

նյարդահանգույցի վրա ազդելով փոփոխվում են վերջինիս բջիջների էլեկտրական ակտիվությունը.

— մազնիսացված հեղուկի նկատմամբ բջիջները զուցաբերում են հարմարման պատասխան. ա) միևնույն բջջի վրա մազնիսացված հեղուկի մի քանի հաջորդական կիրառումների բջջի պատասխանը թուլանում է, բ) լուրարանչուր կիրառման զեպում 8—15 րոպեից բջիջը վերագառնում է իր նախկին վիճակին:

Կենսահամակարգերի վրա մազնիսական դաշտի ազդեցության մեխանիզմի մեջ ջրի և ջրաչին լուծույթների հատկությունների փոփոխությունը պայմանավորված ներդրման պատկերը կարելի է կոնկրետացնել միայն ավելի մանրամասն նւտազո հետազոտություններից հետո:

#### ՊԵՆԱԿՆԻՔՅՈՒՆ

1. Айрапетян С. Н., Богларян Р. А., Григорян Х. В., Стамболцян Х. В., Арутюкян Р. С., Григорян Т. Е. ДАН АрмССР, 32, 4, 1986.
2. Айрапетян С. Н., Рыжков Г. Е. ДАН СССР, 285, 6, 1464—1467, 1986.
3. Данилов В. Н., Паршинцев В. В., Туркин В. В. Биофизика, 29, 1, 109, 1984.
4. Класен И. А. В кн.: Омагничивание водных систем. М., 1982.
5. Пресман А. С. В кн.: Электромагнитные поля и живая природа. М., 1967.
6. Adcy W. R. Proceedings IEEE, 68, 1, 199, 1980.
7. Gould J. L. Ann. Rev. Physiol., 46, 585—98, 1984.
8. Hefoux P. Bioelectromagnetics, 8, 135—148, 1987.
9. Leucht Th. Naturwissenschaften, 74, 192, 1957.

Поступило 6.11.1989 г.

Высшее ж. Армении. № 6.(42) 1989

УДК 577.352.4

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА В МЕМБРАНУ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ АНИЗОТРОПИИ

С. Я. АДАМЯН, Т. Г. АМБАРЦУМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский физический институт. ИКАЭ СССР

Лецитиновые липосомы—гемагглютинин—виросомы—флуоресцентная анизотропия

Слияние вируса с мембраной клетки—это процесс, который удобно моделировать, работая с выделенным вирусным белком и искусственной липидной мембраной. Липосомы с включенным в мембрану вирусным белком, так называемые виросомы, используются также в иммунологии, поскольку вызывают повышение иммуногенности в 10—30 раз по сравнению с обычными методами иммунизации [3, 7]. В связи с этим проведение структурных и функциональных исследований на модельных объектах представляет большой практический и теоретический интерес.

Сокращения: ДФГТ—1,6-дифенил-1,3,5-гексаатрен.

Для определения процесса связывания белка вируса гриппа гемагглютинина с искусственной мембраной обычно используется метод, связанный со способностью этого белка вызывать специфический гемолиз эритроцитов [5]. Недавно для этой цели был предложен метод гашения флуоресценции [6]. Нами предлагается метод флуоресцентной анизотропии для определения включения гемагглютинина в мембрану лецитиновых липосом.

*Материал и методика.* Липосомы получали из яичного лецитина Харьковского завода «Милект» вост. Очистку лецитина от леволецитина осуществляли с помощью окиси алюминия.

Сухую липидную смесь, полученную на роторном испарителе и очищенную от остатков хлороформа, эмульгировали вручную в течение 15 мин в 20 мМ триацетатного буфера с 130 мМ KCl, pH раствора равнялся 8,2. Концентрация липида—7,5 мг/мл. Полученную суспензию отстаивали в течение часа, а затем озвучивали в трубчатом озвучителе с частотой 22 кГц на ультразвуковом деинтеграторе УЗДН-2 до достижения просветления и опалесценции. Затем суспензия отстаивалась в течение часа. Гемагглютинин вируса гриппа (H3N2) был любезно предоставлен Институтом вирусологии и вирусных лицевитозов АМН СССР. Концентрация гемагглютинина составляла—150 мкг/мл. Вирусомы получали путем смешивания озвученной суспензии с равным объемом гемагглютинина и озвучивания полученной смеси в течение 20 мин в трубчатом озвучителе [7].

В качестве флуоресцентной метки использовали ДФГТ в соотношении с липидом 1:750. Подробное описание методики приводится в работе [1]. Регистрацию спектров флуоресценции проводили на флуориметре Perkin Elmer MPF-43 A (США).

*Результаты и обсуждение.* Добавление гемагглютинина к липосомам в весовом отношении 1:50 и последующее совместное озвучивание суспензии приводит к образованию вирусом.

О включении гемагглютинина в мембрану судили по изменению флуоресцентной анизотропии ДФГТ. Анизотропию вычисляли по формуле

$$A = \frac{(J_{\parallel} - G J_{\perp}) - (J'_{\parallel} - G J'_{\perp})}{(J_{\parallel} + G J_{\perp}) - (J'_{\parallel} + G J'_{\perp})}$$

где  $J_{\parallel}$  и  $J_{\perp}$  — параллельная и перпендикулярная составляющая флуоресценции в условиях «холостого» опыта, то есть в суспензии без ДФГТ.  $G$ —так называемый  $G$ -фактор, представляющий собой отношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света.

Результаты опытов показали, что при включении белка в мембрану флуоресцентная анизотропия статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) снижается. Для липосом  $g = 0,185 \pm 0,008$ , а для вирусом  $g = 0,159 \pm 0,008$  ( $n = 4$ ). Уменьшение анизотропии свидетельствует о разупорядоченности структуры мембраны, связанной с встраиванием белка.

Параллельно в качестве контроля включение гемагглютинина в липосомы проверили по специфическому гемолизу эритроцитов вирусным белком [2]. С этой целью суспензию центрифугировали в течение 1 часа при 18000 об./мин, а затем супернатант и осадок (вирусомы) использовали для определения гемолиза эритроцитов человека в растворе Альсвеера. Специфический гемолиз наблюдался при дей-

ствии осадка (т. е. действительно образуются виросомы), но не супернатанта (т. е. при таком соотношении липида и белка, вероятно, весь белок включается в липидный матрикс).

Полученная суспензия виросом была устойчива в течение 10 дней. Так как известно, что закисление раствора приводит к лучшему включению белка в фосфолипидную мембрану [4], то была предпринята попытка снизить pH раствора при получении виросом до семи. Однако уже через 2—3 дня в такой суспензии наблюдалось частичное выпадение виросом в осадок. Поэтому дальнейшие опыты проводили при pH 8,2.

Таким образом, в данной работе была получена устойчивая суспензия виросом. Показано также, что включение гемагглютинина в мембрану лецитиновых липосом вызывает уменьшение флуоресцентной анизотропии, что может быть использовано в качестве теста на образование виросом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марики Г. Г., Петросян Я. С. Биолог. ж. Армении, 41, 318—322, 1988.
2. Harper T., Hulse C. Вирусология, методы, М., 1988.
3. Altson A. C., Gregoriadis G. Nature, 252, 251—254, 1974.  
Dunst P. W., Heinen A., Klotz U. J. Biol. Chem., 260, 2973—2981, 1985.
4. Hoeg R. T. C., Dale G. A. Biol. Chem., 261, 12913—12914, 1986.
5. Waxham O., Lyster A. FEBS Letters, 221, 61—67, 1987.
6. Oxford J. S., Hockley D. J., Heath T. F., Fattersin S. J. Gen. Virol., 52, 329—343, 1981.

### ИЗУЧЕНИЕ МИКРОЯДЕР В РЕТИКУЛОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ

А. К. НЕРСЕСЯН, Р. М. АРУТЮНЯН

ОНЦ им. В. А. Фанарджяна МЗ АрмССР, Ереванский государственный университет

*Микроядра—ретикулоциты—злокачественные новообразования—химиотерапия.*

Известно, что изучение МЯ в клетках является достаточно информативным краткосрочным тестом, который в обязательном порядке входит в батарею тестов для выявления канцерогенов/мутagens [3]. Этот тест хорошо разработан для лабораторных животных [1]. Имеются также немногочисленные данные о применимости МЯ-теста для изучения мутагенеза у людей, подвергшихся действию мутagens в производственных условиях или химиотерапии [3]. Нам известна только одна рабо-