

печени и более слабого - в мозге и почках.

Полученные данные позволяют заключить, что при создании условий для вовлечения образовавшегося при дезаминировании аминокислот аммиака в биосинтетические процессы, в частности, в биосинтез карбомилфосфата и далее цитруллина, предотвращается ингибирующее влияние его на ферментативные системы дезаминирования аминокислот, и последние приобретают возможность функционировать в условиях гомогенатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А.Е. Биохимия аминокислотного обмена. 91-105, М., 1949.
2. Браунштейн А.Е., Азарх Р.М. Биохимия, 9, 337-357, 1944.
3. Браунштейн А.Е., Северина И.С., Бабская Ю.Е. Биохимия, 21, 738, 1956.
4. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Биохимия, 18, 393-411, 1953.
5. Геворкян Ж.С., Оганесян А.С. ДАН Арм.ССР, 58, 229-235, 1974.
6. Archibald R.M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.

Поступила 15.VIII.1997

Биол. Журн. Армении, 1-2 (51), 1997

УДК 577.963.3

НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

А.О. ВАРДЕВАНИАН, А.М. ДАВТЯН, М.Б. МОЛАН РАД,
М.О. ХЕЧОЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Исследованы изменения негистоновых белков хроматина печени крыс при введении смеси аминокислот и гидрокортизоновой индукции. Показано, что при обеих формах индукции негистоновые белки хроматина печени крыс претерпевают существенные изменения, выявляемые при их электрофоретическом разделении и фракционировании на ионообменнике.

Ուսումնասիրվել են առնետների լյարդի քրոմատինի ոչ հիստոնային սպիտակուցային փոփոխությունները, ամինաթթուների խառնուրդ ներարկելիս և հիդրոկորտիզոնով հրահրելիս: Ցույց է տրվել, որ երկու եղանակով էլ հրահրելիս առնետների լյարդի քրոմատինի սպիտակուցները կրում են էական փոփոխություններ, որոնք ի հայտ են գալիս նրանց էլեկտրոֆորետիկ և իոնափոխանակային բաժանման ժամանակ:

Changes of chromatin non-histone proteins in rats liver were studied during injection of amino acids mixture and hydrocortisone induction. Both forms of induction caused essential changes in chromatin non-histone proteins which were revealed by electrophoretic separation and fractionation on ion exchanger.

Негистоновые белки хроматина - негормональная индукция

Механизмы гормональной индукции хорошо и детально изучены на всех уровнях клеточного метаболизма, включая взаимодействие гормонрецепторного комплекса с хроматином, происходящее в хроматине. О механизмах же негормональной индукции известно мало [3,6]. Особенно это касается изменений, происходящих в хроматине. Исследование хроматина в этом процессе является принципиальным, так как выявление специфических изменений хроматина и его отдельных компонентов на различных уровнях его организации и сопоставление этих изменений с таковыми при гормональной индукции может помочь вычленить общее и специфическое в этих процессах.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании негистоновых белков хроматина (НГБ), которые являются важным звеном регуляции генной активности. Качественные и количественные изменения этих белков при введении смеси аминокислот (АК) в сравнении с контролем и при индукции гидрокортизоном (ГК) могут пролить свет на степень их вовлеченности при указанных условиях.

Материал и методика. Исследования проводили на белых беспородных крысах с массой тела 100-150 г. Полную смесь аминокислот вводили внутривенно [5] из расчета 180 мг на 100 г массы тела животного; крыс забивали через 5 ч после введения. Гидрокортизоновую эмульсию вводили внутривенно из расчета 5 мг на 100 г массы тела животного. Декапитацию животных осуществляли через 4 ч после введения гормона. Хроматин получали из ядер перфузированной печени по методу, описанному ранее [5]. Чистоту и воспроизводимость получения препаратов хроматина проверяли измерением оптических параметров хроматина при разных длинах волн (эти соотношения были равны: $A_{260/280}=1,7\pm0,05$, $A_{260/240}=1,4\pm0,05$, $A_{260/230}=1,3\pm0,04$, $A_{260/320}=35\pm1,2$).

Тотальный негистоновый белок из хроматина печени крыс выделяли известным методом [1] с некоторыми модификациями. Суспензию хроматина, концентрация которого при этом составляла 30 О.Е., диссоциировали 2 М NaCl и 0,7М фосфатом натрия (рН 7,0). Содержимое перемешивали на холоду в течение 8 ч. Диссоциированный хроматин диализовали против 9 объемов 10 мМ Трис - HCl (рН 9,0) и центрифугировали при 25000 g в течение 2 часов.

Фракционирование негистоновых белков проводили на QAE - Сефадексе А-25 [2], уравновешенном буфером А (5 М мочевины, 0,5М дигиотрейтол, 0,5М $MgCl_2$, 1М ЭДТА - в 10 мМ Трис-HCl, рН 8,3). Тотальный НГБ перед нанесением на колонку диализовали против буфера А в течение 18 ч. Элюцию осуществляли ступенчатым возрастанием концентрации NaCl (0,15; 0,4; 0,6; 1,0 М NaCl в буфере А). На колонку наносили примерно 10 О.Е. белка при длине волны 280 нм. Высота столбика ионообменника составляла 12 см (объем 18 мл). Регистрацию профилей элюции проводили при $\lambda=280$ нм в проточной кювете объемом 0,3 мл на спектрофотометре Specord UV VIS, подключенном к самописцу К-200. Фракции собирали на коллекторе по 3 мл. Все операции проводили при 4°.

Электрофорез тотального негистонового белка проводили в системе DS-Na-полиакриламидный гель (DS-ПААГ) [2]. Денситометрирование электрофоретического профиля белков осуществляли на спектрофотометре Unicam SP 8-100.

Результаты экспериментов статистически обработаны.

Результаты и обсуждение. Нами изучены профили элюции НГБ, выделенных из хроматина контрольных (К) животных и животных, которым вводили смесь аминокислот (АК) и гидрокортизон (ГК).

Как видно из рис. 1, при вымывании фракции 0,15 М NaCl белок элюируется некомпактным пиком, в случае использования 0,4 М NaCl НГБ обретают сложный профиль и, наконец, использование 0,6 и 1,0 М NaCl

приводит к элюированию белков компактными пиками. Профиль элюции НГБ опытных вариантов в основном аналогичен обнаруживаемому в контрольных пробах с определенными различиями между отдельными фракциями. Например, в тех, которые получались вымыванием 0,4 М NaCl; НГБ, выделенные из хроматина животных, которым вводилась смесь аминокислот, элюируется с дополнительным плечом. Вместе с тем, оно оказывается слабовыраженным в случае выделения НГБ из хроматина животных, стимулированных гидрокортизоном, и полностью отсутствует в контрольном варианте. Относительное содержание отдельных фракций НГБ приведено в таблице. Видно, что при активации хроматина как смесью аминокислот, так и гидрокортизоном имеют место заметные количественные изменения в отдельных фракциях НГБ, элюируемых при ступенчатом повышении концентрации NaCl. Если при элюции белков 1,0 М NaCl между контрольным и опытным вариантами заметных различий не наблюдается, то при остальных концентрациях его (0,15; 0,4; 0,6 М) выявляются существенные расхождения. Причем, если гидрокортизон увеличивает относительное содержание фракции, вымываемой 0,15 М NaCl, то смесь аминокислот, наоборот, уменьшает его, хотя и количество фракций, вымываемых 0,4 М NaCl, при обеих формах индукции претерпевает однонаправленное изменение. Примечательно, что в случае действия смеси аминокислот это увеличение составляет примерно 4,6% по сравнению с контролем, а на фоне гормональной индукции оно достигает примерно 7,5%. Противоположная картина наблюдается при элюции 0,6 М NaCl, когда под воздействием введенной смеси аминокислот и гидрокортизона обнаруживается уменьшение выхода белка, причем в случае с гидрокортизоновой индукцией оно выражено ярче.

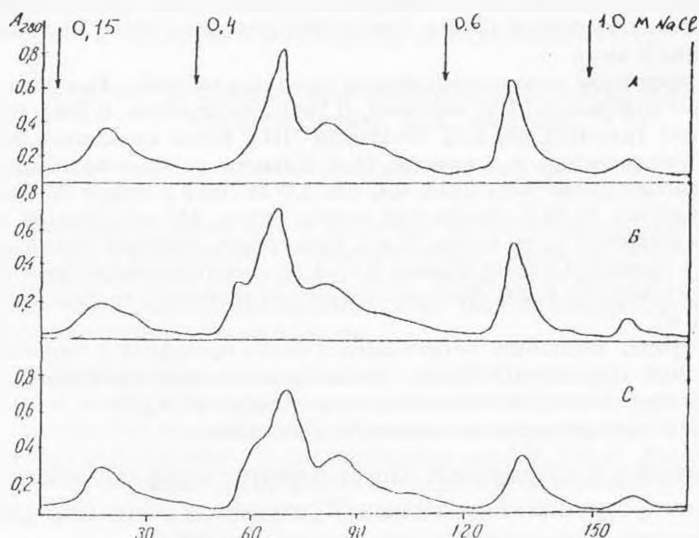


Рис 1. Профили элюции НГБ хроматина из контрольных (А) и опытных групп животных: при введении смеси аминокислот (В), гидрокортизона (С), на ионообменнике QAE-Сефадексе А-25.

Результаты электрофореза тотальных НГБ в системе DS-ПААГ,

приведенные на рис. 2, выявили определенные изменения, происходящие при обеих формах индукции. Как видно из денситограмм, они характеризуются возрастанием некоторых зон, при одновременной редукции других. Это, в частности, касается зоны 7, увеличивающейся при введении смеси аминокислот и не изменяющейся при введении гидрокортизона. Вместе с тем зоны 11 и 12 при разных формах индукции претерпевают разнонаправленные изменения. Изучаемые виды индукции приводят к уменьшению 13 и 15 зон и возрастанию 16 и 17, что наиболее отчетливо проявляется при использовании смеси аминокислот.

Изменения в характеристиках тотальных НГБ при обеих формах активации хроматина с использованием метода ступенчатой ионообменной хроматографии и электрофореза позволяют сделать вывод о наличии значительных изменений НГБ, обусловленных преимущественно сдвигами, имеющими место в хроматине. Разнонаправленность отмечаемых сдвигов в вымываемых NaCl фракциях НГБ, а также изменения в зонах денситограмм указывают на запуск при этих двух формах индукций отличающихся друг от друга механизмов, регулирующих перестроечные процессы в хроматине. В табл. 1

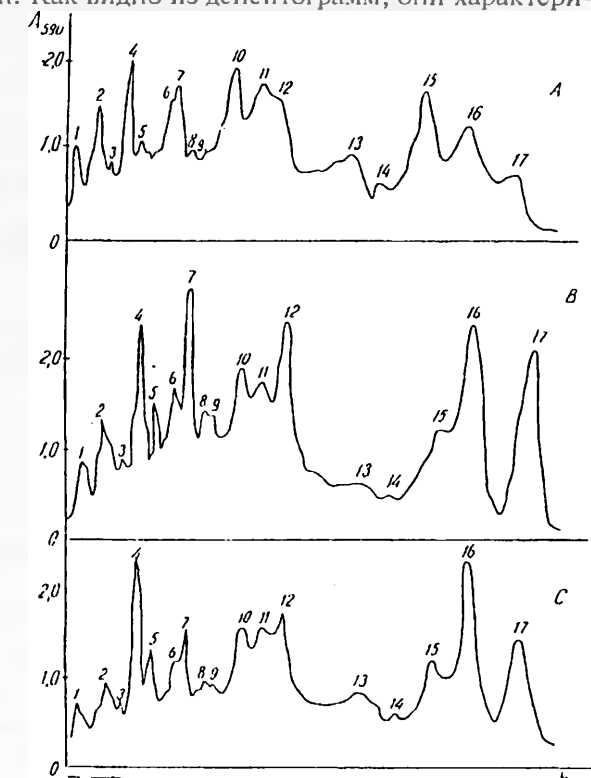


Рис 2. Денситограммы электрофоретических профилей тотальных белков, выделенных из контрольных (А) и индуцированных смесью аминокислот (В) и гидрокортизоном (С).

Таблица 1. Относительное содержание (в %) отдельных фракций негистоновых белков, выделенных из хроматина контрольных животных, и животных, которым вводили смесь АК и ГК, при элюировании различными концентрациями NaCl

Концентрация NaCl, М	Фракции НГБ		
	Контроль	АК	ГК
0,15	24,3±0,2	21,4±0,3	26,8±0,3
0,4	49,7±0,4	54,3±0,5	57,2±0,7
0,6	22,8±0,3	19,8±0,4	12,1±0,3
1,0	3,2±0,1	4,5±0,2	3,9±0,2

Примечание: всю площадь под кривой элюции принимали за 100%, абсолютное значение площадей отдельных пиков рассчитывали по формуле $S = \frac{h_i a_i}{2}$, где h_i - высота пика, a_i - его ширина.

приведены средние арифметические значения, $\pm$ стандартная ошибка.

Полученные результаты подтверждают факт существования истинной индукции ферментов белкового катаболизма при введении смеси аминокислот, однако вопросы, связанные с пониманием механизмов экспрессии генов при негормональной индукции, еще далеки от своего окончательного решения, что делает актуальной дальнейшую разработку задач, связанных с выяснением особенностей функционального статуса хроматина при этой форме индукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борщевская Т.А., Добрецов Г.Е., Петров В.А., Молек. биол., 9, 5, 676-682, 1975.
2. Вардеванян А.О., Вардапетян Р.Р., Тирацунян С.Г., Паносян Г.А. Физиол. раст., 32, 6, 1114-1119, 1985.
3. Вардеванян П.О., Тирацунян С.Г., Галстян Р.Г., Шибиб Г.Х., Давтян М.А. Вopr. мед. химии (деп. рук. ВИНТИ 07. 05. 1990, N 2400-13).
4. Давтян А.М., Вардеванян А.О., Акопян Л.М., Карагезян К.Г. Биолог. журн. Армении, 42, 9-10, 946-949, 1989.
5. Давтян М.А., Вардеванян П.О., Тирацунян С.Г., Шибиб Г.Х. Биохимия, 52, 5, 737-742, 1987.
6. Давтян М.А., Вардеванян П.О., Тирацунян С.Г., Шибиб Г.Х. Биолог. журн. Армении, 41, 1, 38-45, 1988.

Поступила 30.1.1997

Биолог. Журн. Армении, 1-2 (51), 1998

УДК 612.014.462.4

ПРОСТАГЛАНДИН F_{2a} СТИМУЛИРОВАННОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭРИТРОЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

А.В. ГЮЛЬХАНДАНЯН*, М.П. МАХАУТ-СМИТ**, А.К. БЛБУЛЯН***

*Институт биохимии НАН Армении 375044, Ереван

**Кембриджский университет, Кембридж, Англия

***Центр перинатологии, акушерства и гинекологии МЗ Армении, Ереван

Используя Ca^{2+} -й флуоресцентный индикатор фура-2, изучали влияние простагландина F_{2a} на Ca^{2+} -й отклик единичной клетки линии человеческих эритролейкемических клеток. Выявлено преходящее увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Форма Ca^{2+} -й кривой в условиях присутствия ЭГТА несколько отличается от кривой, полученной при его отсутствии. Предполагается, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в основном обусловлено выходом Ca^{2+} из внутриклеточных запасов.

Օգտագործելով Ca^{2+} -ական լուսածորող ֆուրա-2 ինդիկատորը, ուսումնասիրել է ենթալոբարի արոստագլանդին F_{2a} -ի, ազդեցությունը մարդու էրիթրոլեյկեմիկ բջիջներին