

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ХРОМАТИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

М. А. ДАВТЯН, Р. Р. КАЗАРЯН

Проведен полный флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени крыс после введения аргинина, а также смеси аминокислот. Аргинин в флуоресцирующих характеристиках хроматина изменений не вызывает, в то время как смеси с различным содержанием аминокислот приводят к изменению флуоресцентной картины.

Глюкоза, введенная вместе с аминокислотами, препятствует индукции катаболических ферментов, предотвращая указанные изменения.

Ключевые слова: хроматин, аминокислоты, флуоресценция, спектрофотометрия.

Ранее нами было показано [3, 4], что введение гидрокортизона крысам приводит к индукции печеночной аргиназы, и при этом улавливаются определенные количественные и качественные сдвиги в флуоресцирующих характеристиках хроматина печеночной клетки [3]. Известно, что у животных не удается выявить субстратную индукцию. Введение аргинина или других аминокислот в отдельности не вызывает индукции соответствующих катаболических ферментов в печени, между тем как смесь аминокислот способствует этому процессу [2, 5—7, 12]. Даже изъятие из смеси той или иной аминокислоты не снимает индукции всех ферментов, и в том числе фермента, обеспечивающего катаболизм изъятой аминокислоты, а присутствие глюкозы, вводимой со смесью аминокислот, полностью снимает ее [5—7].

На основании этих данных было заключено, что, очевидно, у животных взамен субстратной функционирует генерализованный механизм индукции, обеспечивающий контроль биосинтеза катаболических ферментов белковым и углеводным питанием [7, 8].

Перед нами была поставлена задача выяснить степень участия хроматина в этом процессе, а также функцию надпочечников в указанных ситуациях. С этой целью был произведен полный флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени как интактных, так и адренал-эктомированных животных после введения смеси аминокислот.

Материал и методика. В экспериментах использовались белые крысы массой 120—150 г. Хроматин из печени получали по описанной нами методике [3]. Этапы выделения также описаны [3]. Белок определяли по Лоури [14], ДНК—по Дише, РНК—спектрофотометрически, после гидролиза 1 N HClO₄. Спектральные характеристики снимали на спектрофотометрах СФ-16. Введение аминокислот проводили как описано

в работе [7]. Полная смесь аминокислот содержала (в^o/о): 5,9—аргинина, 0,7—триптофана, 4,0—гистидина, 12,8—лизина, 5,1—тирозина, 6,6—фенилаланина, 5,7—цистина, 0,8—метионина, 4,2—серина, 5,8—треонина, 12,3—лейцина, 2,6—изолейцина, 5,9—валина, 6,2—аланина, 1,8—глицина, 4,8—пролина, 10,9—аспаргиновой кислоты и 16,5—глутаминовой кислоты, что соответствует составу сыровоточного альбумина.

Перед опытом крысы голодали в течение 10—12 ч. Смеси вводили по 1,5 г/кг рег ос (через трубку в пищевод) трижды в течение суток. Через 5 ч после третьего введения аминокислот животных забивали и выделяли хроматин. Подвергались флуоресцентному анализу также препараты хроматина, полученные после введения аргинина (рег ос 1,5 г/кг массы в день в течение 5—7 дней), полной смеси аминокислот с глюкозой (глюкозу вводили одновременно с аминокислотами по 2 г/кг), смеси аминокислот без аргинина, а также смеси аминокислот без фенилаланина, триптофана, лейцина, изолейцина, валина, тирозина, метионина и треонина. Спектры возбуждения и эмиссии хроматина регистрировались на флуоресцентном спектрофотометре МРФ-2А фирмы «Hitachi» (Япония), а также на люминесцентной установке [1] с монохроматическим возбуждением (линия ртути—296, 280, 270, 246 нм от лампы СВД-120), в кварцевых прямоугольных кюветках, при комнатной температуре, в многократных разбавлениях 1×10^{-3} М трис-НСI буфере, рН 8.

Надпочечники крыс удаляли под эфирной анестезией. Адреналэктомированные крысы получали вместо питьевой 0,9^o/о-ный NaCl. Для устранения градиента температуры растворов в кювете перемешивали механической стеклянной мешалкой.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов исследовались флуоресцирующие свойства хроматина после трехкратного введения полной смеси аминокислот. Как видно из рис. 1, хроматин, полученный после введения полной смеси аминокислот, имитирующей по соотношению компонентов сыровоточный альбумин, обнаруживает мак-

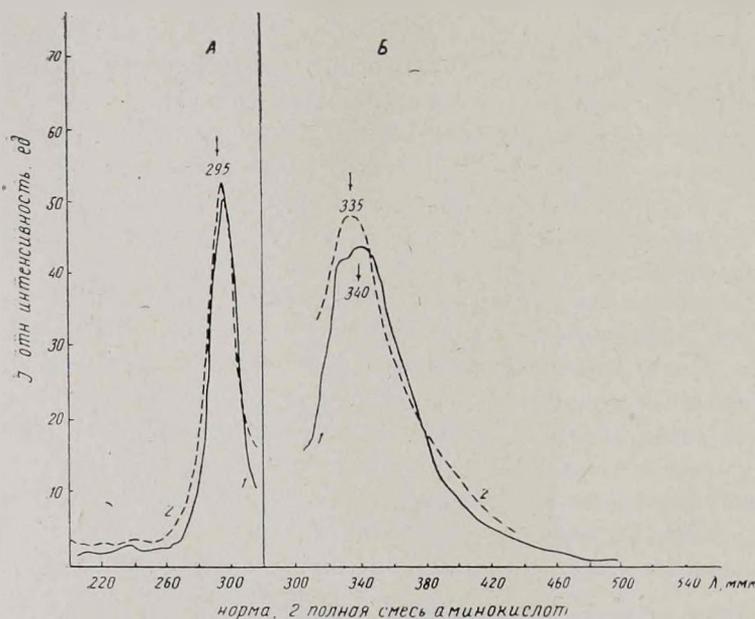


Рис. 1. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного из печени крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения эмиссии—4 нм. 1. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в 1×10^{-3} М трис-НСI буфере, рН 8. 2. Хроматин, полученный при введении полной смеси аминокислот, разбавленный $\times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

симум спектра возбуждения при 295 нм и максимум спектра эмиссии при 335 нм, при этом основной флуоресцирующий комплекс его при 340 нм, обусловленный триптофановой флуоресценцией [4], сдвигается в ультрафиолетовую область, не выходя за пределы величин, характерных для триптофанилов. Аналогичный эффект проявлялся при гормональной индукции гидрокортизоном [3], а также при голодании крыс. В то же время флуоресцентный анализ хроматина на всех длинах волны энергии активации показал изменения флуоресцирующих свойств в области длин волн возбуждения 230—270 нм в пределах спектра флуоресценции 330—470 нм, наблюдаемые также у хроматина, подвергнутого гормональной индукции гидрокортизоном [3]. Все это свидетельствует о качественных перестройках флуоресцирующих характеристик структуры хроматина после введения полной смеси аминокислот. Исследование хроматина, выделенного из адреналэктомированных крыс, получавших полную смесь аминокислот, выявило картину, аналогичную наблюдаемой у интактных животных при введении смеси аминокислот.

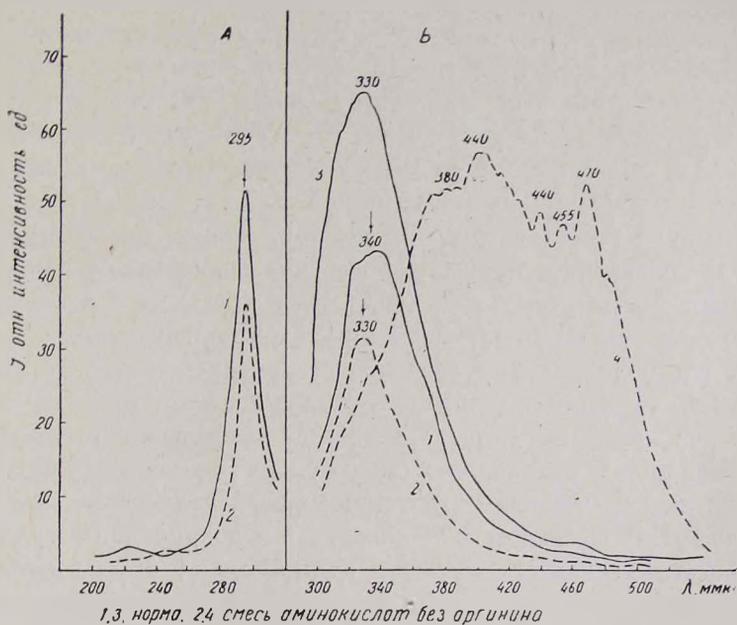


Рис. 2. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) при длине волны возбуждения $E_{\lambda W}$ —295 нм (1,2), $E_{\lambda W}$ —270 нм (3,4) хроматина, выделенного из печени крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—4 нм (1,2), 6 нм (3,4). 1.3. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в 1×10^{-3} М трис-НСl буфере, рН 8. 2.4. Хроматин, полученный при введении смеси аминокислот без аргинина, разбавленный $\times 20$ в 1×10^{-3} М трис-НСl буфере, рН 8.

В следующей серии экспериментов исследовались флуоресцентные характеристики хроматина, выделенного после введения смеси аминокислот без аргинина. Как видно из рис. 2, отсутствие аргинина не сказывается на флуоресцентной картине, так как и в этом случае четко об-

наруживались конформационные изменения структуры хроматина с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в пределах спектра эмиссии 380—470 нм, в области длин волн возбуждения 230—270 нм. Был исследован также эффект введения смеси аминокислот, не содержащей незаменимых аминокислот, кроме аргинина, гистидина и лизина, взятых соответственно в большем количестве, так что в этом случае крысы получали примерно столько же аминокислот, сколько при введении полной смеси. Флуоресцентные характеристики хроматина претерпевали такие же качественные перестройки, какие наблюдались после введения полной смеси аминокислот, при этом адреналэктомия не меняла характера флуоресценции после введения смеси без аргинина и некоторых незаменимых аминокислот.

Следующий этап работы был посвящен исследованию флуоресцирующих свойств хроматина после введения животным только аргинина, а также полной смеси аминокислот, с глюкозой, когда, согласно литературным данным, аргиназа и другие катаболические ферменты не индуцируются [2, 5, 7, 9, 12, 13]. При введении только аргинина или смесей аминокислот с глюкозой новых флуоресцирующих комплексов на всех длинах волн энергии активации не было обнаружено, а четко выявлялся один максимум спектра возбуждения при 295 нм и один максимум спектра эмиссии при 340 нм, т. е. обнаруживались максимумы, характерные для флуоресцирующих спектров нативного хроматина, обусловленных триптофановой флуоресценцией [4].

Суммируя результаты экспериментов, можно заключить, что хроматин претерпевает конформационные изменения лишь при условиях, сопровождающихся индукцией аргиназы и других катаболических ферментов. Даже введение аргинина в высокой концентрации не вызывает сдвигов в флуоресцентных характеристиках хроматина. Примечательно, что адреналэктомия не предотвращала конформационные изменения в структуре хроматина, происходящие после введения смесей аминокислот. Очевидно, в механизме индукции катаболических ферментов при введении смесей аминокислот гормоны коры надпочечников не принимают участия. По-видимому, белковая и эндокринная регуляция биосинтеза катаболических ферментов аминокислот в печени животных достаточно независимы. Это заключение находится в полном соответствии с мнением В. П. Скулачева относительно того, что у животных взамен субстратной индукции выработался генерализованный механизм индукции, вызываемый каким-то продуктом, общим для целой группы субстратов [8]. Очевидно, этот неизвестный промежуточный продукт реализует свой эффект, минуя гормоны коры надпочечников. Подобное свойство генерализованного действия, но в сторону репрессии в наших экспериментах проявила глюкоза, которая, как известно, является в микробиологических объектах катаболическим репрессором.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 6.VII 1979 г.

ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՖԼՈՒՈՐԵՍԵՆՏՆԵՏՈՎ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՀԵՏԱԶՁՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԽԱՌՆՈՒՐԳԻ
ՆԵՐԱՐԿՈՒՄՈՎ

Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Ռ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

Կատարված է առնետների լյարդից ստացված քրոմատինի լրիվ ֆլուորեսցենտային անալիզ արգինինի, ինչպես և ամինաթթուների խառնուրդի ներարկումով: Արգինինի ներարկման ժամանակ քրոմատինի ֆլուորեսցենտող ցուցանիշներում փոփոխություններ չեն դիտվում, այն դեպքում, երբ տարբեր տեսակի ամինաթթուների խառնուրդները առաջ են բերում փոփոխություններ քրոմատինի ֆլուորեսցենտային ցուցանիշներում, որն արտահայտվում է նոր ֆլուորեսցենտային կոմպլեքսներով զրգոման ալիքի 230—270 նմ երկարության շրջանում, էմիսիայի սպեկտրի 330—470 նմ սահմաններում, ընդ որում, այդ փոփոխությունները արտահայտվում են նաև ազդենալէկտոմիայի ֆոնի վրա:

Ամինաթթուների հետ ներարկված գլյուկոզան արգելակում է կատարելիք ֆերմենտների ինդուկցիան և կանխում ֆլուորեսցենտային պատկերի վերահիշյալ փոփոխությունները:

STUDY OF FLUORESCENTING PROPERTIES OF CHROMATIN
UNDER AMINOACID MIXTURE INJECTION

M. A. DAVTIAN, R. R. KASARIAN

Complete fluorescent analysis of chromatin isolated from rat liver under injection of arginin and aminoacid mixture has been carried out. Under arginin injection in fluorescent characteristics of chromatin changes are not observed, while mixtures of different aminoacid content bring to the change of fluorescenting chromatin characteristics with display of new fluorescent complexes in the range of exitation wave lengths 230—270 nm in the limits of 330—470 emission spectrum, these changes also occure on adrenalectomy background.

Glucose, injected with aminoacids hinders the induction of catabolic enzymies and the above mentioned changes of fluorescent picture.

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. Вовченко Г. Д. Арх. биол. наук, 42, 3, 89, 1936.
3. Давтян М. А., Казарян Р. Р., Демин Ю. М. Биолог. ж. Армении, 32, 1, 1979.
4. Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тироццян С. Г., Манвелян А. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 1978.
5. Мясоедова К. Н. Вопр. мед. химии, 9, 1, 1963.
6. Мясоедова К. Н. Вопр. мед. химии, 5, 547, 1964.
7. Мусоедова К. Н. Биохимия, 31, 1, 1966.
8. Скулачев В. П. В кн. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
9. Bach S. J. and Williamson S. Nature, 150, 575, 1942.
10. Chauveau J., Moule Y., Rouiller C. Exptl. Cell Res., 11, 317, 1956.
11. Dishe L. Microchemie, 8, 9, 1930.
12. Edlbacher S. and Zeller A. Z. Physiol. Chem., 242, 253, 1936.
13. Hunter A. and Downs C. E. J. Biol. Chem., 157, 427, 1945.
14. Lowry D. U., Rosenbrough N. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.