

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВЫСОКОБЕЛКОВОЙ И БЕЗБЕЛКОВОЙ ДИЕТЕ

Р. Р. КАЗАРЯН, М. А. ДАВТЯН

Проведен флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени белых крыс при высокобелковой и безбелковой диете. Хроматин, полученный при высокобелковой диете, подвергается конформационным изменениям структуры с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в области длин волн возбуждения 230—270 нм, в пределах спектра эмиссии 340—470 нм. Аналогичные комплексы обнаруживаются при высокобелковой диете с адреналэктомией. При безбелковой диете в флуоресцирующих характеристиках хроматина изменений не обнаруживается.

К числу факторов, обуславливающих повышение в организме уровня продуктов белкового катаболизма, относится также высокобелковая диета, вызывающая индукцию как ферментов орнитинового цикла, так и других катаболических ферментов, присутствующих в печени животных [4, 6, 10—13, 15—17, 20]. Ранее с помощью метода флуоресцентного анализа нами были выявлены качественные конформационные изменения структуры хроматина при гормональной индукции гидрокортизоном [2], с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в области волн возбуждения 230—270 нм в пределах спектра эмиссии 330—485 нм. При этом положение максимума спектра эмиссии хроматина при 340 нм, обусловленного триптофановой флуоресценцией [3], также претерпевало определенные изменения (сдвиг в ультрафиолетовую область с подавлением квантового выхода флуоресценции).

В настоящей работе приводятся результаты исследования флуоресцирующих свойств хроматина при высокобелковой диете, вызывающей индукцию аргиназы и ряда других катаболических ферментов, присутствующих в печени крыс [4, 6, 10—13, 15—17, 20].

Материал и методика. В экспериментах использовались белые крысы массой 120—150 г. Методика получения хроматина включала предварительное выделение ядер [5, 7] (в 0,25 М сахарозе, 0,25 М сахарозе с 0,5% тритон-х-100), с дальнейшей очисткой их через слой 2,2 М сахарозы ($d=1,291$), при pH буферных растворов 7,5. Дальнейшую очистку клеточных ядер для получения хроматина проводили растворами 0,024 М ЭДТА с 0,075 М NaCl (pH 8), а также 0,05, 0,01, 0,02 и 0,001 М трис-буфером (pH 8). Все этапы получения хроматина описаны ранее [2]. Белок определяли по Лоурри [14], ДНК — по Дише [8], РНК — спектрофотометрически после гидролиза IN HClO_4 . Соотношение белок/ДНК во всех исследованных препаратах хроматина составляло 2:1, соотношение РНК/ДНК — 0,04:1. Спектральные характеристики препаратов хроматина снимали на спектрофотометрах СФ-4А и СФ-16.

Исследовались препараты хроматина, полученные при четырех различных состояниях организма животных: в норме, при высокобелковой диете, высокобелковой диете с адреналэктомией и безбелковой диете. Удаление надпочечников производили под эфирной анестезией. Адреналэктомизированные крысы получали рацион высокобелковой диеты [18], в котором питьевую воду заменяли 0,9% NaCl. В качестве источника белка использовался авитаминизированный казеин с содержанием белка 25—75%. Этот режим поддерживали в течение 14 дней. За этот период крысы адаптировались к нему. Вес животных в течение двух недель практически не менялся. На 10-й день часть крыс подвергалась операции по удалению надпочечников.

Безбелковая диета содержала следующие компоненты: вместо авитаминизированного казеина декстрин (84%), кукурузное масло (9%), физиологический раствор NaCl (4%), агар (2%), жир печени трески (1%) и витаминподкрепляющая микстура — раствор ундевита или гендевита (2%).

На пятнадцатый день животные забивались и производилось выделение и очистка хроматина. Все препараты хроматина подвергались детальному флуоресцентному анализу на всех длинах волн энергии активации. Спектры возбуждения и эмиссии регистрировались на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A (Hitachi, Япония) в кварцевых прямоугольных кюветах, при комнатной температуре, с высокими чувствительностями (SS-5, SS-6), в многократных разбавлениях 1×10^{-3} М трис-HCl буфера, pH 8. Для сравнительного анализа полученных данных спектры флуоресценции регистрировались на люминесцентной установке с монохроматическим возбуждением [1] (линия ртути 296, 280, 270, 240 нм от лампы СВД-120). Температура контролировалась непосредственно в кювете полупроводниковым микротермоспрогнозированием МТ-54 системы Карманова. Для устранения градиента температуры раствор в кювете перемешивался механической стеклянной мешалкой.

Результаты и обсуждение. Как известно, существует прямая зависимость между активностью ферментов сринтинового цикла и содержанием белка в рационе. По мере увеличения белка в рационе (6, 25, 60, 75%) активность как печеночной аргиназы, так и остальных ферментов синтеза мочевины повышается [10—13, 15, 16], при этом повышенные активности аргиназы сопровождается пропорциональным увеличением экскреции мочевины [6].

Учитывая эти литературные данные, в первой серии экспериментов мы предприняли попытку исследовать флуоресцентные свойства хроматина, выделенного из печени крыс при высокобелковой диете. Как показали исследования, он имеет один максимум спектра возбуждения при 295 нм и один максимум спектра эмиссии при 340 нм (рис. 1). Как видно из рис. 1, максимумы спектров возбуждения и эмиссии хроматина как в норме, так и при высокобелковой диете практически идентичны, с незначительной разницей в интенсивности флуоресценции. Таким образом, в отличие от гормональной индукции гидрокортизоном [2], когда положение максимума спектра эмиссии хроматина сдвигается при 340 нм в ультрафиолетовую область примерно на 10 нм, с подавлением квантового выхода флуоресценции, при высокобелковой диете оно [3] каких-либо изменений не претерпевает. С другой стороны, флуоресцентный анализ хроматина, полученного при высокобелковой диете, показал, что в области длин волн возбуждения 230—270 нм происходят качественные изменения в структуре хроматина с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в пределах спектра эмиссии 340—470 нм (рис. 2, 3).

В следующей серии экспериментов исследовались флуоресцентные характеристики хроматина при безбелковой диете, когда вследствие усиленного распада тканевых белков также может происходить некото-

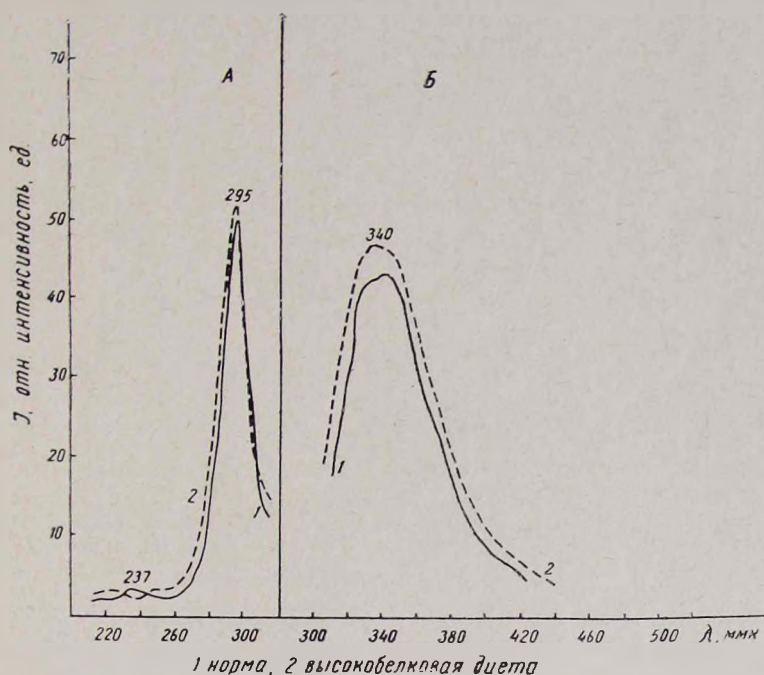


Рис. 1. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного из печени белых крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—4 мμ. 1. Нативный хроматин, разбавленный в $\times 20$ в 1×10^{-3} М трис-НСI буфере, рН 8. 2. Хроматин, полученный при высокобелковой диете, разбавленный в $\times 20$ в 1×10^{-3} М трис-НСI буфере, рН 8.

рое активирование аргиназы и других катаболических ферментов. Однако при длительной безбелковой диете, когда распад тканевых белков предотвращается с сохранением калорийности пищи за счет жиров и углеводов, наблюдается снижение активности аргиназы и других ферментов орнитинового цикла [19, 21].

Как показали результаты исследования, хроматин, полученный при безбелковой диете, практически не претерпевает каких-либо изменений в максимумах спектров возбуждения и эмиссии исходного препарата (295 и 340 нм) (рис. 4). В то же время детальный флуоресцентный анализ показал, что никаких качественных перестроек в флуоресцентных характеристиках хроматина при всех длинах волн энергии активации также не происходит; четко выявлялся лишь основной флуоресцирующий комплекс при 340 нм (рис. 4).

Суммируя полученные данные, можно сказать, что в отличие от высокобелковой диеты, при безбелковой, когда калорийность пищи сохраняется за счет добавочных количеств жиров и углеводов, аргиназа

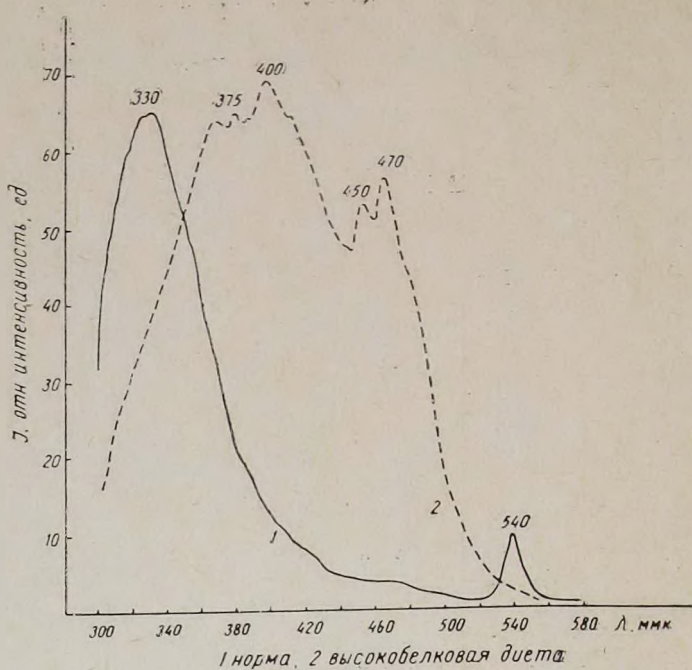


Рис. 2. Флуоресценция хроматина при длине волны возбуждения E_{xW} —270 нм. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии — 6 нм. Разъяснения 1, 2 см на рис. 1

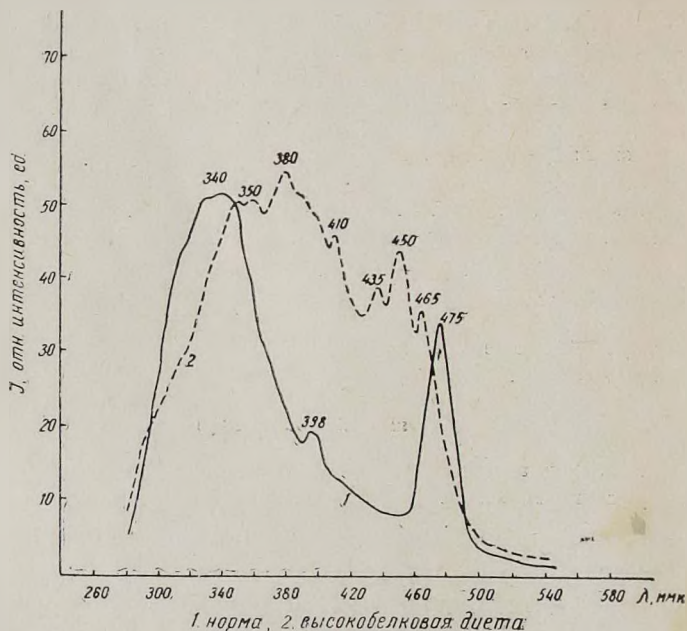


Рис. 3. Флуоресценция хроматина при длине волны возбуждения E_{xW} —237 нм. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии — 8 нм. Разъяснения 1, 2 см., на рис. 1.

и другие катаболические ферменты не индуцируются, и в флуоресцентных характеристиках хроматина изменений не происходит.

По данным Шимке [17], повышение активности аргиназы и других ферментов орнитинового цикла при высокобелковой диете происходит и у адреналэктомированных крыс. Аналогичный результат получен и Фридлэндом [9].

Для выяснения влияния функций надпочечников на флуоресцентные свойства хроматина следующая серия экспериментов проводилась на адреналэктомированных крысах, получивших полный рацион высокобелковой пищи. Как показали полученные данные, выделенный из печени этих крыс хроматин в максимумах спектров возбуждения и эмиссии изменений не претерпевает, обнаруживая характерные показатели (295 и 340 нм) нативного хроматина, обусловленного триптофановой флуоресценцией [3].

Однако в области длин волн возбуждения 230—270 нм обнаруживается аналогичный наблюдаемому при высокобелковой диете крыс в пределах спектра эмиссии 340—370 нм (рис. 2, 3) сигнал новых флюо-

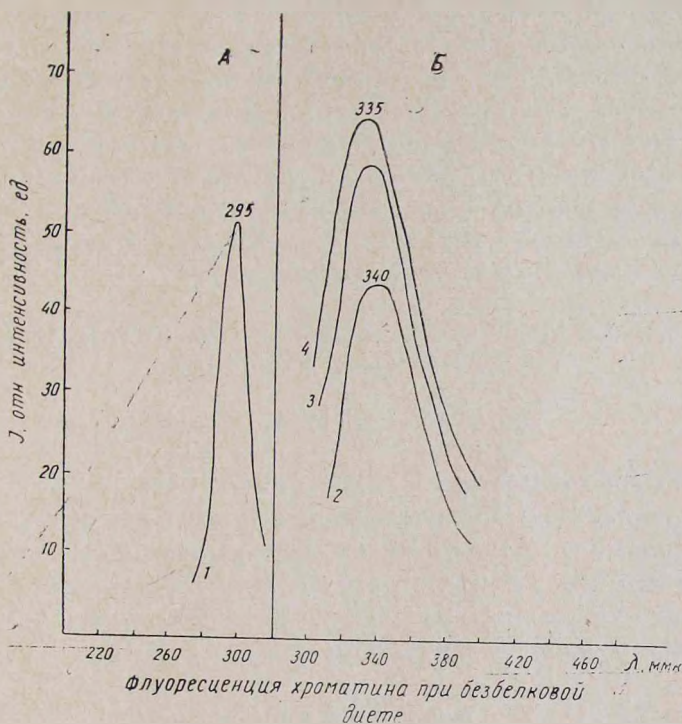


Рис. 4. Спектр возбуждения (А) при длине волны эмиссии EmW —340 нм и спектры эмиссии (Б) при длине волн возбуждения ExW —295 нм (2), ExW —270 нм (3) и ExW —230 нм (4) хроматина, полученного при безбелковой диете. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—(1; 2)—4 нм, (3)—6 нм, (4)—8 нм.

ресцирующих комплексов. По-видимому, индукция аргиназы и ряда других катаболических ферментов при высокобелковой диете осуществляется не через адреналовую железу.

В заключение следует сказать, что при гормональной индукции гидрокортизоном [2] и высокобелковой диете, когда продукты белкового распада вызывают индукцию аргиназы и ряда других кагаболических ферментов [4, 6, 10—13, 15—17, 19, 20] в области длин волн возбуждения 230—270 нм, обнаруживаются качественные конформационные изменения в структуре хроматина с проявлением новых флуоресцирующих групп в пределах спектра эмиссии 340—370 нм.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 22. VI 1979 г.

**ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԲԱՐՁՐ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ ԵՎ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱԶՐԿԱՅԻՆ
ԴԻԵՏԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Ռ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻՅԱՆ

Կատարված է սպիտակ առնետների լյարդից ստացված քրոմատինի ֆլուորեսցենտային անալիզ՝ բարձր սպիտակուցային և սպիտակուցազրկված դիետայի պայմաններում: Բարձր սպիտակուցային դիետայի պայմաններում ստացված քրոմատինի մեջ հայտնաբերվել են կառուցվածքի կոնֆորմացիոն փոփոխություններ նոր ֆլուորեսցենտային կոմպլեքսների ձևով, զրգոման ալիքների 230—270 նմ երկարության շրջանում, էմիսիայի սպեկտրի 340—470 նմ սահմաններում: Նույնանման կոմպլեքսներ են արտահայտվում բարձր սպիտակուցային դիետայի պայմաններում ադրենալեկտոմիայից հետո: Սպիտակուցազուրկ դիետայի պայմաններում քրոմատինի ֆլուորեսցենտային ցուցանիշներում փոփոխություններ չեն հայտնաբերվել:

**STUDY OF RAT LIVER CHROMATIN UNDER THE HIGH-PROTEIN
AND NON-PROTEIN DIET**

R. R. KAZARIAN, M. A. DAVTIAN

Fluorescent analysis of chromatin isolated from the liver of white rats under high-protein and non-protein diet has been carried out.

In chromatin, obtained under high-protein diet conformational changes in structure with the display of new fluorescing complexes in the range of excitation wave lengths 230—270 nm, and in the limits 340—470 nm of emission spectrum have been revealed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. Практикум по общей биофизике, вып. 8, М., 1964.
2. Давтян М. А., Казарян Р. Р., Демин Ю. М. Биолог. ж. Армении, 32, 1, 1979.
3. Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тираццун С. Г., Манвелян А. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 1978.
4. Ковальский В. В., Луцкий Д. Я. ДАН СССР, 63, 1007, 1965.
5. Лавриенко И. А., Морозова Т. М., Юшкова Л. Ф. Молекулярная биология, 5, 1, 1971.

6. *Ashida K. and Harper A. E.* Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 107, 151, 1961.
7. *Chauveau J., Moule Y., Rouiller C.* Exptl. Cell Res., 11, 317, 1956.
8. *Dishe Z.* Microchemie, 8, 9, 1930.
9. *Freedland R. A.* Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 116, 692, 1964.
10. *Kiriyama Sh., Iwao H. and Ashida K.* Agric. and Biol. Chem., 31, 671, 1968.
11. *Kochakian C. D., Bartlett M. N. and Moe J.* Amer. J. Physiol., 154, 489, 1948.
12. *Van der Lee P. J. and Gorter A.* Enzymologia, 4, 129, 1937.
13. *Lightbody H. D. and Kleinman A. J.* Biol. Chem., 129, 71, 1939.
14. *Lowry D. U., Rosenbrough N. J. et al.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
15. *Mandelstam J. and Gudkin J.* Biochem., J., 51, 681, 1962.
16. *Schimke R. T.* J. Biol. Chem., 237, 459, 1962b.
17. *Schimke R. T.* J. Biol. Chem., 238, 1012, 1963.
18. *Schimke R. T.* Biochim. Biophys. Acta, 62, 599—601, 1952.
19. *Schimke R. T.* J. Biol. Chem., 237, 1921, 1962a.
20. *Schimke R. T., Brown M. B. and Smallman E. T.* Ann. N. Y., Acad. Sci., 102, 587, 1963.
21. *Seifter S., Harkness D. M., Rubin L. and Muntwyler E. J.* Biol. Chem., 176, 1371, 1948.