9. *Carpenter M. B. Mc Masters R. S.* Amer. j. Anat., *144*, 293, 1954.
10. *De Groot J.* The Rat Forebrain in stereotaxic coordinates. Amsterdam, 1959.
11. *Jang R., Hassler R.* The extrapiramidal motor sistem. Washington, 863, 1960.
12. *Laursen A. M.* Acta physiol. scand., *57*, 1—2, 81, 1963.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 6, 1983

УДК 574.963.3

О ДЕЙСТВИИ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА КРОВЕТВОРНЫЕ ОРГАНЫ МЫШИ

А. С. САФАРЯН, Г. С. БАХЧИЕВА, А. С. АГАБАЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Изучалось влияние синтетического гормона дексаметазона на восстановительные процессы в кроветворных органах мышей. Показано, что в период обработки животных гормоном имеет место выраженное уменьшение общего количества лимфоцитов, синтеза ДНК, массы селезенки и печени, и в то же время практически неизмененным остается общее количество других форм лейкоцитов. Установлено более выраженное действие дексаметазона на клетки селезенки и содержание в них ДНК по сравнению с клетками костного мозга. Определено, что восстановление общего количества лимфоцитов, синтеза ДНК и массы селезенки происходит к концу первой недели после прекращения воздействия дексаметазоном, т. е. в срок, достаточный для клонирования стволовых гемопоэтических клеток костного мозга в селезенке сингенных мышей.

Ключевые слова: кроветворные органы, дексаметазон, ДНК.

Известно, что наиболее доступной и удобной моделью для изучения молекулярных механизмов пролиферации и дифференциации клеток являются кроветворные клетки, полученные из костного мозга, селезенки, эмбриональной печени, а также лимфоциты периферической крови человека. Наряду с этим хорошо известно, что кроветворные клетки в связи со своей способностью трансформироваться с высокой частотой и расселяться в кроветворных органах летально облученных мышей той же линии и формировать на селезенке мышей колонии гемопоэтических клеток могут служить прекрасной моделью для транспорта необходимой генетической информации [4, 5, 10]. Однако по причине необходимости применения при этом высоких доз гамма-лучей такой подход практически не может быть использован в медицине.

В связи с вышесказанным на первом этапе исследований нам представлялось интересным изучить влияние синтетического глюкокортикоида дексаметазона на восстановительные процессы, происходящие в кроветворных органах после длительного воздействия им, и возможность замены облучения животных гамма-лучами введением фармакологических доз дексаметазона.

Материал и методика. В работе использовали сингенных мышей линии СВА массой 18—22 г, которым ежедневно, в течение семи дней, через каждые 18—20 ч внутрибрюшинно вводили дексаметазон в дозе 80 мкг/мышь. Животных забивали декапи-

тированием как в период обработки гормоном, так и после прекращения инъекций, затем извлекали селезенку и вымывали средой 199 из бедренной и берцовой костей задних конечностей костный мозг.

Лимфоциты из селезенок и костного мозга получали двумя путями. Независимо от используемого способа клетки тщательно гомогенизировали в среде 199, гомогенат центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при 4° и отбирали осадок. В первом случае суспендировали осадок в минимальном объеме среды 199 и наносили на фиколверографиновый градиент [7], лимфоцитарную интерфазу отбирали, отмывали и использовали в последующей работе. При втором, количественном, способе осадок суспендировали в буфере, содержащем 0,17 М NH_4Cl, 0,2 М трис-HCl, pH 7,4, тщательно пипетировали и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при 4°, полученный осадок лимфоцитов суспендировали в среде 199.

^{3}H-тимидин вводили животным за час до их декапитации в дозе 100 мккю внутрибрюшинно. ДНК из клеток селезенки и костного мозга выделяли по способу Мармура [6]. Количественную и качественную характеристики препаратов ДНК проводили спектрофотометрически. Электрофоретическую идентификацию препаратов ДНК осуществляли в 0,7%-ном геле агарозы по описанному ранее методу [2].

Результаты и обсуждение. Сравнительная характеристика количественного выхода лимфоцитов в период обработки дексаметазоном выявила преимущество обработки клеток смесью трис-хлористого аммония как при получении лимфоцитов из клеток селезенки, так и костного мозга.

Количественный анализ выхода лимфоцитов из клеток селезенки и костного мозга мышей, обработанных дексаметазоном, показал резкое уменьшение их в селезенке, на 65—70%, и примерно на 20% в костном мозге (рис. 1). Как видно из рисунка, клетки костного мозга обладают значительной устойчивостью к действию гормона по сравнению с клетками селезенки.

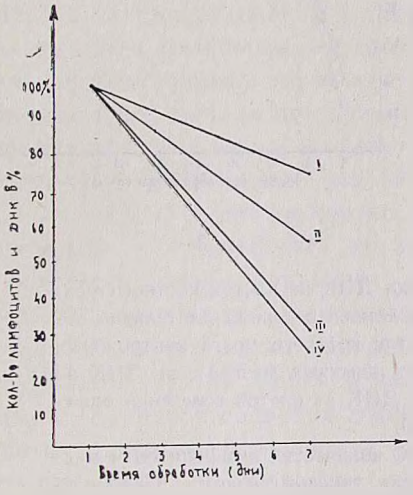

Рис. 1. Количество лимфоцитов и содержание ДНК в клетках костного мозга и селезенке мышей в период длительной обработки дексаметазоном. I—количество лимфоцитов из костного мозга; II—количественное содержание ДНК в клетках костного мозга; III—количество лимфоцитов из селезенки; IV—количественное содержание ДНК в селезенке. За 100% принимали количество лимфоцитов и ДНК, полученных из костного мозга и селезенки контрольных мышей.

В специальных экспериментах было установлено резкое уменьшение количества ДНК в клетках обоих органов. В то же время отмечалось более выраженное действие дексаметазона на клетки селезенки по сравнению с клетками костного мозга. Как видно из рис. 1, после обработки дексаметазоном количество ДНК в костном мозге составляло 60—65%, а в селезенке 25—30%. Аналогичные результаты были получены в отношении действия гормона на количественное содержание ДНК в печени.

Ингибирующее влияние глюкокортикоидов на лимфопоэз было показано рядом авторов [8, 9], но в то же время, по этим данным, лимфолитический эффект не сопровождался резким угнетением миелопоэза, что полностью согласуется с результатами наших исследований.

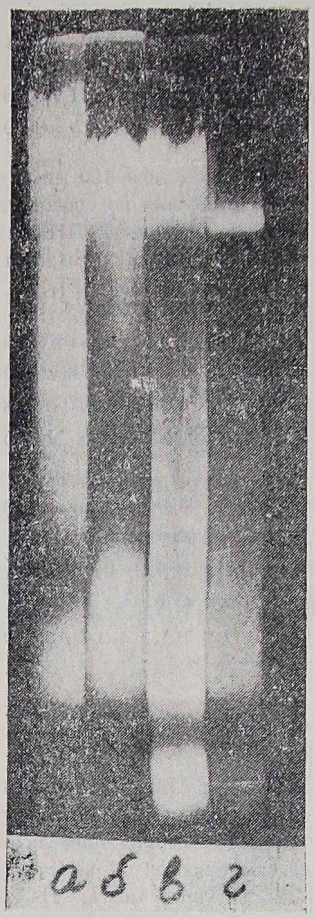

Рис. 2.

Электрофоретический анализ препаратов ДНК, выделенных из клеток селезенки и костного мозга интактных и опытных животных, обнаружил гомогенность полученных ДНК с различными уровнями миграции (рис. 2). Как видно из рис. 2, ДНК, полученные из костного мозга и селезенки после воздействия дексаметазона, отличаются от контрольных ДНК из тех же органов своей электрофоретической

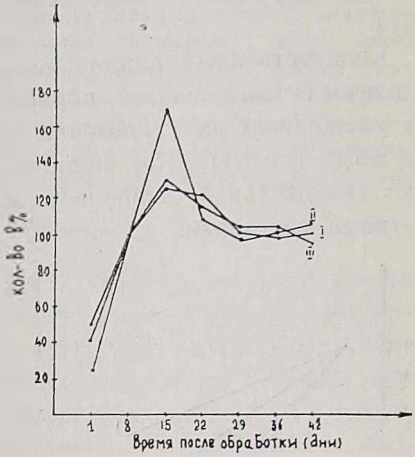

Рис. 3.

Рис. 2. Электрофоретическая характеристика ДНК из клеток костного мозга и селезенки контрольных и подопытных мышей в период длительной обработки дексаметазоном: а) ДНК из клеток костного мозга контрольных мышей; б) ДНК из клеток костного мозга опытных мышей; в) ДНК из клеток селезенки контрольных мышей; г) ДНК из клеток селезенки опытных мышей.

Рис. 3. Динамика нарастания синтеза ДНК, количества лимфоцитов и масса селезенки после длительного воздействия дексаметазоном, I—количество лимфоцитов; II—масса селезенки; III—синтез ^{3}H ДНК. За 100% принимали количество лимфоцитов, синтез ^{3}H ДНК и массу селезенки контрольных мышей.

подвижностью, имея относительно низкий молекулярный вес. Наличие в клетках лимфоидной ткани выраженной эндонуклеазной активности, фрагментирующей ДНК по спейсерным участкам в хроматине и активируемой глюкокортикоидами, описано в ряде работ [1, 3].

На представленной электрофореграмме видно также значительное уменьшение рибонуклеинового фона у препаратов ДНК, полученных из клеток селезенки и костного мозга опытных мышей, по сравнению с контролем.

При изучении воздействия дексаметазона на количественное содержание лимфоцитов и других форменных элементов крови в период обработки животных дексаметазоном и после длительного воздействия им было установлено, что за исключением лимфоцитов дексаметазон практически не влияет на биогенез других форм лейкоцитов (табл.).

Таблица

Влияние дексаметазона на количественное содержание форменных элементов крови

Время, недели	Контроль, %					Опыт, %				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
I	84	1	—	—	15	13	1	—	—	9
II	83	1	—	—	—	79	1	—	1	—
III	88	2	—	—	9	82	3	—	1	13
IV	81	2	—	—	17	88	1	—	0,5	10
V	84	1	—	—	14	83	2	—	—	10

1—лимфоциты, 2—моноциты, 3—юные, 4—палочкоядерные, 5—сегментоядерные. I неделя—период обработки дексаметазоном; II, III, IV, V недели—после прекращения инъекций дексаметазона. Приведены средние данные 5-ти экспериментов.

Для выяснения действия дексаметазона на биогенез лимфоцитов и ДНК в селезенке мышей, а также изменение весовых показателей этого органа в различные интервалы времени животных после соответствующей обработки гормоном и внесения радиоактивного изотопа забивали через каждые два дня. Как видно из рис. 3, сразу же после прекращения длительного воздействия дексаметазона резко подавляется включение ^{3}H-тимидина (на 80%), уменьшается количество лимфоцитов на 60% и почти двукратно снижается масса селезенки, после чего постепенно увеличиваются все параметры, которые к 8-му дню достигают контрольных значений. В дальнейшем обнаруживается значительное увеличение количества лимфоцитов, синтеза ДНК, а также массы селезенки с постепенным возвратом к норме на 29—30-й день и сохранением этого уровня в дальнейшем. Следует отметить, что истощение селезенки, сопровождающееся снижением ее массы, подавлением синтеза ДНК и уменьшением количества лимфоцитов происходит также при облучении животных летальными дозами гамма-лучей, однако восстановительные процессы при этом длятся значительно дольше при частичной выживаемости животных, тогда как при гормональном воздействии они протекают в течение недели при практически 100-процентной выживаемости, в срок, достаточный для расселения в кроветворных органах введенных извне стволовых гемопоэтических клеток.

Идентичные результаты были получены при изучении динамики влияния дексаметазона на количественное содержание ДНК и весовые показатели печени.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на возможность замены облучения животных гамма-лучами длительным воздействием фармакологической дозы дексаметазона для клонирования в селезенке стволовых клеток костного мозга, трансформированных соответствующими генами.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 4.X 1982 г.

ՄԿԱՆ ԱՐՅՈՒՆԱՍՏԵՂԾ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ՎՐԱ ԴԵՔՍԱՄԵՏԱԶՈՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա. Ս. ՍԱՖԱՐՅԱՆ, Գ. Ս. ԲԱԽՉԻԵՎԱ, Ա. Ս. ԱՂԱԲԱԼՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է դեքսամետազոն սինթետիկ հորմոնի ազդեցությունը մկների արյունաստեղծ օրգաններում վերականգնման պրոցեսների վրա։ Ցույց է տրված, որ կենդանիներին դեքսամետազոնով մշակելու ընթացքում նկատվում է լիմֆոցիտների ընդհանուր քանակի, ԴՆԹ-ի սինթեզի, փայծաղի և լյարդի քաշի զգալի նվազում, բայց միևնույն ժամանակ գործնականորեն անփոփոխ է մնում լեյկոցիտների մնացած ձևերի ընդհանուր քանակը։ Դեքսամետազոնի ազդեցությունը փայծաղի բջիջների և այդ բջիջներում ԴՆԹ-ի պարունակության վրա առավել արտահայտված է, քան ողնուղեղի բջիջների վրա։ Լիմֆոցիտների ընդհանուր քանակի, ԴՆԹ-ի սինթեզի և փայծաղի քաշի վերականգնումը տեղի է ունենում դեքսամետազոնի ազդեցությունը դադարեցուց հետո առաջին շաբաթվա վերջում, այսինքն՝ մի ժամկետում, որը բավական է սինգենային մկների փայծաղում ողնուղեղի հեմոպոետիկ բջիջների վեգետատիվ բազմացման համար։

ON DEXAMETHAZONE INFLUENCE ON THE MOUSE BLOOD-CREATING ORGANS

A. S. SAFARYAN, G. S. BAKCHIEAVA, A. S. AGABALYAN, R. A. ZACHARYAN

The influence of the synthetic hormone dexamethazone on the regenerating processes in the mouse blood-creating organs has been studied. The decrease of the lymphocytes general amount, DNA synthesis and the weight of the spleen and the liver have been observed. At the same time the general amount of lymphocytes practically does not undergo any changes. The influence of dexamethazone on the spleen cells and their content of DNA is more than on the cells of bone marrow.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Захарян Р. А.* В кн.: Структура и транскрипция генома. Тез. симп. СССР—ФРГ, 19, Ереван, 1981.
2. *Захарян Р. А., Агабалян А. С., Чил-Акопян Л. А., Гаспарян Н. С., Бакунц К. А., Татевосян П. Е., Африкян Э. К.* Докл. АН АрмССР, *63*, 1, 42—47, 1976.
3. *Захарян Р. А., Погосян Р. Г.* Докл. АН АрмССР, *67*, 2, 110—114, 1978.
4. *Михайлов В. Г.* В кн.: Консервация костного мозга. 117—119, М., 1979.
5. *Швец В. Н.* Радиобиология, *22*, 2, 264—268, 1982.

6. *Marmur J.* Mol., Biol., *12*, 468—487, 1961.
7. *Sulc K., Neuwirt J., Travnicek T., Kobylka P., Radikovska E.* Haematologia 11 (1/2), 41—46, 1977.
8. *Thompson E., Lipmann N.* Metabolism, *23*, 159—165, 1974.
9. *Tormey D., Fundendery H. Katin R.* Nature, *213*, 281—283, 1967.
10. *Till T., McCulloch E.* Radiat., Res., *14*, 213—218, 1961.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 6, 1983

УДК 575.24:576.851.48

ВЛИЯНИЕ rpsL⁻ МУТАЦИЙ НА ПРОЯВЛЕНИЕ Lon⁻ ФЕНОТИПА ESCHERICHIA COLI K—12

А. А. БАРСЕГЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Изучено влияние рибосомных мутаций, определяющих устойчивость культуры к высоким концентрациям стрептомицина, на проявление *lon* мутаций. Сконструированы изогенные *lon* штаммы отличающиеся аллельным состоянием *rpsL*-гена. Обнаружена разница в клеточном делении, УФ-чувствительности и скорости роста у исследуемых культур. Отмечена корреляция между УФ-чувствительностью и скоростью роста. Быстрорастущие культуры намного чувствительнее медленнорастущих. Добавление 200 мкг/мл стрептомицина в пострадиационную ростовую среду модифицировало действие *rpsL* аллелей. В зависимости от типа *rpsL* мутаций стрептомицин способствовал ускорению или замедлению роста культур и, соответственно, повышению или снижению их УФ-чувствительности.

Ключевые слова: радиочувствительность, рибосома, стрептомицин, мутации.

Lon⁻ мутации *E. coli* K-12 имеют широкое плейотропное проявление. Мутантные клетки отличаются повышенной чувствительностью к УФ лучам и радиомиметикам, синтезируют в больших количествах капсульный полисахарид—колановую кислоту, дефицитны по процессу клеточного деления [3, 6, 13, 18, 20], характеризуются пониженной способностью к лизогенизации умеренными фагами и нестабильностью наследования плазмид [9, 22]. В связи с идентичностью *lon* - и *deg*⁻ мутаций к числу признаков, свойственных *lon* ⁻ мутациям, можно прибавить и стабилизацию дефектных белков [12].

Недавно в экспериментах по молекулярному клонированию было установлено, что у *lon*⁻мутантов отсутствует протеазная активность, характерная для протеазы La [7, 26], однако природа мутаций и механизм действия *lon* ⁻ гена остаются невыясненными.

Известно, что УФ-чувствительность и нарушение клеточного деления, вызванные *lon* ⁻ мутацией, подвергаются супрессии со стороны мутаций в генах sulA (suf) и sulB [14, 20], а также некоторых нонсенс-супрессоров [4, 19].

Имеется ряд данных, указывающих на то, что повышенная УФ-чувствительность и нарушение процессов деления клеток после облучения обусловливаются нарушением нормального соотношения ДНК: (РНК+белок) [17, 23].