

УДК 591.1.15

СОДЕРЖАНИЕ ФРАКЦИЙ ГИСТОНОВ В МОЗГЕ СОБАК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ ЦНС

М. С. ПЕТРОСЯН, И. С. ХАЧАТРЯН

Из мозга собак выделены гистоны и изучены содержание и хроматографические профили F1, F2a, F2b, F3 фракций гистонов при различных функциональных состояниях ЦНС. Показано повышение содержания F2a и недостоверное понижение количества F1 фракций гистонов в мозге при возбуждении и торможении ЦНС. Хроматографические профили основных гистоновых фракций и их примесей из мозга собак, полученные на КМ-целлюлозе при различных функциональных состояниях, особым изменениям не подвергаются.

Ключевые слова: гистоны, ЦНС, головной мозг.

В механизме регуляции функции генетического аппарата клеток, наряду с другими ядерными белками, важное значение придается гистонам [8, 14]. Показано взаимодействие гистонов с ДНК, их влияние на активность ДНК-зависимой, РНК-полимеразы [9, 15] и РНК-азы [7]. В животных тканях найдено 6 главных гистоновых фракций [5, 10], количественное соотношение которых может изменяться в зависимости от метаболической активности клеток. Несмотря на наличие ряда работ в области изучения роли гистонов, прямое их участие в механизме функционирования генетического аппарата окончательно не доказано. Недостаточно изучена количественная характеристика фракций гистонов в высокодифференцированных нервных клетках при различных функциональных состояниях ЦНС.

Ставилась задача изучить количественную характеристику фракций гистонов в мозге при различных функциональных состояниях ЦНС, выполненных на базе натуральных пищевых рефлексов.

Материал и методика. Опыты ставились на собаках-самцах массой 4—5 кг, в возрасте от одного до двух лет, содержащихся в одинаковых условиях. Подопытные животные подразделялись на 4 группы. Первая группа служила в качестве контроля, вторая предназначалась для выработки пищевого возбуждения. У животных третьей группы вырабатывалось условнорефлекторное пищевое возбуждение, а у четвертой—условнорефлекторное пищевое торможение. С целью фиксации обменных процессов в мозге при различных функциональных состояниях ЦНС собак замораживали в жидком азоте в условнорефлекторной камере марки УРК-73 [6]. В качестве безусловного раздражителя служило кормление собак мясом из расчета 5 г на 1 кг массы животного. Подача пищи сопровождалась применением условного раздражителя (звучание зуммера). Условный рефлекс вырабатывался по отставленному способу. Торможение вызывалось угашением положительного условного рефлекса.

Фракции гистонов получали из предварительно выделенных ядер клеток мозга собак по методу Дингмана и Спорна [12], Шово и др. [11]. Чистоту полученных ядер контролировали под микроскопом. Выделение отдельных фракций гистонов проводили

по методу Джонса [16]. Принцип выделения гистонов основывался на их избирательной растворимости в растворе этанол—HCl и последующем осаждении ацетоном. Количество реагентов и осадителей, необходимое для выделения гистонов из мозговой ткани собак, определяли исходя из массы выделенных ядер по методу Джонса [16], применительно для тимуса. Экстракцию гистонов смесью этанол—1,25 HCl проводили в полиэтиленовой пробирке со стеклянными шариками, на качалке со скоростью 160 об/мин. Дополнительное очищение фракций гистонов проводили хроматографией на КМ целлюлозе по Джонсу и Батлару [17], размеры колонки—0,95×3 см. На колонку наносили предварительно выделенные фракции гистонов в количестве 5—12 мг. Для построения калибровочной кривой использовали фракции гистонов фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение. Из мозга собак выделяли четыре основных фракции гистонов: лизинбогатые—F1, относительно лизинбогатые—F2a, F2b и аргининбогатые—F3. Выход гистоновых фракций из мозговой ткани у контрольной группы животных в наших экспериментах составляет для фракции F1—16,24; F3—20,56, F2b и F2a—25,53 и 37,19 мг на 100 мг общего гистона соответственно, что в основном совпадает с данными, полученными в экспериментах на головном мозге быка [1], зубной железе телят [18], опухоли Уокера [13]. Если принять выход фракции F1 за единицу, то соотношение гистоновых фракций F1:F3:F2b:F2a составит 1:1, 26:1, 63:2,28. Это соотношение для мозга телят составляет соответственно 1:0, 92:1, 2:2,51 [3], а для тимуса телят—1:1, 32:1, 4:2,07 [16].

Общий выход гистонов от массы сырых ядер для ткани головного мозга собак у контрольной группы составляет 2,29. Если учесть, что содержание ДНК в ядрах составляет 3% [2], то можно принять, что выход гистонов по отношению к ДНК составляет 75—80%. По данным Мюльберга и сотр. [3], для ткани головного мозга телят эта величина составляет 85—90%.

Анализ полученных данных по изучению количественной характеристики общих гистонов при различных функциональных состояниях показывает, что общий выход гистонов от массы сырых ядер при пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении колеблется в пределах контроля и составляет 2,22 и 2,35% соответственно. При условнорефлекторном торможении ЦНС также особым изменениям не подвергается и составляет 2,27%.

При сопоставлении полученных нами данных с данными литературы [3] приходим к заключению, что у разных видов животных и в различных тканях при одинаковом уровне содержания общих гистонов встречаются различные вариации количественного состава гистоновых фракций.

С целью определения видов подфракций и количества их содержания в основных гистоновых фракциях далее проводили хроматографический анализ выделенных нами фракций. На рис. (1—4) приведены хроматографические профили четырех основных фракций гистонов. Результаты анализа фракций гистонов F1, F2a, F2b и F3 из мозга собак показывают, что по хроматографическим профилям они в основном не отличаются от гистонов, полученных из мозга и тимуса телят [3]. Спектральный анализ отдельных фракций при $\lambda=278$ nm в зависимости

от содержания в них примесей дает несколько пиков. Первый пик (F_x), обнаруживаемый при элюировании NaOH-ацетатным буфером pH—4,2, соответствует белку, не задерживающемуся на колонке. Этот пик характерен как для всех исследованных нами фракций гистонов мозга

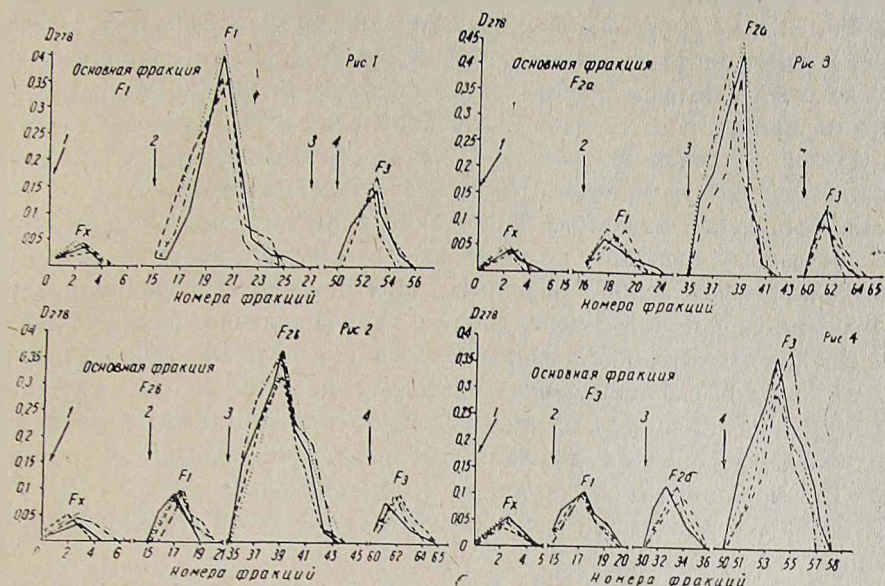


Рис. 1–4. Хроматографические профили основных фракций гистонов в норме и при различных функциональных состояниях ЦНС. 1. Буфер 0,1 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,01 \text{ М NaOH}$, pH 4,2. 2. Буфер 0,17 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,051 \text{ М NaOH}$ и 0,42 М NaCl, pH 4,2. 3. 0,01 М HCl. 4. 0,02 М HCl. ——— Контроль ——— Пищевое возбуждение Условнорефлекторное пищевое торможение. — · — · — Условнорефлекторное пищевое возбуждение.

собаки, так и для гистонов других тканей [3]. Количество не задерживающегося на колонке белка зависит от количества наносимой на колонку фракции гистонов. Второй пик, соответствующий богатой лизинном фракции, элюируется NaOH-ацетатным буфером с добавлением NaCl и выходит сразу после пропуска буфера в пробах 15—25 (рис. 1). Максимальный пик оптической плотности отмечается в основной F1 фракции. После F1 фракции при дальнейшем пропускании 0,01 М HCl, а затем 0,02 М HCl в качестве примеси выходит F3 фракция гистонов в пробах 50—56. Как видно из рис. (2), при нанесении на колонку основной фракции F2a и применении вначале NaOH-ацетатного буфера и затем смеси NaOH: ацетат: NaCl соответственно выходят в качестве примесей F_x и фракция, которая по месту выхода соответствует гистону F1. При пропускании 0,01 М HCl через колонку выходит основная фракция F2a в пробах 35—43. После выхода основной фракции F2a в качестве примеси при применении 0,02 М HCl в пробах 60—65 выходит аргининбогатый гистон—F3. Мюльбергом и др. [3] отмечено лишь наличие аналогичной примеси F3 в мозге и тимусе телят, между тем как F1 фракция в качестве примеси ими не отмечена. Небольшой пик, соответствующий фракции F1 гистона в качестве примеси, обнаружен

нами при хроматографии фракции гистонов как в контрольной группе экспериментов, так и в опытах с выработанными функциональными состояниями ЦНС.

При хроматографии основной фракции F2b также отделяются примеси Fx, F1 и F3 (рис., 3). Как показывают данные рис. (2 и 3), хроматографические профили основных фракций F2a и F2b имеют определенное сходство. Обе фракции выходят в пробах 35—44, поэтому трудно выяснить присутствие указанных фракций в качестве примеси в одной или другой основной фракции. Хроматография основной фракции F2b выявляет в качестве примесей Fx, F1, F2a фракции (рис., 4).

Сопоставление данных о содержании примеси в основных F1, F2a и F3 гистоновых фракциях мозга собак с таковыми в мозге телят не выявляет качественной разницы, хотя отмечается разница между указанными фракциями в мозге собак и телят. Так, например, если основная фракция F3 из мозга собаки и телят содержит примеси лизинбогатой фракции и относительно богатой лизином гистона F2a фракция из телят содержит только относительно богатый лизином гистон. F1 фракция гистона телят содержит примеси F3 и F2a фракции [3], а по нашим и литературным данным [3], F1 фракция из мозга собаки и телят содержит только аргининбогатую фракцию.

Таким образом, исследование состава примесей гистоновых фракций выявило и сходство и различие в качественном составе как у разных видов животных, так и в различных тканях одного и того же вида.

В свете вышеприведенных данных представляло интерес и исследование количественного и качественного состава, а также хроматографических профилей гистоновых фракций под воздействием естественных физиологических раздражителей. Полученные данные показывают, что характер примесей основных фракций гистонов из мозга собаки остается неизменным как при возбуждающем, так и при тормозном процессах. Хроматографические профили фракций гистонов из мозга при выработанных функциональных состояниях ЦНС также не подвергаются особым изменениям.

Сопоставление полученных нами данных о соотношении и чистоте основных фракций гистонов мозговой ткани собаки (табл. 1) с данными литературы [3, 4, 19] позволяет заключить, что они варьируют в зави-

Таблица 1
Степень загрязнения отдельных фракций гистонов из мозга собаки, процент от основной фракции (контрольная группа)

Основные фракции	Примеси других фракций			
	F 1	F 3	F 2a	%
F 1		29,189		26,189
F 3	10,036		18,232	26,268
F 2a	7,468	17,626		25,094
F 2b	6,168	23,057		29,225

симости от вида животного и изучаемой ткани. Количественная характеристика примесей гистоновых фракций при пищевом, условнорефлекторном пищевом возбуждении и условнорефлекторном пищевом торможении не выявляет заметных сдвигов в их содержании по сравнению с данными контрольных опытов.

В дальнейшем нами изучалось абсолютное содержание гистоновых фракций мозговой ткани собак в норме и при различных функциональных состояниях ЦНС; результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Содержание гистоновых фракций в мозге при различных функциональных состояниях ЦНС
($M \pm m$ в мг/г сырых ядер)

	Фракции			
	F 1	F 2b	F 3	F 2a
Контроль	$2,89 \pm 0,16$ (6)	$4,10 \pm 0,17$ (6)	$3,26 \pm 0,08$ (6)	$5,9 \pm 0,195$ (6)
Пищевое возбуждение	$2,46 \pm 0,108^*$ (5)	$3,93 \pm 0,16^*$ (5)	$2,87 \pm 0,14^{**}$ (5)	$6,82 \pm 0,132^*$ (5)
Условнорефлекторное пищевое возбуждение	$2,89 \pm 0,175^*$ (5)	$3,82 \pm 0,074^*$ (5)	$3,37 \pm 0,14^*$ (5)	$6,73 \pm 0,238^*$ (5)
Условнорефлекторное пищевое торможение	$2,43 \pm 0,08^*$ (5)	$3,92 \pm 0,151^*$ (5)	$3,01 \pm 0,14^*$ (5)	$6,60 \pm 0,15^*$ (5)

В скобках—число опытов *— $p > 0,05$; **— $p < 0,05$.

Как видно из данных табл. 2, при пищевом, условнорефлекторном пищевом возбуждении и условнорефлекторном пищевом торможении количество относительно богатой лизином F2b и аргининбогатой F3 фракций гистонов не претерпевает заметных изменений. При пищевом возбуждении и условнорефлекторном пищевом торможении происходит недостоверное снижение содержания богатой лизином фракции. В отличие от этой фракции, при различных функциональных состояниях ЦНС происходит повышение количества F2a гистона.

Анализ полученных данных показывает, что при различных функциональных состояниях ЦНС, выработанных на базе натуральных пищевых рефлексов, количество отдельных фракций гистонов в мозге не подвергается значительным изменениям и остается на уровне, характерном для контрольной группы животных. Этот факт дает нам основание полагать, что при осуществлении высших функций головного мозга количество фракций гистонов не претерпевает особых изменений. Участие гистонов в репрессии и дерепрессии генетического аппарата нервных клеток при различных функциональных состояниях ЦНС, возможно, обусловлено модификацией гистонов и их фракций, направленной на повышение интенсивности ацетилирования, фосфорилирования и других реакций межмолекулярного переноса, способных изменять функциональную роль различных фракций гистонов в генной активности, в пути биосинтеза нейроспецифических белков головного мозга. Изучение этих вопросов—задача наших дальнейших исследований.

**ՀԻՍՏՈՆԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՇՆՆԵՐԻ
ԳԼԽՈՒՂԵՂՈՒՄ ԲԱՐՉՐԱԳՈՒՅՆ ՆՅԱՐԳԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ
ՏԱՐԲԵՐ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԻՃԱԿՆԵՐԻ ԴԵՊԶՈՒՄ**

Մ. Ս. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Գ. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Շնների գլխուղեղից անջատվել են F 1, F 2a, F 2b և F 3 հիստոնային ֆրակցիաները, ուսումնասիրվել են նրանց պարունակությունը և քրոմատոգրաֆիկ բնութագրերը կնշ տարբեր ֆունկցիոնալ վիճակներում: Ցույց է տրված F 2a ֆրակցիայի քանակի բարձրացում և F 1 ֆրակցիայի վիճակադրոնեն ոչ հավաստի իջեցում կնշ դրդման և արգելակման ժամանակ: Հիմնական հիստոնային ֆրակցիաների և նրանցում պարունակվող խառնուրդների քրոմատոգրաֆիկ բնութագրերը ուղեղի տարբեր ֆունկցիոնալ վիճակներում նկատելի փոփոխության չեն ենթարկվում:

**CONTENT OF HISTONE FRACTIONS IN THE DOG BRAIN
AT DIFFERENT FUNCTIONAL STATES OF CNS**

M. S. PETROSIAN, G. S. KHACHATRIAN

Quantitative changes in histone content isolated from the F1, F2a, F2b and F3 fractions of the dog brain have been studied in various functional states of CNS. An increase of the F2a and unauthentic reduction in the amount of the F1 histone fractions in the brain are shown during stimulation and inhibition of CNS.

Chromatographic profiles of the main histone fractions and the admixtures received from the KM — cellulose do not undergo significant modifications at different functional states of CNS.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ашмарин И. П., Садикова Н. В., Дюрнбаум В. И., Степанова И. С. Укр. биохим. ж., 48, 6, 593, 1976.
2. Броун Р. Г., Краснопецева Н. Г. Вестн. ЛГУ, 3, 90, 1963.
3. Мюльберг А. А., Дюрнбаум В. И., Кокряков В. Н., Чихиржина Г. И., Ашмарин И. П. Биохимия, 35, 4, 815, 1970.
4. Мюльберг А. А., Дюрнбаум В. И., Розенфельд О. К., Шарыгин А., Ашмарин И. П. Биохимия, 33, 774, 1968.
5. Паносян Г. А. Структура и функция гистонов. Ереван, 1978.
6. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга при нормальных физиологических условиях. Гексомонофосфатный шунт в мозгу. Ереван, 1967.
7. Шанор В. С. Нуклеазы. М., 1968.
8. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 49, 414, 1963.
9. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 49, 412, 1963.
10. Bush H. In „Histones and other nuclear proteins“, N. Y., London, Acad. press 1965.
11. Chauveau I., Moule Y., Rouiller C. Exptl. Cell. Res., 11, 317, 1956.
12. Dingman C. W., Sporn M. J. Biol. Chem., 23, 3483, 1964.
13. Hnilica L. S., Busch H. J. Biol. Chem., 238, 918, 1963.
14. Huang R. C. C., Bonner J. Proc. Natl. Acad. Sci. US., 48, 1216, 1962.
15. Huang R. C. C., Bonner J., Murray K. J. Mol. Biol., 8, 54, 1964.

16. Johns E. W. Biochem. J., 92, 55, 1964.
17. Johns E. W., Butler J. A. V. Biochem. J., 82, 15, 1962.
18. Johns E. W. J. Bonner and P. TS'o eds. Holden-day. San-Francisco, California, 52—57, 1964.
19. Mac Gillivray A. J. Biochem. J., 101, 24, 1966.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982.

УДК 612.014.4

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРЬЯ

Г. А. КАЗАРЯН, Т. Г. СТЕПЛЯН, А. Г. САРУХАНИЯ,
А. С. ЗУРАБЯН, С. С. ГАМБАРОВ, А. С. АМБАРЦУМЯН

Определялись изменения в гормональной и иммунной системах организма в процессе адаптации к условиям среднегорья и высокогорья. Результаты исследования указывают на то, что эти изменения находятся в прямой зависимости от высоты наблюдения.

Ключевые слова: высокогорье, клеточный иммунитет, гормоны, эндокринная система.

Различным вопросам влияния неблагоприятных факторов высокогорья на организм человека посвящены многочисленные публикации отечественных и зарубежных исследователей [1—3, 6, 7, 14—16]. В наши дни в связи с широким освоением территории земного шара для работы в экстремальных климатических условиях изучение роли эндокринных факторов в процессах адаптации является особенно актуальным, тем более что приводимые в литературе данные по этому вопросу отрывочны и зачастую противоречивы [5, 8, 9, 17, 18]. Целью проведенных нами исследований было определение функциональной активности системы гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа-надпочечники у сотрудников Ереванского физического института на ст. Нор-Амберд и Арагац на высоте соответственно 2000 и 3250 м над ур. м., а также определение у них иммунологических и гематологических показателей.

Материал и методика. Обследован 31 сотрудник в возрасте от 25-ти до 60-ти лет. Все обследуемые имеют длительный производственный стаж от 5-ти до 20-ти лет и являются коренными жителями Аштаракского района (1600 м) и г. Еревана (960 м). К моменту обследования все сотрудники находились на станции от 7-ми до 10-ти дней. Исследования проводились в зимне-весеннее время. С помощью тест-наборов фирмы Corning (США) и Sea Sorin (Франция) радиоиммунологическим методом определяли уровень в крови трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4), тиреотропного гормона (ТТГ) и кортизола. Одновременно определяли содержание общего йода крови титрометрическим вариантом каталитического метода [13]. Кроветворение и клеточный иммунитет определяли общепринятыми методиками.