем Твин—80—0,4%; карбоксиметилцеллюлозу—0,5%; бензилалкоголь—0,5%, вводилась собакам внутривенно из расчета: 25 мкг на 100 г веса животного. Собак декапитировали спустя четыре часа после введения дексаметазона.

Препараты ДНК выделяли по следующей прописи. Свежие ткани из разных отделов головного мозга (коры больших полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) гомогенизировали на холоду (0—4°) в 0,15M NaCl, содержащем 0,01M цитрат натрия, 0,015M ЭДТА, 1,5% SDS, pH 8,5.

К гомогенату добавляли 1/4 объема 5M NaCl и равный объем хлороформа. Суспензию встряхивали 15 минут и центрифугировали 30 минут при 2000 об/мин. Водный слой аккуратно отсасывали и добавляли к нему 1/9 объема смеси ацетата+ЭДТА и равный объем изопропилового спирта. Полученную ДНК растворяли в дистиллированной воде, затем добавляли 1/9 объема 5M NaCl и равный объем смеси свежеперегнанного водонасыщенного фенола, содержащего 0,01% 8-оксихинолина и хлороформа (5:1). Суспензию встряхивали 90 мин и центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. Затем проводили еще несколько хлороформных депротенизаций и из прозрачного водного раствора осаждали ДНК добавлением 1/9 объема смеси ацетат+ЭДТА и равного объема изопропилового спирта. Для удаления примесей РНК выделенные препараты ДНК обрабатывали предварительно прогретой при 85° РНК-азой и продукты гидролиза отделяли путем осаждения ДНК изопропанолом по методу Мармура.

Затем, ДНК многократно промывали 70—96% этанолом, эфиром и высушивали в термостате при 100—105° 30 мин. Нуклеотидный состав ДНК определяли после кислотного гидролиза 85%-ной муравьиной кислотой при 175°, 30 мин методом хроматографии на бумаге в системе (бутанол—вода—аммиак 60:10:0,1).

Плавление ДНК: ДНК растворяли в 0,1M SSC так, чтобы плотность не превышала 0,4 Е. Д. Плавление проводили на спектрофотометре «Уникем Р—800» в термостатированных кюветах.

Коэффициент седиментации препаратов ДНК ($S_{20, \omega}$) определяли в 0,1M SSC при плотности не выше 0,8 Е. Д. на ультрацентрифуге «Spinco» при 40000 об./мин.

Как было нами ранее показано (2) ДНК отдельных участков мозга крупного рогатого скота различаются по содержанию метилированного цитозина. Мы допустили возможность, что эти различия отражают дифференцировку и конкретно определенное функциональное состояние генома клеток нервной ткани.

Изучение уровня 5—CH₃—цитозина ДНК мозга собак выявило, что по содержанию 5—CH₃ цитозина ДНК разных отделов так же отличаются друг от друга, и кроме того, значительно разнятся от ДНК тех же отделов мозга крупного рогатого скота (табл. 1).

К сожалению, на сегодня нет возможности однозначной трактовки полученных различий. Можно лишь полагать, что эти различия явля-

ются отражением видовых различий, дифференциации и функционального состояния. В этом смысле представляют интерес данные Б. Ф. Ваюшина и др., которые приводят три разные величины уровня метилированного цитозина селезеночной ДНК трех быков: 1,07; 1,39; 1,66 мол%, что может расцениваться, по всей вероятности, как отражение определенной функциональной активности органа.

Мы попытались обнаружить функциональную зависимость в содержании метилированного цитозина в ДНК разных отделов головного мозга у собак от уровня кортикостероидов в организме.

Рядом авторов изучалось влияние кортикостероидов при гиперкортицизме на развитие центральной нервной системы в периоде раннего постнатального роста.

Было показано подавление активных синтетических процессов в мозге: уменьшение числа нервных и глиальных клеток, снижение уровня синтеза РНК.

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК некоторых участков мозга собаки и крупного рогатого скота (мол.%)

Основания	Полушария		Мозжечок		Продолговатый мозг	
	собака	корова	собака	корова	собака	корова
Г	22,4	22,7	21,8	22,5	21,7	22,3
Ц	20,8	21,2	20,5	20,9	20,3	21,1
5МЦ	1,33	1,63	1,26	1,55	1,34	1,45
А	28,5	27,3	28,2	27,7	28,3	27,6
Т	28,0	27,2	27,5	27,4	27,5	27,5

Таблица 2

Нуклеотидный состав ДНК некоторых участков мозга собаки до и после введения дексаметазона (мол.%)

Основания	Полушария		Мозжечок		Продолговатый мозг	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Г	22,2	22,4	21,8	21,9	21,7	21,7
Ц	20,8	20,7	20,5	20,3	20,3	20,2
5МЦ	1,33	1,65	1,26	1,64	1,34	1,55
А	28,5	28,5	28,2	28,4	28,3	28,3
Т	28,0	27,8	27,5	27,7	27,5	27,6

Недавно мы показали, что у крыс под влиянием дексаметазона количество РНК-АУ типа в хромосомно-ядрышковом аппарате мозговой ткани резко уменьшается, наблюдается увеличение цитоплазматической, немитохондриальной фракции ДНК мозга (6). Исследование уровня 5—СН₃ цитозина в ДНК головного мозга собак после введения дексаметазона выявило увеличение степени метилирования ДНК изученных участков (табл. 2).

	Полушария		Мозжечок		Продолговатый мозг	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
(t°) плавления	87,0	86,5	87,5	87,5	86,0	86,0
% гиперхромии	27—28	27—28	27—28	27—28	27—28	27—28
Константа седиментации $S_{20,w}$	19—20	19—20	19—20	19—20	19—20	19—20
Молекулярный вес	$7 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$				

Исследованные препараты ДНК имели коэффициенты седиментации 19—20 $S_{20,w}$, молекулярный вес, вычисленный по кривой Эгнера, $7-8 \cdot 10^6$, что свидетельствует о нативности изученных ДНК, (табл. 3). Имеющиеся в литературе данные о воздействии кортикостероидов на клетки нервной ткани позволяют увеличение содержания 5— CH_3 —цитозина в ДНК под влиянием дексаметазона рассматривать как результат активации катаболических процессов. Де Дюва и Ватто (⁷), Абе-лан и Рот (⁸) приводят данные о том, что стероидные гормоны активируют ряд лизосомальных ферментов—катеписины, ДНК-аза, РНК-аза и др. Мы допускаем, что в результате активации ДНКаз ДНК мозговой ткани может претерпевать ограниченную деполимеризацию, освобождаться из ядра и частично утрачиваться в процессе выделения, если учесть, что метод выделения ДНК, использованный нами (см. методы) позволяет получать высокомолекулярную ДНК, освобождая ее от низкомолекулярных и деполимеризованных фракций.

При этом изменению подвергается и частично утрачивается часть ДНК с низким уровнем 5— CH_3 —цитозина.

Этот механизм согласуется с представлением о стабилизирующей роли метилирования цитозина по « C_5 » на структуру ДНК.

Мы не исключаем другие механизмы, которые могут лежать в основе полученных нами данных, например, конформационная доступность ДНК к метилированию в результате взаимодействия дексаметазона с ДНП, активация метилаз, изменение соотношения основной и сателитной ДНК в ядре и т. д.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԴԱ քղրակից-անդամ Ա. Ա. ԳԱՂՅԱՆ, Թ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ,
Ջ. Վ. ՂԱՐԻՐՅԱՆ, Վ. Թ. ԳԱՅԱՅԱՆ

Դեմո-ի մերիլացումն ուղեղի տարբեր մասերում դեֆամերազոնի ազդեցության տակ

Տվյալ հետազոտությունները նվիրված են Դեմո-ի 5- CH_3 -ցիտոզինի քանակական փոփոխության ուսումնասիրությանը շան ուղեղի տարբեր մասերում՝ դեֆամերազոնի ազդեցության տակ:

Ուսումնասիրությունները շան ուղեղի ԴՆԹ-ի CH_3 -ցիտոզինի մակարդակով բացահայտեցին, որ ըստ ԴՆԹ-ի δ - CH_3 -ցիտոզինի պարունակության տարբեր մասերը տարբերվում են մեկը մյուսից և նկատելիորեն տարբերվում են ԴՆԹ-ից, խոշոր եղջերավոր անասունի նույն մասերում:

Հեղինակները հայտնաբերել են ֆունկցիոնալ կախվածություն շան գլխուղեղի ԴՆԹ-ի մեթիլացված ցիտոզինի պարունակության և օրգանիզմում կորտիկոստերոիդների մակարդակի միջև: Հետազոտությունները շան գլխուղեղի ԴՆԹ-ի δ - CH_3 -ցիտոզինի մակարդակով, դիքսամեթազոնի ներմուծումից հետո բացահայտեց ԴՆԹ-ի մեթիլացիայի աստիճանի բարձրացումը 15—20% -ով ուսումնասիրվող տեղամասերում (կիսագնդեր, ուղեղիկ, երկարավուն ուղեղ):

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Б. Ф. Ванюшин, Успехи современной биол, 65, 163 (1968). ² В. К. Васильев, Д. В. Гарибян, Р. А. Захарян, А. А. Галоян, Б. Ф. Ванюшин, ДАН СССР, 205, 3 (1972). ³ Б. Ф. Ванюшин, Г. К. Коротаев, А. Л. Мизин, Г. Д. Бердышев, Биохимия, 34, 1, 191 (1969). ⁴ Г. Д. Бердышев, Г. К. Коротаев, Г. В. Боярский, Б. Ф. Ванюшин, Биохимия, 32, 5, 988 (1967). ⁵ Б. Ф. Ванюшин, Особенности первичной структуры ДНК. Автореферат докт. дисс., Изд. Моск. университета, 1972. ⁶ А. А. Галоян, Р. А. Захарян, Ж. Г. Абелян, Вопросы биохимии мозга, 4, 157 (1968). ⁷ G. de Duve, Wattiaux R., Ann. Rev. Physiol, 28, 435(1966). ⁸ E. Abellan, I. S. Roht, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 2, 244(1967).