

Влияние антигистоновой сыворотки на фракционный состав гистонов при иммунном ответе

Р. А. Башникова

Несмотря на то, что гистоны — довольно хорошо изученный класс белков, роль их в регуляции генетической активности клеток при иммунном ответе до сих пор не выяснена. С целью изучения влияния гистонов на генетические механизмы регуляции была применена антигистоновая сыворотка, хотя получение антител к гистонам осложняется их слабой антигенностью, причин которой несколько: 1-я — консервативность гистонов, приводящая к тому, что при иммунизации гистоновыми фракциями животное получает фактически свой собственный или очень сходный с ним белок; 2-я — низкое содержание ароматических аминокислот; 3-я — низкая молекулярная масса гистонов; 4-я — высокий положительный заряд; 5-я — слабо выраженная вторичная структура молекулы; 6-я — чувствительность к действию протеолитических ферментов [9]. Однако в ряде работ сообщалось, что все это удалось преодолеть, закрепив вторичную структуру молекулы комплексированием с высокомолекулярным носителем [8].

Учитывая имеющиеся в литературе данные о возможном участии гистонов в регуляции активности генов, изменении функциональной активности генетического материала, качественных и количественных перестройках электрофоретических спектров нуклеиновых кислот и гистонов лимфоидных клеток при формировании иммунного ответа и иммунологической памяти на гетеро- и аллоантигены [1, 7], мы поставили перед собой следующую задачу: исследовать электрофоретический спектр гистонов, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов, в условиях применения антигистоновой сыворотки на фоне первичной и вторичной алло- и гетеросенсибилизации организма трансплантационными антигенами кожи.

Методика

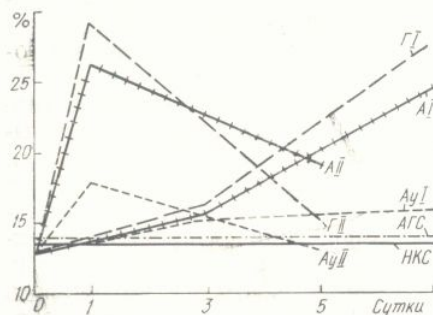
Исследования проведены на 380 мышах линии СВА. Эффект первичной аллосенсибилизации достигали внутрибрюшинным введением 0,9 мг водорастворимого кожного антигена, полученного из кожи мышей С₅₇BL, вторичной — повторным введением антигена (интервал — 7 сут после первой инъекции). Эффект первичной и вторичной гетеросенсибилизации достигали соответственно с помощью крысиного кожного антигена. Антисыворотку к суммарному гистону (титр преципитирующих антител по методу Уанье составлял 1:2560; титр агглютинирующих антител в РПГА — 1:32) вводили каждому животному по 0,25 мл (1,8 мг белка) однократно за 24 ч до забора органов. Антигистоновую сыворотку (АГС) получали иммунизацией кроликов с учетом рекомендаций Заленской [6]. В общей сложности за весь курс иммунизации каждый иммунопродуцент получал по 32,5 мг белка.

Трудности, с которыми приходится сталкиваться при выделении гистонов, составляют часть общей проблемы выделения ядерных компонентов из клеток. В связи с этим воспользовались методами, позволяющими экстрагировать гистоны в количестве, достаточном для их разделения на индивидуальные молекулярные фракции.

Изучение электрофоретического спектра гистонов осуществляли в условиях воздействия АГС на 3-и и 7-е сутки формирования первичного или на 1-е и 5-е сутки формирования вторичного иммунного ответов к аллогенному и гетерогенному антигенам кожи. Электрофореграммы обрабатывали на денситометре типа «Chomосkan 200/201» (Англия). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью непараметрического критерия U [5].

Результаты и их обсуждение

При сравнении количественного соотношения отдельных фракций в составе суммарных гистонов, выделенных из лимфоцитов лимфоузлов животных при формировании первичного иммунного ответа в условиях воздействия АГС, заметна тенденция к статистически достоверному росту фракции Н1 с увеличением срока сенсибилизации до 7 сут. Так (рисунок), при введении аутологичного антигена относительно содержание фракции Н1 составляет 16,1, алло— 24,7; гетеро— 28,0 % (в контроле— 12,9, на фоне НКС— 13,5; на фоне АГС— 14,1 %).



Изменение фракции гистона H1 в условиях воздействия АГС при иммунном ответе:

I — первичный иммунный ответ; *II* — вторичный иммунный ответ; АГС — антигистоновая сыворотка; НКС — нормальная кроличья сыворотка; Ау — аутологичный антиген; А — аллогенный антиген; Г — гетерогенный антиген.

аутологичным антигеном появлением гетерогенности (разделением на 2—3 подфракции). Увеличение фракции Н1 сопровождается соответствующим уменьшением доли совместно идущих фракций Н3 и Н2В. Фракции Н2В и Н4 претерпевают незначительные изменения.

Изменение электрофоретического спектра суммарных гистонов на 3-и сутки формирования первичного иммунного ответа не выявило существенных сдвигов количественной и качественной характеристик отдельных фракций. Содержание фракций Н1 при использовании аутологичного антигена составляло 15,0, алло— 15,6, гетеро— 16,2 %.

Согласно полученным данным относительная электрофоретическая подвижность фракции Н1 при увеличении срока первичной сенсibilизации организма трансплантационными антигенами кожи до 7 сут несколько увеличивается: на фоне аутологичного антигена до 0,34 см, алло- — до 0,37, гетеро- — до 0,39 см (в контроле — 0,30, на фоне НКС — 0,30 и на фоне АГС — 0,31 см). Подвижность остальных гистоновых фракций значительно выше подвижности фракции Н1 и подвержена незначительным изменениям. Не заметны отклонения относительной электрофоретической подвижности гистоновых фракций на 3-и сутки формирования первичного иммунного ответа к аутологичному, аллогенному и гетерогенному антигенам кожи. Это означает, что формирование первичной сенсibilизации организма на 7-е сутки алло- и гетероантигенами кожи в условиях однократного применения АГС сопровождается тенденцией к увеличению фракции Н1, которая при гетеросенсibilизации (28,0 %) более выражена, чем при аллосенсibilизации (24,7 %). Относительный количественный рост гистона Н1, синтез которого по сравнению с синтезом других гистонов осуществляется скорее, сочетающийся с его качественными изменениями (появлением гетерогенности), по всей вероятности, связан с усилением пролиферации лимфоидных клеток, сопровождающимся увеличением синтеза клеточных (в том числе и ядерных) белков под влиянием антигенного раздражения и воздействием АГС.

При анализе электрофоретического спектра суммарных гистонов в период формирования вторичной сенсибилизации на фоне применения АГС выявлен четкий ответ на 1-е сутки (особенно в сериях исследований с использованием гетероантигенов кожи).

Проведенные исследования показали (см. рисунок), что при гиперсенситизации содержание фракции Н1 составляло 29,0, алло- — 26,1, ауто- — 17,7 %. Количественный рост фракции Н1 сопровождался

ее выраженной гетерогенности разделялась на 5—2—3 подфракции. На 5-м гистона H1 значительное влияние гетеро- и аутоиммунным значениям (15,1 и 10,3) в серии с аллосенсибилизацией.

Относительная элек-
тр. Н1 на 1-е сутки форми-
руется однократного примене-
ния 0,37, к аллоантигенам
На 5-е сутки значения
0,32, 0,31 и 0,31 см. По-
сле и несущественно в:

Несомненно, фракция H1 занимает особое место. В состав хроматина [10, 11] входит матричную активность гистона H1 в составе нуклеосомы. В хроматине остаются все фракции гистона H1, обладающие активностью генов [2]. В зависимости от времени в сериях исследований в течение 1-е сутки формирования действия АГС, вероятно, в этой фракции от функции исследования по содержанию гистона H1 его электрофоретический вариант гистона H1 в хроматин и тем самым активности. Возможно для возникновения фибрильного происхождения фибрильных свойств г

Выводы

1. Основные ядерные узлы претерпевают алло- и гетеросенсибилизации антигенного во

2. Однократное значительный рост ф делением ее на под первичного иммунного иммунного отве нам кожи.

THE INFLUENCE OF AN COMPOSITION OF HIST

R. A. Bannikova

The portion of the H1 fr heterogeneity (division in terosensibilization period ponse and earlier stages to the essential effect o

Advanced Training Institute

Физиол. журн., 1987, т. 3

ее выраженной гетерогенностью. При гетеросенсибилизации фракция Н1 разделялась на 5—6 подфракций, при аллосенсибилизации — на 2—3 подфракции. На 5-е сутки вторичной сенсибилизации содержание гистона Н1 значительно уменьшилось в сериях исследований с использованием гетеро- и аутоантигенов кожи и почти приблизилось к исходным значениям (15,1 и 13,0 % соответственно). Исключение составила серия с аллосенсибилизацией, где доля гистона Н1 составила 18,7 %.

Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) фракции Н1 на 1-е сутки формирования вторичного иммунного ответа на фоне однократного применения АГС к гетероантигенам кожи составляла 0,37, к аллоантигенам — 0,35, к аутологичным антигенам — 0,32 см. На 5-е сутки значения ОЭП фракции Н1 составляли соответственно 0,32, 0,31 и 0,31 см. Подвижность остальных фракций значительно выше и несущественно варьирует независимо от условий опыта.

Несомненно, фракция Н1 среди основных гистоновых фракций занимает особое место. Известно, что гистон Н1 стабилизирует структуру хроматина [10, 11], а удаление фракции Н1 существенно повышает матричную активность ДНК [3]. Однако точная локализация гистона Н1 в составе нуклеосомной цепи и непосредственная его функция в хроматине остаются неизвестными [4]. Существует мнение, что не все фракции гистонов принимают одинаковое участие в регуляции активности генов [2]. Подверженность фракции гистона Н1 изменениям в зависимости от силы антигенного раздражения, регистрируемая в сериях исследований на 7-е сутки формирования первичного и 1-е сутки формирования вторичного иммунных ответов в условиях воздействия АГС, вероятно, может свидетельствовать об отличии функций этой фракции от функций остальных гистоновых фракций. Проведенные исследования позволили определить корреляцию между увеличением содержания гистона Н1 и выраженностью качественных сдвигов его электрофоретического спектра. Не исключена возможность, что варианты гистона Н1 обладают способностью сильнее компактизировать хроматин и тем самым участвовать в «грубой» регуляции генетической активности хроматина. Применение же АГС, расширяя возможности для возникновения антигенной трансформации белков лимфоидного происхождения, усугубляет изменение структурных и функциональных свойств гистонов.

Выводы

1. Основные ядерные белки (гистоны) лимфоидных элементов лимфоузлов претерпевают количественные и качественные изменения при алло- и гетеросенсибилизации, что указывает на их участие в реализации антигенного воздействия.

2. Однократное применение антигистоновой сыворотки вызывает значительный рост фракции Н1, сопровождающийся выраженным разделением ее на подфракции, не только на 7-е сутки формирования первичного иммунного ответа, но и на 1-е сутки формирования вторичного иммунного ответов к алло- и в большей мере к гетероантигенам кожи.

THE INFLUENCE OF ANTIHISTONIC SERUM ON THE FRACTIONAL COMPOSITION OF HISTONES IN THE IMMUNE RESPONSE

R. A. Bannikova

The portion of the H1 fraction was found to increase, which was accompanied by its heterogeneity (division into subfractions) in accordance with prolongation of the heterosensibilization period from 3 to 7 days in the formation of the primary immune response and earlier stages of the secondary immune response (the first day). It testifies to the essential effect of AHS on the fractional composition of summary histones.

Advanced Training Institute for Physicians, Kiev

1. Антоненко В. Т. Лимфоидная система как основа специфико-неспецифической резистентности организма и ее участие в гуморальной регуляции метаболизма // Клиническая лимфология. Тез. докл. I Всесоюз. конф. Москва, Подольск.— М.: Б. и., 1985.— С. 9—10.
2. Ашмарин И. П. Загадки и откровения биохимии памяти.— Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975.— 156 с.
3. Георгиев Г. П. Исследования структуры геномов эукариотов в Институте молекулярной биологии АН СССР // Молекуляр. биология.— 1977.— 2, вып. 6.— С. 1274—1282.
4. Глотов Б. О., Иткес А. В., Николаев Л. Г. и др. О локализации гистона H1 в хроматине // Докл. АМН СССР.— 1978.— 240, № 3.— С. 741—744.
5. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1973.— 141 с.
6. Заленская И. А., Заленская Е. О., Михайлов В. М. Методы получения и характеристики антисывороток к индивидуальным фракциям гистонов // Цитология.— 1977.— 19, № 2.— С. 238—242.
7. Коврикова Н. П., Банникова Р. А., Коруля В. А. К механизму иммуностимуляции лимфоидных клеток на повторное антигенное раздражение // Механизмы иммуностимуляции.— Киев: Б. и., 1985.— С. 104—106.
8. Козлов А. В., Берс Э. П., Водопьянова Л. Г. и др. Иммунные антисыворотки к индивидуальным фракциям гистонов тимуса теленка. I. Анализ антисывороток к гистонам количественным методом связывания комплемента // Цитология.— 1978.— 20, № 10.— С. 1167—1173.
9. Buslin M. Histone antibodies — structural probes for chromatin and chromosomes // Cell. Nucl. Chromatin.— 1978.— 4.— P. 195—238.
10. Cole R. D., Lawson G. M., Hsiang M. W. H1 histone and the condensation of chromatin and DNA // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1978.— 42, Part 1.— P. 253—263.
11. Gaubatz Y., Hardison R., Muphey Y. et al. The role of H1 in the structure of chromatin // Ibid.— P. 265—271.

Киев, ин-т усовершенств. врачей
М-ва здравоохранения СССР

Поступила 12.12.85

УДК 577.3:591.3+612.31

Влияние голодания в раннем возрасте на интенсивность окисления энергетических субстратов в тонкой кишке

В. В. Спитивский

Адаптация новорожденного организма к условиям внешней среды и становление специфических функций его органов сопровождается изменениями концентрации гормонов и метаболитов в крови при высокой интенсивности окислительного метаболизма в тканях [4, 7, 9, 12]. Считается, что главным энергетическим субстратом в слизистой кишечника крыс является глюкоза [6, 7, 8]. Однако наряду с этим показано, что в слизистой оболочке тонкой кишки животных экспериментальных видов интенсивно окисляются жирные кислоты, кетоновые тела и аминокислоты [7, 8, 10].

В связи с тем, что в теле новорожденных поросят нет запасов триацилглицеринов, их энергетические потребности обеспечиваются главным образом метаболизмом глюкозы [3, 4, 11, 13]. Высокая скорость гликолиза в тканях новорожденных поросят и недостаточный уровень развития глюконеогенеза [3, 4] способствуют развитию у них гипогликемии с нарушением деятельности разных жизненно важных органов и систем [11]. В то же время поросята 5-суточного и старше возраста даже при длительном голодании, по-видимому, способны контролировать гликемию посредством окисления жирных кислот и более экономного использования глюкозы в тканевой энергетике.

В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на познание адаптивных механизмов энергетического

обмена в желудочно-кишечных термизирующихся различных условиях голодания [1].

Показано, что скорость окисления глюкозы в печени крыс, питающихся кормом, содержащим 10% глюкозы, повышается после голодания, что обычно бывает связано с увеличением окисления жирных кислот [5, 11].

Поэтому целью настоящего исследования было изучение кратковременного голодания на окисление кетоновых тел, 1- и 5-суточных поросят физиологических механизмов [5, 11].

Методика

В опыте использованы поросята, а также отнятые от матерей поросята, содержащиеся на гидролизном корме с гидратацией им 2 раза в день (10 мл/кг). Животных из материнского отделения двенадцати в сосудики аппарата Варб (рН 7,4) Кребса—Рингера сибутирата, [1-¹⁴C]-лейцина, выявляемых в плазме при 37 °С в течение 60 мин, вали с помощью мишени, ности ¹⁴CO₂ проводили в СБС-2. Интенсивность окисления за одну минуту в 1 часе.

Результаты и их обсуждение

Из данных, приведенных в таблице, видно, что окисление глюкозы в тонкой кишке поросят 5-суточного возраста осуществляется с высокой скоростью. Это согласуется с данными других авторов [6, 7, 9, 12], что в тонкой кишке поросят 5-суточного возраста окисление глюкозы является основным источником энергии. Окисление жирных кислот и кетоновых тел в тонкой кишке поросят 5-суточного возраста является вторичным источником энергии. Окисление аминокислот в тонкой кишке поросят 5-суточного возраста является основным источником энергии.

Интенсивность образования CO₂ в тонкой кишке сытых и голодающих поросят

Исследуемый субстрат

[1-¹⁴C]-глюкоза
[6-¹⁴C]-глюкоза
[3-¹⁴C]-оксипальмитат
[1-¹⁴C]-лейцин
[1-¹⁴C]-пальмитат