

УДК 577.125.2:018

Э. С. ГЕВОРКЯН, Ю. С. БАБАЯН, Л. О. ДЕМИРХАНИЯН, Г. В. АНАНЯН

ДЕЙСТВИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА И ИНСУЛИНА НА ПОЛОЖИТЕЛЬНУЮ ЭЛЛИПТИЧНОСТЬ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

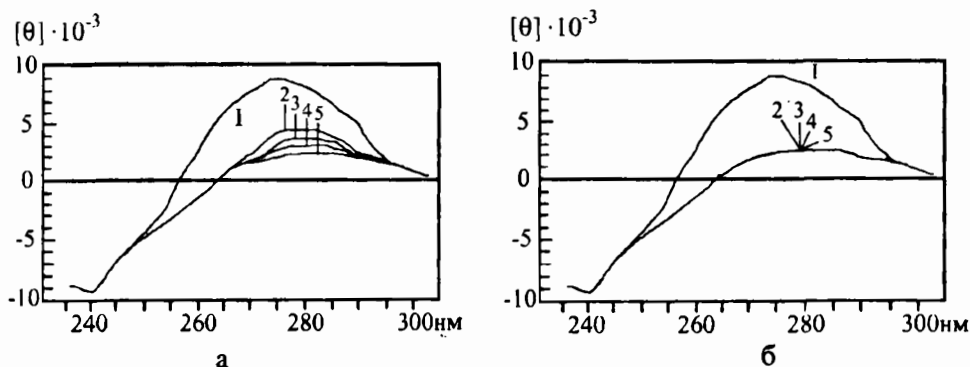
Получены величины параметра максимальной положительной эллиптичности препаратов хроматина клеток печени крыс в контроле и при воздействии *in vitro* и *in vivo* стероидного гормона гидрокортизона и пептидного гормона инсулина. Показано, что оба гормона при воздействии *in vivo* приводят к заметному повышению величины данного параметра, причем сдвиг более выражен при воздействии гидрокортизона. Воздействие гормонов *in vitro* не оказывает влияния на величину данного параметра. Совместное влияние гормонов не выявляет аддитивности, проявляется своеобразный антагонизм действия гидрокортизона и инсулина на уровне хроматина. Примечательно, что изменение величины параметра максимальной положительной эллиптичности наблюдается как в препаратах тотального хроматина, так и в его активной фракции.

Хорошо известно, что основным воздействием стероидных гормонов на клетку-мишень является специфическое и высокоаффинное влияние гормон-рецепторных комплексов на хроматин, приводящее к индукции *de novo* того или иного белка [1,2]. Для пептидных гормонов более характерны быстротечные воздействия посредством универсальных трансмембранных регуляторных механизмов, приводящие, главным образом, к модификации различных белков [1]. Вместе с тем в настоящее время в литературе накопилось достаточное количество данных, свидетельствующих о том, что некоторые пептидные гормоны, в частности инсулин, способны оказывать относительно длительные воздействия на внутриклеточный метаболизм, путем их интернализации в клетку и влияния на уровне ядра [3–5]. Эти работы свидетельствуют о возможности воздействия гормонов разной природы на изменение конформации хроматина, что может быть выявлено различными физическими методами, в том числе методом кругового дихроизма. В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментов по определению параметра максимальной положительной эллиптичности препаратов хроматина и его активной фракции клеток печени крыс при отдельном и совместном воздействии гидрокортизона и инсулина.

Материал и методы исследования. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах 100–150 г массы. В опытах *in vivo* оба гормона вводили внутривенно в следующих концентрациях: гидрокортизон (“Sigma”, США) – 5 мг/100г массы, инсулин (“Sigma”, США) – 2 ед./100г массы животного. В экспериментах по совместному воздействию сначала

вводили гидрокортизон, затем – инсулин. Животных декапитировали через 4 часа после введения гормонов. В экспериментах *in vitro* гормоны в соответствующих концентрациях добавляли в образец, содержащий препараты хроматина. Ядра из клеток печени выделяли по методу Блобела и Потера [6], хроматин – из очищенных ядер [7]. Активную фракцию хроматина определяли по методу Готтесфельда и др. [8]. Белок определяли по Лоури и др. [9], ДНК – по Бартону [10], РНК – по методу Шмидта и Танхаузера [11]. Параметр максимальной положительной эллиптичности определяли из спектров кругового дихроизма, которые регистрировали на дихрографе Roussel-Jouan-2 и выражали в единицах молярной эллиптичности ($\text{град} \cdot \text{см}^2 / \text{дмоль}$) нуклеотидных остатков ДНК [12].

Результаты и их обсуждение. В ранних работах ряда авторов [13,14] выявлена взаимосвязь между матричной активностью хроматина и положительной эллиптичностью спектров кругового дихроизма, что явилось основой для нижеприведенных исследований. Коррелятивная связь между параметром максимальной положительной эллиптичности и матричной активностью хроматина предполагает изменение величины данного параметра при воздействии гормонов, вызывающих повышение матричной активности и,



Спектры кругового дихроизма препаратов ДНК (1), хроматина в контроле (5) при воздействии гидрокортизона(2), инсулина(4) и при совместном воздействии гормонов (3) *in vivo* (а) и *in vitro* (б).

следовательно, изменение конформации хроматина. На рисунке представлены спектры кругового дихроизма тотального хроматина клеток печени контрольных, обработанных гидрокортизоном и инсулином, крыс. Амплитуда положительной эллиптичности спектра кругового дихроизма хроматина опытных животных заметно превышает контрольный уровень. Введение гидрокортизона *in vivo* повышает данный параметр примерно на 40%, а инсулина – на 16–18% (см. рис.(а)). Учитывая повторяемость результатов пяти серий экспериментов, а также высокую чувствительность прибора, полученную разницу можно считать достоверной. Примечательно, что совместное действие гидрокортизона и инсулина не выявляет аддитивности, более того, величина параметра максимальной положительной эллиптичности повышается на 23–25%, что, видимо, свидетельствует о своеобразном антагонизме в действии на хроматин указанных гормонов. Наблюдаемые сдвиги в спектрах кругового дихроизма препаратов хроматина при воздействии гормонов *in vivo* не являются результатом непосредственного влияния моле-

кул этих гормонов на хроматин, а скорее опосредованы внутриклеточными регуляторными механизмами, так как их воздействие *in vitro* не вызывает достоверных сдвигов (см. рис.(б)).

*Сдвиги величин параметра максимальной положительной эллиптичности (град · см² /дмоль) в препаратах тотального хроматина и его активной фракции при воздействии гормонов *in vivo*. Приведены средние значения пяти серий экспериментов*

Вариант эксперимента	Тотальный хроматин		Активный хроматин	
	максимальная эллиптичность	%	максимальная эллиптичность	%
контроль	2650	100	2760	100
гидрокортизон	3700	140	4150	150
инсулин	3090	117	3460	126
гидрокортизон + инсулин	3290	124	3640	132

Таким образом, величина параметра максимальной положительной эллиптичности повышается при воздействии *in vivo* обоих гормонов, что указывает на возможность выявления методом кругового дихроизма тонких изменений, происходящих в хроматине при повышении его матричной активности гормонами разной природы. Аналогичная картина наблюдается также в активной фракции хроматина, где сдвиги величины указанного параметра более выражены, что также свидетельствует о коррелятивной связи между величиной максимальной положительной эллиптичности и степенью транскрибируемости хроматина (см. табл.). Отсутствие аддитивности при совместном воздействии гормонов, наблюдаемый некоторый антагонизм, по-видимому, можно объяснить своеобразной “конкуренцией” между акцепторными участками хроматина, связывающими рецептор гидрокортизона и фактор, ответственный за действие инсулина на геном. Иначе говоря, “разрыхляющее” определенным локус генома влияние одного гормона препятствует аналогичному “разрыхлению” других участков хроматина, среди которых могут быть локусы, чувствительные ко второму гормону. Разумеется, для подтверждения вышеуказанных предположений необходимы дополнительные, целенаправленные исследования.

Кафедра биофизики, кафедра молекулярной биофизики

Поступила 03.09.2000

ЛИТЕРАТУРА

1. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Высшая школа. 1984, с.1–336.
2. Watson C.E., Archer T.K. In Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors., Edited by L.P.Freedman, Birkhauser, Boston, Basel, Berlin, 1997, p.209–236.
3. Goldfine I.D., Clawson G.A., Smuckler E.A., Purello F., Vigneri R. – Mol.Cell. Biochem., 1982, v.48, N 1, p.3–13.
4. Harada S., Smith R.M., Jarett L. – Cell. Biochem. Biophys., 1999, v.31, N 3, p.307–319.
5. Smirnova O.V. – Membr. Cell. Biol., 2000, v.13, N 2, p. 245–261.
6. Blobel G., Potter V.R. – Science, 1966, v.154, p.1662–1665.
7. Umansky S.R., Kovalev J.Y., Tokarskaya V.Y. – Biochem. Biophys. Acta, 1975. v.383, N3, p.242–248.
8. Gottesfeld J.M., Bagi G., Berg B., Bonner J. – Biochem., 1976, v.15, N 11, p. 2472–2483.

9. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y., Farr L., Randall R.J. – J. Biol. Chem., 1951, v.193, N 1, p.265–275.
10. Burton K. – Biochem. J., 1956, v.62, N 2, p.315–323.
11. Schmidt G., Tannhauser J.A. – J. Biol.Chem., 1945, v.161, N 1, p.83–89.
12. Вардеванян П.О., Тирацуйян С.Г., Бабаян Ю.С., Паносян Г.А., Минасбекян Л.А. – Биолог. ж. Армении, 1983, т.36, N 3, с.193–197.
13. Lange B., Huang Ch.H. – Biochem. Biophys. Acta, 1978, v.521, N 1, p.324–332.
14. Samal B., Bekhor J. – Arch. Biochem., 1977, v.179, N 2, p.527–536.

Է.Ս.ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, ՅՈՒ.Ս.ԲԱԲԱՅԱՆ, Լ.Հ.ԴԵՄԻՐԿԻԱՆՅԱՆ, Գ.Վ.ԱՆԱՆՅԱՆ

ՀԻԴՐՈՎՈՐՏԻՉՈՆԻ ԵՎ ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏԻ
ԼՅԱՐԿԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ԴՐԱԿԱՆ
ԷԼԻՊՍԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ստացվել են առնետի հեպատոցիտներից անջատված քրոմատինի պլեպարատների առավելագույն դրական էլիպսականության պարամետրի արժեքները ստուգիչում և ստերոիդային հորմոն հիդրոկորտիզոնի ու պեպտիդային հորմոն ինսուլինի *in vivo* և *in vitro* ազդեցությունների դեպքում: Ցույց է տրվել, որ երկու հորմոններն էլ *in vivo* ազդեցության դեպքում հանգեցնում են այս պարամետրի արժեքի էական աճի, որն առավել արտահայտված է հիդրոկորտիզոնի ազդեցության ժամանակ: Հորմոնների *in vitro* ազդեցությունը չի փոփոխում նշված պարամետրի արժեքը: Հորմոնների համատեղ ազդեցության դեպքում ադիտիվություն չի դրսևորվում, նույնիսկ ավելին՝ դիտվում է յուրօրինակ անտագոնիզմ: Ուշադրության է արժանի նաև այն, որ առավելագույն դրական էլիպսականության պարամետրի արժեքի փոփոխություն դիտվում է ինչպես տոտալ քրոմատինի պրեպարատներում, այնպես էլ նրա ակտիվ ֆրակցիայում:

E.S.GEVORGIAN, YU.S.BABAYAN, L.H.DEMIRKHANDIAN, G.V.ANANIAN

HYDROCORTISONE AND INSULIN ACTION ON RAT LIVER
CHROMATIN'S POSITIVE ELLIPTICITY

Summary

Maximum positive ellipticity parameter's values were received for rat liver chromatin preparations in control and under *in vivo* and *in vitro* actions of steroid hormone hydrocortisone and peptide hormone insulin. It was shown, that *in vivo* action of both hormones lead to significant increase of this parameter's value. *In vitro* action of hormones doesn't change the value of the mentioned parameter of hormones doesn't reveal additivity. Specific antagonism of hydrocortisone and insulin action at chromatin is observed. It is noteworthy that a change of the parameter's value of the maximum positive ellipticity is observed in total chromatin preparations as well as in its active fraction.