



УДК 547.963.3.611+616.127—005.8 : 0.96

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ХРОМАТИНА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОДНОСТОРОННЕЙ ГАНГЛИОСИМПАТЭКТОМИИ

КАРАГЕЗЯН К. Г., ОВЕЯН Г. А., ДЕМИН Ю. М., ОВСЕПЯН А. М.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

*Ереванский государственный медицинский институт

На фоне односторонней ганглиосимпатэктомии (удаление правого верхнего шейного симпатического узла) были изучены флуоресцентные характеристики и фосфолипидный состав хроматина. Впервые при односторонней ганглиосимпатэктомии показаны изменения в физико-химических свойствах хроматина, в качественном и количественном составе связанных с ним фосфолипидов и жирных кислот, входящих в состав этих соединений.

Показано, что фосфолипиды принимают активное участие в функциональной регуляции генетического аппарата клетки, контролируемой со стороны симпатической НС.

Установлено, что ганглиосимпатэктомия сопровождается значительными: качественными и количественными сдвигами гистонов, негистоновых белков, нуклеиновых кислот клеток головного мозга, что, естественно, может привести к расстройствам структурной организации и функциональной активности хроматина [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение на фоне ганглиосимпатэктомии физико-химических свойств хроматина с использованием данных по изучению флуоресцентных показателей, сдвигов качественного и количественного состава фосфолипидов и их жирнокислотного спектра.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах, массой 180—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Правый верхний шейный симпатический узел удаляли под легким эфирным наркозом. О достоверности проведенной операции судили по развивающемуся синдрому Клода-Бернара-Горнера (четко выраженный анофтальм, сужение глазной щели и зрачка). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 7 суток после экстирпации узла. Ядра выделяли по методу Dingman, Sprogn [2] и очищали. Из последних получали хроматин

по методу Shaw, Huang [3] и изучали его флуоресценцию в 0,001 М трис-НСl буфере, рН 8,0 в концентрации 25 и 50 мкг/мл в прямоугольных кварцевых кюветах 1×1 см при комнатной температуре на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A («Hitachi», Япония) при максимальной чувствительности прибора и ширине щелей монохроматоров 6—10 ммк. Экстракцию фосфолипидов (ФЛ) из хроматина проводили по методу Folch [4] в модификации Карагезяна [5]. Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли с помощью одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля марки КСК в системе растворителей хлороформ/метанол/аммиак в соотношении 65:35:5. Идентификацию пятен ФЛ проводили с помощью фирменных, химически чистых свидетелей («Sigma», США). Минерализацию липидного фосфора проводили в среде серной и азотной кислот с последующим пересчетом в мкг на 1 мг свежего хроматина [6]. Метилловые эфиры жирных кислот ФЛ получали по методу Штоффеля [6]. Состав высших жирных кислот ФЛ хроматина определяли методом ГЖХ на хроматографе «Хром-5» (ЧССР) с пламенноионизационным детектором. В качестве жидкой фазы использовали полиэтиленгликольсукцинат, твердой—хромосорб. Газ-носитель гелий. Температура испарителя, колонки и детектора соответственно 210, 180 и 210°. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили путем сравнения с хроматограммой смеси насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот с длиной углеродной цепи C_{14-22} .

Результаты и обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали относительное повышение при ганглиосимпатэктомии интенсивности флуоресценции хроматина в обоих полушариях мозга (рис. 1), сопровождающееся подавлением квантового выхода и некоторым сдвигом спектров возбуждения (287 нм в правом, со стороны эктомированного шейного ганглия и 288 нм в левом, интактном полушариях против 292 нм контроля) и эмиссии (325 нм в правом и 328 нм в левом полушариях против 330 нм контроля) в коротковолновую область. При диссоциации же хроматина 2 М раствором NaCl происходит относительное повышение интенсивности флуоресценции контрольного хроматина по сравнению с хроматином эктомированной и интактной сторон и увеличение квантового выхода. При этом отмечается также сдвиг спектров возбуждения и эмиссии в коротковолновую область (289 нм против 292 нм и 325 нм против 330 нм соответственно) без выхода, однако, за пределы, характерные для триптофанильных остатков [7]. Вместе с этим с эктомированной стороны констатируется смещение спектра эмиссии хроматина в длинноволновую область (328 нм против 325 нм), что свидетельствует об изменении полярности микроокружения вокруг триптофанилов белков хроматина [8]. Примечательно, что наличие положительной заряженности служит причиной перемещения спектра излучения в коротковолновую область. Таким образом, становится очевидным, что эффект десимпатизации сопровож-

дается изменениями в хроматине, носящими разнонаправленный характер, в связи с чем было предпринято также изучение и флуоресценций катионного красителя АО (акридин-оранж), адсорбированного на хроматине. Исследования показали, что для комплексов АО+хроматин характерны незначительный коротковолновый сдвиг спектров флуоресценции, возрастание интенсивности и длительности флуоресценции крас-

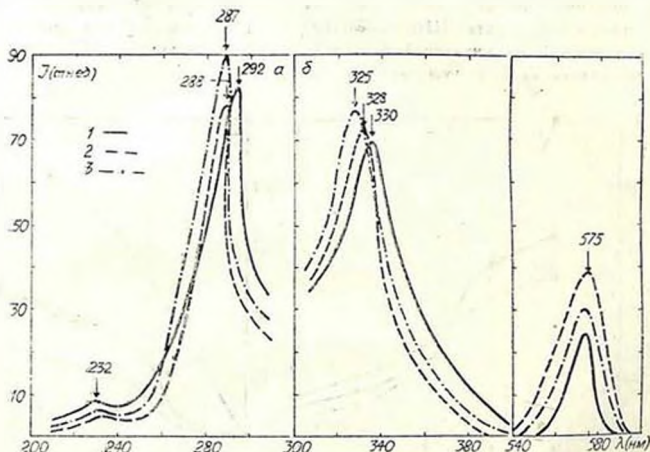


Рис. 1. Спектры экстинкции (а) при E_{in} W-330 нм и эмиссии (б) при E_{ex} W-292 нм хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс; 1—контроль (неоперированные животные), 2—левое интактное полушарие, 3—правое эктоморфное полушарие. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—7 нм. Хроматин разбавлен в 20 раз в $\times 10^{-3}$ М трис-НСI буфер, рН 8.0.

теля, имеющие более выраженное проявление в хроматине интактного полушария и в хроматине обоих полушарий контрольных животных. Эти данные свидетельствуют о доступности меньшей части ДНК хроматина эктоморфной стороны к взаимодействию с красителем [9]. Были изучены и некоторые особенности взаимодействия Ca^{2+} с хроматином. При добавлении раствора $CaCl_2$ в конечной концентрации $3 \cdot 10^{-2}$ М при 575 нм наблюдается резкое возрастание интенсивности флуоресценции и светорассеяния, что фактически является проявлением феномена рассеяния возбуждающего света Релея и Тиндаля второго порядка [10]. Эти закономерности оказались наиболее демонстративными в отношении хроматина мозговой ткани с ганглиоэктоморфной стороны. Последующее добавление $CaCl_2$ сопровождается развитием эффекта тушения флуоресценции. Как видно из рис. 2, с увеличением концентрации Ca^{2+} параметры флуоресценции, отражающие структурное состояние белков хро-

матии мозговой ткани контрольных животных и в какой-то степени интактного полушария десимпатизированных животных, претерпевают скачкообразные сдвиги. Последнее свидетельствует о кооперативном характере переходов, происходящих в белках, демонстрирующих весьма высокую степень чувствительности к конформационному состоянию белковой макромолекулы [8]. Этого нельзя сказать в отношении хроматина ганглиозектомированной стороны, резко отличающегося и эффективностью тушения в координатах Штерна-Фольмера [11] от контрольного хроматина, полученного из интактной половины головного мозга, демонстрирующего сходную картину тушения (рис. 3).

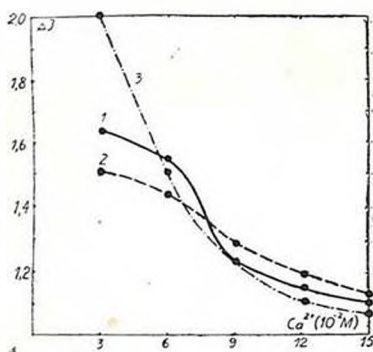


Рис. 2. Зависимость параметра ΔJ , характеризующего относительную интенсивность флуоресценции от концентрации CaCl_2 хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс. Обозначения те же, что на рис. 1

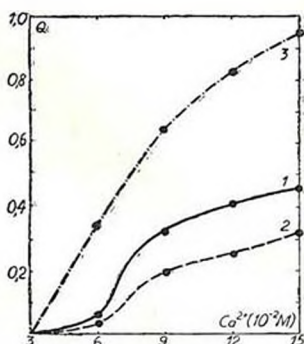


Рис. 3. Зависимость эффективности тушения (Q) в координатах Штерна-Фольмера от концентрации CaCl_2 хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс. Обозначения те же, что на рис. 1

Таким образом, при односторонней ганглиосимпатэктомии констатируются принципиально новые и значительные по существу отклонения в физико-химических свойствах хроматина, наиболее резко проявляющиеся в полушарии мозга со стороны десимпатизации. Об этом, в частности, свидетельствуют и результаты проведенных нами исследований по изучению инфракрасных спектров хроматина [12].

Учитывая имеющиеся сведения относительно изменений количества и состава гистонов, негистоновых белков, нуклеиновых кислот, разыгрывающихся и в интактной половине головного мозга при ганглиосимпатэктомии, можно прийти к заключению о разнонаправленности изменений, совершающихся во взаимодействиях между ДНК и белками хроматина. При этом существенна также роль липидного окружения, обеспечиваемого преимущественно за счет фосфолипидов, принимающих, по всей ве-

Таблица 1

Состав фосфолипидов хроматина головного мозга белых крыс при
односторонней ганглюсимпатэктомии
(абсолютные количества, $M \pm m$ и % от суммы фосфолипидов)

Фосфолипиды	Контрольный хроматин		Хроматин правого полушария			Хроматин левого полушария		
	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	% отклонение от контроля	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	% отклонение от контроля
Фосфатидхолины	$4,579 \pm 0,107$	40,5	$3,296 \pm 0,025^*$	40,3	$< 28,0$	$3,464 \pm 0,011^*$	40,0	$< 24,3$
Фосфатидэтанолламины	$2,031 \pm 0,050$	18,0	$1,383 \pm 0,038^*$	16,9	$< 31,9$	$1,226 \pm 0,033^*$	14,1	$< 39,6$
Сфингомиелины	$1,457 \pm 0,036$	12,8	$0,933 \pm 0,011^*$	11,4	$< 40,0$	$1,020 \pm 0,013^*$	11,8	< 30
Монофосфоэтидифосфатиды	$1,432 \pm 0,031$	12,7	$0,891 \pm 0,039^*$	10,9	$< 37,8$	$0,926 \pm 0,013^*$	10,7	$< 35,2$
Фосфатидилсерины	$0,909 \pm 0,018$	8,0	$0,816 \pm 0,015$	10,0	$< 10,2$	$1,076 \pm 0,027^{**}$	12,4	$> 18,4$
Кардиолипины, фосфатидная кислота	$0,901 \pm 0,032$	8,0	$0,856 \pm 0,021$	10,5	$< 5,0$	$0,954 \pm 0,017$	11,0	$> 5,9$
Общее количество	$11,309 \pm 0,130$	100	$8,175 \pm 0,088^*$	100	$< 27,7$	$8,669 \pm 0,054^*$	100	$< 23,3$
Коэффициент нейтральных ФЛ к кислым ФЛ	2,48		2,26		$< 8,9$	1,93		$< 22,2$

Примечание. * $p < 0,001$, ** $p < 0,02$

роятности, немаловажное участие в качестве одного из существенных компонентов генетического аппарата. Нами были изучены изменения в качественном и количественном составе фосфолипидов хроматина при односторонней ганглиосимпатэктомии. Как видно из табл. 1, последняя сопровождается снижением общего содержания фосфолипидов хроматина как в правом (на 27%), так и в левом (интактном) полушариях мозга. Эти результаты свидетельствуют о возможном снижении матричной активности хроматина путем изменения степени гидрофобных взаимодействий между ДНК и гистонами, а также влиянием на конформацию белков и белок-белковые взаимодействия, уменьшая доступность РНК-полимераз к промоторной области гена [13]. В реализации отмеченных сдвигов важное значение имеет, по-видимому, уменьшение относительного количества сфингомиелина и фосфатидилинозита (табл. 1).

Таблица 2

Жирынокислотный состав фосфолипидов хроматина головного мозга белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии (% от суммы жирных кислот)

Жирные кислоты	ЖК ФЛ контрольного хроматина	ЖК ФЛ хроматина правого полушария	ЖК ФЛ хроматина левого полушария
C _{14:0}	1,01±0,04	1,02±0,04	1,58±0,05*
C _{15:0}	0,69±0,04	0,74±0,06	1,31±0,02*
C _{16:0}	20,37±0,22	32,06±0,52*	26,64±0,67*
C _{16:1}	4,83±0,29	3,79±0,16***	7,02±0,61****
C _{17:0}	2,86±0,17	3,08±0,20	4,58±0,22**
C _{18:0}	29,08±0,38	27,26±0,25***	19,48±0,76*
C _{18:1}	26,87±0,39	24,07±0,49**	23,51±0,31**
C _{18:2}	6,28±0,41	4,12±0,31**	5,58±0,27
C _{20:3}	4,95±0,48	1,12±0,11*	3,46±0,134****
C _{20:4}	3,07±0,16	2,75±0,06****	6,87±0,25*
Насыщенные	54,01±0,43	64,15±0,35*	53,58±0,09
Моноеновые	31,70±0,47	27,86±0,55**	30,42±0,34****
Полиеновые	14,29±0,74	7,95±0,36*	16,03±0,31****

Примечание. ЖК ФЛ—жирынокислотный состав фосфолипидов; * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,02$; **** $0,05 > p > 0,02$.

Однако матричная активность хроматина зависит не только от спектра и количественного содержания отдельных фракций, но и от жирнокислотного состава фосфолипидов хроматина [13, 14]. Поэтому нами было предпринято специальное изучение жирнокислотного состава фосфолипидов хроматина при односторонней ганглиосимпатэктомии и, как вытекает из данных табл. 2, наблюдающиеся изменения носят разносторонний характер. Так, например, увеличение уровня насыщенных жирных кислот совершается, в основном, за счет C_{16:0}, а уменьшение количества полиеновых жирных кислот фосфолипидов хроматина в эктомированном полушарии свидетельствует о подавлении РНК-полимеразной ак-

тивности [15]. Этого нельзя сказать в отношении хроматина интактного полушария мозга: здесь, наоборот, имеет место увеличение содержания полиеновых жирных кислот при почти неизменном уровне насыщенных с одновременным уменьшением количества $C_{18:0}$ по сравнению с контролем. Этот факт мы склонны объяснить компенсаторным характером описанных изменений в хроматине интактного полушария, что и находит свое подтверждение в картине разносторонних изменений физико-химических свойств хроматина при односторонней ганглиосимпатэтомии.

FLUORESCENT AND PHOSPHOLIPID ANALYSIS OF RAT BRAIN CHROMATINE AFTER THE UNILATERAL GANGLIOSYMPATHECTOMY

KARAGEOZIAN K. G., HOVEYAN G. A., DYOMIN Yu. M.,
HOVSEPIAN L. M.

Institute of Experimental Biology, Arm. Acad. Sci. and Yerevan
State Medical Institute, Yerevan

The fluorescent characteristics and phospholipid composition of chromatine were studied under the conditions of unilateral gangliosympathectomy (removal of high cervical right sympathetic ganglion).

Alterations in physico-chemical properties of chromatine after the unilateral gangliosympathectomy have been first demonstrated, as well as the quantitative and qualitative changes in the phospholipids and fatty acids associated with it. Thus, the data obtained lead us to the conclusion that phospholipids play an important role in functional regulation of cell genetic apparatus controlled by sympathetic nervous system.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочарян К. М. Канд. дисс., Ереван, 1981.
2. Dingman C. W., Sporn M. B. J. Biol. Chem., v. 239, p. 3483-3488, 1964.
3. Shaw L. M. J., Huang R. C. Biol. Chem., v. 9, p. 4530-4536, 1970.
4. Folch J. J. Biol. Chem., v. 145, p. 35-40, 1942.
5. Карагеомян К. Г.—В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма, с. 267, Ереван, 1972.
6. Методы биохимических исследований, (под ред. М. И. Прохоровой), Ленинград, ЛГУ, 1982.
7. Давтян М. А., Каварян Р. Р., Асмин Ю. М. Биол. журн. Армении, т. 31, № 7, 714-719, 1978.
8. Черницкий Е. А.—В кн.: Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке, с. 277, Минск, Наука и техника, 1972.
9. Борисова О. Ф., Суrowая А. Н. Молекуляр. биология, т. 1, с. 141-195, Итоги науки и техники, 1973.
10. Юленфредд С.—В кн.: Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, с. 484, М., Мир, 1965.
11. Бурштейн Э. А. Биофизика, т. 7, с. 187, Итоги науки и техники, 1977.

12. Овсян Г. А., Кочарян К. М., Саакян Л. А. V Всесоюз. биохимический съезд, т. 2, с. 364, Киев, Наука, 1986.
13. Алесенко А. В., Пальмина Н. П.—В кн.: Биоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 84—100. М., Наука, 1982.
14. Буракова Е. Б., Джалялова М. И., Гвахария В. О., Глуценко Н. Н., Молочихина Е. М., Штолько В. Н.—В кн.: Биоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 113—140. М., Наука, 1982.
15. Бабенко Н. А. Украинский биохим. журнал, т. 58, № 3, с. 40—47, 1985.

Поступила 25. III 1989