

УДК 577.112:577.217

UDC 577.112:577.217

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ
БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ
ЖИВОТНЫХ К ИМБАЛАНСУ
АМИНОКИСЛОТ**

**MOLECULAR-BIOLOGICAL ADAPTATION
MECHANISMS OF PROTEIN-SYNTHESIZING
SYSTEM IN ANIMALS TO IMBALANCED
AMINO ACIDS**

Рядчиков Виктор Георгиевич
д.б.н., профессор, академик РАСХН
ryadchikovv@mail.ru

Ryadchikov Victor Georgievich
Dr.Sci.Biol., professor, Academician of Russian
Academy of Agriculture
ryadchikovv@mail.ru

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
vkpbio21@mail.ru
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Plotnikov Vladimir Konstantinovich
Dr.Sci.Biol.
vkpbio21@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Полежаев Сергей Леонидович,
к.б.н.
*ООО «Вита-Лайн», ст.Динская, Краснодарский
край, Россия*

Polezhaev Sergey Leonidovich.
Cand.Biol.Sci.
*Vita-Line company, st.Dinskaya, Krasnodar region,
Russia*

Омаров Махмуд Омарович
д.б.н.
*Северо-Кавказский научно-исследовательский
институт животноводства, Краснодар, Россия*

Omarov Makhmud Omarovich
Dr.Sci.Biol.
*North-Caucasian Scientific Institute of Stock Raising,
Krasnodar, Russia*

В статье представлены результаты сравнительных исследований влияния диет, имеющих имбаланс по лизину и триптофану, на рост, аппетит и компоненты белоксинтезирующей системы тканей у крыс Вистар и свиней

In the article, there are the results of comparative studies of the effect of diets with imbalance lysine and tryptophan on the growth, appetite and tissue components of the protein-synthesizing system of Wistar rats and pigs

Ключевые слова: ИМБАЛАНС АМИНОКИСЛОТ, ЛИЗИН, ТРИПТОФАН, КРЫСЫ, СВИНЬИ, РОСТ, ПЕЧЕНЬ, МУСКУЛЫ, РНК, ДНК, ПОЛИРИБОСОМЫ, мРНК, СТАБИЛЬНОСТЬ мРНК

Keywords: IMBALANCE OF AMINOACIDS, LYSINE, TRIPTOPHANE, RATS, PIGS, GROWTH, LIVER, MUSCULS, RNA, DNA, POLYRIBOSOMES, mRNA, mRNA STABILITY

В отличие от растений животные способны синтезировать далеко не все аминокислоты. Из 20-ти постоянно встречающихся в белках аминокислот в животной клетке синтезируются в среднем только половина их (заменимые аминокислоты), остальные 50% белковых аминокислот не синтезируются (незаменимые аминокислоты). Как правило, к незаменимым аминокислотам относятся: валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан, гистидин и аргинин. Хорошо известно, что недостаточное содержание одной или нескольких незаменимых аминокислот нарушает нормальное развитие животных, так

как биосинтез белка не обеспечен необходимыми компонентами и идёт на низком уровне. Как правило, это приводит к снижению роста животных. Введение в рацион недостающих незаменимых аминокислот позволяет нормализовать белковый обмен и увеличить прирост на каждую израсходованную единицу корма.

Несбалансированность питания по незаменимым аминокислотам является самым распространённым стрессом, которому подвергаются моногастричные животные [1]. Нормальный рост и развитие животных, а также их способность адекватно отвечать на изменения внешней и внутренней среды требуют точной и оперативной регуляции экспрессии многих генов. Регуляция экспрессии генов питательными веществами включает множество событий в живой клетке: эпигенетические влияния на определённые гены, изменение транскрипции, сплайсинга и транспорта РНК в цитоплазму, трансляции, а также ряд посттранскрипционных и посттрансляционных превращений. В этих процессах активно принимают участие различные гормоны и цитокины, окислительно-восстановительная среда клетки и многое другое [2-4].

Центральным процессом, определяющим реализацию экспрессии генов, является функционирование белоксинтезирующего аппарата. Регуляция синтеза белка связана в первую очередь с функционированием рибосом и мРНК. Эта система быстро изменяется в ответ на концентрацию аминокислот в цитоплазме. Под влиянием стрессовых воздействий в клетках эукариот изменяется синтез рРНК, меняется соотношение концентраций тРНК и активно транслируемых мРНК.

Методы генной инженерии позволили за последние 20-25 лет установить, что наиболее лабильным компонентом системы регуляции экспрессии генов является стабильность (время полужизни) мРНК, которая зависит как от гена, на котором синтезирована эта мРНК, так и от условий окружающей среды. Кроме того, как выясняется из всей совокупности

данных по структуре рибосом и из особенностей катализируемой рибосомой реакции образования пептидных связей в процессе биосинтеза белка, каталитический центр этой реакции (пептидилтрансферазный центр рибосомы) определяется доменом большой рибосомной РНК, без участия рибосомных белков, т.е. имеет рибозимную природу. Поэтому стабильность рибосомной РНК также является важнейшим компонентом системы регуляции экспрессии генов [5].

В настоящее время хорошо изучен молекулярный механизм изменения стабильности мРНК ряда регуляторных белков, определяющих перестройку метаболизма при аминокислотном имбалансе [2, 6]. Вместе с тем представляет несомненный интерес исследования влияния имбаланса аминокислот на взаимоотношение вышеупомянутых двух высокомолекулярных РНК.

Нередко в практике свиноводства и птицеводства наблюдается имбаланс по таким незаменимым аминокислотам как лизин и триптофан. Основные исследования, представленные в настоящей статье, были направлены на изучение влияния имбаланса этих аминокислот на количество и качество РНК животных.

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-отъёмышках линии Вистар. На первом этапе изучали влияние имбаланса лизина и триптофана на обмен веществ, синтез белка и содержание нуклеиновых кислот. На этом этапе проводили два опыта. Схема экспериментов, соответствующая составу диет, представлена в таблице и на рисунке 1.

Основная диета (группа 1) включала 6% сублимированного говяжьего мяса + 1,7% смеси незаменимых аминокислот №1 и 2,5% смеси незаменимых аминокислот №3 и была умеренно недостаточной по белку (8,9%). Содержание каждой незаменимой аминокислоты составляло 90%, лизина – 50% от норм NRC-1972. Такой состав достигается за счёт

добавления смеси кристаллических аминокислот №1 (+0,04% триптофана), смесь №3 добавляли для создания соотношения «незаменимые: заменимые = 1 : 1».

Таблица 1 -- Состав диет в 1-ом и 2-ом экспериментах (% по массе)

Ингредиенты	Основная	Имбаланс лизина	Имбаланс триптофана	Скорректированная
Сублимированное мясо	6,00	6,00	6,00	6,00
Смесь аминокислот №1	1,70	-	-	-
Смесь аминокислот №2	-	5,50	5,50	5,50
Смесь аминокислот №3	2,50	8,00	6,00	6,00
L – лизин HCl	-	-	1,00	1,00
L- триптофан	0,04	0,15	-	0,15
Целлюлоза	5,00	5,00	5,00	5,00
Сахар	10,00	10,00	10,00	10,00
Масло подсолнечное	8,00	8,00	8,00	8,0
Смесь витаминов	2,00	2,00	2,00	2,00
Смесь минеральных веществ	4,00	4,00	4,00	4,00
NaCl	0,50	0,50	0,20	0,20
Цитрат натрия	-	-	0,40	0,40
Крахмал кукурузный	60,26	50,85	51,90	51,75
Итого	100	100	100	100
Содержится, %:				
Азот (белок=N×6.25)	1,42 (8,9)	2,69 (16,8)	2,36 (16,4)	2,56 (16,0)
Лизин	0,41	0,41	1,21	1,21
Триптофан	0,11	0,22	0,07	0,22

Состав смесей аминокислот L-формы № 1 и № 2 в %, соответственно:

гистидин HCl - 7,2 и 7,6; аргинин HCl - 12,5 и 14,6; треонин - 11,3 и 10,7; цистин - 8,3 и 6,1; валин - 12,5 и 12,5; метионин - 4,2 и 4,9; изолейцин - 11,9 и 11,5; лейцин - 14,9 и 15,3; тирозин - 8,9 и 8,5; фенилаланин - 8,3 и 8,3

Смесь № 3 в %: аспарагиновая кислота - 16,2; серин - 1,6; глутаминовая кислота - 34,0; пролин - 7,0; глицин - 5,0; аланин - 9,0; аспарагин - 13,9; глутамин - 13,3.

Имбаланс по лизину (группа 2) создавали добавлением 5,5% смеси незаменимых аминокислот без лизина + 0,15% триптофана (№2). Содержание каждой аминокислоты составляло 160% от нормы, в то время как количество лизина, как и в первой группе, оставалось на уровне 50%.

Имбаланс по триптофану создавали добавлением той же смеси

аминокислот № 2 + 1% лизина, но без триптофана. Как и в основной диете содержание триптофана составляло около 40% нормы потребности. Смесь №3 добавляли в диеты 2-4 групп из расчёта создания соотношения НАК : ЗАК = 1 : 1.

В первом опыте использовали 60 отъёмышей крыс-самцов в возрасте 23-25 дней, разделённых на три подгруппы – А, Б, В по 30 животных в каждой, во втором опыте 20 животных в каждой группе. В предварительный период животных содержали в течение 4 дней на низкобелковой диете (6% казеина + 0,15% метионина + крахмал, жир, сахар, витамины, минеральные вещества).

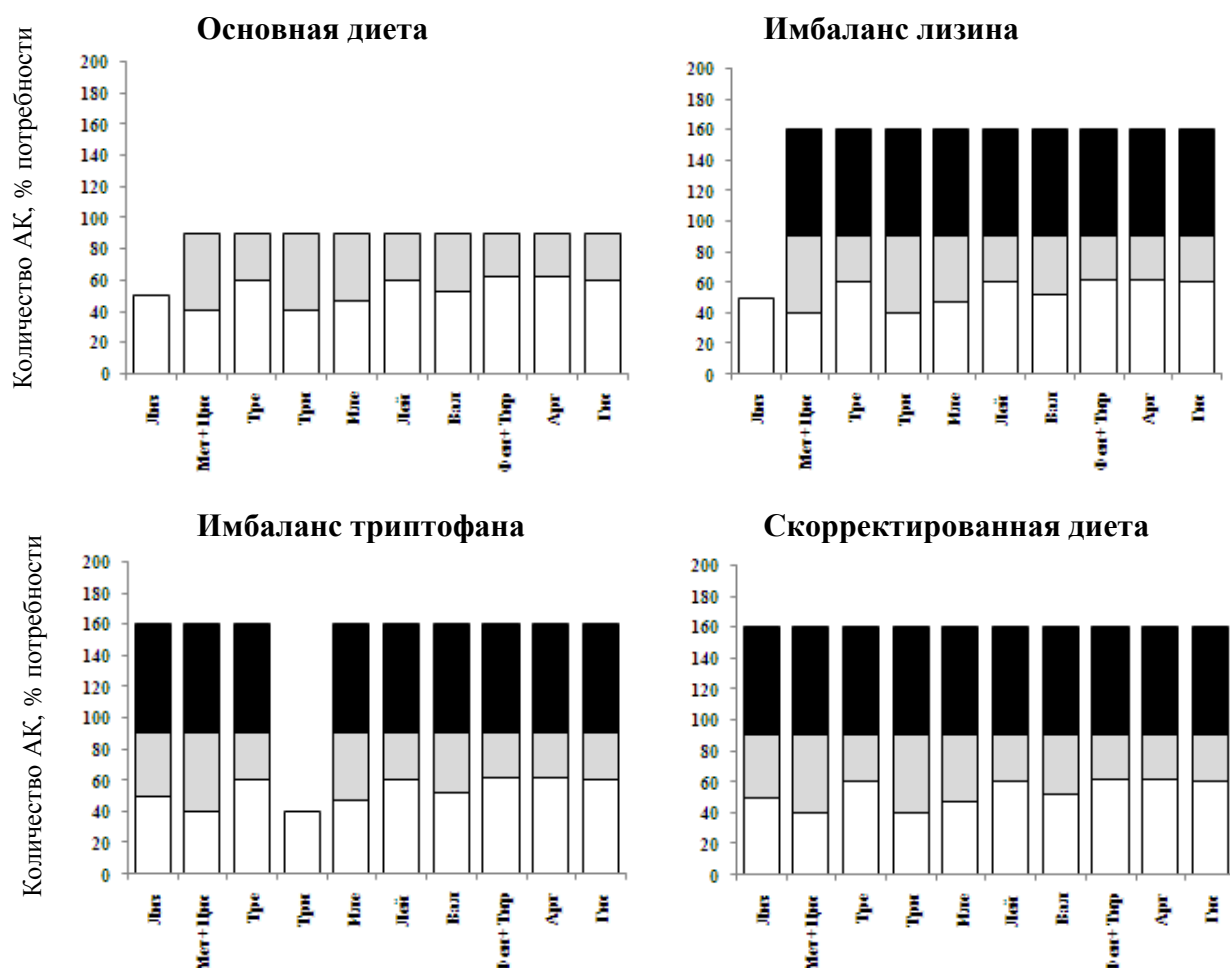


Рис 1 Содержание незаменимых аминокислот в % от норм потребности. Источники аминокислот: □ - сублимированное мясо; ■ - смесь кристаллических незаменимых аминокислот (НАК) №1; ■ - смесь кристаллических незаменимых аминокислот (НАК) №2.

Для анализа состава сыворотки и плазмы крови, количества и

качества нуклеиновых кислот в печени и мышцах животным утром в 7 часов давали корм. Через 2 часа корм убирали и через 4 часа от начала кормления животных убивали декапитацией: группу А на 2-ой день опыта, Б – на 7-ой день и В – на 14-й день. Быстро брали печень и бедренные мускулы конечностей и фиксировали в жидком азоте.

Продолжительность 2-го опыта, проведённого по такой же схеме с целью проверки и углубления результатов 1-го опыта, составляла 9 дней.

Второй этап исследований состоял из серии опытов по имбалансу на фоне монозерновой кукурузной диеты.

Первый опыт, продолжительностью 14 дней, провели в двух повторностях на четырёх группах крыс-отъёмышей в возрасте 18-20 дней, с живой массой 45-47 граммов. В каждой группе по 10 голов (поровну самцов и самок). Схема опыта представлена на рисунке №2.

Основная диета состояла из кукурузной дерти, с уровнем переваримого белка - 7%, обогащённой до нормы потребности витаминами, макро- и микроэлементами.

В этой диете первой лимитирующей аминокислотой по степени дефицита был лизин (26,7% от нормы потребности), второй – триптофан (42% от нормы). В то же время количество лейцина, валина, фенилаланина, тирозина было выше норм. Имбаланс лизина и триптофана в 1-ом опыте создавали добавлением смеси кристаллических L-аминокислот до 150% норм потребности, но без лизина и триптофана. Количество лизина во второй группе и триптофана в третьей группе оставалось на уровне содержания в основной диете (рис. 1).

Перед убоем животных в течение ночи оставляли без корма. Утром давали корм, через два часа корм убирали и через 4 часа от начала

кормления животных убивали декапитацией. Печень и часть крови замораживали в жидком азоте для молекулярно-биологических исследований.

По пять тушек из каждой группы сушили в сушильном шкафу при 65°C, готовили из них муку мелкого помола, в которой определяли содержание белка по Кьельдалю, жира и аппарате Соксклета и воды. Активность энзимов АСА и АЛА в печени определяли по инструкции Минздрава. Отложение азота и жира в тушке и печени оценивали по их разнице в конце и начале опыта.

Опыт по изучению влияния имбаланса лизина и триптофана на степень полиаденирования мРНК проведён на 5 группах поросят-отъёмышей породы СМ-1, в возрасте постановки на опыт 60 дней. Животные аналоги по возрасту, полу, с начальной живой массой 18,3 - 18,7 кг. В каждой группе по 12 голов (поровну хрячков и самочек). Содержание животных - групповое, кормление - по поедаемости, двукратное, обеспечение водой - вволю из автопоилок. Основной экспериментальный период - 20 дней. Опыт проведён по той же схеме, как на крысах. Смеси кристаллических L-аминокислот добавляли до 100% норм потребности свиней в незаменимых аминокислотах, за исключением лизина во 2-ой группе и триптофана в 3-ей группе. Рацион 4-ой группы был скорректирован за счёт добавления всех аминокислот, в том числе – лизина и триптофана.

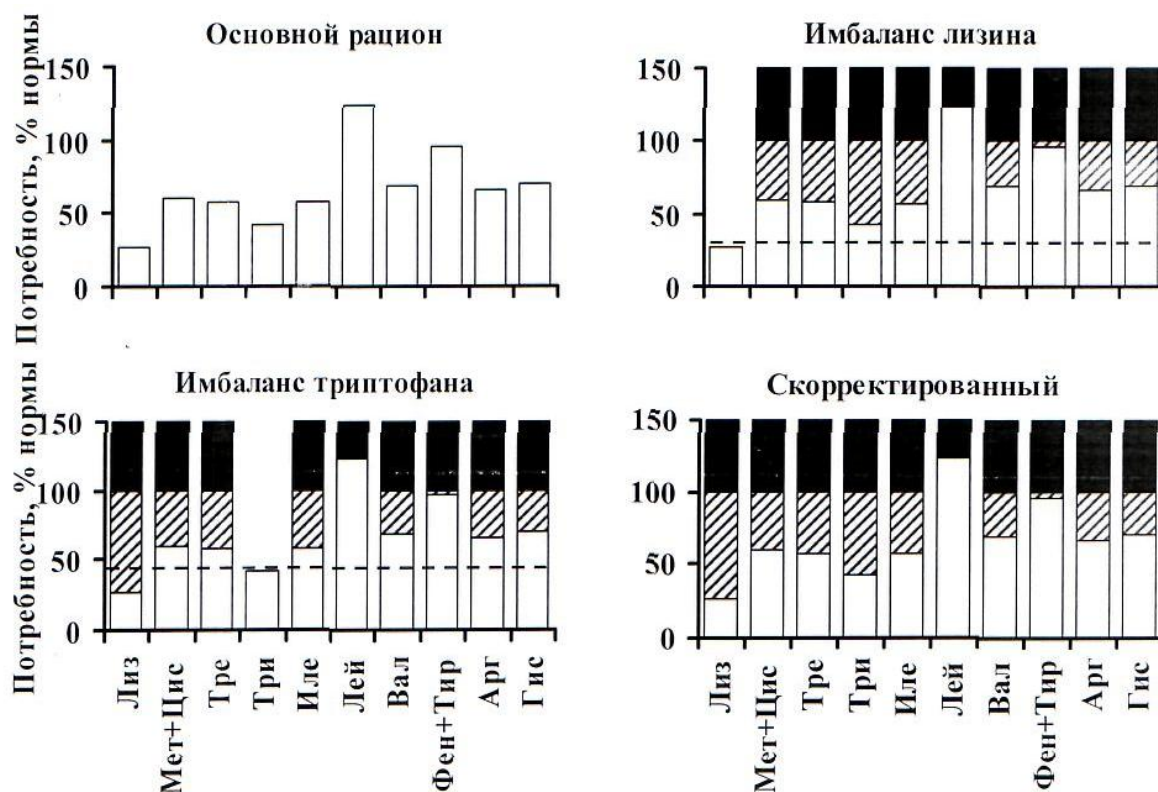


Рис. 2 Содержание незаменимых аминокислот в % от норм потребности в рационах. Источники аминокислот: □ - кукуруза; ▨ - кристаллические аминокислоты до 100% (опыт 1); ■ - то же до 150%

Определение содержания РНК и ДНК в печени и мышцах крыс. Определение количества нуклеиновых кислот осуществляли методом Шмидта и Тангаузера в модификации Флека и Монро [7]. Определение проводили строго на холоде в центрифужных пробирках, одновременно в 4-х параллельных пробах одного образца.

Ткань, замороженную жидким азотом, растирали в ступке до пылевидного состояния. К навеске при помешивании стеклянной палочкой добавляли 0,3М раствор хлорной кислоты (HClO₄) в соотношении 1г/10мл.

Для полноты осаждения кислотонерастворимой фракции пробирки на 15 минут помещали в лёд. После этого центрифугировали при 2-3000 g в течение 10-15 минут. Осадки ещё дважды отмывали таким же образом. После последнего центрифугирования пробирки тщательно подсушивали фильтровальной бумагой.

Осадки суспендировали в 3 мл дистиллированной воды, после чего

добавляли 3 мл 0,6М КОН, суспензия светлела. Гидролиз проводили в течение 1 часа при 37°C, после чего пробирки переносили в лёд для остановки гидролиза.

В каждую пробирку добавляли по 3 мл 0,6М HClO₄ и оставляли на 15 минут во льду, центрифугировали в прежнем режиме. В надосадочной жидкости спектрофотометрически определяли количество РНК при λ 260 нм.

Для перевода величины оптической плотности при 260 нм в миллиграммы РНК использовали значение $E^{1\%}_{1\text{мл}}, 260=312$. Стенки пробирки тщательно подсушивали, так как в осадке в дальнейшем определяли ДНК.

Содержание ДНК определяли в осадках оставшихся после гидролиза при определении РНК. Подсушенные пробирки с осадками заливали раствором 0,5М HClO₄ по 6 мл на пробу (объём пробы точно фиксировали). Гидролиз проводили на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Центрифугировали и в надосадочной жидкости спектрофотометрически определяли содержание ДНК. Для расчёта использовали формулу: количество ДНК в мкг/мл= $D_{270} - D_{290}/10.1$. [7].

Выделение цитоплазматической РНК. Животную ткань, замороженную жидким азотом, разрушали до пылевидного состояния и экстрагировали РНК буфером А: 200мМ Трис-HCl, pH 7,5; 250мМ сахарозы и 50мМ MgCl₂ в соотношении 1:25 (г/мл). Гомогенат центрифугировали при 3000 g 10 минут для удаления гликогена и ядер. К надосадочной жидкости добавляли раствор додецилсульфата натрия (ДДС-Na₂) до концентрации 1% и равный объём смеси фенол - хлороформ (1:1). Пробу встряхивали при комнатной температуре в течение 20 мин, затем центрифугировали при 5000 g 20 мин.

Водную фазу переносили в 2,5 объема этилового спирта и выдерживали 1 ч при -20°C, затем центрифугировали в том же режиме.

Осадок растворяли в минимальном объеме 0,01 % раствора ДДС- Na_2 и добавляли равный объем депротеинизирующего раствора (ДР): 8М мочевины, 8М LiCl , 4мМ ЭДТА- Na_2 . Смесь оставляли на ночь при $+4^\circ\text{C}$. Осадок РНК собирали центрифугированием (3000 g, 20 мин), промывали 70%-ым этиловым спиртом, подсушивали и растворяли в минимальном объеме бидистиллированной воды.

Спектрофотометрические характеристики препаратов РНК были следующими: $\lambda_{260}/\lambda_{280} = 1,9$; $\lambda_{260}/\lambda_{230} = 2,0$. РНК активно транслировалась в бесклеточной системе синтеза белка [7,8].

Определение количества транспортной РНК. Надосадочную жидкость (супернатант) после первого центрифугирования использовали для оценки количества тРНК. Для этого к супернатанту добавляли равный объем депротеинизирующего раствора (ДР) и оставляли на ночь при 4°C для высаливания высокополимерных рРНК и мРНК. Центрифугировали при 5 000 g, 30 минут и в надосадочной жидкости определяли количество тРНК после её щелочного гидролиза как описано выше для суммарной РНК.

Выделение поли-(А)-содержащей мРНК аффинной хроматографией на поли-(У)-сефарозе. Определение индекса стабильности мРНК. К раствору РНК (1 мг/мл) добавляли равный объем буфера А (40мМ Трис- HCl , pH 7,5; 1М LiCl , 20мМ ЭДТА- Na_2 ; 0,2 % ДДС- Na_2). Раствор дважды наносили на поли-(У)-сефарозу при комнатной температуре со скоростью 30 мл/час.

Отмывали колонку буфером Б (20мМ Трис- HCl , pH 7,5; 0,5М LiCl ; 1 мМ ЭДТА- Na_2 ; 0,1 % ДДС- Na_2) до отсутствия поглощения при 260 нм и промывали этим же буфером, разбавленным в 5 раз бидистиллированной водой, для удаления неспецифически сорбированной РНК на поли-(У)-сефарозе. Поли(А)⁺-мРНК элюировали с колонки 10 мМ цитратно-фосфатным раствором pH 7,5 (буфер В) (1-ый цикл хроматографии).

Определяли количество РНК из расчета 1 ОЕ260=40 мкг/мл. Затем к препарату поли-(А)⁺-мРНК добавляли равный объем буфера А и проводили 2-ой цикл хроматографии. Рассчитывали индекс стабильности мРНК (ИС мРНК) как процент поли-(А)⁺-мРНК от поли(А)⁺-мРНК, принимая количество последней за 100%. Все растворы для хроматографии подвергали автоклавированию [7,8].

Определение степени полиаденилирования мРНК ступенчатой термальной хроматографией на колонке поли-(У)-сефарозы. Соотношение молекул мРНК с короткими и длинными поли-(А) последовательностями на 3'-конце молекул - (А)_n 65°/(А)_n 35° - определяли термальной ступенчатой элюцией поли-(А)⁺-мРНК с колонки поли-(У)-сефарозы при 35°С и 65°С буфером Г: 10мМ Трис-НСl, рН 7,5; 1мМ ЭДТА-Na₂, 0,05% ДДС- Na₂ при 35°С и при 65°С. Количество РНК в каждой фракции определяли спектрофотометрически как описано выше. Соотношение количества РНК высоко- и низкотемпературной фракции – (А)_n65°С/(А)_n35°С – использовали в качестве характеристики степени полиаденилирования мРНК [7,8].

Зонды и их мечение. В исследовании использовали олигодезоксирибонуклеотидные зонды к мРНК:

протоонкогена с-тус 5'-СССТСТТТССАСАСАССАСАТ-3' [9].

β-глобина 5'-СТСТТСТТССАСАССАТССАСА-3' [10].

субъединицы α фактора элонгации трансляции (eEF-1α)

5'-ТТСССАССТССТССАСССТТСТТ-3' [11].

Олигодезоксирибонуклеотиды метили концевым включением радиоактивной метки с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 и [γ³³Р] АТФ. Реакцию проводили в ТМ-буфере (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 5мМ MgCl₂) по следующей схеме: к 2 мкл раствора нуклеотида (0,5 мкг) добавляли 2 мкл буфера ТМ, 8 мкл [γ³³Р] АТФ (4 мБк), 2 мкл 20мМ спермидина, 2 мкл 5мМ дитиотреитола, 4 мкл полинуклеотидкиназы (3,5

ед/мкл.). Инкубировали 45 мин при 37°C. По завершении инкубации реакционную смесь кипятили 1-2 мин и осаждали олигонуклеотид добавлением пяти объемов этилового спирта, подвергали пятикратному замораживанию-оттаиванию в жидком азоте. Осадок осаждали центрифугированием при 5000 g, 15 мин, растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды. Включение метки в олигонуклеотид составляло обычно более 70 % [7, 8].

Гибридизация радиоактивно меченых олигонуклеотидных зондов с поли-(А)-мРНК на колонке поли-(У)-сефарозы. Для изучения относительной стабильности индивидуальных ген-специфических мРНК высокополимерную РНК наносили на две одинаковые колонки с поли-(У)-сефарозой (А и Б). С колонки Б поли-(А)⁺мРНК элюировали и повторно наносили, как описано выше. Затем на параллельных колонках проводили гибридизацию поли-(А)⁺ и поли-(А)⁺⁺-мРНК с соответствующим радиоактивно меченым зондом.

Поли-(У)-сефарозу с сорбированной на ней поли-(А)-мРНК уравнивали буфером для гибридизации: 5 x SSPE (пятикратный стандартный солевой буфер), 50 % формамида, 0,1 % ДДС-Na₂. ³³P-зонд наносили на поли-(У)-сефарозу в объеме, равном свободному объему колонки,. Гибридизацию проводили при 36°C, 1 час. По окончании инкубации поли-(У)-сефарозу отмывали буфером Б до отсутствия радиоактивности в промывающем растворе.

Молекулы мРНК элюировали с колонки при 65°C как описано ранее. Полученные препараты высушивали и определяли их радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rack Beta Spectral (LKB, Sweden). Рассчитывали индекс стабильности ген-специфической мРНК как % радиоактивности мРНК второго цикла (колонка Б) от радиоактивности мРНК первого цикла (колонка А) [7, 8].

Выделение свободных и мембраносвязанных полирибосом и их

трансляция *in vitro*. Полирибосомы выделяли дифференциальным ультрацентрифугированием на ультрацентрифуге VAC-601 (Германия) и транслировали в полной бесклеточной системе синтеза белка из ретикулоцитов кролика как описано в [12]. Интенсивность синтеза белка определяли по включению радиоактивно меченого ^{35}S -метионина на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rack Beta Spectral (LKB, Sweden).

Выделение прочно связанной с МАК мРНК. Селективную ионообменную сорбцию мРНК на колонке МАК (метилованный альбумин-кизельгур) проводили по модифицированному методу А.В. Лихтенштейна [13]. Полирибосомы из печени крыс растворяли в буферном растворе, содержащем 20мМ Трис-НСl, рН 7,5; 0,45М NaCl, 3М мочевины, 20мМ ЭДТА- Na_2 и наносили на колонку при комнатной температуре со скоростью 70 мл в час. В этих условиях особенности первичной и вторичной структуры рРНК не позволяли ей сорбироваться на МАК. Колонку отмывали вышеупомянутым раствором, не содержащем мочевины, и затем элюировали мРНК раствором 1,5М NaCl при 90°C.

Статистика. В таблицах и на рисунке приведены средние арифметические значения из двух биологических повторностей. Статистическую оценку проводили с помощью критерия Стьюдента. Представленные результаты имели достоверное различие с уровнем значимости 0,5.

Результаты и их обсуждение

Имбаланс по лизину и триптофану приводил к резкому снижению аппетита и роста животных, при этом имбаланс по триптофану сопровождался более тяжёлыми последствиями, чем имбаланс по лизину, несмотря на то, что уровень обеспеченности этими аминокислотами относительно норм потребности был одинаковым (табл.2). Это

свидетельствует о существенных различиях метаболической и адаптационной реакции животных на разные формы аминокислотного имбаланса. При имбалансе по триптофану животные зачастую снижали потребление корма более чем в 2 раза, они выглядели худыми, имели взъерошенный волосяной покров.

Таблица 2 - Изменение живой массы и потребление корма у крыс в ходе первого эксперимента

Диета	Потребление на 1 голову в день			Среднесуточный прирост, г
	Корм, г.	Азот, мг	Лизин, мг	
<u>0-2 дня – подгруппа А (n=60)</u>				
1.Основная	11,3±4,3	160	46	2,34±0,21
2.Имбаланс лизина	10,0±0,30	269	41	1,54±0,23
3.Имбаланс триптофана	7,51±0,35	197	91	1,29±0,23
4.Скорректированная	10,1±0,10	259	123	1,77±0,23
<u>0-7 дней – подгруппа В (n=40)</u>				
1.Основная	14,9±0,1	211	61	3,63±0,12
2.Имбаланс лизина	12,7±0,3	341	52	2,40±0,08
3.Имбаланс триптофана	11,1±0,4	291	134	1,76±0,11
4.Скорректированная	13,1±0,4	336	159	3,96±0,20
<u>8-14 дней – подгруппа В</u>				
1.Основная	14,6±0,1	207	60	2,91±0,13
2.Имбаланс Лизина	13,4±0,2	360	55	2,20±0,09
3.Имбаланс триптофана	9,5±0,3	250	115	0,86±0,09
4.Скорректированная	14,2±0,7	364	172	3,76±0,22
<u>0-14 дней – подгруппа В</u>				
1.Основная	14,7±0,1	209	60	3,27±0,09
2.Имбаланс лизина	13,0±0,1	350	53	2,30±0,06
3.Имбаланс триптофана	10,5±0,3	270	124	1,31±0,06
4.Скорректированная	13,6±0,3	348	165	3,86±0,16

Влияние имбаланса аминокислот на содержание ДНК и РНК в печени и мышцах крыс. РНК/ДНК соотношение и концентрация РНК в печени и мышцах рассматриваются как индекс, характеризующий потенциальные возможности белоксинтезирующей системы животных [14]. Увеличение соотношения свидетельствует о возрастании транскрипционной активности, а также об усилении образования рибосом.

В первом эксперименте, начиная с 2-го дня, у животных 2-ой и 3-ей групп концентрация суммарной РНК в печени более высокая, чем у животных на основной диете, несмотря на то, что последние лучше росли (таблица 3). Эта разница сохраняется на протяжении всего опыта. В печени животных на скорректированной диете уровень РНК лишь на 14-й день оказался несколько выше, чем у животных на рационе с имбалансом по триптофану. В среднем по трём периодам существенных различий между этими группами не было.

Концентрация суммарной РНК в мышцах животных скорректированной группы на протяжении всего эксперимента была более высокая, чем у остальных: в среднем за опыт 1,10 против 0,84-0,93 мг/г. Но на 14-й - различия по уровню крыс на скорректированном рационе и имбалансе по триптофану были менее значительными 1,38 и 1,27 мг/г, соответственно.

Отложение азота в расчёте на мг РНК в печени и мышцах наиболее высоким было у животных 1-й, а самым низким - 3-й группы (имбаланс по триптофану) к 14-ому дню опыта (таблица 4). При имбалансе лизина эти показатели на уровне таковых у животных на скорректированном рационе.

Таблица 3 - Изменение содержания суммарной РНК и ДНК под влиянием имбаланса в мышцах и печени крыс (мг/г) в ходе первого эксперимента

Диета	Печень			Мышцы		
	РНК	ДНК	РНК/ДНК	РНК	ДНК	РНК/ДНК
2 дня						
1.Основная	4,23	2,35	1,88	0,84	0,80	1,05
2.Имбаланс Лизина	5,03	2,48	2,02	0,83	0,65	1,28
3.Имбаланс триптофана	5,32	2,48	2,05	0,80	0,55	1,45
4.Скорректи-Рованная	4,90	2,69	1,82	1,00	0,63	1,58
7 дней						
1.Основная	4,90	2,39	2,05	0,73	0,70	1,04
2.Имбаланс Лизина	5,13	2,03	1,97	0,72	0,70	1,03
3.Имбаланс триптофана	5,19	2,75	1,89	0,73	0,59	1,24
4.Скорректи-Рованная	5,20	2,52	2,07	0,92	0,73	1,25
14 дней						
1.Основная	5,05	2,44	2,07	0,86	1,02	0,84
2.Имбаланс Лизина	5,34	2,32	2,30	0,96	1,28	0,75
3.Имбаланс триптофана	5,57	2,80	1,99	1,27	1,48	0,86
4.Скорректи-Рованная	5,99	2,34	2,56	1,38	1,50	0,92
В среднем 0-14 дней						
1.Основная	4,73±0,31	2,33±0,07	2,00±0,07	0,84±0,12	81±0,05	0,98±0,03
2.Имбаланс Лизина	5,19±0,11	2,48±0,11	2,10±0,13	0,84±0,09	0,88±0,25	1,02±0,18
3.Имбаланс триптофана	5,24±0,05	2,68±0,12	1,98±0,06	0,93±0,21	0,87±0,37	1,18±0,21
4.Скорректи-Рованная	5,38±0,39	2,52±0,13	2,15±0,27	1,10±0,17	0,95±0,34	1,24±0,24

животных 3-ей группы – незначительные (1,38 против 1,27 мг/г).

Синтез РНК в печени при имбалансе аминокислот не снижается, если судить по отношению РНК/ДНК в среднем за весь опыт: 1 гр. 2,0; 2 гр.- 2,10; 3 гр.-1,98; 4 гр.- 2,15; в мышцах оно выше у животных 3 и 4 группы: 1 гр.-0,98; 2 гр.: -1,02, 3 гр.- 1,18, 4 гр. – 1,24. Интересно, что, при значительно меньшей скорости роста, синтез РНК в печени при

триптофаном имбалансе на 14-й день оказался близким к таковому у животных на скорректированном рационе.

Таблица 4 - Влияние имбаланса на общее содержание РНК в печени и мышцах и отношении РНК к отложенному азоту в теле и печени в ходе первого эксперимента

Диета	Печень			Мускулы		
	Всего РНК, мг	РНК/100 г массы тела, мг	мг N печени/мг РНК	Всего РНК, мг	РНК/100 г массы тела, мг	мг N мышц/мг РНК
7 дней						
1.Основная	15,44	17,27	2,55	29,4	32,9	24,8
2.Имбаланс лизина	14,08	17,55	2,34	26,0	32,5	21,5
3.Имбаланс триптофана	13,49	18,11	2,87	24,5	32,9	18,0
4.Скорректированная	16,48	17,91	4,55	38,1	41,4	24,4
14 дней						
1.Основная	19,59	18,65	4,04	40,3	38,8	28,3
2.Имбаланс лизина	16,02	17,74	3,66	39,0	43,2	21,5
3.Имбаланс триптофана	14,48	18,93	3,28	43,7	57,1	13,7
4.Скорректированная	25,58	22,78	3,99	69,7	62,1	21,5

Общее количество РНК в целой печени у животных сравниваемых групп различно в силу различий по массе их печеней. Но если рассчитать содержание РНК печени на 100 г массы тела, то оно оказывается очень близким во всех группах и лишь к 14-ому дню повышалось у крыс на скорректированном рационе

Общее количество РНК мышц в расчёте на 100 г тела было наибольшим к 14-ому дню у крыс 3-ей группы – при имбалансе по триптофану – и у крыс на скорректированной диете: 57,1 мг и 62,1 мг. Однако отложение азота в теле в расчёте на 1 мг РНК мускулов оказалось самым низким у животных третьей группы: 1 гр.- 28,3 мг N/мг РНК, 2 гр. – 21,5; 3 гр. – 13, 7 и 4 гр. – 21,5. По-видимому, большое количество РНК в

мышечной ткани при триптофановом имбалансе обусловлено интенсивными процессами образования ферментов, обеспечивающих катаболизм и анаболизм белков.

Во втором эксперименте, проведённом в течение 9-ти дней, наблюдалась та же тенденция роста и потребления корма, но с более контрастными различиями между группами по росту и потреблению корма по сравнению с таковыми в первом опыте. Животные на скорректированном рационе росли существенно лучше, а при триптофановом имбалансе были сильнее угнетены (таблица 5.). Содержание жира в теле и в печени животных 2 и 3 групп было значительно ниже, чем в теле крыс на низкобелковой диете и согласуется с результатами первого эксперимента за 14-дневный период.

Таблица 5 - Рост, потребление корма, состав тушки и печени крыс во 2-ом эксперименте

Показатели	Основная	Имбаланс лизина	Имбаланс триптофана	Скорректированная
Ср.сут. прирост, г	3,49±0,15	1,88±0,07	0,71±0,07	5,02±0,22
Затраты корма, г:				
На голову в сутки	14,0±0,4	9,9±0,4	6,6±0,3	11,9±0,3
На 1 г прироста	4,14±0,2	5,25±0,11	11,09±1,24	2,68±0,7
Жир, % сух.в-ва:				
Тушка	36,1±2,4	28,1±2,3	21,4±1,8	25,0±2,6
Печень	23,3±2,2	17,4±1,1	15,5±1,0	15,2±1,7
Белок, % сух.в-ва:				
Тушка	47,2±2,0	52,6±2,5	56,2±1,9	56,5±1,4
Печень	52,3±1,5	61,1±1,8	59,2±1,2	70,1±1,1
Вода, %:				
Тушка	62,8±1,3	67,9±0,7	69,3±0,4	67,9±0,4
Печень	72,3±0,8	72,1±1,0	73,1±1,1	72,3±0,9
Сыворотка крови:				
Белок, %	4,94±0,21	5,79±0,37	4,94±0,16	5,53±0,21
В т.ч. альбумин	2,41±0,07	3,14±0,13	2,52±0,11	2,94±0,15
α-глобулин	0,87±0,08	0,89±0,07	0,84±0,06	0,96±0,03
β-глобулин	1,30±0,07	1,30±0,08	1,23±0,05	1,20±0,10
γ-глобулин	0,41±0,06	0,40±0,05	0,36±0,06	0,44±0,06

Таблица 6 - Влияние имбаланса аминокислот на содержание суммарной РНК и ДНК в печени и мышцах крыс во втором эксперименте (мг/г)

Диета	Печень			Мускулы		
	РНК	ДНК	РНК/ДНК	РНК	ДНК	РНК/ДНК
1.Основная	5,02±0,15	1,87±0,08	2,74	1,11±0,03	0,64±0,1	1,73
2.Имбаланс лизина	6,00±0,29	1,89±0,13	3,17	1,60±0,07	1,12±0,09	1,43
3.Имбаланс триптофана	5,72±0,28	2,12±0,07	2,70	1,40±0,07	0,94±0,07	1,48
4.Скорректи-Рованная	6,12±0,47	1,96±0,04	3,14	2,08±0,13	1,03±0,6	2,00

Различия по концентрации суммарной РНК в печени оказались аналогичными таковым первого эксперимента (таблица 8). При имбалансе она была выше, чем у животных на основном рационе, и одинакова с концентрацией на скорректированной диете. Однако, в мышцах животных 4-ой группы, которые росли намного лучше других, концентрация РНК достоверно выше, чем в мышцах животных остальных групп ($P < 0,05 - 0,001$). Более высокое содержание ДНК на грамм мускулов у животных 2-3 групп, по-видимому, связано с более высоким числом клеток в единице массы ткани, что, возможно, обусловлено пониженным увеличением живой массы, а у животных 4-ой группы меньшим накоплением в клетках жира.

Прямая зависимость между ростом животных и концентрацией суммарной РНК в печени и мышцах наблюдается лишь при сравнении показателей у животных на низкобелковой, недостаточной по лизину и на высокобелковой скорректированной по аминокислотам диетах. Такой зависимости нет при имбалансе. Животные 3 группы росли в 3 раза хуже в первом опыте и в 7 раз во втором по сравнению с животными, получавшими скорректированную диету. В то же время по концентрации РНК в печени за весь период опытов и в мышцах в первом опыте на 14-й день достоверных различий между ними не отмечено.

Количественное соотношение РНК и ДНК в тканях, как правило, положительно коррелирует со скоростью роста организма [14]. Однако при имбалансе аминокислот эта закономерность не выдерживается.

Этот факт подтверждается и некоторыми литературными данными. Показано, что более активный синтез РНК в ядрах печени крыс при имбалансе лизина (20% глутена) сопровождался замедленным её выходом в цитоплазму, а при кормлении крыс диетой с имбалансом по триптофану включение меченой аминокислоты в белки печени и мышц было почти в 2 раза выше, чем на основной и скорректированной диетах (опыт похож на наш 1 эксперимент), наблюдалось более активное включение меченого фенилаланина в белки мышц (но не печени) крыс на диете без лизина, чем на диете без триптофана, но при этом не обнаружено достоверных различий по количеству рРНК на грамм печени у животных на казеиновых и глутеновых рационах, несмотря на значительно лучший рост и более активное включение меченой аминокислоты в белки печени и мышц крыс на казеиновом рационе. Кроме того, показано, что концентрация РНК на грамм печени крыс на безтриптофановом рационе не снижается и усиливается синтез РНК в печени у крыс на рационе с зеином, лишённого лизина и триптофана [4, 15, 16]. Это может свидетельствовать о наличии более активного синтеза белков при имбалансе и необходимости высокой концентрации РНК.

По-видимому, в печени животных, получавших диеты с имбалансом, происходит как активный синтез, так и деградация белка. Сохранение или даже повышение концентрации РНК, вероятнее всего, связано с интенсивным синтезом ферментов деградации излишних аминокислот, а также ферментов глюконеогенеза.

Наряду с повышением общего содержания РНК аминокислотный имбаланс вызывает повышение активности рибонуклеаз (РНКаз) в животных тканях [17]. Интересно отметить, что в физиологической зоне

стресса (закаливающая зона стресса) у высших растений также наблюдается парадоксальное увеличение количества РНК при усилении активности РНКаз, аналогичная картина – увеличение количества РНК в клетках при значительно более высокой активности РНКаз – наблюдается и в созревающем зерне кукурузы, мутантной по регуляторному гену *opaque-2* (высоколизиновая кукуруза) [5]. При этом во всех случаях наблюдается негативное действие повышенной активности РНКаз на популяцию молекул мРНК.

Влияние имбаланса аминокислот на трансляционную активность полисом из печени крыс в бесклеточной системе синтеза белка (in vitro).

Основную массу РНК клетки составляют рибосомная РНК (около 80-85%) и транспортная РНК (около 10-15%). Содержание мРНК обычно в пределах 1-5%.

По концентрации тРНК в печени животных 1, 2 и 3-ей группы значительных различий не отмечено, но в 4-ой группе содержание тРНК на 26-30% выше по сравнению с остальными группами. Это соответствует самой высокой скорости роста животных 4-ой группы, а, следовательно, самому интенсивному синтезу белка и снижению их под влиянием имбаланса по лизину и триптофану (табл. 7).

Различия в аминокислотном питании крыс отражались на концентрации полисомной РНК в цитоплазме клеток печени и мышц (табл.6). В мышцах животных 3-ей группы её уровень значительно ниже, чем других групп. Это согласуется с самым низким ростом и отложением азота в теле (см. табл. 5)

Таблица 7 - Концентрация полисомной и транспортной РНК, активность аминотрансфераз в цитоплазме клеток печени и мышц после 8-ми дней кормления (2 опыт)

Показатели	Диета			
	Основная	Имбаланс лизина	Имбаланс триптофана	Скорректированная
Печень				
Суммарная полисомная РНК, мкг/г	0,92	1,33	1,03	1,15
В %	100	145	112	126
В т.ч. свободных полисом	0,61	0,84	0,82	0,79
В %	100	138	134	130
Мембранносвязанных полисом	0,30	0,49	0,21	0,36
В %	100	161	68	120
Транспортная РНК, мкг/г	0,84±0,07	0,82±0,06	0,81±0,03	1,06±0,05
В %	100	98	96	126
Аспартата-аминотрансфераза, мкМ/г	246±3	276±32	311±7	256±28
Аланин-аминотрансфераза, мкМ/г	370±48	681±18	710±6	542±76
Мышцы				
Полисомная РНК, мкг/г	141,7±6,8	138,3±10,3	104,7±5,2	118±14,9
Аспартат-аминотрансфераза, мкМ/г	157±10	177±44	178±57	124±25
Аланин-аминотрансфераза, мкМ/г	332±14	373±24	351±44	387±16

крыс этой группы. Уровень полисомной РНК в печени животных 2,3 и 4 групп как суммарных, так и свободных полисом выше на 45-12-26% и 38-34-30%, соответственно, по сравнению с тем у животных 1 группы. Вместе с тем, концентрация мембранносвязанной РНК в группе с триптофановым имбалансом составила только 68% от таковой в 1 группе. В группе с лизиновым имбалансом значительно выше 161% и на скорректированном рационе – 118%.

Биологический смысл существования двух топографически различающихся классов полирибосом состоит, по современным представлениям, в синтезе на них различных белков. Свободные полисомы ответственны в большей мере за синтез ферментных белков, хотя часть ферментов может синтезироваться и мембраносвязанными полисомами, которые в основном синтезируют секреторные белки [18].

Высокая концентрация свободных полирибосом в группах с имбалансом, вполне вероятно, свидетельствует об активном синтезе цитоплазматических ферментных белков, необходимых для деградации нелимитирующих свободных аминокислот. Например, в печени животных 2-3 групп активность аминотрансфераз, играющих большую роль в катаболизме аминокислот, была наиболее высокой (табл. 7). В литературе также есть данные о повышении активности аспартатаминотрансферазы при недостатке лизина в рационах цыплят [1, 2].

Низкое содержание мембраносвязанной РНК при триптофановом имбалансе согласуется с более низким уровнем секреторных белков, в частности глобулиновых фракций в сыворотке крови. Самое высокое содержание этого класса рибосом при лизиновом имбалансе согласуется с высокой концентрацией альбумина в крови. Несмотря на это, животные росли намного хуже, чем на основной диете. Известно, что на мембраносвязанных полисомах синтезируются некоторые ферменты, например, каталаза, сериндегидрогеназа [18]. Возможно, что при имбалансе лизина РНК мембраносвязанных полисом особым образом включена в синтез специфических ферментов. Не исключено также, что этот класс полисом менее активно обменивается и как бы стабилизируется в условиях имбаланса по лизину, но не по триптофану. Чаще всего именно мембраносвязанные полисомы обладают наиболее высокой трансляционной активностью *in vitro*, в бесклеточной системе синтеза белка [5].

Используя полную бесклеточную систему синтеза белка из ретикулоцитов кролика (лизат ретикулоцитов, все необходимые энергетические, функциональные и структурные компоненты для синтеза белка за исключением полирибосом) была изучена активность экзогенных полирибосом по их способности синтезировать белок. Полирибосомы выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования из печени белых крыс, находившихся на рационах с имбалансом по той или иной незаменимой аминокислоте.

Таблица 8 - Влияние имбаланса аминокислот *in vivo* на трансляционную активность полирибосом из печени крыс в бесклеточной системе синтезе белка (*in vitro*)

Вариант диеты	Распад ³⁵ S-метионина/мин	% к контролю
Контроль (4-я группа)	40000±1000	100,0
Имбаланс метионина	39000±1000	97,5
Имбаланс валина	48000±980	120,0
Имбаланс триптофана	28000±1200	70,0
Имбаланс изолейцина	29000±1300	72,5
Имбаланс лейцина	25000±1300	62,5
Имбаланс фенилаланина	34000±1120	85,0
Имбаланс лизина	80000±800	200,0
Имбаланс треонина	107000±700	267,5
Имбаланс гистидина	58500±1120	145,0

Этот эксперимент позволил установить, что имбаланс по метионину не влиял на привесы животных и практически не менял трансляционную активность полирибосом (95% от такового показателя для скорректированной диеты). Сходным образом проявил себя имбаланс по валину (115%) (табл. 8).

Имбаланс по трём аминокислотам: лизину, треонину и гистидину

приводил к увеличению трансляционной активности полисом на 194%; 264%; 148% соответственно. Подобное неспецифическое усиление трансляционной активности полисом *in vitro* под влиянием закаливающей зоны стрессов описано у растений [5] и рассматривается как активная адаптивная реакция.

Имбаланс по четырём аминокислотам: триптофану, лейцину, изолейцину и фенилаланину снижал трансляционную активность полисом до уровня 67%; 69%; 59%; 79% соответственно, что вероятно связано с исчезновением тяжёлых полисом.

Степень стрессового воздействия в клетках эукариот определяет характер и уровень перестройки метаболизма: «закаливающая» зона стресса приводит к интенсификации метаболизма, необходимой для экстренного изменения обмена веществ в адаптационном плане; «повреждающая» зона стресса приводит к угнетению метаболизма и в перспективе – к гибели организма.

Таким образом, имбаланс по аминокислотам группы лизина соответствует закаливающей зоне стресса, в то время как имбаланс группы триптофана соответствует повреждающей зоне стресса. Тем не менее, имбаланс по всем семи аминокислотам приводит к снижению привесов животных в краткосрочных экспериментах. Долговременные эксперименты по имбалансу невозможны из-за явно плохого самочувствия животных.

Триптофан – наиболее редкая аминокислота в полипептидных цепях белков животных. Можно предположить, что при значительной нагрузке всеми аминокислотами при умеренном дефиците триптофана стимулируется синтез не только ферментативных, но и структурных белков тканей и органов. Но при этом трансляция приводит к синтезу значительного количества незаконченных или ошибочных полипептидных цепей, которые сходят с матрицы после того как обнаруживается

отсутствие субстрата (триптофана) или вставка неверной аминокислоты.

Лизин медленно обновляется и лучше других аминокислот реутилизируется [4]. Поэтому обеспеченность организма лизином, по всей вероятности, создаётся лучше, чем при имбалансе триптофана, даже при условии одинакового дефицита в диете. Кроме того, лизин – наиболее часто встречаемая аминокислота в белках организма животных. Вероятность образования ошибочных полипептидов при имбалансе лизина должна быть ниже, а обнаружение таковых быстрее, чем при триптофановом имбалансе.

В классических исследованиях, представляющих особый интерес, продемонстрировано, что формирование полирибосом зависело от присутствия в рационе незаменимых аминокислот. При этом эффективность синтеза белка определяется степенью агрегации рибосом на мРНК: наиболее интенсивно синтез белка происходит с участием тяжёлых высокоагрегированных полирибосом [2-5, 18].

Исследования по регуляции синтеза белка показывают, что сбалансированность корма по незаменимым аминокислотам оказывает сильное действие на агрегацию рибосом. Дезагрегированные полисомы при отсутствии или остром недостатке какой-либо аминокислоты быстро восстанавливаются после включения в рацион животных недостающих аминокислот. Однако реагрегация идёт значительно медленнее, когда исключённой аминокислотой был триптофан. Это указывает на то, что содержание в рационе триптофана играет особую роль в формировании полирибосом [2, 18].

При отсутствии в питании крыс аргинина, фенилаланина, метионина, цистина, изолейцина, треонина и гистидина активность полисом не снижалась до такой сильной степени, как при отсутствии триптофана [2, 18]. Что вполне согласуется с данными, представленными в таблице 8.

Возможность ошибок (или неоднозначность трансляции) в синтезе

полипептидных цепей при считывании генетического кода вполне вероятно. Синтез и деградация белка – тесно взаимосвязанные процессы. Интенсификация ошибочного синтеза может стимулировать «ошибочную» деградацию белка. По-видимому, при имбалансе, по триптофану в особенности, происходит дезорганизация белоксинтезирующей системы. Следствием этого являются нарушения обмена веществ, накопление вредных метаболитов, усиление активности синтеза и деградации белка и нуклеиновых кислот. Отказ от корма или снижение потребности в этих условиях становится защитной реакцией от более серьёзных нарушений. При имбалансе возрастают непроизводительные затраты энергии на корректировку точности трансляции на уровне деацилирования, деградацию ошибочных полипептидов, синтез ферментов деградации излишних аминокислот. Эти процессы при низкобелковом питании и умеренном дефиците лизина, по-видимому, экзоэнергетичны, что в итоге создаёт условия для более эффективного использования энергии корма на продукцию.

Ответить на вопрос, какую функциональную нагрузку несет неоднозначность трансляции (ошибочный синтез белков), в настоящее время трудно. Мы до сих пор не знаем многих весьма важных деталей в работе аппарата белкового синтеза. Такие проблемы, как относительные частоты использования кодонов-синонимов у различных организмов, дублирование генов для различных классов тРНК, функциональное значение различных белков в рибосомах, механизм работы аминоацил-тРНК синтетаз, и многие другие сейчас лишь затронуты в экспериментальных исследованиях.

Чтобы описать возможные последствия поливариантности белкового синтеза в более или менее строгой форме, необходимы подробные сведения о процессе трансляции. Сейчас можно высказать лишь некоторые предположения в общей форме. Представляется допустимым рассматривать *поливариантность как адаптивный признак* (подобно тому,

что фактически адаптивным признаком являются ошибки репликации — мутации, источник наследственной изменчивости). Возникновение серии близкородственных белков в результате «ошибок» трансляции может служить для расширения нормы реакции клетки [19, 20].

Влияние имбаланса аминокислот на стабильность *in vitro* мРНК из печени крыс. Одним из самых существенных компонентов белоксинтезирующей системы является матричная РНК (мРНК), переносящая генетическую информацию от гена к рибосомам. Концентрация мРНК определяет интенсивность синтеза белков и складывается из скоростей двух основных процессов: синтеза мРНК в ядре и её распада в цитоплазме (время полужизни мРНК). Наиболее оперативным механизмом регуляции экспрессии генов является изменение стабильности мРНК.

Так, например, индивидуальные мРНК значительно различаются по времени жизни, которое варьирует в клетках эукариот от нескольких минут до недель, в то время как транскрипция (т.е. синтез мРНК) изменяется сравнительно мало. Наиболее изучены в этом отношении мРНК гистонов. Уровень мРНК гистонов определяется тремя параметрами: нормой транскрипции, эффективностью процессинга и транспорта мРНК, временем жизни мРНК. В целом это позволяет повысить концентрацию мРНК в клетке в 30-50 раз в течение клеточного цикла. При этом транскрипция изменяется только в 3-5 раз. Значительное увеличение уровня мРНК гистонов в S-фазу клеточного цикла в основном обусловлено возрастанием времени её полужизни от 10-15 до 45-60 мин.

Другим наглядным примером роли стабильности мРНК может служить глобиновая мРНК, составляющая 90% суммарной мРНК ретикулоцитов. Большое содержание этой мРНК является результатом высокой стабильности (2-3-ое суток) по сравнению с другими мРНК, что и определяет её относительное накопление при отсутствии транскрипции

генов в ретикулоцитах [5].

Известно, что онкогенная с-тус мРНК, ответственная за синтез белка, определяющего деление клеток, имеет время полужизни менее 10 минут или оборот её составляет 10 000% в сутки, в то время как мРНК глобина – 50 часов или 33% в сутки. При изменении условий жизни стабильность с-тус мРНК может возрасти или снизиться на 400%, соответственно изменив синтез белка с-тус, без изменения транскрипции гена с-тус [19].

Примером «прямого» влияния питательного вещества на генную экспрессию через воздействие на стабильность мРНК и эффективность трансляции является контролируемая катионами железа трансляция определённых мРНК. Показано, что 3'-нетранслируемая область мРНК рецептора трансферина человека обеспечивает зависимый от железа контроль стабильности этой мРНК. Делеционные эксперименты позволили идентифицировать фрагменты длиной в 678 нуклеотидов в ДНК, комплементарной мРНК для рецептора, которые определяют стабильность мРНК. Внутри этого фрагмента располагается пять структур «стебель-петля», дестабилизирующие эту мРНК в присутствии избытка ионов железа [5].

Поэтому весьма актуальными представлялись исследования влияния имбаланса аминокислот на стабильности мРНК. Ранее на суммарной полиаденилированной мРНК и на примере ряда индивидуальных, ген-специфических мРНК было показано тождество закономерностей Mg^{++} -зависимого распада мРНК *in vivo* (при блокаде транскрипции актиномицином Д) и *in vitro* (при инкубации водного препарата Mg^{++} -содержащей РНК или в ходе хроматографического отделения мРНК от основной массы РНК) [5, 8].

В первом эксперименте была проведена работа по оценке процента поли-(А)-содержащей мРНК методом аффинной хроматографии на поли-(У)-сефарозе от суммы высокополиаденилированной и

слабополиаденилированной мРНК. Суммарную мРНК выделяли из полисомной РНК как препарат псРНК - мРНК прочно связывающейся с колонкой МАК (метилованный альбумин-кизельгур) при селективной ионообменной её сорбции по методу А.В. Лихтенштейна [13].

РНК прочно связанную с МАК элюировали с колонки и непосредственно наносили на колонку поли-У-сефарозы. При этом только 30% мРНК печени лабораторных белых крыс 4-ой группы связывалось с поли-У-сефарозой. Это свидетельствует о том, что в целом мРНК печени слабо полиаденилирована. Имбаланс по лизину и триптофану приводил к снижению этой величины (1-я и 2-я группы) (табл. 9). Имбаланс по триптофану вызывал резкую дестабилизацию мРНК, что вполне соответствует обсуждаемым выше экспериментальным и литературным данным о резко выраженной дезагрегации полирибосом и значительном снижении трансляционной активности полирибосом при имбалансе по триптофану.

Таблица 9 - Концентрация суммарной мРНК и высокополиаденилированной мРНК в печени крыс (опыт 1)

РНК	Основная	Имбаланс лизина	Имбаланс триптофана	Скорректированный
Суммарная мРНК, мкг/г в % от полисомной РНК	11,0 1,2	13,3 1,0	16,4 1,6	13,8 1,2
Высокополиаденилированная мРНК, мкг/г в % от суммарной мРНК	2,42 22	3,72 28	2,46 15	4,14 30

Концентрация суммарной прочносвязанной с МАК фракции РНК (мРНК) в печени согласуется с данными по содержанию суммарной РНК. Она значительно выше у крыс 2-ой и 3-ей групп, по сравнению с её уровнем в первой группе. Количество поли-(А)-мРНК (высокополиаденилированных мРНК) было более высоким у животных 2-ой и 4-ой групп. Хотя абсолютное количество этой субфракции в печени животных при триптофановом имбалансе такое же, как у животных на основной диете, но в процентах от суммарной мРНК концентрация поли(А)-мРНК оказалась самой низкой, что свидетельствует о

относительно низкой стабильности мРНК.

Таким образом, показано, что при имбалансе (2-я и 3-я группы животных) концентрация РНК в печени, в том числе матричной, выше, чем на основной диете (1-я группа) и находится на том же уровне, как и в печени животных, получавших высокобелковую скорректированную диету (4-я группа). В мышцах концентрация полисомной РНК несколько выше у животных при триптофановом имбалансе (3-я группа). Учитывая слабый рост крыс в этой группе, можно сделать вывод, что имбаланс не оказывает ингибирующего действия на синтез РНК.

Аналогичная работа была проведена (по схеме, представленной на рис. 2) во второй серии опытов (рис. 2) путём определения поли-(А)-содержащей мРНК суммарной РНК, выделенной из печени крыс в присутствии катионов магния (Mg^{++}). Индекс стабильности (ИС) полиаденилированной мРНК оценивали двуциклической афинной хроматографией мРНК на поли(У)-сефарозе как % поли-(А)⁺⁺-мРНК второго цикла от поли-(А)⁺-мРНК первого цикла. Было так же показано, что ИС мРНК печени действительно относительно низок (30%), а имбаланс по незаменимым аминокислотами приводит к значительному снижению этой величины (табл. 10).

Таблица 10 - Соотношение интенсивности роста крыс и стабильности мРНК печени (опыт 3)

Диета	Потребление корма на голову в сутки, относит. 1 группы, %	Среднесут. прирост, относит. 1 группы, %	Индекс стабильности суммарной поли-(А) ⁺ мРНК, %
1. Основная (кукуруза)	100	100	27
2. Имбаланс лизина до 100%	91,7	14	23
3. Имбаланс триптофана до 100%	79,4	5	23
4. Скорректированная до 100%	248,8	853,6	33

В этом эксперименте были проведены и сравнительные исследования стабильности индивидуальных, ген-специфических мРНК методом молекулярной гибридизации с соответствующими радиоактивно мечеными олигодезоксинуклеотидными зондами, комплементарными по последовательности нуклеотидов тому или иному гену и соответственно его мРНК. При этом в исследовании использовали суммарную Mg^{++} -содержащую РНК из печени и мозга подопытных животных. Молекулярные зонды были взяты для мРНК вышеупомянутых β -глобина и σ -туб. А также для субъединицы α фактора элонгации трансляции 1 (eEF-1 α).

Исследование экспрессии гена eEF-1 α представлялось наиболее интересным, поскольку известно, что у высших растений увеличение трансляционной активности полисом под влиянием холода или засоления связано с возрастанием доли тяжелых полисом. Вместе с тем, стимуляция трансляционной активности полисом *in vitro* при поранении, холоде и гипоксии коррелирует с усилением экспрессии гена субъединицы α фактора элонгации трансляции eEF-1 и его соответствующим накоплением в растительной клетке. Этот фактор играет центральную роль в элонгации полипептидных цепей эукариотических клеток, в ходе которой расходуется ГТФ. Помимо этого, для eEF-1 α показаны ассоциация с цитоскелетом, связь с эндоплазматическим ретикулумом, участие в распаде белков и в организации митотического аппарата клетки. Несомненно, фактор элонгации EF-1 α играет важную роль в регуляции синтеза белка и изменение его содержания в той или иной ткани свидетельствует об изменении интенсивности синтеза белка [5].

Печень		Мозг
	eEF-1 α	
1 > 4 > 2 = 3		4 > 3 > 2 > 1
	β -глобин	
1 > 4 > 2 > 3		1 > 4 > 3 > 2
	c-тус	
1 > 4 > 2 = 3		1 > 4 > 3 > 2

Рис. 3. Влияние имбаланса по лизину (2-я группа) и триптофану (3-я группа) на относительные ряды стабильности мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции (eEF-1 α), β -глобина и c-тус печени и мозга крыс в сравнении с основной (1-я группа) и скорректированной диетой (4-я группа)

Как следует из данных, представленных на рис. 3, ряды стабильности мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции (eEF-1 α), β -глобина и c-тус в печени крыс были практически одинаковы для всех групп: наиболее стабильны эти мРНК были у крыс на основной и скорректированной диетах, имбаланс по лизину и триптофану снижал стабильность этих мРНК. Эта закономерность соответствует действию имбаланса на суммарную мРНК.

Для мРНК β -глобина и c-тус этот ряд сохранялся и для мозга: имбаланс снижал стабильность этих транскриптов. Отличия коснулись лишь мРНК eEF-1 α - её стабильность была самой высокой на скорректированной диете, а имбаланс аминокислот, как и в печени, снижал стабильность этой матрицы. Но самой низкой стабильность этой мРНК оказалась в первой группе животных, получавших основную диету. Для выяснения причин такого различия печени и мозга необходимы дополнительные исследования.

Стабильность мРНК может определяться разными молекулярными механизмами. Наиболее вероятным молекулярным механизмом в случае имбаланса аминокислот является изменение длины поли-(A)-последовательности на 3'-конце молекулы мРНК, т.е. степень её

полиаденилирования. Важно подчеркнуть, что степень полиаденилирования определяет и трансляционную активность мРНК: чем длиннее поли-(А)-хвост, тем продолжительнее время полужизни и эффективнее трансляция матрицы, т.е. терминальная поли-(А)-последовательность является цис-фактором стабильности мРНК и энхансером (усилителем) трансляции.

Таблица 11 - Влияние имбаланса по лизину и триптофану на степень полиаденилирования мРНК печени, прирост и аппетит поросят

№ группы	1	2	3	4
Показатели	Основная	Имбаланс лизина	Имбаланс триптофана	Скорректированная
Относительно короткие поли-(А)-хвосты (A) _n 35°	9,8±0,7	10,8	10,0±0,6	11,6±0,8
Относительно длинные поли-(А)-хвосты (A) _n 65°	8,0±0,4	5,1±0,3	3,1±0,2	11,7±0,6
(A) _n 65°/(A) _n 35°	0,85	0,47	0,31	1,01
Среднесуточный прирост поросят, г	221±11	180±12	80±13	580±23
Потребление корма, кг/гол/день	1,14±0,1	1,04±0,02	0,89±0,06	1,28±0,06

В экспериментах на поросятах методом ступенчатой термальной элюции поли-(А)-содержащей мРНК печени с колонки поли-(У)-сефарозы было установлено, что, как и в печени крыс, имбаланс по лизину и триптофану негативно повлиял на стабильность мРНК: соотношение фракций мРНК, элюируемых с колонки при температуре 65°С (длиннохвостовые молекулы) и при температуре 35°С (короткохвостовые молекулы) составляло для 1-й группы 0,85, для 4-й – 1,04, а для 2-й и 3-й -

0,47 и 0,31, соответственно (табл. 11).

Изменения в полиаденилировании мРНК могут быть вызваны действием эндогенных и экзогенных факторов. Так, под действием NaCl увеличивается длина поли-А-хвоста аргинин-вазопрессина и окситоцина у крыс. В гипоталамусе крыс увеличивается размер поли-А-хвоста мРНК окситоцина в течение беременности и лактации. На 100-150 адениловых остатков увеличивается мРНК гормона роста в цитоплазме клеток крыс под воздействием тиреоидных гормонов. Наблюдаются циркадные ритмы в изменении поли-(А)-хвоста ядерных транскриптов вазопрессина крыс: на свету мРНК имеет хвост протяжённостью 240 остатков аденина, а в темноте – всего лишь 30. Сильно увеличивается полиаденилирование мРНК крыс также при обработке клеток высокими концентрациями актиномицина Д и при аминокислотном голодании. Укорачивание поли-А-хвостов короткоживущих мРНК протоонкогенов *c-myc* и *c-fos* в клетках животных происходит с различной скоростью в зависимости от условий внешней среды. В целом это определяет изменение стабильности мРНК в 5-6 раз [5].

Вместе с тем, относительно хорошо изученным является механизм стабилизации специфических мРНК под влиянием голода как следствие усиления синтеза специфических белков, взаимодействующих с (U)_nА-обогащённой последовательностью нуклеотидов в 3'-некодирующей области молекулы мРНК, предшествующей поли-(А)-хвосту. Синтез этих белков усиливается и при блокаде транскрипции антибиотиком актиномицином Д, когда происходит частичный распад мРНК. Это говорит о том, что в свою очередь синтез этих белков усиливается как следствие парадоксальной стабилизации их мРНК [6].

Представляется вероятной цепь следующих событий, для описания перестройки экспрессии генов в адаптационном плане [5]: в условиях имбаланса аминокислот в клетках животных повышается активность РНК-

аз, которая в первую очередь подавляет синтез гипотетических белков-репрессоров (или РНК-интерференции - iRNA), продуктов генов-регуляторов, мРНК которых относится к группе короткоживущих и которые в норме снижают время жизни мРНК клеток эукариот. В результате предполагается стабилизация мРНК и стимуляция синтеза белков ряда структурных генов, изначально имеющих относительно стабильные мРНК, и подавление синтеза белков, изначально имеющих относительно короткоживущие мРНК (соразмерные по времени жизни с РНК генов-репрессоров). Всё это приводит к перестройке популяции мРНК и изменяет экспрессию генов в адаптационном плане.

Заключение

Итак, в результате изучения влияния имбаланса по лизину и триптофану на коэффициент активности генома в клетках печени и мышц крыс (РНК/ДНК) установлено, что эта расчётная величина, обычно рассматриваемая как показатель активности транскрипции, не коррелирует с изменением роста животных.

Наиболее интересным показателем, связывающим особенности белоксинтезирующего аппарата подопытных животных и их роста, оказался индекс стабильности матричных РНК (ИС), рассчитываемый по результатам двуциклической афинной хроматографии поли-(А)-содержащей мРНК на поли-(У) сефарозе, как процент поли-(А)⁺⁺ мРНК второго цикла хроматографии от поли-(А)⁺ мРНК первого цикла, или как показатель степени полиаденилирования мРНК: $(A)_n65^\circ / (A)_n35^\circ$. Эти параметры характеризуют потенциальную эффективность экспрессии генов в зависимости от генотипа и аминокислотной сбалансированности питания. Как было показано, величина ИС, определяемая степенью полиаденилирования мРНК, отражает интенсивность роста животных: чем выше значение ИС, тем интенсивнее рост. Аналогичные закономерности

были выявлены и для растений [5].

Роль катионов магния (Mg^{++}). Обязательным условием стабилизации нативной структуры рРНК является наличие в ней катионов магния, которые оказывают негативное влияние на степень полиаденилирования мРНК. Анализ литературных экспериментальных данных показывает, что количество магния в клетках эукариот прямо пропорционально стабильности рРНК и обратно пропорционально стабильности мРНК [5, 21].

При изучении печени и мускулов цыплят-бройлеров было установлено, что мускулы содержат в 2,5 раза больше катионов магния, чем печень. Имбаланс по лизину повышал содержание катионов магния в печени на 20-30% и практически не влиял на его содержание в мускулах. Чем меньше магния содержат клетки, тем интенсивнее рост эукариот [21].

О взаимоотношении стабильности рибосомной и матричной РНК. Представленные в настоящей статье данные показывают, что снижение роста крыс при аминокислотном имбалансе часто сопровождается увеличением содержания РНК (основная масса которой представлена рРНК) печени и дестабилизацией мРНК, составляющей всего лишь 1-2% от суммарной РНК. Но именно мРНК определяет возможности биосинтеза белка и потому её стабильность и содержание положительно взаимосвязаны с ростом животных.

Анализ прямых и косвенных научных фактов, описанных в литературе, показывает, что инверсия направленности стабилизации и дестабилизации мРНК и рРНК были отмечены и в других исследованиях. Установлено, что в полирибосомах десяти различных злокачественных тканей содержание магния оказалось на 30-50% ниже по сравнению с таковыми нормальных клеток, что позволяет предполагать снижение стабильности рРНК. При этом стабильность мРНК в опухолевых клетках

выше, чем в нормальных [5]. Противоположные колебания стабильности рРНК и мРНК наблюдали также при сравнительных исследованиях модифицированных нуклеозидов мочи здоровых детей и педиатрических пациентов с черепно-мозговой травмой головы [22]. В подобных экспериментах также установлено, что уровень деградации рРНК на килограмм массы тела выше на 24% у мужчин по сравнению с женщинами во всех возрастных группах; в противоположность этому, уровень распада мРНК был немного выше у женщин, чем у мужчин [23]. На инверсии стабильности мРНК и рРНК и вариациях содержания катионов магния в РНК основан и молекулярный механизм морозоустойчивости озимой мягкой пшеницы [5].

В связи с этим представляется понятным факт, отмеченный в научной литературе: денситометрический анализ рРНК по отношению 28S рРНК/18S рРНК в препарате высокополимерной РНК не может быть критерием качественного состояния мРНК, т.е. рРНК и мРНК имеют разные механизмы деградации [5]. Это хорошо иллюстрируется экспериментами по изучению влияния концентрации рРНК и мРНК на их распад в водном препарате Mg^{++} -содержащей РНК при его инкубации в условиях положительных температур (37°; 65°С – система *оттп*): разбавление концентрации РНК снижало степень распада рРНК, но никак не сказывалась на интенсивности распада ряда ген-специфических мРНК [5]. Вероятно, это обусловлено наличием у рРНК наряду с прочно связанными катионами магния и диффузно (слабо) связанных с молекулой катионов Mg^{++} , в то время как мРНК имеет только прочносвязанные катионы магния.

Основной вывод

Таким образом, можно полагать, что центральным молекулярным механизмом перестройки метаболизма животных при аминокислотном имбалансе является разнонаправленное изменение стабильности рРНК и

мРНК. Дестабилизация мРНК приводит к дезагрегации полирибосом и таким образом затрудняет синтез белка, приводит к снижению роста животных. Стабилизация рРНК, по-видимому, направлена на противодействие этому негативному процессу с целью повышения жизнеспособности организма в стрессовых условиях через обеспечение короткоживущей мРНК избытком рибосом.

Этот вывод согласуется с хорошо изученным молекулярным механизмом влияния аминокислотного имбаланса на активацию системы mTOR (mammalian target of rapamycin), включающей каскад фосфорилирования ряда белков, и приводящей, в конечном итоге, к усилению синтеза рибосомных белков, через повышение уровня трансляции соответствующих им мРНК [2].

Следовательно, аминокислотный имбаланс включает феномен реализации физиологического резервирования (использование скрытых ресурсов организма) через усиление образования рибосом.

Несомненно, представляют интерес дальнейшие более масштабные исследования этого фундаментального явления, важного как для получения новых знаний о регуляции экспрессии генов в животной клетке, так и для разработки новых молекулярно-биологических маркёров и методов оценки генетико-физиологического статуса животных и разработки на их основе научно обоснованных норм питания.

Литература

1. Рядчиков В.Г., Плотников В.К., Плотникова А.В. Баланс аминокислот, как регулятор аппетита и синтеза белка у свиней //Повышение продуктивности свиноводства на Северном Кавказе: Сборник научных трудов КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко и Северо-Кавказского НИИ животноводства, Краснодар, 1986., С. 39-57.
2. Kilberg M.S., Pan Y-X., Chen H., Pineda L. Nutritional control of the gene expression: how mammalian cells respond amino acid limitation // Annu. Rev. Nutr., 2005, 25, P. 59-85.
3. Kimball S.R., Jefferson L. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation // Am. J. Nutr. 2006. 83. P. 500-507.
4. Park B-Ch. Amino acid imbalance – biochemical mechanism and nutritional aspects

// Asian-Aust. J. Anim. Sci., 2006, v. 19, P. 1361-1368.

5. Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур Краснодар.: ЭДВИ, 2009. 375 с.
6. Yaman I., Fernandes J., Sarkars B., Schneiders R.J., Snider M.D., Nagy L.E., Hatzoglou M. Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR // The journal of Biological Chemistry, 2002, 277, P. 41539-41546.
7. Насонов А.И. Гетерогенность свойств РНК зерновых культур. Связь с биологическими особенностями линий и сортов // Saarbrücken, LAP Lambert Academic Publishing, 2010. 190 с
8. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // Plant Molecular Biology. 1996. V.31. P. 507-515.
9. Хеймс Б., Хиггинс С. Транскрипция и трансляция. М.: «Мир», 1987. 400 с.
10. Hayashi X., Makino R., Kawamura H.// Characterization of rat c-myc and adyasted regions. Nucl. Acid. Res. 1986, 15, 6419-6436,.
11. Linhh A.D., Lee S., Wang E./ Characterization of statin-like S-1 and rat elongation factor 1 alfa as two distinctli expressed messedges in rat // J. Biol. Chem. 1987, v.267. P.699-702.
12. Stevanovic M. Crvenjakov R. Genomic sequence of rat beta-globin minor gene// Nucl. Acid. Res. 1989, 17. P.4878.
13. Лихтенштейн А.В. Фракционирование ядерных и цитоплазматических РНК печени крысы на колонке метилированного альбумина-кизельгура // Докл. Акад. наук СССР. 1970. Т. 193. № 4. С. 936-938.
- 14 Wang H., Lu D., A study on the optimal amino acid pattern at the proximal duodenum in growing sheep // Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2002. V. 15. No 14. P. 38-44,
- 15 Bocker R., Jones I.K., Karsten W. Metabolism of protein and RNA in liver of rats deprived of tryptophan//J. Nutrition. 1977. v. 107. P. 1737-1746.
- 16 Canfield L.M., Chytil F. Effect of low lysine diet on rat liver nuclear metabolism//J. Nutrition. 1978. 108. P. 1336-1342.
- 17 Омаров М.О. Динамика содержания нуклеиновых кислот и активность РНК-аз печени крыс при имбалансе аминокислот // Повышение продуктивности свиноводства на Северном Кавказе: Сборник научных трудов КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко и Северо-Кавказского НИИ животноводства. Краснодар, 1986. С.127-132
- 18 Лишневецкая Е.В. Мембранносвязанные рибосомы//Успехи современной биологии. 1977. т. 83. вып.2. С. 182-197.
- 19 Сидорин В.В. Пищевая геномика и пищевая регуляция экспрессии генов// WWW MGIMO.RU
20. Тер-Аванесян М.Д., Инге-Вечтомов С.Г. Генетический контроль синтеза белка. Л.: ЛГУ, 1988. 296 с.
21. Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg^{++}), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2008. № 2(11). С.104-110.
22. Grimble G.K., Malik S.B., Boza J.J. Method for measuring tissue RNA turnover//Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2000. v. 3, P.399-408.
23. Topp H., Schöch G. Whole-body degradation rates of transfer-, ribosomal-, and messenger ribonucleic acids and resting metabolic rate in 3- to 18-year-old humans // Pedeatric Res. 2000. V. 47. P. 163-175.