

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издаётся с 1946 года
Այստան քեսաբանական անձե.

Խմբագրական կազմի անդամներ՝ Մ. Մ. Ավագյան, Վ. Ն. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադյան, Հ. Գ. Բատիկյան, Ա. Ե. Գալստյան (գլխ. խմբագրի տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Կ. Ս. Մարտիրոսյան (պատ. քարտուղար), Ս. Գ. Մովսիսյան, Ս. Հ. Մովսիսյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Ե. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Դ. Ն. Բաբայան, Ս. Ա. Բակունց, Գ. Ս. Դավթյան, Ա. Լ. Թախտաջյան, Պ. Ա. Խորշուդյան, Ս. Կ. Կարապետյան, Ն. Հ. Հասրաբյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղազարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չալախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Ն. Տեր-Մինասյան:

ԽՄԲԱԳՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՑԵՆ՝

Երևան—19, Բարեկամության, 24դ, հեռ. 58-01-97

Редакционная коллегия: Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Акопян, Э. К. Африкян (главный редактор), О. Г. Баклаваджян, Г. Г. Батикян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), В. О. Казарян, К. С. Марджанян (ответ. секретарь), С. Г. Мовсисян, С. О. Мовсисян.

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. Н. Акрамовский, Э. А. Асратян, Э. К. Африкян (пред. совета), Д. Н. Бабалян, С. А. Бакунц, Г. С. Давтян, Л. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, С. А. Погосян, А. Л. Тахтаджян, М. Е. Тер-Минасян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

© Издательство АН Армянской ССР, 1978 г.

АДРЕС РЕДАКЦИИ: 375019, Ереван-19, Барекамутия 24г, тел. 58-01-97.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФОСФОЛИПИДОВ МОЗГА КРЫС ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

М. И. АГАДЖАНОВ, Л. Н. ЕРИЦЯН, А. И. ЧЕРКАСОВ, В. Г. МХИТАРЯН

Изучалось влияние ожога на жирнокислотный состав фосфолипидов, выделенных из мозга крыс в различные сроки после травмы. Показано, что после ожога содержание арахидоновой кислоты снижается. Введение витамина Е по 1 мг/кг внутривентрально в целом нормализует содержание жирных кислот в фосфолипидах, в том числе и арахидоновой.

Ожоговая болезнь, являясь заболеванием со сложным патогенезом, сопровождается нарушениями функций различных органов и систем, в том числе и головного мозга. Известно, что в патогенезе ее определенной роль играют липидные перекиси [1], которые, являясь агрессивными соединениями, в значительной степени способствуют развитию характерной клинической картины. Усиление липидной перекисидации после ожоговой травмы приводит к снижению содержания таких важных субстратов, как α -токоферол [2] и фосфолипиды [3, 4]. На искусственных бислойных фосфолипидных мембранах было показано значительное повышение их проницаемости при ожоговой травме [5]. Известно, что в структуре клеточных мембран важная роль принадлежит фосфолипидам, в частности их жирнокислотному составу [6, 7]. Наличие полиеновых жирных кислот в фосфолипидах мембран придает последним наибольшую устойчивость [8, 9]. Согласно гипотезе Диплока и Луци [10], стабилизация клеточных мембран осуществляется за счет специфического физико-химического взаимодействия между остатками полиеновых жирных кислот фосфолипидов, главным образом производных арахидоновой кислоты, и фитильной боковой цепью витамина Е. В то же время ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов, в частности полиненасыщенные жирные кислоты (главным образом арахидоновая кислота), являются основными субстратами перекисного окисления липидов [11].

Таким образом, качественный состав жирных кислот фосфолипидов играет важную роль в проницаемости мембран и оказывает влияние на их стабильность. В связи с этим было интересно изучить изменения в жирнокислотном составе фосфолипидов мозга при ожоговой болезни, а также влияние экзогенного α -токоферола на этот процесс.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самках весом 120—160 г. Ожоги III—III⁶ степени 12—15% поверхности тела вызывали погружением задних

лапок животного в воду, имеющую температуру 80°, на 10 сек. Части животных интубирующе вводили витамин Е (α -токоферилацетат, который в организме гидролизуется до α -токоферола [12]) в дозе 1 мг/кг веса сразу после ожога, а затем через 3, 7, 12 дней.

Исследования проводили через 1 час, 1, 3, 7 и 15 дней после ожога. Липиды экстрагировали из мозга, не изменяя их структуры при разрушении липопротеидных комплексов и гликолипидных связей [13, 14].

Выделенные липиды фракционировали методом тонкослойной хроматографии. Фосфолипидную фракцию подвергали щелочному гидролизу, жирные кислоты метилировали и выделенные метиловые эфиры подвергали дополнительной очистке в смеси диэтиловый эфир—петролейный эфир (1:9). Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе «Цвет-5» с капиллярной колонкой диаметром 0,35 мм длиной 40; неподвижная фаза—полипропиленгликольдипалмитат, газ-носитель—водород, температура колонки—202°, температура испарителя—275°, детектор ионизационный. Время анализа 150—170 мин. Для интерпретации хроматограмм использовали метод Андреева и др. [16]. Содержание каждой жирной кислоты рассчитывали в процентах к сумме всех кислот, принятой за 100%.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что в фосфолипидах мозга интактных крыс имеются 24 жирные кислоты, причем на долю $C_{16:0}$ (пальмитиновая) приходится 13,86, $C_{18:0}$ (стеариновая)—18,74, $C_{24:0}$ (лигноцериновая)—18,85, $C_{18:1}$ (олеиновая)—18,84, $C_{20:4}$ (арахидоновая)—14,57 и $C_{22:6}$ (докозагексаеновая)—1,39%, т. е. названные 6 кислот составляют 86% общего количества всех кислот фосфолипидов мозга.

Ожоговая травма приводит к определенному изменению в соотношении отдельных жирных кислот (табл. 1). Интересно, что при этом

Таблица 1

Изменения в содержании жирных кислот в фосфолипидах мозга крыс
после ожоговой травмы, %

Кислота	Контроль	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
$C_{16:0}$	13,86 $\pm$ 0,87	14,83 $\pm$ 1,0	17,23 $\pm$ 1,74	13,98 $\pm$ 0,74	22,58 $\pm$ 1,2	13,28 $\pm$ 1,5
$C_{18:0}$	18,74 $\pm$ 0,51	16,71 $\pm$ 1,06	15,29 $\pm$ 0,79	20,0 $\pm$ 0,75	21,72 $\pm$ 1,0	29,99 $\pm$ 3,2
$C_{18:1}$	18,84 $\pm$ 0,43	21,69 $\pm$ 0,3	22,09 $\pm$ 2,48	20,45 $\pm$ 0,63	24,41 $\pm$ 1,25	11,96 $\pm$ 2,6
$C_{20:4}$	14,57 $\pm$ 0,12	16,31 $\pm$ 1,0	14,02 $\pm$ 1,5	13,68 $\pm$ 0,74	10,0 $\pm$ 0,8	19,85 $\pm$ 2,07
$C_{22:6}$	1,39 $\pm$ 0,11	0,7 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,09	1,42 $\pm$ 0,23	0,62 $\pm$ 0,14
$C_{24:0}$	18,85 $\pm$ 0,48	11,79 $\pm$ 1,02	13,29 $\pm$ 0,8	17,25 $\pm$ 1,6	7,73 $\pm$ 0,75	14,06 $\pm$ 2,4

содержание $C_{24:0}$ снижается во все исследуемые сроки соответственно на 39, 28, 6, 60 и 23%. Что касается $C_{20:4}$, то количество ее через 1 час после ожога увеличивается на 12%, через 1 и 3 дня несколько снижается, через 7 дней уменьшается на 30% и к 15-му дню вновь возрастает на 35%. Содержание $C_{22:6}$ при этом уменьшается через 1 час, 1 и 3 дня после ожога соответственно на 50, 51 и 58%, через 7 дней нормализуется и к 15-му дню вновь уменьшается на 56%. Определенные изменения происходят в содержании остальных кислот.

Введение витамина Е по указанной схеме способствует нормализации содержания $C_{20:4}$ и $C_{24:0}$, однако уровень $C_{22:6}$ остается низким (табл. 2).

Таблица 2

Влияние α -токоферола (1 мг/кг) на содержание жирных кислот в фосфолипидах мозга крыс после ожоговой травмы, %

Кислота	Контроль	Через 1 час	Через 1 день	Через 3 дня	Через 7 дней	Через 15 дней
C _{16:0}	13,88±0,8	16,62±2,0	18,38±2,2	12,11±1,3	14,70±1,2	14,80±0,7
C _{18:0}	18,74±0,51	21,76±0,5	18,24±0,3	19,40±0,7	17,93±0,4	17,92±0,1
C _{18:1}	18,84±0,43	21,89±0,4	20,21±1,0	19,04±1,01	20,41±0,4	19,70±0,5
C _{20:4}	14,57±0,12	14,05±1,6	13,50±0,86	15,38±0,64	12,8 ±0,34	13,93±0,7
C _{22:6}	1,39±0,11	1,44±0,2	0,83±0,13	0,43±0,05	0,73±0,05	0,53±0,1
C _{24:0}	18,45±0,48	11,82±1,05	15,22±1,2	19,10±0,5	20,92±0,9	19,99±0,8

Таким образом, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран, хотя и обеспечивает высокую устойчивость их, однако создает предпосылки для усиления процесса перекисного окисления липидов. Последние окисляют полиеновые жирные кислоты, вследствие чего количество их в фосфолипидах уменьшается. Эти изменения сопровождаются уменьшением содержания эндогенного α -токоферола в мозге [2]. При этом проницаемость клеточных мембран повышается, что было показано на бислойных фосфолипидных мембранах, сформированных из фосфолипидов, выделенных из органов обожженных животных. Эти изменения соответствуют исключительно высокому уровню липидной перекиссации, отмеченному при этом в различных органах животных.

Интересно, что содержание арахидоновой кислоты через 15 дней после ожоговой травмы вслед за уменьшением вновь повышается. Такое изменение в содержании C_{20:4} вследствие усиления ее синтеза, на фоне уменьшения количества других полиеновых жирных кислот (C_{22:6}), является компенсаторной реакцией [16, 17], направленной на поддержание высокого уровня этой кислоты для обеспечения биосинтеза простагландинов.

Нормализующее действие витамина Е, вводимого с лечебной целью, объясняется подавлением липидной перекиссации [1], предотвращением окисления полиеновых жирных кислот [18], в частности арахидоновой кислоты. Витамин Е, очевидно, включается в специфическое взаимодействие с ненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов [19], что и приводит к нормализации проницаемости мембран и других изученных показателей.

Авторы выражают благодарность Е. К. Алимовой и А. Т. Аствацатуряну за внимание и содействие в выполнении данной работы.

**ՎԻՏԱՄԻՆ Ե-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆՏՆՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ
ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԶԱՐԴԱԹՔՎԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ ԱՅՐՎԱԾՔԱՅԻՆ
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ**

Մ. Ի. ԱԳԱԶՅԱՆՈՎ, Լ. Ն. ԵՐԻՑՅԱՆ, Ա. Ի. ԶԵՐԿԱՍՈՎ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է առնետների մոտ այրվածքից հետո տարբեր ժամկետներում ուղեղից անշատված ֆոսֆոլիպիդների ճարպաթթվային կազմը և ցույց է տրվել, որ այրվածքից հետո ֆոսֆոլիպիդներում իջնում է արախիդոնաթթվի քանակը:

Վիտամին Ե-ի ներդրովայնային ներարկման դեպքում (1 մգ/կգ քաշին) կարգավորվում է ֆոսֆոլիպիդներում ճարպաթթուների, այդ թվում նաև արախիդոնաթթվի քանակը:

THE EFFECT OF VITAMIN E ON FATTY ACID CONTENTS OF CEREBRAL PHOSPHOLIPIDS IN RATS DURING BURNS

M. I. AGADJANOV, L. N. YERITSIAN, A. I. CHERKASSOV,
V. G. MKHITARIAN

The effect of burns on fatty acid contents of phospholipids isolated from the brain of rats has been studied after different periods of trauma. It is shown that the contents of arachidonic acid is decreased after burns. Vitamin E, administered 1 mg/kg intraabdominally normalizes on the whole the contents of fatty acids in phospholipids including arachidonic acid.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Журн. exper. и клинич. мед., 15, 1, 1975.
2. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биологический журнал Армении, 31, 2, 1978.
3. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. Г., Карагезян К. Г. Укр. биохим. журн., 50, 5, 1978.
4. Бакирова В. А. Вопросы биохимии ожоговой травмы. Челябинск, 1973.
5. Агаджанов М. И., Баджиян С. А., Карагезян К. Г., Мхитарян В. Г. Мат-лы I Всесоюзн. симп. «Мембранная энзимология и проницаемость мембран», Ереван, 1977.
6. Korn E. D. Science, 153, 216, 1966.
7. Robertson J. D. The Membrane of the living cell. San Francisco, 1962.
8. Алимова Е. К., Аствацатурьян А. Т., Жаров Л. В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. М., 1975.
9. Collins F., Pury G., Habulcer M. Lipids, 7, 144, 1971.
10. Diplock A. T., Lucy J. A. FEBS Letters, 29, 205, 1973.
11. Лапкин В. З., Гуревич С. М., Бурлакова Е. Б. Биоантиокислители. М., 1975.
12. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. Биоантиокислители в лучевом поражении и злокачественном росте, М., 1975.
13. Enterman C. J. Amer. Oil Chem. Soc., 38, 10, 534, 1961.

14. *Folch C. B., Lees M., Sloane Stanley G. H.* J. Biol. Chem. 226, 1, 497, 1957.
15. *Андреев А. В., Афанасьев М. И., Чаброва О. Г., Вигдергауз М. С.* Успехи химии, 34, 5, 1965.
16. *Witting J., Horwitt M.* Lipids, 2, 89, 1967.
17. *Witting J., Theron J., Horwitt M.* Lipids, 2, 97, 1967.
18. *Green J.* Ann. N. Y. Acad. Sci, 203, 29, 1972.
19. *Lucy J. A.* Ann. N. Y. Acad. Sci, 203, 4, 1972.

СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В СИНАПТОСОМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ ЦНС

Г. С. ХАЧАТРЯН, Л. А. СТЕПАНЯН

Исследовались сдвиги в содержании норадреналина и адреналина в синаптосомах головного мозга крыс при естественных физиологических воздействиях. При пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении отмечается увеличение их количества. Условнорефлекторное пищевое торможение вызывает уменьшение содержания норадреналина, количество адреналина в синаптосомах при этом не меняется.

В нейрогуморальной регуляции физиологических функций организма особое место занимают катехоламины, серотонин и другие физиологически активные вещества. Катехоламины являются важнейшими трансммиттерами в адренергической рецепции и регуляторами приспособительных реакций организма. Они создают возможность для быстрого адекватного перехода организма из состояния покоя в состояние возбуждения или торможения, что вытекает из их свойства нервной регуляции, а также быстро и интенсивно ускорять обменные процессы. Обмен катехоламинов связан с функциональным состоянием нервной системы. Существует определенная связь между содержанием их в головном мозге и поведением животных. В настоящее время есть много данных о влиянии биогенных аминов на условнорефлекторную деятельность, об их участии в процессах воспроизведения и сохранения памятного следа [1—8]. Катехоламины влияют на соотношение процессов возбуждения и торможения в коре и подкорковых центрах головного мозга. Многочисленны исследования, свидетельствующие о медиаторной роли норадреналина в ЦНС. Как эндогенный, так и меченый норадреналин при центрифугировании в градиенте плотности сахаразы сконцентрирован во фракции нервных окончаний [9—10]. За последние годы в литературе появились некоторые данные, говорящие о наличии адреналина в ЦНС и его медиаторной роли [11—13]. Вопрос о трансммиттерной роли адреналина и поныне остается дискуссионным, требующим глубокой научной разработки.

Несмотря на наличие ряда исследований в области биохимии катехоламинов и серотонина, раскрытия механизмов их участия в специфической рецепции, роль этих соединений в химической передаче нервных импульсов до конца не выяснена. Много неясного и противоречивого также относительно роли катехоламинов в процессах обучения, восприятия, памяти и других реакций поведения животных [14, 15].

В наших прежних исследованиях были выявлены значительные сдвиги в содержании норадреналина и адреналина и активности моноаминоксидазы в целом мозге и его различных отделах в условиях естественных физиологических воздействий [11, 12].

Для выяснения причин мобилизации, связывания и обмена транссмиттеров адренергической природы в субклеточных частицах мозга при различных функциональных состояниях ЦНС ставилась задача изучить содержание норадреналина и адреналина в синапсосомах головного мозга при естественных физиологических воздействиях.

Материал и методика. Исследования были проведены на белых крысах-самцах весом 150—180 г в четырех сериях экспериментов. Различные функциональные состояния мозга вызывали методом условных рефлексов. Для фиксации и регистрации биохимических сдвигов в мозге при том или ином функциональном состоянии применяли метод замораживания подопытного животного в жидком азоте в требуемый момент функциональной активности мозга в условнорефлекторной камере УРК-66 [16]. Первая серия служила в качестве контроля. У крыс второй серии вырабатывали пищевое возбуждение, безусловным раздражителем служило кормление их сахарозой, из расчета 0,4—0,5 г на 100 г веса животного. В третьей серии вырабатывали условный рефлекс по оставленному способу. В четвертой вырабатывали внутреннее торможение методом угашения.

Синапсосомы были выделены по методу Маршбанка [17]. После осаждения ядер при 1000 g надосадочную жидкость центрифугировали на центрифуге Spinco L 2 65 K при 18000 g. В осадок выпадали «грубые митохондрии», которые гомогенизировали в 0,7 М растворе сахарозы и центрифугировали в течение 2-х час при 60000 g. Осажденные митохондрии гомогенизировали в 1,2 М растворе сахарозы и центрифугировали 2 часа при 60000 g. В осадок выпадали чистые митохондрии. Надосадочную жидкость разводили в 3,75 раза и центрифугировали 30 мин при 30000 g, в растворе получали миелиновые фрагменты, в осадок выпадали синапсосомы. Осадок гомогенизировали в 10 мл бидистиллированной воды, прибавляли 0,52 мл 57% HClO_4 , 1 мл 0,2 М ЭДТА и оставляли на холоду. В дальнейшем катехоламины определяли по методике Крута [18]. Адсорбцию проводили в суспензии окиси алюминия. Адсорбированные на окиси алюминия катехоламины количественно переносили на хроматографическую колонку (12×100 мм), элюировали 0,2 N уксусной кислотой. В качестве окислителя применяли феррицианид калия. Для определения содержания норадреналина реакцию проводили при pH 6,2, адреналина—при pH 4,2. Параллельно ставили также реакцию со стандартами норадреналина и адреналина (l-arterenol bitartrat, l-epi-ephedrine bitartrat) марки Sigma. Флуорометрическое определение катехоламинов проводили на спектрофотометре, сконструированном Г. С. Хачатряном и др. [11]. Количество норадреналина и адреналина выражали в мкг на 1 г свежей мозговой ткани.

Результаты и обсуждение. Данные о сдвигах в содержании норадреналина приведены в табл. 1, согласно которой этот показатель в синапсосомах мозга составляет $0,092 \pm 0,0003$ мкг/г ткани. Полученные результаты в основном согласуются с литературными данными [19].

Функциональные состояния вызывали значительные изменения в этом показателе. Как видно из данных той же таблицы, содержание норадреналина при пищевом возбуждении повышается, составляя $0,117 \pm 0,006$ мкг/г. Такое же повышение отмечается при условнорефлекторном возбуждении ($0,117 \pm 0,01$ мкг/г против $0,092 \pm 0,0003$ мкг/г в контроле). По сравнению с данными контрольных опытов содержание норад-

Таблица 1

Содержание норадреналина в синапсах головного мозга при различных функциональных состояниях, мкг/г

	Контроль	Пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое торможение
M±	0,092±0,0003	0,117±0,006	0,117±0,01	0,065±0,003
n	8	6	9	6
b		±0,014	±0,03	±0,022
p		<0,01	<0,05	<0,05

реналина в синапсах при возбуждении повышается на 30%. Аналогичное повышение при указанном состоянии отмечалось нами также в целом мозге, в лобной и теменной с височной долях коры головного мозга [11].

Таким образом, мы пришли к заключению, что возбуждательный процесс, выработанный на базе естественных физиологических воздействий, сопровождается повышением содержания норадреналина как в целом мозге, его различных отделах, так и в синаптическом аппарате.

Условнорефлекторное торможение вызывает понижение содержания норадреналина в синапсах мозга, а также в целом мозге.

Большой интерес представляют результаты исследований, касающиеся сдвигов в содержании адреналина в синапсах мозга при различных функциональных состояниях (табл. 2).

Таблица 2

Содержание адреналина в синапсах головного мозга при различных функциональных состояниях, мкг/г

	Контроль	Пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое торможение
M±	0,024±0,003	0,03±0,001	0,034±0,001	0,029±0,002
n	12	7	7	7
b		±0,001	±0,001	±0,007
p		<0,001	<0,001	>0,05

Результаты наших предыдущих исследований показали, что в целом мозге при пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении содержание адреналина значительно, в 3—4 раза, повышается. Такое же изменение количества адреналина отмечается в синапсах головного мозга, однако в последних оно, хотя и достоверное, но не столь значительное. При внутреннем торможении заметных сдвигов в содержании адреналина в синапсах не отмечалось, хотя в целом мозге имело место недостоверное повышение его. Такое значительное различие в количестве адреналина в синапсах, в особенности при

торможении, при котором оно особым изменениям не подвергается, косвенно указывает на менее важную роль его, по сравнению с норадреналином, в адренергической рецепции мозга при торможении.

Таким образом, обобщая результаты исследований, можно отметить, что в синапсосамах, как и в целом мозге, возбуждение вызывает повышение содержания норадреналина и адреналина, а торможение — только снижение количества норадреналина.

Результаты наших исследований представляют определенный интерес, особенно данные о сдвигах в содержании адреналина в синапсосамах, так как в доступной нам литературе мы не встретили сведений о наличии и количестве его в синапсосамах. Это тем более важно, что присутствие адреналина в головном мозге некоторыми исследователями оспаривается [20], хотя в последнее время в головном мозге была обнаружена фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза, ответственная за синтез адреналина из норадреналина как *in vitro*, так и *in vivo*. Имеются также работы относительно распределения адреналина в головном мозге [21, 22].

Повышение содержания адреналина в синапсосамах мозга, выявленное при пищевом и условнорефлекторном возбуждении, может иметь значение для выяснения как метаболической, так и медиаторной роли его в ЦНС. Полученные данные могут в какой-то мере служить подтверждением выдвинутой нами гипотезы относительно медиаторной роли адреналина в головном мозге [11, 12].

Нужно отметить, что, хотя в настоящее время имеется много биохимических и фармакологических исследований, посвященных участию норадренергических структур в выработке условнорефлекторных реакций, влиянию катехоламинов на поведение, однако часто приводятся противоречивые и спорные результаты [23].

Введение ингибиторов дофамин- β -гидроксилазы у мышей и крыс приводит к уменьшению норадреналина и ухудшению памяти, к замедлению приобретения условнорефлекторной реакции избегания, причем ее сохранение зависит от соотношения уровней биогенных аминов, находящихся в разных путях метаболизма, от скорости их обмена [24, 25]. Противоположный эффект оказывает введение в мозг норадреналина [26]. Есть много работ о связи норадренергической системы мозга с процессами самостимуляции, для поддержания которой необходим норадреналин [27]. Фармакологически обусловленные сдвиги в обмене катехоламинов оказывают влияние на эмоциональное, условно-оборонительное поведение, на процессы формирования и воспроизведения следов памяти. Истощение резервов норадреналина в мозге крыс сопровождается снижением синтеза ядерной РНК, а накопление церебрального норадреналина ускоряет этот процесс [28]. У крыс, обученных рефлексу, тестирование после предварительного введения ингибитора синтеза норадреналина вызывает достоверное уменьшение его содержания в норадренергических терминалях [29].

Нужно отметить, что во всех упомянутых работах сдвиги в содер-

жании норадреналина, которые приводили к нарушению условнорефлекторной деятельности, вызывались введением тех или иных препаратов. Полученные нами результаты интересны и важны в том отношении, что касаются обмена катехоламинов при воздействии адекватных раздражителей, максимально приближенных к естественным. Результаты нашей работы указывают на то, что в воспроизведении условнорефлекторных реакций участвуют также норадренергические терминали головного мозга. В связи с полученными данными возникает вопрос о биохимических механизмах, вызывающих подобные сдвиги. Для ответа на этот вопрос нужно исследовать изменения активности ферментов, ответственных за синтез и распад катехоламинов, а также процессы высвобождения и обратного связывания в условиях естественных физиологических воздействий, что явится задачей наших дальнейших исследований.

Ереванский государственный
медицинский институт

Поступило 18.II 1976 г.

ԿԱՏԵՆՈԼԱՄԻՆՆԵՐԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼԽՈՒՂԵՂԻ ՍԻՆԱՊՏՆԵՐՈՒՄ ԿՆՀ ՏԱՐՔԵՐ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԻՃԱԿՆԵՐՈՒՄ

Գ. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Լ. Հ. ՄՏԵՓԱՆՅԱՆ

Բնական, ֆիզիոլոգիական զրգռիչների ազդեցության պայմաններում սպիտակ առնետների գլխուղեղի սինապտոսոմներում ուսումնասիրվել են նորադրենալինի և ադրենալինի քանակական տեղաշարժերը:

Հետազոտվող նյութերի անջատման և որոշման համար կիրառվել է սյունային քրոմատոգրաֆիա և սպեկտրոֆոտոֆլուորոմետրիա: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ սննդային և պայմանական սննդային դրդման ժամանակ սինապտոսոմներում ավելանում է նորադրենալինի և ադրենալինի քանակը: Պայմանական սննդային արգելակման ժամանակ սինապտոսոմներում պակասում է նորադրենալինի պարունակությունը, իսկ ադրենալինի քանակը չի փոխվում:

THE CONTENTS OF CATECHOLAMINS IN THE BRAIN SINAPTOSOMES AT DIFFERENT FUNCTIONAL STATES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

G. S. KHACHATRIAN, L. H. STEPANIAN

Changes in noradrenaline and adrenaline contents in the rat brain sinaptosomes have been studied at the natural physiological effects. The increase of noradrenaline and adrenaline contents has been noted during the alimentary and conditioned alimentary stimulation. The conditioned alimentary inhibition causes the decrease in the noradrenaline level. The adrenaline contents in sinaptosomes remains unchanged at this state.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бару А. М., Божко Г. Х. Бюлл. exper. биологии и медицины, 70, 9, 45, 1970.
2. Бородин Ю. С., Крауз В. А. Сб. Память и следовые процессы. Пушкино-на-Оке, 103, 1971.
3. Громова Е. А. Физиологические механизмы памяти. Пушкино-на-Оке, 35, 1973.
4. Комиссаров И. В., Талалаенко А. Н. Бюл. exper. биологии и медицины, 80, 3, 1975.
5. Buccì L., Bovet D. Psychopharmacologia, 35, 179, 1974.
6. Crow T. Y. In: Frontiers in Catecholamine Research, 723, 1973.
7. Fulgnitti S., Orsingher O. Arch. Int. Pharmacodyn. et ther., 190, 291, 1971.
8. Kitsikis A., Roberge A. G., Frenete G. Exptl. Brain Res., 15, 305, 1975.
9. Potter L. T., Axelrod J. J. Pharmacol., 142, 299, 1963.
10. Whittaker V. P. Biophysics and Molecular Biology, 15, Pergamon Press, Oxford, 39, 1965.
11. Степанян Л. А. Канд. дисс., Ереван, 1972.
12. Хачатрян Г. С., Степанян Л. А., Аветисян Н. Г. Вопросы биохимии мозга, 8, 221, Ереван, 1973.
13. Montagu K. J. Biochem., 86, 9, 1963.
14. Dahlström A., Häggendall J. Biochem. Psychopharmacology, 2, 65, 1970.
15. Iversen L. Nature (Engl.), 214, 8, 1967.
16. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга при нормальных физиологических условиях. Гексозомонофосфатный шунт в мозгу. Ереван, 1967.
17. Marchbanks R. J. Neurochem., 13, 1481, 1966.
18. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.
19. Lagercrantz H., Pertoft H. J. Neurochem., 19, 3, 811, 1972.
20. Shore P. A., Olin J. S. J. Pharmacol. and Exptl Therap., 122, 295, 1958.
21. Connet R. J., Kirshner N. J. Biol. Сnem., 245, 329, 1970.
22. Gugten J., Palkovits M., Wijnen H. L. J. M., Verstug D. H. G. Brain Res., 107, 171, 1976.
23. Salama A. I., Coldberg M. E. Life Sci., 12, 521, 1973.
24. Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга. М., 1976.
25. Butcher L. L., Engel J., Fuxe K. Brain Res., 41, 387, 1972.
26. Corrodi H., Fuxe K., Lindbrin K., Olson L. Brain Res., 2, 91, 1971.
27. Franklin K. B., Herberg L. J. Brain Res., 97, 127, 1975.
28. Бару А. М., Крауса В. С. Бюлл. exper. биологии и медицины, 80, 1975.
29. Князев Г. Г., Никифорова А. М. Физиол. журн. СССР, 62, 169, 1976.

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА КОНФОРМАЦИЮ И
КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Л. В. КАРАБАШЯН, Н. Г. ЭКИЗЯН, С. Г. МОВСЕСЯН

Изучено влияние мочевины на конформационные состояния и каталитическую активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Методом кругового дихроизма показано, что взаимодействие фермента с коферментами и субстратами практически не отражается на устойчивости ГДГ в отношении денатурирующего действия мочевины. Инактивация фермента под влиянием мочевины происходит в 2 стадии: первая является обратимой и не сопровождается изменением вторичной структуры ГДГ, вторая представляет собою необратимый процесс и является следствием денатурации ГДГ. Исследование некоторых физико-химических и каталитических характеристик фермента в присутствии мочевины показало, что обратимая инактивация ГДГ происходит в результате влияния мочевины на каталитический центр фермента.

Согласно представлениям Тенфорда [1], денатурация белков под действием мочевины может быть представлена как динамическое равновесие между нативной (N) и денатурированными (Д) формами фермента, не обладающими каталитической активностью. Однако потеря ферментом каталитической активности может предшествовать критическому конформационному переходу N—Д, вызванному действием денатурирующего агента, как это наблюдалось на ряде ферментов под влиянием нейтральных солей [2]. Такого рода эффекты могут быть обусловлены тем, что область активного центра фермента не вовлекается в систему кооперативных связей, поддерживающих упорядоченную конформацию белковой глобулы в целом. В этом случае структура активного центра фермента может принимать участие в флуктуациях локального характера, которые отражаются на функциях фермента, но не затрагивают конформацию макромолекулы в целом.

Настоящая работа посвящена изучению влияния мочевины на конформационные состояния и каталитические свойства ГДГ с целью выяснения некоторых сторон механизма инактивации этого фермента.

ГДГ катализирует обратимую реакцию окислительного дезаминирования глутамата с образованием α -кетоглутарата и аммиака. Минимальная по молекулярному весу каталитически активная единица фермента представляет собою олигомер, состоящий из шести идентичных протомеров с молекулярным весом 56000 [3]. В зависимости от условий среды (температура, ионная сила, концентрация) олиго-

меры ГДГ способны ассоциировать в линейные полимеры с молекулярным весом до 2×10^6 [4]. При этом наблюдается прямая корреляция между молекулярным весом ассоциата, его удельной активностью и специфичностью [4, 5]. Для исключения влияния ассоциации гексомеров ГДГ на исследуемые свойства эксперименты проводили на уровне олигомеров. В соответствии с поставленной целью концентрация ГДГ не превышала 5×10^{-7} М, при которой равновесие между ассоциированной формой олигомеров и индивидуальными олигомерами резко сдвинуто в сторону последнего [4].

Материал и методика. Использовали кристаллический препарат ГДГ фирмы «Fluka» (Швейцария), суспензированный в насыщенном растворе сульфата аммония, который перед употреблением центрифугировали и очищали от низкомолекулярных соединений на колонке 1×20 см сефадекса G-25. Дифосфопиридиннуклеотид в окисленной и восстановленной формах (НАД и НАДН), α -кетоглутарат (α -КГ), глутамат, хлористый аммоний и мочевины производства «Sigma» (США) применяли без дополнительной очистки.

Концентрацию реагентов определяли спектрофотометрически, используя следующие молярные коэффициенты экстинкции при нейтральных значениях pH: $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 52000$ [6]; $\epsilon_{340 \text{ нм}} = 6200$ и $\epsilon_{260 \text{ нм}} = 17400$ [7] для протомеров ГДГ, НАДН и НАД соответственно, а концентрацию мочевины — с помощью рефрактометра ИРФ-22. Степень денатурации фермента под действием мочевины определяли по уменьшению амплитуды кругового дихроизма (КД) при 223 нм (в области поглощения пептидных связей в α -спиральной конформации). В качестве показателя степени денатурации использовали параметр $[\theta]_m / [\theta]_0$, где $[\theta]_0$ — эллиптичность ГДГ в буферном растворе, а $[\theta]_m$ — эллиптичность в растворе мочевины с молярной концентрацией М.

Спектры КД снимали на дихрографах «Russel-Jouan II» или «Jobin-Jvon III» при чувствительности 10^{-5} и 5×10^{-6} соответственно. Поглощение исследуемых образцов не превышало 1,5 о. е. В зависимости от концентрации длину оптического пути образцов варьировали от 0,5 см до 2 см. Разностные спектры поглощения снимали, используя прецизионную шкалу 0, — 0,1 или 0 — 0,5 о. е. спектрофотометра Cary — 118 с помощью тандемной схемы из кювет с длиной оптического пути 1,000 см.

Константу диссоциации комплексов ГДГ с НАД и НАДН определяли по следующему соотношению: $\Delta A = \Delta \epsilon \times \frac{K_d + [E] + [L] - \sqrt{(K_d + [E] + [L])^2 - 4[E][L]}}{2}$,

где ΔA — разностная оптическая плотность, K_d — константа диссоциации, $[E]$ и $[L]$ — тотальные концентрации фермента и лиганда соответственно и $\Delta \epsilon$ — молярный коэффициент разностной экстинкции. При определении K_d конечная концентрация фермента в смеси с лигандом, в отличие от остальных экспериментов, составляла 10^{-5} М.

Начальные скорости реакции восстановительного аминирования α -КГ и окислительного дезаминирования глутамата определяли по изменению экстинкции в максимуме поглощения НАДН (340 нм), используя шкалу 75—125% или 100—80% спектрофотометра «Specord» в течение 1—2 мин после начала реакции. Измерения активности проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см в объеме 2 мл. Концентрации реагентов в реакционной смеси составляли (мМ): ГДГ—0,07; НАДН—0,1; α -КГ—5; NH_4Cl —50, или НАД—0,5 и глутамата—2,5. В зависимости от поставленной цели реакцию инициировали добавлением фермента или субстрата. Все измерения были проведены в 0,1 М К-фосфатном буфере при pH 7,3.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 А приведены спектры КД ГДГ в 0,1 М К-фосфатном буфере и в буферных растворах, содержащих мочевины. Спектр КД фермента в буферном растворе характери-



зуется отрицательным дихроизмом с максимумом при 223 нм и эллиптичностью $[\theta]_{223} = 1,3 \times 10^4$ град. см² децимоль⁻¹. Согласно данным Уэльса [8], наблюдаемая эллиптичность обусловлена тем, что около 43% полипептидной цепи находится в α -спиральной конформации.

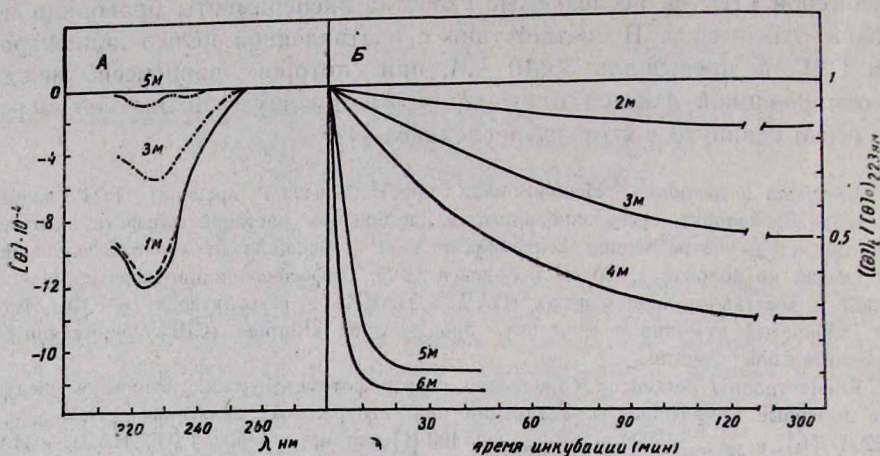


Рис. 1. А—спектры КД ГДГ в 0,1 М К-фосфатном буфере (—) и в буферных растворах, содержащих различные концентрации мочевины. Б—зависимость изменения амплитуды КД ГДГ от времени инкубации в растворах с различной концентрацией мочевины ($t=25^\circ$).

Из того же рисунка видно, что добавление в раствор ГДГ мочевины приводит к уменьшению величины $[\theta]_{223}$, что свидетельствует о денатурации нативной конформации фермента параллельно увеличению концентрации мочевины. Как было отмечено, реакция денатурации при любой концентрации мочевины может быть представлена в виде равновесия между нативной и денатурированной формами фермента ($N \rightleftharpoons D$), которое достигает стационарного состояния, как правило, в течение нескольких часов [1].

Время, необходимое для установления равновесия зависит от концентрации мочевины и варьирует от нескольких часов для растворов, содержащих не более 4 М мочевины, до 5—10 мин для растворов, содержащих 5 М мочевины и выше (рис. 1 Б).

С учетом этих данных методом КД была получена кривая изотермической денатурации ГДГ под влиянием мочевины (рис. 2). Из рисунка видно, что денатурация фермента носит кооперативный характер, происходит в интервале 2 М—4 М мочевины и характеризуется точкой полуденатурации $C_0=3,2$ М.

Исходя из упомянутой схемы равновесия между двумя состояниями ($N \rightleftharpoons D$), следовало ожидать, что то же действие мочевины проявится также и на каталитической активности фермента. Однако из приведенной на рис. 3б зависимости относительной активности ГДГ (в реакции восстановительного аминирования α -КГ) от концен-

трации мочевины видно, что в отличие от денатурации ГДГ инактивация происходит в интервале 0,5–3 М мочевины, а точка полунинактивации соответствует 2 М мочевины.

Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что устойчивость ГДГ к денатурационному действию мочевины может изменять-

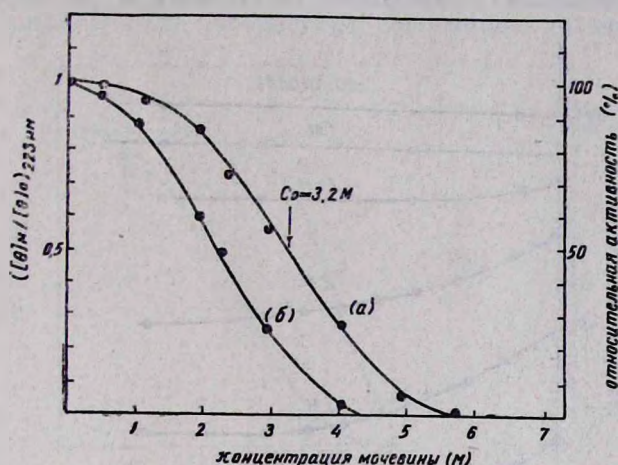


Рис. 2. Кривая изотермической денатурации ГДГ под действием мочевины (а). Относительное изменение начальной скорости восстановительного аминирования α -КГ в зависимости от концентрации мочевины (б).

ся при взаимодействии с коферментом и субстратами, присутствующими в реакционной смеси, как это наблюдалось в случае аспаратаминотрансферазы [9]. Однако из табл. 1, в которой приведены зна-

Таблица 1
Значения точек полуденатурации ГДГ в присутствии некоторых специфических лигандов
(концентрация ГДГ $1,3 \times 10^{-7}$ М)

ГДГ + лиганды	Концентрация лигандов в смеси, М	Точка полуденатурации — $C_{0.5}$, М мочевины
ГДГ	—	$3,2 \pm 0,1$
ГДГ + НАДН	10^{-3}	$3,2 \pm 0,3$
ГДГ + НАД	10^{-3}	$3,2 \pm 0,3$
ГДГ + α -КГ	10^{-3}	$3,2 \pm 0,2$
ГДГ + глутамат	10^{-3}	$3,2 \pm 0,3$
ГДГ + НАДН + глутамат	5×10^{-4}	$3,2 \pm 0,3$

чения точек полуденатурации $C_{0.5}$ для ГДГ в присутствии различных коферментов и субстратов, видно, что взаимодействие фермента с лигандами, присутствующими в реакционной смеси, практически не сказывается на его стабильности к денатурационному воздействию

мочевины. Сравнивая данные по денатурации и инаktivации ГДГ под влиянием мочевины, можно прийти к заключению, что инаktivация фермента предшествует (в шкале концентрации мочевины) его денатурации.

При концентрациях мочевины 2 М и выше потеря ферментом каталитической активности происходит в 2 стадии (рис. 3). Первая стадия

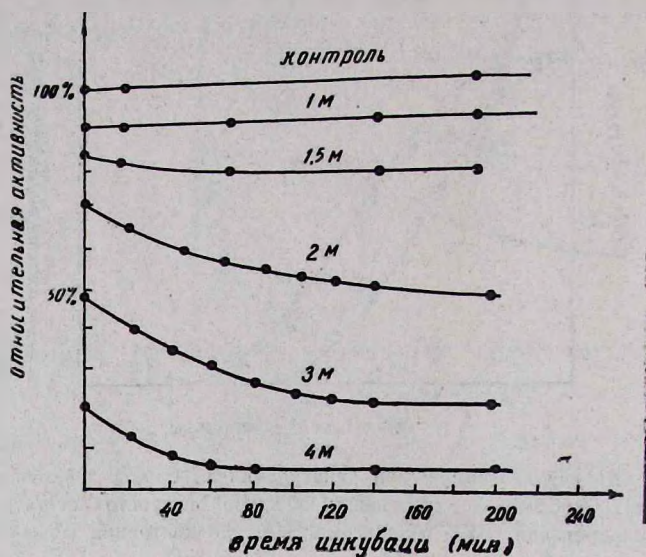


Рис. 3. Зависимость инаktivации ГДГ от времени инкубации фермента в растворах с различной концентрацией мочевины.

характеризуется высокой скоростью и заканчивается в течение времени, не подающемуся регистрации используемым методом, вторая — представляет собою медленный процесс, достигающий равновесия в интервале времени, совпадающем со временем установления $N \rightleftharpoons D$ (рис. 1Б) и, следовательно, представляет собою инаktivацию ГДГ в результате его денатурации. Этот вывод подтверждается тем фактом, что при концентрациях мочевины ниже 2 М, при которых денатурация ГДГ не имеет места, наблюдается только одна стадия инаktivации, характеризующаяся высокой скоростью. Следует также отметить, что удаление мочевины из растворов фермента методом диализа приводит к полному восстановлению ферментативной активности, если концентрация мочевины не превышает 2 М. Диализ растворов ГДГ в 3 М мочеvine приводит к восстановлению активности всего до 50% от активности нативного фермента. Иными словами, инаktivация ГДГ, наблюдаемая на 1-й стадии, представляет собой полностью обратимый процесс, в то время как на 2-й стадии она является необратимой. Это дополнительное свидетельство того, что вторая стадия инаktivации фермента является следствием его денатурации.

На рис. 4а приведена зависимость активности фермента от концентрации мочевины, отражающая только первую стадию инактивации, для получения которой ферментативную реакцию инициировали добавлением фермента в реакционную смесь, содержащую мочевины. В этих условиях фермент практически не инкубирован в растворах мочевины. На том же рисунке (рис. 4б) дана зависимость амплитуды КД ГДГ при 223 нм от концентрации мочевины, полученная в ана-

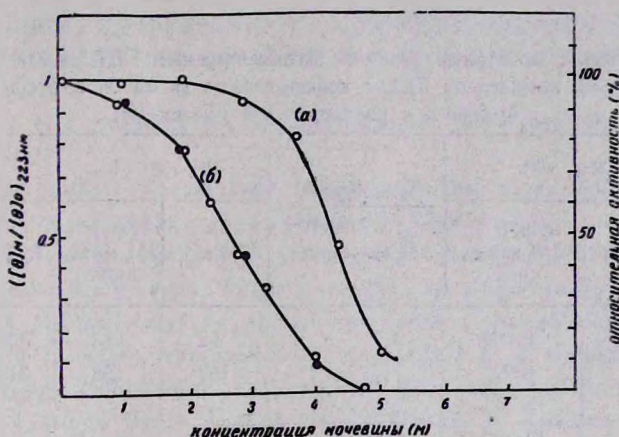


Рис. 4. а—кривая изотермической денатурации ГДГ, б—зависимость изменения начальной скорости реакции восстановительного аминирования α -КГ (O) и окислительного дезаминирования глутамата (●) от концентрации мочевины в условиях, исключающих денатурацию фермента в мочеvine.

логичных условиях, исключающих денатурацию фермента мочевиной. Из приведенных данных видно, что вплоть до 4 М концентрации мочевины ГДГ сохраняет вторичную структуру, несмотря на то, что ферментативная активность падает более чем на 90% от исходной. Следовательно, денатурация глобулы ГДГ не является необходимым условием для потери ферментом каталитической активности, хотя, как это видно из рис. 3, денатурация вносит определенный вклад в инактивацию образцов ГДГ, инкубированных в растворах мочевины в течение 3 час. и более. Из рис. 4 видно, что этот вклад не превышает 40% от общей инактивации в 3 М мочеvine и практически достигает нуля при повышении или понижении концентрации мочевины в реакционной смеси.

Следовательно, основная причина инактивации ГДГ мочевиной не связана с денатурационными эффектами и, по всей вероятности, вызвана локальными нарушениями конформации активного центра фермента. Одним из путей инактивирующего действия мочевины могут быть локальные нарушения, затрагивающие контактные участки фермента, которые обеспечивают специфическое связывание коферментов и субстратов. Другой возможной причиной ингибирования ГДГ мочевиной могут быть нарушения, затрагивающие каталитический центр

фермента. Для выяснения этих вопросов было изучено влияние мочевины на спектральные характеристики и константу диссоциации комплексов ГДГ с НАД и НАДН, а также исследована кинетика реакций восстановительного аминирования α -КГ и окислительного дезаминирования глутамата в присутствии 3 М мочевины.

В табл. 2 приведены величины кинетических констант (K_m и $k_{кат.}$) в реакциях, катализируемых ГДГ, а также значения констант

Таблица 2

Кинетические константы реакций, катализируемых ГДГ, и константы диссоциации комплексов ГДГ с коферментами (в 0,1 М К-фосфатном буфере и в растворах 3М мочевины)

Лиганд	K_m , мМ		$k_{кат.}$ буфер	$10^4 \cdot K_d$, М		$\Delta\epsilon$ (260nm—285nm) М ⁻¹ см ⁻¹	
	буфер	буфер + 3М моче- вина	$k_{кат.}$ (буфер + 3М моче- вина)	буфер	буфер + 3М моче- вина	буфер	буфер + 3М мо- чевина
НАДН	0,040	0,038	2,5	62	83	3200	2800
НАД	0,12	0,11	2,5	163	152	3100	3200
α -КГ	2,5	3	2,5	—	—	—	—
глутамат	9,5	10—11	2,5	—	—	—	—
NH_4^+	3	6—7	2,5—3	—	—	—	—

Значения K_m и $k_{кат.}$ определены по методу Лайнуивера и Берка [10].

диссоциации K и амплитуды разностных спектров поглощения ($\Delta\epsilon$) для комплексов ГДГ с коферментами. Из приведенных данных видно, что присутствие мочевины практически не влияет ни на величину K_d , ни на значение ($\Delta\epsilon$) для двойных комплексов ГДГ с НАД или НАДН (измерения амплитуды разностных спектров проводили в течение не более 10 мин после смешения фермента и мочевины, т. е. в условиях, когда денатурацией фермента под влиянием 3М мочевины можно пренебречь, рис. 1 Б). Кроме того, константа Михаелиса (K_m) ни для одного из лигандов не претерпевает существенных изменений в присутствии 3М мочевины. Исключение составляет величина K_m для иона NH_4^+ , которая изменяется примерно в 2 раза. Однако такое изменение этой величины не является достаточным для объяснения наблюдаемой инактивации ГДГ. Это утверждение основано на том факте, что инактивирующее действие мочевины на ГДГ в реакции восстановительного аминирования α -КГ совпадает с аналогичной зависимостью в реакции окислительного дезаминирования глутамата (рис. 4б).

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о том, что инактивация фермента под действием мочевины не является следствием изменения характера взаимодействия ГДГ с коферментом и с субстратами.

Вместе с тем, существенное влияние мочевины на величину $k_{кат.}$ (табл. 2) указывает на то, что ингибирование происходит в результате нарушений, происходящих в каталитическом аппарате ГДГ.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 1.III 1978 г.

ՄԻՋԱՆՅՈՒԹԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԼՅՈՒՏԱՄԱՏԻԵԶԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՏԻ ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻՈՆ ԵՎ ԿԱՏԱԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Լ. Վ. ԿԱՐԱՐԱՇՅԱՆ, Ն. Գ. ԷԲԻԶՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՏՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է միզանյութի ազդեցությունը գլյուտամատդեհիդրոգենազայի (ԳԴՀ) և սպեցիֆիկ լիզանզիների (կոֆերմենտների և սուբստրատների) հետ նրա կազմած կոմպլեքսների կատալիտիկ հատկությունների և կոնֆորմացիոն կայունության վրա: Ցույց է տրվել, որ միզանյութի ազդեցության ներքո ԳԴՀ-ի ինակտիվացումը ընթանում է երկու փուլով: Առաջին փուլում այն ընթանում է բարձր արագությամբ, դարձելի է և չի ուղեկցվում սպիտակուցի զլորուլայի կանոնավոր երկրորդային կառուցվածքի հալմամբ: Ինակտիվացիայի երկրորդ փուլը իրենից ներկայացնում է դանդաղ պրոցես, որը հետևանք է ֆերմենտի զլորուլայի դենատուրացման՝ միզանյութի ազդեցությամբ:

ԳԴՀ-ի կատալիտիկ և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ միզանյութի ներկայությամբ գործնականորեն չի փոփոխվում ֆերմենտի հետ կոֆերմենտների և սուբստրատների փոխազդեցության բնույթը: ԳԴՀ-ի ինակտիվացման առաջին փուլը տեղական խանգարումների հետևանք է, որոնք շոշափում են ֆերմենտի կատալիտիկ կենտրոնը:

ACTION OF UREA ON CONFORMATION AND ENZYMATIC ACTIVITY OF GLUTAMINASE DEHYDROGENASE

L. V. KARABASHIAN, N. G. EKIZIAN, S. G. MOVSESSIAN

The influence of urea on conformation and enzymatic activity of glutamate dehydrogenase (GDH) has been studied. By using the method of circular dichroism it has been shown that the interaction of enzyme with coenzymes and substrates does not influence the stability of GDH to denaturing action of urea. The inactivation of enzyme under the influence of urea is a two-stage process. The first stage is reversible and is not accompanied by changes of the regular structure of GDH. The second stage is irreversible and is a result of denaturation of GDH. The investigation of some physico-chemical and catalitical properties of enzyme in the presence of urea has shown that reversible inactivation of GDH is a result of urea action on the catalitical site of the enzyme.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Tenford Ch.* Adv. Prot. Chem. 23, 121 1968.
2. *Warren I. C., Cheatum S. G.* Biochemistry, 5, 1702, 1966.
3. *Moon K., Piszkielwicz, Smith E. L.* Proc. Natl Acad. Sci USA, 69, 1380, 1972.
4. *Gauper F. P., Mafkau K., Sund H.* Eur. J. Biochem., 49, 555, 1974.
5. *Dessen P., Pantaloni D.* Eur. J. Biochem. 39, 157, 1973.
6. *Egan R. R., Dalzel K.* BBA. 250, 4750, 1971.
7. *Beaucamp K., Bergmeyer U. H., Grabl M.* In Methoden der enzymatischen analyse (H. E. Bergmeyer, ed., 2nd. ed., Band I. Verlag Chemie. Weinheim), 1970.
8. *Wells B. D. J.* Mol. Biol. 97, 391, 1975.
9. *Ivanov V. I., Bocharov A. L., Volkenstein M. V., Karpetsky M. Ya., Mora S., Okina E. L., Yudina L. V.* Eur. J. Biochem. 40, 519, 1973.
10. *Lineweaver H., Birk D. I.* J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, 1934.

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМИНАЗЫ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, В. Г. АМБАРЦУМЯН

Изучение глутаминазы печени показало, что при pH 8,5 одновременное применение фосфата и активаторов фосфатнезависимой глутаминазы приводит к полному подавлению эффекта одного из них, а при pH 7,5, наоборот, происходит потенцирование их стимулирующего действия. Тироксин, являясь сильным активатором глутаминазы мозга, не действует на активность глутаминазы печени.

Деамидирование глутамина в печени, почках и мозге животных осуществляется под действием фосфатзависимого (ФЗГ) и фосфатнезависимого (ФНГ) изоэнзимов глутаминазы, которые активируются различными низкомолекулярными соединениями неорганической и органической природы [1—5].

В результате многолетних исследований выявлен ряд новых активаторов глутаминазы, ~~обладающих сильным стимулирующим эффектом [6—13]. Среди известных активаторов мозга наиболее эффективным является тироксин [6—8].~~

~~Проведенные нами исследования показали, что в митохондриальной фракции мозга кролика и крысы процесс регуляции активности глутаминазы носит сложный и поливалентный характер. Особое место в этом процессе занимает тироксин. При одновременном применении тироксина с фосфатом или эффекторами ФНГ происходит сильное потенцирование их стимулирующего действия [7]. То же наблюдается при сочетании фосфата с активаторами ФНГ, но значительно слабее [15—16]. Следует отметить, что этого не происходит в опытах с почечной глутаминазой [13, 14]. Печеночная глутаминаза в этом аспекте практически не изучена.~~

Исходя из вышесказанного, мы задались целью выяснить, активирует ли тироксин глутаминазу митохондриальной фракции печени, и изучить взаимоотношение эффекта различных активаторов этого фермента.

Материал и методика. В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию, полученную из печеночной ткани крыс. Печень сразу после удаления пленки и промывания холодным раствором сахарозы гомогенизировали в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 6 мин. После осаждения ядерной фракции (700 g в течение 6 мин) центрифуги-

рованием надосадочной жидкости при 16000 г в течение 25 мин выделяли митохондриальную фракцию. Полученную фракцию промывали холодной дистиллированной водой и центрифугировали при 80000 г в течение 15 мин. Затем из осадка готовили взвесь из расчета 200 мг ткани в 0,4 мл воды, которую после выдерживания при комнатной температуре в течение 1 часа использовали в качестве источника глутаминазы. Для опытов с pH 8,5 брали 0,4 мл взвеси, соответствующей 50 мг ткани, а для опытов с pH 7,5—соответствующей 200 мг ткани на пробу.

Инкубационная смесь содержала: 0,4 мл митохондриальной фракции, 0,5 мл 0,2М трис-HCl буфера pH 7,5 или 8,5, L-глутамин—20 мкмоль/мл, активаторы в различных концентрациях. Общий объем доводили водой до 1,5 мл. Смесь инкубировали 20 мин при 37° при постоянном встряхивании, после чего к каждой пробе добавляли по 0,3 мл 15%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом Зеллгосона в модификации Силаковой и сотр. [17].

Результаты и обсуждение. Известно, что ФЗГ в животных тканях активируется фосфатом, ацетил-КоА и ацил-производными жирных кислот—КоА, а ФНГ—малеатом, малонатом, продуктами цикла трикарбоновых кислот и ацетил-аминокислотами [4, 5, 9, 11].

Исходя из поставленной задачи, в первой серии опытов мы изучали действие тироксина, фосфата, активаторов ФНГ и различных их сочетаний на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени.

Таблица 1

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени в присутствии фосфата и цитрата, NH₃ мкмоль/г свежей ткани, pH 8,5

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	NaH ₂ PO ₄ , мкмоль/мл		Цитрат, мкмоль/мл
			2,5	5	10
			25±1,5 (16)	66±1,9 (16)	49±1,2 (16)
Цитрат	5	11±1,2 (18)*	29±2,8 (16)	56±2,5 (16)	—
Цитрат	10	49±1,2 (17)	56±3,3 (13)	69±3,0 (15)	—
Цитрат	20	56±2,5 (19)	—	77±5,1 (9)	—
L-аспартат	20	35±5,2 (20)	49±2,9 (9)	90±6,3 (9)	74±4,7 (9)
N-ацетил-L-аспартат	20	39±3,1 (15)	53±2,5 (8)	70±4,6 (8)	76±4,1 (9)
Сукцинат	20	34±4,2 (15)	45±2,6 (8)	78±5,8 (9)	70±3,2 (9)
L-тироксин	0,1	2,2±0,9 (9)	—	76±4,9 (6)	51±7,3 (6)
	0,2	3,8±1,2 (12)	—	87±8,8 (12)	55±7,1 (12)

* в скобках здесь и в остальных таблицах указано количество опытов.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что при pH 8,5 под действием испытанных нами эффекторов глутаминаза стимулируется в различной степени, наиболее эффективно—в присутствии фосфата. Ак-

тивирующее действие цитрата слабее, чем фосфата, но значительно сильнее, чем остальных эффекторов, а L-аспартат (АК), N-ацетил—L-аспартат (ААК) и сукцинат, добавленные по 20 мкмоль/мл, примерно в одинаковой степени усиливали деамидирование глутаминна.

Из полученных результатов заслуживает внимания тот факт, что тироксин даже при сравнительно высоких концентрациях практически не стимулирует активность глутаминназы (табл. 1).

Следует отметить, что стимулирующее действие вышеуказанных соединений на активность глутаминназы митохондриальной фракции мозга выражено сильнее, чем в печени, а тироксин, как уже отмечалось, не только является самым сильным активатором этого фермента, но и значительно усиливает стимулирующее действие других эффекторов. Примечательно, что сочетание совершенно неэффективных концентраций тироксина с фосфатом или другими активаторами тоже приводит к усилению их стимулирующего действия на активность глутаминназы мозга [7]. Однако исследования, проведенные с глутаминназой митохондриальной фракции печени, показывают, что сочетание тироксина с другими активаторами не приводит к сколько-нибудь заметному усилению их стимулирующего действия. Наряду с этим выяснилось, что одновременное применение фосфата с цитратом или же сочетание этих соединений с другими активаторами также не приводит к усилению их стимулирующего действия. Более того, при этом происходит подавление эффекта одного из активаторов. Это означает, что при рН 8,5 в действии различных активаторов глутаминназы печени не обнаруживается положительной кооперативности. В аналогичных исследованиях, проведенных с глутаминназой митохондриальной фракции мозга, наблюдается обратная картина [16].

Учитывая то обстоятельство, что в митохондриальной фракции мозга кролика при низких значениях рН эффект потенцирования при одновременном применении двух активаторов еще больше усиливается [16], мы решили проводить наши исследования при рН 7,5.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что при рН 7,5 АК, ААК и сукцинат, добавленные в отдельности, даже в концентрации 60 мкмоль/мл не влияют на активность глутаминназы митохондриальной фракции печени, однако одновременное применение этих соединений с фосфатом резко усиливает их стимулирующее действие, причем разные концентрации фосфата в различной степени. Наибольший эффект потенцирования наблюдается при сочетании активаторов с 5 мкмоль/мл фосфата, с повышением концентрации фосфата этот эффект уменьшается и полностью исчезает при 20 мкмоль/мл.

Далее, мы исследовали влияние различных эффекторов на активность глутаминназы печени в присутствии цитрата. Данные табл. 3 показывают, что при одновременном применении АК, ААК или сукцината с цитратом также наблюдается потенцирование их стимулирующего действия, причем в этом случае оно происходит сильнее, чем в случае

Таблица 2

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени, NH_3 мкмоль/г свежей ткани, pH 7,5.

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	NaH_2PO_4 , мкмоль/мл		
			5	10	20
Цитрат	10	$1,1 \pm 0,5$ (30)	$2,3 \pm 0,5$ (26) $35 \pm 5,2$ (12)	$25 \pm 3,0$ (20) $42 \pm 4,7$ (12)	$65 \pm 5,4$ (18) $65 \pm 5,7$ (12)
Цитрат	20	$39 \pm 2,3$ (30)	$32 \pm 2,2$ (10)	$37 \pm 2,2$ (10)	—
L-аспартат	20	$0,6 \pm 0,2$ (18)	$9 \pm 1,7$ (10)	$31 \pm 5,0$ (10)	$71 \pm 6,6$ (12)
L-аспартат	40	$1,7 \pm 0,3$ (18)	$13 \pm 2,1$ (9)	$32 \pm 3,7$ (9)	—
L-аспартат	60	$1,4 \pm 0,5$ (10)	$17 \pm 1,7$ (10)	—	—
N-ацетил-L-аспартат	20	$0,3 \pm 0,05$ (18)	$19 \pm 2,7$ (8)	$34 \pm 2,5$ (8)	$68 \pm 8,2$ (8)
N-ацетил-L-аспартат	40	$0,9 \pm 0,1$ (12)	$38 \pm 4,3$ (6)	$38 \pm 4,3$ (6)	—
N-ацетил-L-аспартат	60	$1,1 \pm 0,1$ (10)	$40 \pm 5,0$ (10)	—	—
Сукцинат	20	$3,0 \pm 0,6$ (18)	$16 \pm 2,0$ (12)	$40 \pm 4,0$ (12)	$68 \pm 7,5$ (12)
Сукцинат	40	$2,3 \pm 0,3$ (18)	$35 \pm 4,5$ (10)	$35 \pm 4,7$ (10)	—
Сукцинат	60	$7,0 \pm 2,1$ (10)	$40 \pm 5,3$ (10)	—	—
L-тироксин	0,05	$1,7 \pm 0,3$ (10)	$5,5 \pm 1,5$ (8)	$28 \pm 3,7$ (8)	—
L-тироксин	0,1	$1,1 \pm 0,2$ (18)	$8,0 \pm 1,7$ (9)	$31 \pm 4,4$ (9)	—
L-тироксин	0,2	$1,4 \pm 0,2$ (10)	$8,5 \pm 2,2$ (10)	—	—

сочетания их с фосфатом. С повышением концентрации цитрата эффект потенцирования значительно слабеет.

Как выяснилось из наших исследований, тироксин при pH 8,5 и при pH 7,5 практически не повышает активность глутаминазы, а в сочетании с фосфатом или цитратом наблюдается незначительное усиление их стимулирующего действия. Итак, можно заключить, что глутаминаза митохондриальной фракции печени крыс инертна к действию тироксина.

Графическое изображение полученных данных показывает, что при pH 7,5 зависимость активности фермента от концентрации фосфата и цитрата имеет типичную сигмоидную форму, что не наблюдалось при pH 8,5 (рис. 1). При совместном применении фосфата или цитрата с другими эффекторами ФНГ кривая зависимости активности фермента от концентрации фосфата и цитрата из сигмоидной формы приближается к гиперболе (рис. 1 и 2). Эти данные свидетельствуют об аллостерической природе обоих изоэнзимов глутаминазы митохондриальной фракции печени. Вероятно, при pH 7,5 благодаря гомотропной поло-

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы печени в присутствии цитрата, NH_3 мкмоль/г свежей ткани, pH 7,5

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	Цитрат, мкмоль/мл	
			10	20
L-аспарат	20	$0,6 \pm 0,2$ (16)	$1,1 \pm 0,5$ (30) $26 \pm 3,0$ (12)	$39 \pm 2,3$ (30) $45 \pm 4,1$ (10)
L-аспарат	40	$1,7 \pm 0,3$ (18)	$32 \pm 2,5$ (9)	$48 \pm 2,4$ (9)
N-ацетил-L-аспарат	20	$0,3 \pm 0,05$ (18)	$34 \pm 5,0$ (12)	$46 \pm 2,2$ (12)
N-ацетил-L-аспарат	40	$0,9 \pm 0,1$ (18)	$41 \pm 5,2$ (9)	$57 \pm 3,6$ (9)
Сукцинат	20	$3,0 \pm 0,6$ (18)	$51 \pm 3,8$ (9)	$60 \pm 4,6$ (9)
Сукцинат	40	$2,3 \pm 0,3$ (12)	$48 \pm 4,1$ (8)	$54 \pm 5,0$ (8)
L-тироксин	0,1	$1,1 \pm 0,2$ (18)	$4,4 \pm 0,6$ (9)	$38 \pm 4,2$ (9)
L-тироксин	0,2	$1,4 \pm 0,1$ (18)	$8,8 \pm 2,2$ (10)	$41 \pm 5,7$ (10)

жительной кооперативности, возникающей вследствие взаимодействия регуляторных центров глутаминазы митохондриальной фракции печени под влиянием фосфата или цитрата, происходит выраженный конформационный переход молекулы фермента. Между тем как конформационный переход, возникающий при низкой концентрации одного эффектора, по-видимому, недостаточно выражен и не затрагивает каталитического центра фермента, но одновременное добавление двух активаторов быстро приводит к образованию каталитически активной формы фермента. Возможно, этим и объясняется обнаруженный в указанных условиях эффект потенцирования. С повышением pH среды чувствительность ФЗГ и ФНГ к эффекторам повышается, и уже при pH 8,5 деамидирование глутамин, осуществляемое обоими изоэнзимами глутаминазы, протекает достаточно интенсивно. По-видимому, вследствие этого при высоких значениях pH физиологическая необходимость эффекта потенцирования, возникающего благодаря положительной кооперативности, исчезает.

Как показывают полученные данные, процесс регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции печени, так же как и мозга, носит поливалентный характер. Из наших исследований выяснилось также, что регуляторные свойства глутаминазы мозга и печени принципиально отличаются друг от друга. Так, в регуляции активности глутаминазы мозга тироксин занимает центральное место, в то время как глутаминаза печени совершенно инертна к действию этого гормона. Следует отметить, что тироксин специфически действует на активность глутаминазы мозга. Его действие по целому ряду параметров прин-

ципиально отличается от действия остальных активаторов. В связи с этим возникает вопрос—может ли тироксин действовать на активность глутаминазы других органов? Как показывают проводимые нами в нас-

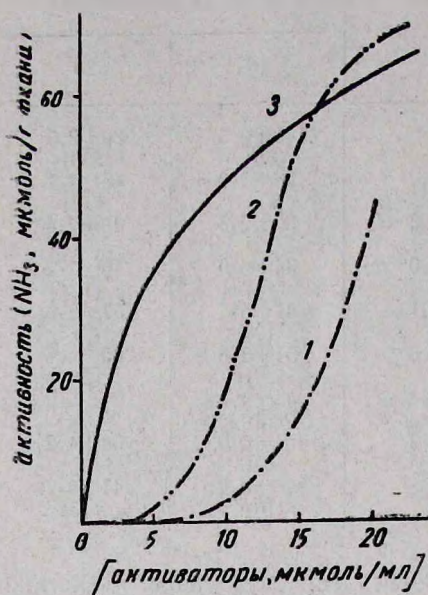


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние фосфата и цитрата на активность глутаминазы в отдельности и при их совместном применении (рН 7,5) 1—цитрат; 2—фосфат; 3—фосфат+цитрат—10 мкмоль/мл.

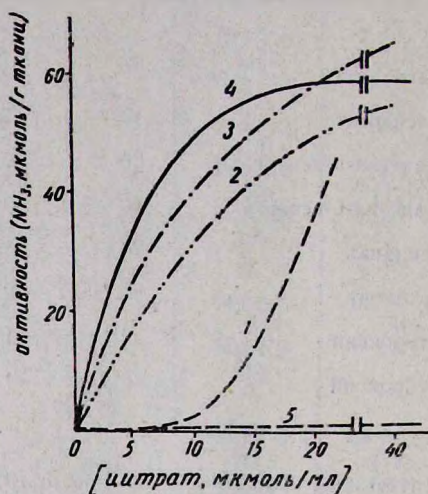


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы в отдельности и в присутствии цитрата (рН 7,5) 1—цитрат; 2—цитрат+АК—40 мкмоль/мл; 3—цитрат+ААК—40 мкмоль/мл; 4—цитрат+сукцинат—40 мкмоль/мл; 5—ААК и сукцинат—по 40 мкмоль/мл.

тоящее время исследования, тироксин оказывает стимулирующее действие на активность глутаминазы почек, а в сочетании с фосфатом их стимулирующее действие сильно потенцируется. Об этих исследованиях будет сообщено отдельно.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 26.XII 1977 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԻՐԻԱԿ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ԳԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՅԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Վ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է լյարդի գլյուտամինազայի ակտիվության կարգավորումը թիրոքսինի, ֆոսֆատի և գլյուտամինազայի ֆոսֆատոշկախյալ իզոֆերմենտի այլ ակտիվատորների առկայության, ինչպես նաև նրանց տարբեր դոզորդման դեպքում: Պարզվել է, որ թիրոքսինը (ուղեղի գլյուտամինազայի

ամենահզոր ակտիվատորը) բուրրովին չի ազդում լյարդի գլյուտամինազայի ակտիվության վրա, ինչպես նաև չի ուժեղացնում այլ ակտիվատորների խթանող ազդեցությունը:

7,5 pH-ի դեպքում ֆոսֆատի և ցիտրատի զուգորդումը, ինչպես նաև այս միացությունների և ֆոսֆատոռկալայալ իզոֆերմենտի այլ էֆեկտորների համատեղ օգտագործումը հանգեցնում է նրանց ֆերմենտի ակտիվության վրա ցուցաբերած խթանող ազդեցության զգալի ուժեղացման: Սակայն միջավայրի pH-ի բարձրացման հետ մեկտեղ պոտենցման էֆեկտը լրիվ անհետանում է: Հաստատված է, որ ֆերմենտի ակտիվության կախվածությունը ֆոսֆատի և ցիտրատի քանակից 7,5 pH-ի դեպքում կրում է լավ արտահայտված S-ձև-բնույթ, իսկ երկու ակտիվատորների համատեղ օգտագործման, ինչպես նաև 8,5 pH-ի դեպքում այն փոխվում է հիպերբոլի: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ լյարդի և ուղեղի գլյուտամինազայի կարգավորիչ հատկությունները սկզբունքորեն զանազանվում են մեկը մյուսից:

REGULATION OF GLUTAMINASE ACTIVITY IN MITOCHONDRIAL FRACTION OF RAT LIVER

V. S. HOVHANNISSIAN, V. G. HAMBARTSUMIAN

The results obtained show that the regulation of glutaminase activity of mitochondrial fraction of rat liver is very different from that of the brain glutaminase.

Thyroxin (the activator of the brain glutaminase) has no effect on the liver glutaminase activity. Kinetic data indicate that the liver glutaminase displays a typical sigmoidal velocity curve with respect to the phosphate concentration, while the addition of other activators changes the sigmoidal curve to a normal one.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Errera M., Greenstein I. J. Biol. Chem., 178, 495, 1949.
2. Greenstein I. P., Carter C. E. J. Nat. Cancer Inst., 7, 57, 1946.
3. Katunuma N., Tomino J., Nishio H. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 22, 321, 1966.
4. Katunuma N., Huzino A., Tomino J. Adv. Enzym. Reg., 5, 55, 1967.
5. Katsunuma T., Temma M., Katunuma N. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 32, 433, 1968.
6. Оганесян В. С. ДАН АрмССР, 48, 171, 1969.
7. Оганесян В. С., Бунятыя Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
8. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
9. Kvamme E., Torgner I. A. Biochem. J., 137, 3, 525, 1974.
10. Kvamme E., Torgner I. A. FEBS Letters, 47, 2, 1974.
11. Kvamme E., Torgner I. A. Biochem. J., 149, 83, 1975.
12. Well-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
13. Well-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
14. Svenneby C., Tvelt B., Kvamme E. J. Biol. Chem., 245, 8, 1878, 1970.
15. Оганесян В. С., Бунятыя Г. Х. Вопросы биохимии мозга 4, 81, Ереван, 1968.
16. Оганесян В. С., Бунятыя Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопросы биохимии мозга, 5, 5, Ереван, 1969.
17. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ТРИМЕТАФОСФАТАЗЫ ТКАНЕЙ БЕЛЫХ КРЫС И КУР

И. Г. АСЛАНЯН, Г. Т. АДУНЦ, А. А. ГАСПАРЯН

Изучалась активность неорганической триметафосфатазы в гомогенатах и субклеточных фракциях тканей (печень, почки, слизистая оболочка тонких кишок, мозг, сердечная мышца, мышцы) крыс и кур, а также влияние $MgCl_2$ и NaF на нее. Полученные результаты свидетельствуют о значительной тканевой гетерогенности фермента.

Процесс образования богатых энергией фосфорных соединений в клетке, в частности аденозинтрифосфата (АТФ), имеет важное значение. Однако такие простейшие накопители энергии в живой клетке, как неорганические полифосфаты, выявленные в настоящее время почти у всех представителей живой природы, в том числе и у высших растений и животных, мало изучены. Известные нам исследования ферментов, участвующих в превращениях неорганических полифосфатов, относятся больше к микроорганизмам. У высших животных и растений неорганические полифосфаты обнаружены в небольшом количестве. Приходящийся на их долю фосфор, по современным данным [1], составляет в одном г сырой ткани этих организмов лишь десятки, максимум сотни микрограмм, тогда как у дрожжей, например, может составлять 10—20% от сухого содержимого их клеток. Поэтому именно у микроорганизмов наиболее подробно изучен их обмен. Что касается высших организмов, до последнего времени не предпринималось попыток широкого изучения неорганических полифосфатов и ферментов их обмена. Возросший за последние годы интерес к изучению свойств неорганических полифосфатов объясняется выявлением широкого спектра деятельности этих ферментов.

В свете вышензложенного становится очевидным целесообразность изучения свойств триметафосфатазы—одного из ферментов, участвующих в метаболизме конденсированных полифосфатов.

В настоящей работе рассматриваются некоторые вопросы, связанные с неорганической триметафосфатазой в различных тканях белых крыс и кур.

Материал и методика. Опыты ставили на гомогенатах и субклеточных фракциях печени, почек, слизистой оболочки тонких кишок, мозга, сердце и мышцах крыс и кур. Отдельные клеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования по схеме, предложенной Пери и Греем [2]. В качестве субстрата использовали триметафосфат Na_3 . Активность триметафосфатазы определяли методом Берга [3].

кислой фосфатазы—методом Боданского [4], неорганический фосфат—Лаури и Лопеса [5]. Инкубационная смесь содержала 1 мл гомогената ткани или соответствующей субклеточной фракции (разбавление 1/25 или 1/10 *в/об* соответственно), 2,5 мл субстрата, приготовленного на медиаловом буфере (рН 5 и 9,6), 0,5 мл соответствующего реагента (NaF и $MgCl_2$ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} М). Реакцию останавливали 40%-ной трихлоруксусной кислотой после часовой инкубации при 37°. Активность триметафосфатазы (КФ 3.6.1.2.) выражали в мкМ Р/г ткани. Повторность опытов 7-кратная.

Результаты и обсуждение. Так как кислая фосфатаза и триметафосфатаза действуют в одном диапазоне рН и продуктом их деятельности является неорганический фосфат, мы вначале задались целью доказать, что изучаемый нами фермент является именно триметафосфатазой, в связи с чем изучалось влияние термообработки на активность обоих указанных ферментов на одной из изучаемых тканей крыс (мозг). Результаты наших исследований показали, что при температурной обработке гомогената мозга крыс в течение 10 мин при 37, 45, 60, 70° активность обоих ферментов проявляется по-разному: триметафосфатаза более термостабильна, чем кислая фосфатаза. Обработка гомогената при 60° приводит к полному исчезновению активности кислой фосфатазы, у триметафосфатазы она на довольно высоком уровне (табл. 1). В норме активность кислой фосфатазы в мозге намного ниже три-

Таблица 1
Активность триметафосфатазы и кислой фосфатазы
при температурной обработке гомогенатов
мозга крыс, мкМ Р/г ткани

Т р и м е т а ф о с ф а т а з а			
Контроль	45°	60°	70°
41,8	48	35,4	0
К и с л я я ф о с ф а т а з а			
15,1	20,6	0	0

метафосфатазной. Ферменты, катализирующие родственные реакции, способны в известной мере, компенсировать деятельность друг друга. Однако в подобных случаях исключается возможность большого сродства фермента к чужому субстрату. Этот факт также подтверждает то, что триметафосфат расщепляется специфической триметафосфатазой. О различных свойствах этих ферментов свидетельствуют и кривые рН (рис. 1).

Нами изучалась в сравнительном аспекте активность триметафосфатазы при кислом и щелочном значении рН в гомогенатах тканей белых крыс (табл. 2). Как видно из таблицы, наивысшей триметафосфатазной активностью обладают почечная и печеночная ткани по сравнению с остальными. Причем при щелочном значении рН она выражена слабее, чем при кислом. В слизистой оболочке тонких кишок ак-

тивность фермента нами не обнаружена, а в сердечной ткани триметафосфатаза при обоих значениях pH проявляет одинаковую активность.

Исследования показали, что наивысшей активностью триметафосфатазы при pH 5 отличаются почки, печень, слизистая оболочка тон-

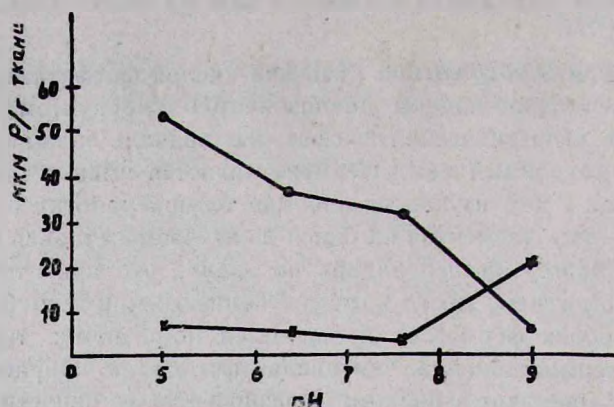


Рис. Активность триметафосфатазы и фосфатазы при разных значениях pH. ● — триметафосфатаза, ✱ — фосфатаза.

ких кишок и мозг кур (табл. 2). В других тканях активность фермента заметно ниже. При pH 9,6 она выражена значительно слабее, а в некоторых органах вообще отсутствует (сердце, мозг).

Представляет интерес изучение триметафосфатазного баланса в различных тканях крыс и кур на субклеточном уровне (табл. 3). Приведенные нами данные характеризуют особенности распределения триметафосфатазы в тканях крыс (pH 5). Высокой активностью триметафосфатазы в почках отличаются фракции митохондрии и цитоплазма+микросомы, более низкой—ядерно-миофибриллярная. В печеночной ткани все три фракции (цитоплазма+микросомы, митохондрии, ядерно-миофибриллярная) обладают почти одинаковой активностью фермента. Мозговая ткань отличается низкой активностью фермента в митохондриях, и высокой—в ядрах. Не обнаружена активность фермента в цитоплазме, в слизистой оболочке тонких кишок она выявляется во всех трех фракциях, при наивысшем проявлении в митохондриях. Небезынтересно отметить, что, согласно некоторым литературным данным [6], высокомолекулярные неорганические полифосфаты, как и ферменты их обмена, отсутствуют в митохондриях животных. Нами было установлено, что активность триметафосфатазы в почках, мозге, слизистой оболочке тонких кишок наблюдается в митохондриях, в сердечной мышце и мышечной ткани в цитоплазме и митохондриях—не обнаружена, в основном она сосредоточена в ядерно-миофибриллярной фракции.

В тканях кур триметафосфатазная активность распределена равномерно по всем трем фракциям в печени. В почках наивысшей активностью отличаются митохондрии, в мозге—ядерно-миофибриллярная

Т а б л и ц а 2

Активность триметафосфатазы при двух значениях pH (5 и 9,6) в тканях крыс и кур, мкМ Р/г ткани

pH 5	pH 9,6	pH 5	pH 9,6
К Р Ы С Ы			
П е ч е н ь		П о ч к и	
$54,1 \pm 2,2$ $p > 0,001$	$10,7 \pm 2,8$ $p < 0,01$	71 ± 7 $p < 0,005$	$21,1 \pm 2,1$ $p < 0,005$
Слизистая тонких кишков		М о з г	
$29,6 \pm 1,3$ $p < 0,01$	0	$30 \pm 3,4$ $p < 0,01$	0
С е р д ц е		М ы ш ц ы	
$11,3 \pm 1,3$ $p < 0,025$	$14,1 \pm 2,2$ $p < 0,01$	$17,9 \pm 0,8$ $p < 0,001$	$5,8 \pm 1,3$ $p < 0,025$
К У Р Ы			
П е ч е н ь		М о з г	
$52,7 \pm 3,5$ $p < 0,05$	$4,2 \pm 0,25$ $p < 0,001$	$62,2 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$12,7 \pm 2,2$ $p < 0,05$
Слизистая тонких кишков		М о з г	
$50,3 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$8,6 \pm 1,1$ $p < 0,025$	$37,9 \pm 3,2$ $p > 0,01$	0
С е р д ц е		М ы ш ц ы	
$16,9 \pm 1,1$ $p < 0,01$	0	$11,9 \pm 1,8$ $p < 0,025$	$8,3 \pm 0,54$ $p < 0,025$

фракция, в цитоплазматической фракции мозга активность не обнаружена. В мышцах она сосредоточена во фракции цитоплазма+микросомы, а в остальных фракциях—практически отсутствует. В сердечной мышце распределена по фракциям цитоплазма+микросомы и ядерно-миофибриллярной. Наивысшая активность наблюдается в ядрах.

Изучение субклеточной локализации триметафосфатазы имеет значение для выяснения некоторых интимных механизмов действия фер-

Таблица 3

Активность кислой триметафосфатазы в субклеточных фракциях тканей
крыс, кур, мкМ Р/г ткани

Гомогенат	Цитоплазма+микросомы	Митохондрии	Ядра	Гомогенат	Цитоплазма+микросомы	Митохондрии	Ядра
К Р Ы С Ы							
Печень				Почки			
$59 \pm 1,3$ $p < 0,001$	$11,7 \pm 2,5$ $p < 0,025$	$18,1 \pm 3,6$ $p < 0,05$	$12,7 \pm 1,7$ $p < 0,01$	$32,1 \pm 1,2$ $p < 0,001$	16 ± 2 $p < 0,01$	$12,9 \pm 2,2$ $p < 0,025$	$3,6 \pm 0,6$ $p < 0,025$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$36,2 \pm 0,8$ $p < 0,001$	$10,7 \pm 2$ $p > 0,025$	$23,5 \pm 1,3$ $p < 0,001$	$10,3 \pm 3,1$ $p < 0,05$	$43,2 \pm 0,4$ $p < 0,001$	0	$17,1 \pm 0,83$ $p < 0,05$	$55,6 \pm 2,1$ $p < 0,001$
Сердце				Мышцы			
$17,9 \pm 0,8$ $p < 0,001$	0	0	$10,5 \pm 1,1$ $p < 0,01$	$14 \pm 1,2$ $p < 0,01$	0	0	$8,5 \pm 0,9$ $p < 0,01$
К У Р Ы							
Печень				Почки			
$53 \pm 3,4$ $p < 0,005$	$17 \pm 1,4$ $p < 0,005$	$15 \pm 0,9$ $p < 0,005$	$13 \pm 0,6$ $p > 0,005$	$62,2 \pm 2,5$ $p > 0,001$	$9,2 \pm 1,4$ $p > 0,01$	$27 \pm 1,9$ $p > 0,005$	$21,8 \pm 3$ $p < 0,025$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$50,3 \pm 1,5$ $p < 0,001$	$14,7 \pm 0,2$ $p < 0,05$	$5,4 \pm 0,6$ $p < 0,01$	$21,8 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$40,4 \pm 3,3$ $p < 0,005$	0	$6,9 \pm 0,7$ $p > 0,05$	$25,9 \pm 1,9$ $p < 0,005$
Сердце				Мышцы			
$18 \pm 1,2$ $p < 0,005$	$9,9 \pm 0,9$ $p > 0,01$	0	$7 \pm 0,5$ $p < 0,01$	$11,9 \pm 0,9$ $p < 0,01$	$9,8 \pm 0,3$ $p = 0,1$	0	0

мента. Кроме того, эти сравнительные данные позволяют в дальнейших экспериментах остановить выбор на тех тканях, которые отличаются высоким уровнем ферментативной активности.

Нами также исследовалась активность триметафосфатазы в тканях крыс и кур под влиянием активаторов и ингибиторов фосфатаз. В

Таблица 4

Влияние $MgCl_2$ и NaF на активность кислой триметафосфатазы в тканях
крыс и кур, в мкМ Р/г ткани

Контроль	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-4} М	Контроль	10^{-2} М	10^{-3} М	10^{-4} М
1	2	3	4	5	6	7	8

К Р Ы С Ы

 $MgCl_2$

Печень				Почки			
$59,6 \pm 2,6$ $p < 0,001$	$58,9 \pm 1,6$ $p < 0,001$	$70,5 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$53,3 \pm 2,6$ $p < 0,001$	$31,7 \pm 2,1$ $p < 0,05$	$34,7 \pm 2,7$ $p < 0,001$	$50,7 \pm 1,6$ $p < 0,001$	$37,4 \pm 2,8$ $p < 0,001$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$32,1 \pm 3$ $p > 0,01$	$2,6 \pm 0,5$ $p < 0,025$	$31 \pm 1,7$ $p > 0,005$	$52 \pm 1,1$ $p < 0,001$	$46 \pm 2,5$ $p > 0,005$	$42,3 \pm 4$ $p < 0,01$	$53,4 \pm 1,2$ $p > 0,005$	$39,4 \pm 4$ $p > 0,005$
Сердце				Мышцы			
$20,8 \pm 4$ $p > 0,025$	$23,1 \pm 4,5$ $p < 0,01$	$37 \pm 1,7$ $p < 0,001$	$27,2 \pm 3,4$ $p > 0,005$	$15,3 \pm 1,5$ $p > 0,01$	$20,2 \pm 4$ $p < 0,025$	$32,7 \pm 3$ $p < 0,01$	$10,4 \pm 2$ $p > 0,05$

NaF

Печень				Почки			
$74,2 \pm 3,4$ $p > 0,001$	$60,8 \pm 1,5$ $p > 0,001$	$49,7 \pm 2,4$ $p < 0,01$	$21,7 \pm 3,5$ $p < 0,01$	$58 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$42,9 \pm 3,7$ $p < 0,005$	$38,2 \pm 2,5$ $p < 0,005$	$17 \pm 1,4$ $p > 0,005$
Слизистая тонких кишок				Мозг			
$32 \pm 2,5$ $p > 0,005$	$2,63 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$2,6 \pm 0,4$ $p < 0,01$	$142,7 \pm 3,6$ $p < 0,001$	$38,8 \pm 2,1$ $p < 0,001$	42 ± 2 $p < 0,01$	13 ± 2 $p < 0,025$	$15,6 \pm 2,5$ $p < 0,01$
Сердце				Мышцы			
$20,7 \pm 3,8$ $p < 0,01$	$24,5 \pm 3,3$ $p < 0,01$	$8,7 \pm 2,5$ $p < 0,05$	$11,2 \pm 2,4$ $p < 0,1$	$16,5 \pm 2$ $p < 0,01$	$8,9 \pm 2,2$ $p < 0,025$	$9,4 \pm 1,7$ $p < 0,01$	$9,9 \pm 0,6$ $p < 0,001$

1	2	3	4	5	6	7	8
К У Р Ы							
MgCl ₂							
П е ч е н ь				П о ч к и			
57,8±3,5 p=0,025	68±2,4 p<0,001	70±1,7 p<0,001	52,3±2,2 p<0,01	43,3±2,8 p<0,025	23,32±2,4 p=0,05	20±1,6 p<0,01	30,3±2,1 p<0,005
Слизистая тонких кишок				М о з г			
48,1±2,7 p>0,001	56,1±3,2 p<0,01	58,3±1,4 p<0,001	41,3±2,6 p<0,005	39,5±1,4 p>0,005	56±1,2 p>0,001	49±0,9 p>0,001	34,4±1,5 p>0,005
С е р д ц е				М ы ш ц ы			
20±1,9 p<0,005	18±1,8 p<0,005	15,1±0,8 p=0,05	17,5±0,8 p=0,025	17,5±0,7 p<0,01	20,4±0,56 p>0,01	21,8±0,9 p>0,001	23,6±1 p<0,001
NaF							
П е ч е н ь				П о ч к и			
49±2,1 p<0,005	10,7±1,3 p<0,01	20,4±2,1 p=0,01	38,3±2 p=0,05	40±1,3 p>0,005	4,6±0,5 p<0,01	27,4±1,8 p>0,005	27±2 p<0,005
Слизистая тонких кишок				М о з г			
50,1±2,1 p<0,001	32±1,9 p>0,005	17,5±1,1 p>0,005	50±1,7 p>0,005	35,9±2 p>0,005	8,5±0,9 p>0,025	10,4±1,1 p<0,01	19±2 p>0,02
С е р д ц е				М ы ш ц ы			
16,2±1,4 p>0,01	3,4±0,4 p>0,025	7,2±0,9 p<0,01	12,1±1 p<0,005	13,4±0,6 p>0,001	6,2±0,5 p<0,005	5,6±0,8 p>0,025	12,8±0,6 p>0,01

качестве ингибитора использовали классический ингибитор фосфатаз NaF, в качестве активатора—MgCl₂ в разных концентрациях.

Как показано в табл. 4, MgCl₂ в концентрации 10⁻³ М повышает активность триметафосфатазы во всех взятых тканях крыс, за исключением слизистой оболочки тонких кишок. NaF в концентрациях 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ М оказывает сильное ингибирующее воздействие на активность фермента почти во всех тканях крыс, кроме мозга. В слизистой оболочке тонких кишок NaF при 10⁻² и 10⁻³ М резко понижает активность фермента, при 10⁻⁴ М наблюдается резкое повышение ее.

Из табл. 4 следует, что $MgCl_2$ в концентрации 10^{-2} М и 10^{-3} М активизирует фермент в печени, слизистой оболочке тонких кишок, в мозге и мышцах кур, и понижает ее активность в почках и частично в сердце во всех взятых концентрациях. NaF резко ингибирует активность триметафосфатазы всех взятых тканей кур и только 10^{-4} М не оказывает существенного влияния на слизистую оболочку тонких кишок, на печеночную и мышечную ткани.

Полученные результаты в отношении действия вышеназванных реагентов на триметафосфатазу отдельных тканей крыс и кур свидетельствуют о значительной тканевой и видовой гетерогенности триметафосфатазы.

Проведенные исследования позволили установить некоторые особенности неорганической триметафосфатазы и произвести выбор наиболее интересного источника для наших последующих изучений.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 22.II 1978 г.

ՀԱՎԵՐԻ ԵՎ ՍՊԵՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԱՆՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՏՐԻՄԵՏԱՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ի. Հ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Դ. Բ. ԱԴՈՒՆՏ, Ա. Հ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

Հետազոտվել է տրիմետաֆոսֆատազայի ակտիվությունը հավերի և սպիտակ առնետների հյուսվածքների (թոքերի, երիկամների, բարակ աղիների լորձաթաղանթի, ուղեղի, սրտամկանի, մկանների) հոմոգենատների և ենթաբջջային ֆրակցիաների վրա, ինչպես նաև $MgCl_2$ -ի և NaF -ի ազդեցությունը այդ ֆերմենտի ակտիվության վրա:

Կատարված ուսումնասիրությունները հնարավորություն են ընձեռել պարզելու տրիմետաֆոսֆատազայի մի քանի առանձնահատկություններ:

SEVERAL PROPERTIES OF INORGANIC TRIMETAPHOSPHATASE OF WHITE RAT AND HEN TISSUES

I. G. ASLANIAN, G. T. ADUNTS, A. A. GASPARIAN

The activity of trimetaphosphatase in homogenate and subcellular fractions of various tissues (liver, kidney, intestinal mucosa, brain, heart, muscle) of rat and hen has been studied along with the influence of $MgCl_2$ and NaF on the activity of the enzyme. These experiments elucidate some peculiarities of trimetaphosphatase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кулаев И. С. Неорганические полифосфаты и их физиологическая роль, Баховские чтения, 1975.
2. Perry S. W., Gray T. S. Biochem. 64, 185, 1956.
3. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови, М., 1953.

4. Bodansky A. J. Biol. Chem. 101, 93, 1933.
5. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem. 162, 3421, 1946.
6. Кулаев И. С., Крашенинников П. А., Афанасьева Т. П., Мансuroва С. Э., Урысон С. О. ДАН СССР, 177, 229, 1965.
7. Кулаев И. С., Мансuroва С. Э., Афанасьева Т. П., Крашенинникова И. А., Холоденко В. П., Коношенко Г. И., Урысон С. О. В сб.: Докл. 14 Всесоюзного симпозиума по митохондриям, 15, М., 1968.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АТФазной АКТИВНОСТИ В МЕМБРАННЫХ СТРУКТУРАХ И ЭКСТРАКТАХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ КУР

А. А. СИМОНЯН, Р. Б. БАДАЛЯН

В статье приводятся данные о распределении АТФазной активности в мембранных структурах и экстрактах митохондрий печени в ходе онтогенетического развития кур. Выявлены некоторые особенности ее локализации в выделенных мембранах и экстракте митохондрий печени в определенные периоды развития.

В предыдущих наших работах было показано, что АТФазная активность в суммарной, так и в отдельных субфракциях митохондрий кур в эмбриональном и раннем постэмбриональном периодах развития постепенно возрастает [1, 2]. Это возрастание соответствует повышению интенсивности дыхания и окислительного фосфорилирования в печени в конце эмбрионального развития [1]. Отмеченные сдвиги в энергетическом метаболизме обеспечивают повышенную температуру тела эмбриона, способствуют интенсивному росту его и развитию.

В данной работе нас интересовал вопрос о распределении активности АТФазы в мембранах и экстракте митохондрий печени в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития кур.

Материал и методика. Опыты проводили на 15-, 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах белой русской породы. Возраст эмбрионов определяли по срокам инкубации. Выделение суммарной митохондриальной фракции печени проводили по Скулачеву [3] при температуре 0—3°. При выделении мембранных структур к извлеченной митохондриальной фракции добавляли тритон X-100 (в количестве 0,9 мг на 2—3 мг митохондриального белка) и через 20 мин центрифугировали при 111000 g в течение 1 часа. Экстракцию митохондрий и осадков, содержащие мембранные структуры, ресуспендировали в трис-HCl буфере.

Для определения активности различных АТФаз добавляли катионы (в конечной концентрации): Mg^{2+} —10, Ca^{2+} —20, Na^{+} —120, K^{+} —100 ммоль. Общий объем смеси—1 мл. Время инкубации—30 мин при 26°. Об активности фермента судили по нарастанию количества неорганического фосфата в среде, который определяли по Лоури и Лопес [4]. Полученные данные были рассчитаны на мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [5].

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных экспериментов показали, что с 15-го дня эмбрионального развития АТФазная активность в экстрактах митохондрий печени постепенно возрастает как в контрольных опытах, так и при добавлении различных ионов— Mg ,

Na, K, Ca (табл. 1). Статистически достоверное ($P < 0,001$) повышение активности фермента наблюдается в постэмбриональном периоде, у 5-дневных цыплят, с некоторыми колебаниями этот уровень сохраняется у половозрелых кур. При этом по сравнению с 15-дневными эмбрионами у 5-дневных цыплят при добавлении Mg^{2+} этот показате-

Таблица 1

Изменение АТФазной активности в экстрактах митохондрий печени кур при эмбриональном и постэмбриональном развитии, ΔP в мкатах/мг белка. $M \pm m$

Условия опыта	Дни развития эмбрионов		5-дневные цыплята	Куры
	15-дневные	20-дневные		
Контроль (без добавления ионов)	$0,53 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,04$	$1,98 \pm 0,39$	$2,50 \pm 0,46$
Mg^{2+}	$1,98 \pm 0,02$	$2,70 \pm 0,45$	$8,81 \pm 1,30$	$7,86 \pm 0,20$
Mg^{2+} , Na^+ , K^+	$2,20 \pm 0,33$	$2,50 \pm 0,32$	$7,88 \pm 0,77$	$7,96 \pm 0,21$
Ca^{2+}	$1,17 \pm 0,18$	$1,20 \pm 0,20$	$4,55 \pm 0,13$	$4,51 \pm 0,59$

тель повышается в 4,4, а Ca^{2+} — 3,8 раза. Интересно, что в различные периоды развития кур активность Na^+ , K^+ -АТФазы в экстракте митохондрий не выявляется (при определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы от величины активности фермента при добавлении ионов магния, натрия и калия вычитывается результат, полученный при добавлении только магния).

В табл. 2 приведены данные об изменении активности различных АТФаз в мембранных структурах митохондрий в течение эмбрионального и постэмбрионального развития кур. При сравнении полученных

Таблица 2

Изменение АТФазной активности в мембранных структурах митохондрий печени кур при эмбриональном и постэмбриональном развитии, ΔP в мкатах/мг белка. $M \pm m$

Условия опыта	Дни развития эмбрионов		5-дневные цыплята	Куры
	15-дневные	20-дневные		
Контроль (без добавления ионов)	$2,37 \pm 0,38$	$2,81 \pm 0,20$	$3,65 \pm 0,36$	$2,12 \pm 0,24$
Mg^{2+}	$7,42 \pm 0,53$	$8,02 \pm 0,28$	$8,57 \pm 0,60$	$6,87 \pm 0,66$
Mg^{2+} , Na^+ , K^+	$6,58 \pm 0,50$	$7,06 \pm 0,24$	$7,15 \pm 0,45$	$6,22 \pm 0,22$
Ca^{2+}	$4,23 \pm 0,79$	$4,01 \pm 0,22$	$5,59 \pm 0,21$	$5,20 \pm 0,80$

результатов оказалось, что во всех изученных периодах в присутствии ионов Mg , по сравнению с контролем, активность фермента достоверно повышается. Однако при добавлении ионов магния, натрия и калия, по сравнению с опытами с одним магнием, она заметно подавляется. Как видно из этих данных, ионы натрия и калия оказывают ингибиру-

ющее действие на активность фермента в митохондриальных мембранах печени. В различные периоды эмбрионального и постэмбрионального развития активность АТФазы по сравнению с контролем достоверно ($P < 0,001$) повышается также в присутствии ионов кальция.

При сопоставлении данных, приведенных в табл. 1 и 2, нетрудно заметить, что в эмбриональном периоде развития кур большая часть активности АТФазы локализована в мембранах митохондрий (примерно в 2—4 раза больше, чем в экстракте). Однако у 5-дневных цыплят происходит некоторое перераспределение активности фермента: в мембранах она снижается, а в экстракте митохондрий, наоборот, заметно повышается. В печени половозрелых кур величины активности фермента в митохондриальных экстрактах и мембранных структурах еще больше приближаются друг к другу. Интересно, что указанные сдвиги в распределении АТФазной активности в экстракте и мембранах митохондрий отмечаются как в контрольных опытах (без добавления ионов), так и при добавлении магния, кальция, натрия и калия.

Таким образом, полученные результаты показывают, что в ходе онтогенетического развития птиц происходит определенное перераспределение АТФазы между мембранами и экстрактом выделенных митохондрий ткани мозга. В раннем эмбриональном периоде большая часть фермента локализована в мембранных структурах митохондрий. У 5-дневных цыплят в экстракте митохондрий активность фермента заметно повышается по сравнению с предыдущими периодами, у половозрелых же кур в мембранных структурах и экстрактах митохондрий она почти одинаковая.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 3.II 1978 г.

ԱՏՖազայի և ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՏԵՂԱԲԱՇԽՈՒՄԸ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆՈՒՐԻԱՆԵՐԻ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ԿԱՌՈՒՑՎԱՄԵՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ՄՋՎԱՄԲՈՒՄ ՀԱՎԵՐԻ ՕՆՏՈԳԵՆԵՏԻԿ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ԸՆԹԱՅՔՈՒՄ

Ա. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ, Ռ. Բ. ԲԱԿԱՅԱՆ

Հավերի օնտոգենետիկ զարգացման տարբեր շրջաններում (15, 20 օրական սաղմեր, 5 օրական ճուռ և հասուն հավեր) ուսումնասիրվել է ԱՏՖազային ակտիվության տեղակայումը ցենտրիֆուգացման եղանակով՝ լյարդի միտոքոնդրիաններից անջատված թաղանթներում և մզվածքում: Պարզվել է, որ լյարդի միտոքոնդրիանների մզվածքում ԱՏՖազային ակտիվությունը ինչպես կոնտրոլ փորձերում, այնպես էլ մազնեզիումի, նատրիումի, կալիումի և կալցիումի իոնների ավելացման դեպքում, սաղմնային զարգացման 15-րդ օրից սկսած, աստիճանաբար բարձրանում է: Իսկ ձվից դուրս գալուց հետո 5 օրական ճուռերի մոտ, 15 օրական սաղմերի համեմատությամբ, ֆերմենտի ակտիվության աճը Mg^{2+} -ի ավելացման դեպքում կազմել է 4,4, իսկ Ca^{2+} -ի դեպքում՝ 3,8 անգամ: Միտոքոնդրիանների մզվածքում NH_4^+ , K^+ -ԱՏՖազային ակտիվություն չի հայտնաբերվել: Իսկ միտոքոնդրիանների թաղանթներում,

կոնտրոլի համեմատությամբ, N_a^+ , K^+ -ի ներկայությամբ ֆերմենտի ակտիվությունը զգալիորեն ճնշվել է:

Համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ սաղմնային շրջանում ֆերմենտի ակտիվությունը մեծ մասամբ տեղակայված է թաղանթներում: Ծնունդ ձվից դուրս գալուց հետո թաղանթներում ֆերմենտի ակտիվությունը պակասում է, իսկ մզվածքում՝ ավելանում և գրեթե հավասարվում է հասուն թռչունների ֆերմենտին:

THE DISTRIBUTION OF ATP-ase ACTIVITY IN THE MITOCHONDRIAL MEMBRANES AND EXTRACTS OF HEN LIVER DURING ONTOGENETIC DEVELOPMENT

A. A. SYMONYAN, R. B. BADALIAN

The distribution of ATP-ase activity has been shown in the membranes and extracts of hen liver mitochondria during the ontogenetic development. The data obtained reveal some peculiarities of ATP-ase activity localization in membranes and extracts of liver mitochondria at certain periods of development.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Симомян А. А. Докт. дисс., Ереван, 1973.
2. Симомян А. А. Изв. с./х. наук МСХ АрмССР, 3, 89, 1970.
3. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. 152, М., 1962.
4. Lowry O. H., Lopes J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
5. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.

РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГАМК НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА—Н³ ИЗ МЕЗО-ДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС

М. Д. ЧИФЛИКЯН, Н. А. ЕСАЯН

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) (10^{-3} М) усиливает спонтанное и вызванное электрической стимуляцией высвобождение норадреналина—Н³ (Н³-НА) из срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс. Направленность действия ГАМК на процессы высвобождения Н³-НА зависит от условий инкубации срезов.

Предыдущие исследования, выявившие прямое действие ГАМК на высвобождение Н³-НА из мозговых срезов при отсутствии сдвигов в его синтезе и захвате [1], подтвердили ранее полученные результаты нашей лаборатории о ее действии на высвобождение эндогенного НА [2—5]. Было показано также [1], что влияние ГАМК на высвобождение Н³-НА находится в строгой зависимости от экспериментальных условий: если при 5-минутной преинкубации содержание Н³-НА в срезах уменьшалось по сравнению с инкубированным контролем, то после 30-минутной—оно оставалось на уровне преинкубированного контроля, что указывало на полное ингибирование спонтанного выхода Н³-НА.

Нами исследовалось действие ГАМК на спонтанное и вызванное электрической стимуляцией высвобождение Н³-НА из срезов мезо-диэнцефальной области мозга в зависимости от продолжительности преинкубации непосредственным определением его содержания в среде.

Материал и методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах весом 120—150 г. Животных декапитировали, мозг быстро извлекали и на холоду из мезо-диэнцефальной области готовили срезы весом 15 мг.

Спонтанное и вызванное электрической стимуляцией высвобождение Н³-НА определяли по изменению выхода трития в среду [6—10]. Срезы помещали в капровые мешочки и инкубировали 5 или 30 мин в Кребс-бикарбонатном буфере при 37° следующего состава (мМ): NaCl—113; KCl—4,75; KH₂PO₄—1,2; MgSO₄—1,2; NaHCO₃—25; CaCl₂—2,5; глюкоза—11,5; витамин С—1,14; pH—7,4. После преинкубации срезы инкубировали дополнительно 30 мин в присутствии этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) (0,05 мг/мл) и ипразида (0,47 мг/мл) с Н³-НА в концентрации 10^{-7} М. Затем срезы промывали в течение 6 мин, переносили на платиновые электроды и последовательно помещали на 2 мин в кюветы, содержащие по 2 мл буфера. После 16—24-минутного промывания срезы инкубировали с ГАМК (10^{-3} М) в течение 2-х мин и стимулировали в течение 1 мин в электрическом поле, генерированном платиновыми электродами (5 В, 10 гц, 4 мсек). На протяжении всего опыта через физиологический раствор непрерывно пропускали смесь O₂ с CO₂ в соотношении 95 и

5% соответственно. После добавления в каждую пробу по 0,5 мл этанола, 7 мл сцинтилляционной жидкости (100 г нафталина, 300 мг ПОПОП (1,4-ди-5-фенил-2-оксазол-лил бензол), 7 г ППО (2,5-дифенилоксазол) измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертекник» СЛ-30 с внешним стандартом. Высвобождение $\text{H}^3\text{-НА}$ определяли по радиоактивности фракции и выражали в количестве радиоактивных распадов в минуту (расп/мин).

В опытах использовали (7H^3)-НА с удельной активностью 5,8 и 8,9 кюри/мМ фирмы «Амершам» (Англия).

Результаты и обсуждение. В предварительной серии опытов изучали спонтанное высвобождение $\text{H}^3\text{-НА}$ из срезов в течение 30 мин. Так как стабилизация наклона кривой высвобождения $\text{H}^3\text{-НА}$, отражающая высвобождение специфически поглощенного $\text{H}^3\text{-НА}$, происходит после 16—20-минутной инкубации, действие ГАМК и электрической стимуляции изучали после этого времени.

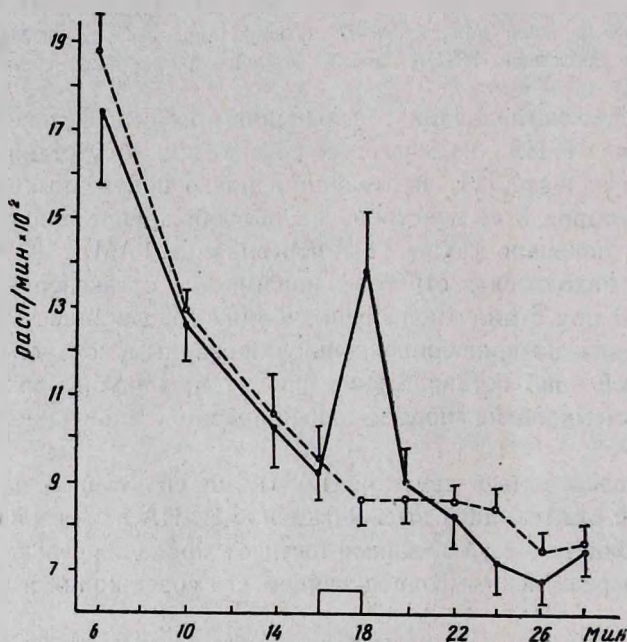


Рис. 1. Действие ГАМК (10^{-3} М) $\square$ на спонтанное высвобождение $\text{H}^3\text{-НА}$ (удельная активность 5,8 кюри/мМ) из срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс в зависимости от времени преинкубации: 5 (—) и 30 (---) мин в физиологическом растворе. Средние данные 8—11 опытов. * $P < 0,025$.

Как видно из рис. 1, при 5-минутной преинкубации срезов добавление ГАМК на 16-й мин приводило к увеличению высвобождения $\text{H}^3\text{-НА}$ на 455 расп/мин (статистически достоверному), которое, как было показано в нашей лаборатории, является Ca^{++} -зависимым [11]. Эти данные свидетельствуют о деполяризующем действии ГАМК на мембраны адренэргических нервных окончаний и согласуются с результатами электрофизиологических исследований, показывающих деполя-

ризацию мембран адренэргических клеток верхнего шейного симпатического ганглия [12, 13] под действием тех же концентраций ГАМК, которые применялись в наших исследованиях.

С физиологической точки зрения представляло интерес изучение действия ГАМК на высвобождение H^3 -НА, вызванное электрической стимуляцией. Чтобы приблизить изученные эффекты к физиологическим условиям применяли эффективную электрическую стимуляцию с наиболее низкими параметрами (5 В, 10 гц, 4 мсек). Результаты (рис. 2) показали потенцирующее действие ГАМК на высвобождение H^3 -НА, вызванное электрической стимуляцией, что несовместимо с увеличением его спонтанного выхода из мозговых срезов (рис. 1), свидетель-

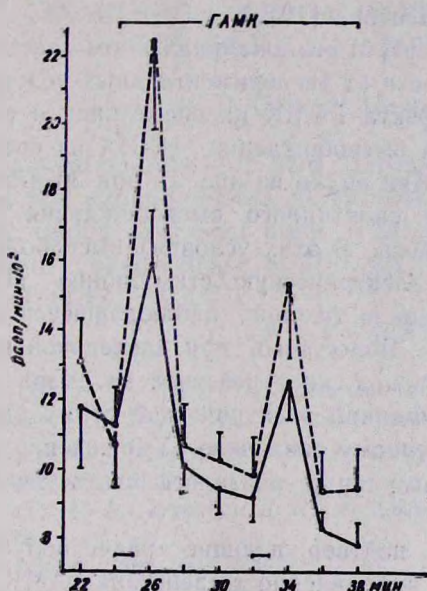


Рис. 2.

Рис. 2. Действие ГАМК на вызванное электрической стимуляцией (—|—) высвобождение H^3 -НА (удельная активность 8,9 кюри/мМ) из срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс при 5-минутной стимуляции. (—) контроль; (---) ГАМК. Средние данные 7—10 опытов.

* $P < 0,025$.

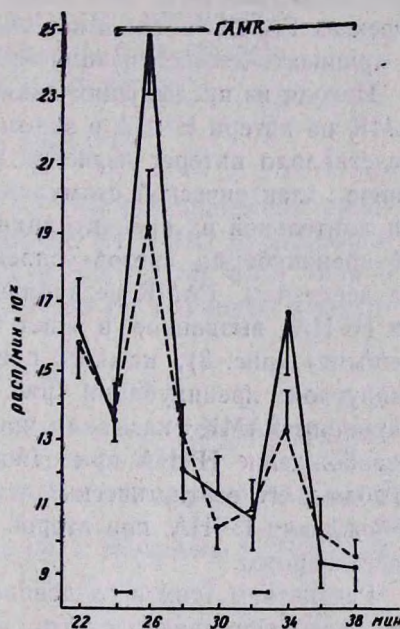


Рис. 3.

Рис. 3. Действие ГАМК на вызванное электрической стимуляцией (—|—) высвобождение H^3 -НА (удельная активность 8,9 кюри/мМ) из срезов мезо-диэнцефальной области мозга крыс после 30-минутной преинкубации. (—) контроль; (---) ГАМК. Средние данные 4 опытов.

* $P < 0,005$.

ствующего о деполяризации норадренэргических окончаний, находящихся в покое. В физиологических исследованиях принято считать, что деполяризация мембран нервных окончаний приводит к уменьшению вызванного высвобождения медиатора [14]. Уменьшение высвобождения H^3 -НА под действием ГАМК в ответ на электрическую сти-

муляцию наблюдалось нами в отношении семявыносящего протока крысы с низким содержанием в нем эндогенной ГАМК [15]. Известно, что в мозговой ткани находится значительное количество ГАМК, часть которого, по всей вероятности, высвобождается под действием электрической стимуляции срезов. Поэтому не исключено, что потенцирование вызванного явления осуществляется благодаря суммарному эффекту эндогенной и экзогенной ГАМК.

В наших экспериментах эффект ГАМК достоверен при первой электрической стимуляции и ее одновременном добавлении. Потенцирование же высвобождения H^3 -НА во время второй стимуляции на 32-й мин, через 8 мин после начала действия ГАМК оказывается статистически недостоверным. Эти данные, как и предыдущие [1], говорят об эффектах ГАМК только в начальные моменты, что, по-видимому, можно приписать десенситизации ее рецептора [13].

Исходя из предыдущих данных [1] о разнонаправленном действии ГАМК на потери H^3 -НА в зависимости от экспериментальных условий, представляло интерес изучение эффекта ГАМК на спонтанное и вызванное электрической стимуляцией высвобождение H^3 -НА из срезов при длительной их преинкубации. Как видно из рис. 1, при 30-минутной преинкубации срезов усиления спонтанного высвобождения НА под действием ГАМК не наблюдалось. В этих условиях высвобождение H^3 -НА, вызванное в ответ на электрическую стимуляцию (1133 расп/мин) (рис. 3), намного превышало таковое, наблюдавшееся при 5-минутной преинкубации (рис. 2). Более того, при длительной преинкубации ГАМК оказывала противоположное действие на вызванное высвобождение H^3 -НА при одновременной электрической стимуляции, приводя к его статистически достоверному снижению. Уменьшение высвобождения H^3 -НА при второй стимуляции оказалось статистически недостоверным.

Результаты этих исследований, подтверждающие ранее полученные, позволяют предположить, что направленность действия ГАМК на процессы высвобождения НА зависит от внутриклеточного ионного состава норадренэргических окончаний, который подвержен несомненным изменениям в зависимости от продолжительности инкубации [16, 17]. Исходя из известного положения о важном значении ионов Cl^- в действии ГАМК [12], можно предположить, что наблюдаемые разнонаправленные действия ГАМК, по всей вероятности, обусловлены повышением внутриклеточного содержания ионов Cl^- .

На основании изложенного, мы полагаем, что ГАМК является тонким пресинаптическим регулятором процесса высвобождения НА в мозге, и очень возможно, что подобная реверсия действия ГАМК может происходить в интактном мозге в зависимости от изменения функционального состояния норадренэргического нейрона.

ԳԱՄԱ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹՔՎԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՌՆԵՏԻ ՈՒՂԵՂԻ ՄԵԶՈ-ԴԻԷՆՅԵՖԱԼԻԿ ՀԱՏՎԱՄԻՑ
H³-ՆՈՐԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ ԱՆՋԱՄԱՆ ՎՐԱ

Մ. Դ. ՉԻՖԼԻԿԱՆ, Ն. Հ. ԵՍԱՅԱՆ

Գամա-ամինակարագթթուն (ԳԱԿԹ-ն) ուժեղացնում է H³-նորադրենալինի սպոնտան և էլեկտրական դրդապատճառով առաջացած անջատումը առնևտի ուղեղի մեզո-դիէնյեֆալիկ հատվածի կտրվածքներից: H³-նորադրենալինի անջատման պրոցեսի վրա ԳԱԿԹ-ի ազդեցության բնույթը կախված է կտրվածքների նախահնկութայի տեղությունից:

REGULATION OF H³-NORADRENALINE RELEASE
IN MESODIENCEPHALIC REGION OF RAT BRAIN
BY GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID

M. D. CHIFLIKIAN, N. H. YESSAIAN

Gamma-aminobutyric acid (GABA) (10^{-3} M) potentiates the spontaneous and evoked release of H³-noradrenaline (H³-NA) in mesodiencephalic region of the rat brain. The effect of GABA on both spontaneous and evoked release of H³-NA is reversed by prolonged preincubation of slices.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чифликян М. Д., Есаян Н. А., Манухин Б. Н. Физиол. журн. СССР, 7, 1978.
2. Yessaian N. H. В сб.: Вопр. биохимии мозга, 2, 96, Ереван, 1966.
3. Yessaian N. H., Armenian A. R., Arakelian L. H. В сб.: Вопр. биохимии мозга 3, 313, Ереван, 1967.
4. Yessaian N. H., Armentan A. R., Buniatian H. Ch. J. Neurochem. 16, 1425—1433, 1969.
5. Есаян Н. А. Докт. дисс., Ереван, 1971.
6. McIlwain H., Snyder S. H. J. Neurochem. 176, 521—530, 1970.
7. McIlwain H. Practical Neurochem. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.
8. Baldessarini R. J., Kopin I. J. Science. 152, 1630—1631, 1966.
9. Katz R. J., Kopin I. J. Biochem. Pharmacol., 18, 1935—1939, 1969.
10. Orrego F., Jankelevich J., Ceruti L., Ferrera E. Nature (Lond) 251, 55—57, 1974.
11. Аракелян Л. Н., Есаян Н. А. Биологический журнал Армении, 31, 5, 1978.
12. Adams P R., Brown B. A. J. Physiol., 250, 85—120, 1975.
13. Bowery N. G., Brown D. A. Br. J. Pharmacol., 50, 205—218, 1974.
14. Eccles J. C., Schmidt R., Wills W. D. J. Physiol., 168, 500—530, 1963.
15. Арменян А. Р., Есаян Н. А. Биологический журнал Армении, 1978 (в печати).
16. Gibson I. M., McIlwain H. J. Physiol. (Lond) 176, 261—283, 1965.
17. Campbell C. W. B. Brain Res., 101, 594—599, 1976.

О НЕКОТОРЫХ ВОПРОСАХ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС

В. О. БАРСЕГЯН, Л. В. САРКИСЯН, Г. Т. АДУНЦ

Под действием ультразвука щелочная фосфатаза почек белых крыс претерпевает существенные изменения. Активирование фермента происходит за счет образования активных радикалов, которые легко окисляют или восстанавливают вещества, связанные с его активным центром.

Вопросы регуляции щелочной фосфатазы затрагивались многими исследователями [1—5].

Наши предыдущие исследования на гомогенатах печени и почек белых крыс и кроликов [6], проведенные с использованием двух субстратов (пара-нитрофенилфосфат бария и β -глицерофосфат натрия), внесли определенную ясность в характер действия щелочной фосфатазы. Однако до настоящего времени нет ясного представления относительно изменения ее активности в срезах, гомогенатах и субклеточных фракциях при хранении.

Материал и методика. Опыты ставились на гомогенате, срезах, микросомальной и митохондриальной фракциях почек белых крыс в свежем состоянии и при хранении их в течение 24, 48, 72, 96 и 120 час. Активность щелочной фосфатазы с использованием субстрата β -глицерофосфата натрия (рН 9,6) определяли по методу Боданского [7], неорганический фосфор—по Лоури и Лопесу [8]. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося от субстрата фосфата на 1 г ткани за час инкубации. Колориметрировали при длине волны 630 мкм.

При использовании пара-нитрофенилфосфата (рН 10,5) ферментативную активность определяли по методу Шлыгина и Михлина [9]. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося фенола на 1 г ткани за 5 мин. Измерение производили при длине волны 420 мкм.

С целью выявления механизма активирования щелочной фосфатазы при хранении применяли ультразвук частотой 880 кГц, интенсивностью 5 Вт/см², при длительности воздействия 10 мин. Озвучивание проводилось в специальной термостатированной кювете, изготовленной нами, в которой поддерживалась постоянная температура (25°).

Результаты и обсуждение. Ранее полученные нами данные показали, что при хранении гомогената почек белых крыс в течение суток при температуре 4° активность щелочной фосфатазы значительно увеличивается [6]. Однако нам не удалось проникнуть в механизм активации фермента в этих условиях и найти пути регуляции этого процесса.

Нами было показано также, что под действием ультразвука активность щелочной фосфатазы в гомогенате и цельной ткани почек белых крыс резко возрастает [10]. Идентичность полученных результатов (при хранении в течение суток и озвучивании) привела к мысли об одновременном испытании этих двух факторов.

Поскольку щелочная фосфатаза в основном локализована в лизосомальной фракции, представлялось целесообразным для сравнения изучить также регуляцию активности фермента в полученных клеточных фракциях (митохондриях с лизосомами и микросомах).

Цельную ткань, гомогенат и клеточные фракции предварительно озвучивали, после чего хранили в течение 24, 48, 72, 96 и 120 час. при температуре 4°.

Приведенные рисунки показывают, что активность коркового слоя гомогената и цельной ткани почек белых крыс превалирует над таковой мозгового. По-видимому, это связано с неодинаковым распределением фермента в этих слоях почек. При хранении гомогенатов коркового и мозгового слоев в течение нескольких суток (рис. 1) наблюдает-

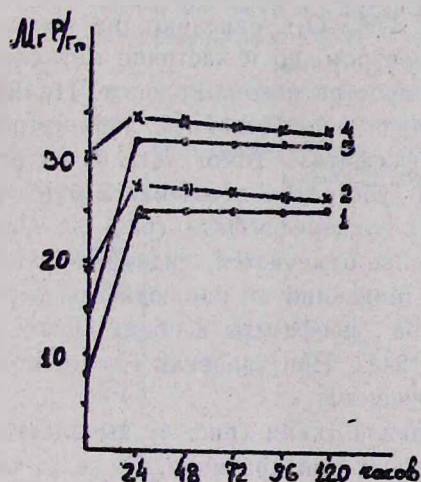


Рис. 1.

Рис. 1. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы гомогенатов мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат β -глицерофосфат натрия. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

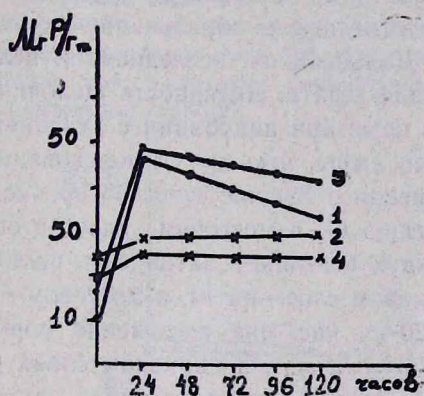


Рис. 2.

Рис. 2. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы цельной ткани мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат β -глицерофосфат-натрия. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

ся резкое увеличение активности щелочной фосфатазы лишь в первые 24 час. (на 210%—в мозговом слое, на 120%—в корковом), после чего она стабилизируется. Ультразвук увеличивает активность фермента свежего гомогената в обоих слоях в среднем на 120%, а при хранении его в течение суток изучаемый показатель в мозговом слое повышает-

ся еще на 28%, но при дальнейшем хранении он не претерпевает особых изменений. Как видно из рисунка, активность фермента в обоих гомогенатах под действием ультразвука одинакова, однако при хранении в мозговом слое она выше, чем в корковом на 90%. Такое повышение активности, вероятно, происходит за счет блокирования ряда связанных ингибиторов, которые имеются в достаточно большом количестве в мозговом слое.

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что процент активации при хранении тканей мозгового и коркового слоев составляет 340 и 300 соответственно, что намного превышает аналогичный показатель при хранении гомогенатов. Это можно объяснить высвобождением ингибиторов при гомогенизировании, что исключается в цельной ткани.

Ультразвук активирует щелочную фосфатазу цельной ткани коркового слоя в минимальной степени, а мозгового—на 125%, при хранении же тканей в течение 120-ти час. активность фермента не меняется. Фактически нарушение целостности ткани при гомогенизировании влечет за собой частичное разрушение веществ, связанных с активным центром изучаемого фермента. Под действием ультразвука в цельной ткани образовавшиеся радикалы ($\dot{H}$, $OH\dot{H}$, O_2) окисляют не только ингибиторы, связанные с активным центром, но и частично металлы, ответственные за образование фермент-субстратного комплекса [11, 12].

Дальнейшие исследования велись с использованием пара-нитрофенилфосфата. Активность щелочной фосфатазы гомогената почек белых крыс при инкубации с указанным субстратом в течение 5 мин гораздо выше, чем при использовании β -глицерофосфата (рис. 3). При хранении в течение суток в корковом слое отмечается тенденция к увеличению ее, в мозговом слое этой тенденции не наблюдается. Ультразвук повышает активность щелочной фосфатазы в обоих слоях: в корковом слое—на 14, в мозговом—на 24%. При хранении гомогенатов к 120-му час. она постепенно нормализуется.

В мозговом и корковом слоях цельной ткани (рис. 4) выявляется более низкая ферментативная активность при хранении, после 24-часового хранения в корковом слое она повышается (на 44%), а в мозговом остается на постоянном уровне. Ультразвук повышает активность фермента в обоих слоях почек белых крыс, в корковом слое на 21, мозговом—на 25%, затем при хранении в течение времени в мозговом слое она резко снижается, а в корковом остается постоянной.

На рис. 5, 6 приведены данные, касающиеся активности щелочной фосфатазы отдельных клеточных фракций при озвучивании и хранении с применением обоих субстратов. Оказалось, что озвучивание не влияет на ферментативную активность полученных фракций в норме и при хранении в течение 120-ти часов.

Таким образом, наиболее высокая активность щелочной фосфатазы при хранении отмечена в цельной ткани, в гомогенате она ниже, а в клеточных фракциях отсутствует. Выявленная закономерность под-

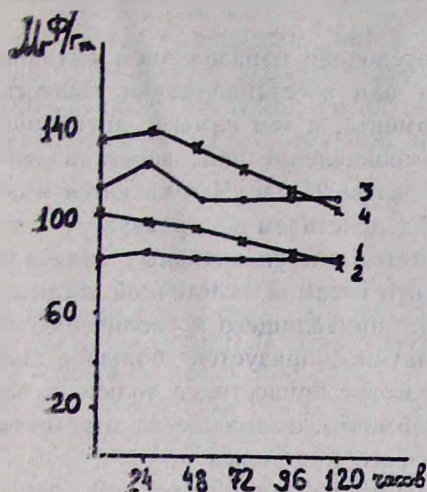


Рис. 3.

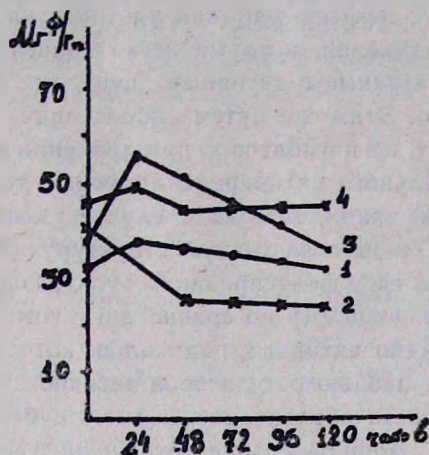


Рис. 4.

Рис. 3. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы гомогенатов мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

Рис. 4. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы цельной ткани мозгового и коркового слоев почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—мозговой слой, 2—мозговой слой—УЗ, 3—корковый слой, 4—корковый слой—УЗ.

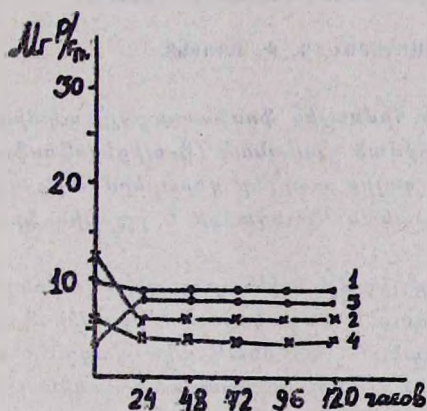


Рис. 5.

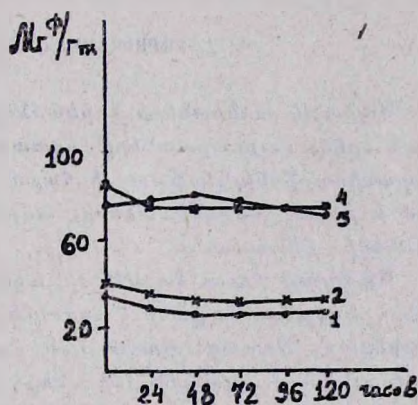


Рис. 6.

Рис. 5. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы субклеточных фракций почек белых крыс. Субстрат β-глицерофосфат натрия. 1—митохондрии, 2—митохондрии—УЗ, 3—микросомы, 4—микросомы—УЗ.

Рис. 6. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы субклеточных фракций почек белых крыс. Субстрат пара-нитрофенилфосфат бария. 1—митохондрии, 2—митохондрии—УЗ, 3—микросомы, 4—микросомы—УЗ.

тверждает, что при нарушении целостности ткани эффект активации фермента резко снижается.

Эффект действия ультразвука обусловлен образованием активных радикалов, которые легко окисляют или восстанавливают вещества, связанные с активным центром фермента, и тем самым активируют его. Этим же путем происходит самоокисление или восстановление тех же ингибиторов при хранении в течение 24 час. Что касается минимального активирования фермента под действием ультразвука в цельной ткани, то в этом случае уменьшается доступ активных радикалов из воды в клеточную структуру, но зато в самой клеточной жидкости (за счет фокусирования ультразвука, приводящего к увеличению интенсивности) по сравнению с гомогенатом образуется большое количество активных радикалов, которые могут привести не только к блокированию регуляторов активности фермента, но и веществ, ответственных за образование фермент-субстратного комплекса.

Избирательное отношение фермента из одной и той же ткани к различным субстратам говорит о том, что активные центры его, ответственные за образование комплексов с этими двумя субстратами, по-видимому, отличаются в этом отношении друг от друга.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 22.II 1978 г.

ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՐՈՇ ՀԱՐՑԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Վ. Հ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՏ

Սպիտակ առնետների երիկամների հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության երկու սուբստրատների օգտագործման ժամանակ (β -գլիցերոֆոսֆատ, պարանիտրոֆենիլֆոսֆատ) ի հայտ է գալիս տարբեր վերաբերմունք՝ պահված և թարմ հոմոգենատների, ամբողջական հյուսվածքի և բջջային ֆրակցիաների նկատմամբ:

Պահելուց հետո ֆերմենտի ակտիվացումը ամենաբարձրն է ամբողջական հյուսվածքում, ցածր է հոմոգենատում և բացակայում է բջջային ֆրակցիաներում: Ճառագայթահարման ժամանակ ֆերմենտի ակտիվացումը տեղի է ունենում ուլտրաձայնի ներգործությամբ առաջացած ռադիկալներով և ակտիվ կենտրոնի հետ կապված նյութերի փոխազդեցության հաշվին:

ON THE REGULATION OF RAT KIDNEY ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

V. O. BARSEGHIAN, L. V. SARKISSIAN, G. T. ADUNTS

It has been shown that in the case of using of two substrates a different pattern in the activities of alkaline phosphatase of rat kidney has been observed in the storeg and fresh homogenates of intact tissue and subcellular fractions.

The highest activity of the enzyme is presented in the intact tissue, lower in the homogenate, but it is not observed in the subcellular fractions. The enzyme activation takes place due to the formation of active radicals under the influence of ultra-sound. These radicals catalyze the oxydation of the substances that are combined with its active centre.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Stein S. S., Koshland D. E.* Arch. Biochem. Biophys., 39, 229, 1952.
2. *Berthet F., De Duve C.* Biochem. J., 50, 174, 1951.
3. *Cohn M. J.* Biol. Chem., 201, 735, 1953.
4. *Kennedy F. S., Hill H. A. O., Kaden T. A., Vallee B. L.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 6, 1533, 1972.
5. *Ahlert J.* Biochem. J., 141, 1, 257, 1974.
6. *Адуң Г. Т., Саркисян Л. В.* Изв. АН АрмССР (биол. науки), 15, 7, 1962.
7. *Bodansky A.* J. Biol. Chem. 101, 93, 1933.
8. *Lowry O. H., Lopez J. A.* J. Biol. Chem., 162, 3, 421, 1946.
9. *Шлыгин Г. К., Михлин С. Я.* Вопросы мед. химии, 1, 461, 1955.
10. *Барсегян В. О., Адуң Г. Т., Сарвазян А. П.* Уч. зап. ЕрГУ, 1, 1976.
11. *Anbar M., Pecht J.* Phys. Chem., 68, 352, 1964.
12. *Weissber A. J.* Acoust. Soc. Amer., 32, 283, 1960.

НОВЫЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДОПЕПТИДАЗ

Т. Н. АКОПЯН, Л. В. КАРАБАШЯН, А. А. АРУТЮНЯН, А. А. ГАЛОЯН

Предложен чувствительный флуоресцентный метод измерения эндопептидазной активности, основанный на применении в качестве субстрата фосфопиридоксильного аналога глобина. Определение активности эндопептидаз проводится путем измерения сигнала флуоресценции фосфопиридоксильных остатков ТХУ-растворимых пептидов, которые образуются в процессе ферментативного гидролиза. Предложенный метод позволяет определить не менее 10 пмоль превращения субстрата.

В настоящее время существует ряд методов определения активности протеолитических ферментов, имеющих эндопептидазную природу. Большинство из них, например, метод Аксона [1] или его модифицированный вариант [2], обладает малой чувствительностью. Другие методы, обладая относительно высокой чувствительностью [3—5], требуют отсутствия в инкубационной смеси соединений, содержащих аминоксигруппы. Между тем, в ряде случаев удаление таких соединений из реакционной смеси представляет трудоемкий процесс. Так, при исследовании спектра протеолитических ферментов методом изоэлектрической фокусировки фракции, собранные из колонки, содержат амфолиты (полиамино-поликарбоновые кислоты), для удаления которых необходимы длительный диализ или пропускание через колонку с сефадексом всех полученных фракций. В подобных случаях целесообразно использовать в качестве субстратов белки, обладающие чувствительной «сигнальной группой» — радиоактивной меткой [6], или флуоресцентным хромофором [7].

В настоящей работе описан чувствительный флуоресцентный метод измерения эндопептидазной активности, основанный на применении в качестве субстрата фосфопиридоксильного аналога глобина.

Материал и методика. В работе использовали: глобин (Олайнровский завод хим. реактивов), пиридоксаль-5-фосфат (пиридоксаль-Р) (фирма Reanal, ВНР), химотрипсин (фирма Worthington, США).

Получение фосфопиридоксильного производного глобина (Р-Рху-глобина). 4 г глобина растворяли в 300 мл воды, содержащей 3 М гуанидин хлорида, и рН смеси доводили до 9,8 добавлением 2 М NaOH. В этот раствор добавляли 600 мг пиридоксаль-Р и полученную смесь инкубировали при 37° в течение 2 час., затем постепенно добавляли боргидрид натрия до исчезновения ярко-желтой окраски. Через час реакционную смесь ставили на диализ против воды в течение 72 час. Полученный препарат использовали в качестве субстрата для протеолитических ферментов.

Измерение активности ферментов. Пробы для измерения активности пепсина и химотрипсина объемом 1 мл содержали 80 мкг Р-Рху-глобина, по 50 мкмоль цитратного (для пепсина) или фосфатного (для химотрипсина) буфера (рН 3.2 и 7.6 соответственно). После инкубации при 37° в течение часа в пробы добавляли 0.25 мл ТХУ, центрифугировали при 5000 g и рН надосадочной жидкости доводили до 5.5 добавлением 1 M лимоннокислого натрия. Интенсивность флуоресценции полученного раствора определяли на спектрофлуорометре Farrand (возбуждение 330 нм, испускание 410 нм). В качестве контроля служили образцы фермента и субстрата, инкубированные раздельно.

Результаты и обсуждение. Известно, что при щелочных значениях рН пиридоксаль-Р взаимодействует с ε-аминогруппами лизиновых остатков белков, образуя основание Шиффа, восстановление которого с помощью боргидрида натрия приводит к ковалентной сшивке этого хромофора с белком. Образующееся производное белка приобретает новые спектральные характеристики (поглощение—при 330 нм, флуоресценция—в области 410 нм), которые обусловлены оптическими свойствами фосфопиридоксильного остатка модифицированного белка и не перекрываются спектральными характеристиками ароматических остатков самого белка.

В качестве белкового субстрата, который был подвергнут модификации пиридоксаль-Р, нами был использован глобин, поскольку известно, что он расщепляется под действием широкого спектра эндопептидаз и содержит большое количество лизиновых остатков. Для обеспечения алкилирования возможно большего количества лизиновых остатков глобина модификацию проводили в присутствии значительного избытка пиридоксаль-Р в 3 M растворе гуанидин хлорида. Количество связанного с глобином пиридоксаль-Р определяли исходя из молярного коэффициента экстинкции фосфопиридоксиллизина, который в области рН 5—8 равен 10600 при 330 нм [8]. На рис. 1 представлен спектр погло-

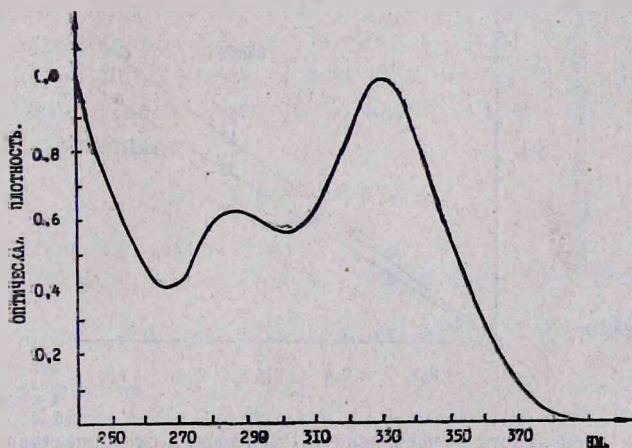


Рис. 1. Спектр поглощения Р-Рху-глобина. Концентрация белка 0,55 мг/мл.

жения Р-Рху-глобина. Сопоставление концентрации фосфопиридоксильного остатка и белка показывает, что на один моль белка приходится 10

моль фосфопиридоксильного остатка. Такой уровень модификации обеспечивает достаточно интенсивную флуоресценцию Р-Рху-глобина. На рис. 2 приведена зависимость сигнала флуоресценции Р-Рху-глобина от его концентрации. Видно, что существует прямолинейная зависимость интенсивности флуоресценции при концентрациях белка 0,1—25 мкг/мл. Величина сигнала флуоресценции пиридоксаминна, который

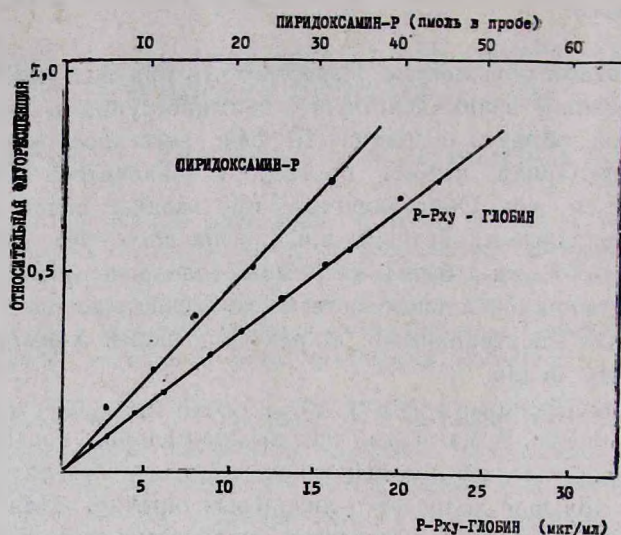


Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от концентрации Р-Рху-глобина и пиридоксамин—Р.

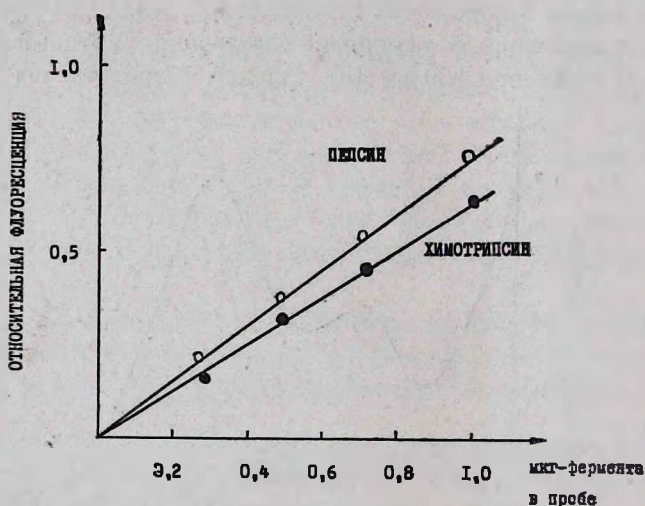


Рис. 3. Зависимость расщепления Р-Рху-глобина от концентрации пепсина и химотрипсина.

был использован в качестве модели фосфопиридоксильного остатка Р-Рху-глобина, указывает, что этим методом можно обнаружить.

Институт биохимии
АН АрмССР

ԼՆՌՈՊԵՊՏԻԴԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ
ՆՈՐ ԶԳԱՅՈՒՆ ՄԵԹՈՂ

Օգտագործելով պիրիդոքսալ-5-ֆոսֆատով մոդիֆիկացված գլոբինը որպես սուբստրատ, մշակվել է էնդոպեպտիդազաների ակտիվության որոշման նոր մեթոդ: Ակտիվությունը որոշվում է՝ չափելով թթվում լուծված ֆոսֆոպիրիդոքսալ պեպտիդների ֆլուորեսցենցիայի մեծությունը ֆերմենտների ազդեցությունից հետո:

A NEW SENSITIVE ASSAY FOR DETERMINATION OF ENDOPEPTIDASE ACTIVITY

A fluorescent method is described that permits the assay of endopeptidase on globin substrate modified by pyridoxal-5-phosphate. Determination of endopeptidase activity is carried out by means of measuring of the signal of fluorescence of acid soluble peptides after enzyme action. The described method permits to detect not less than 10 pmol of the substrate breakdown.

1. Anson M. L. J. Gen. Phys., 22, 79, 1938.
2. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
3. Perlmann G., Lorand L. Proteolytic Enzymes, Methods in Enzymology, 19, 534, 1970.
4. Schwabe C. Anal. Biochem., 53, 484, 1973.
5. Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. А., Галоян А. А. Биологический журнал Армении, 30, 11, 57, 1977.
6. Bohley P., Miehe C., Miehe M., Ansofrage S., Kirschke H., Langner J., Wiederanders B. Acta Biol. Med. Germ., 28, 323, 1972.
7. DeLumen B. O., Tappel A. L. Anal. Biochem., 36, 22, 1970.
8. Fisher E. H., Forey A. W., Hedrich I. L., Hughes R. C., Kant A. B., Krebs E. G. In Chem. and Biol. Aspect of Pyridoxal Catalysis., Pergamon Press., 234, 2963.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РИФАМПИЦИНРЕЗИСТЕНТНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАНТОВ E. COLI B/г

М. Г. ОГАНЕСЯН, А. В. АРУТЮНЯН

Было получено и изучено 200 рифампицинрезистентных РНК-полимеразных мутантов у E. coli B/г. Анализ показал, что у 5 мутантов проявляется высокоплейотропный эффект таких мутаций. Изменению подвергаются такие свойства как термочувствительность, ауксотрофность, способность супрессировать нонсенс мутации, генерационное время, что связано с изменениями свойств РНК-полимеразы.

Показано, что условнолетальные мутации в гене 43 бактериофага T4 (ген, контролирующий биосинтез ДНК-полимеразы) обладают мутаторным эффектом, обусловленным тем, что мутантный фермент допускает ошибки при репликации ДНК [1]. Исходя из общности функций (матричная конденсация нуклеотидов) ферментов ДНК- и РНК-полимеразы, было высказано предположение, что мутантные РНК-полимеразы могут допускать ошибки на разных стадиях (узнавание, инициация, элонгация, терминация) процесса транскрипции генетической информации [2].

При этом предполагалось, что такого рода мутации должны иметь плейотропное (множественное) действие, поскольку РНК-полимераза участвует в транскрипции большинства (если не всех) генов. Действительно, удалось получить рифампицинрезистентные (затрагивают ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы) мутанты E. coli K12 с высокоплейотропным эффектом [3].

Изучение около 80 РНК-полимеразных мутаций, полученных у штаммов E. coli K12, несущих амберные (SupD, SupE, SupF), охровый (SupC) и опаловый (UGA1) супрессоры, показало, что ряд мутантов претерпел изменение таких свойств, как термочувствительность, способность синтезировать важнейшие метаболиты (аминокислоты, нуклеотиды, витамины), характер супрессии нонсенс мутаций у бактерий (по способности сбрасывать лактозу или синтезировать триптофан) и бактериофагов, а также морфо-физиологические особенности клеток и их колоний [4].

В сообщении описываются рифампицинрезистентные РНК-полимеразные мутации с высокоплейотропным эффектом, полученные у E. coli B/г с целью отбора мутантов, пригодных для изучения приро-

ды возможных ошибок, допускаемых мутантной РНК-полимеразой при транскрипции генетической информации.

Материал и методика. Использовали штамм *E. coli* В/г WU36 — 10 — 11 — 12 *leu_{am} tyr_{oc} SupE_{oc}*. В результате супрессии нонсенс мутаций в лейциновом и тирозиновом генах *SupE_{oc}* супрессором (охровый конвертант супрессора *SupE*) фенотипически штамм становится прототрофом.

Был использован фаг Т4В и его производные, содержащие нонсенс мутации (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Нонсенс мутанты фага Т4В

Фаг	Природа мутации	Чувствительность к супрессору
Н—78	амберная	SupД SupЕ
Н ₂ —16	амберная	SupЕ
Н ₂ —36	амберная	SupД SupЕ
Н ₃ —44	амберная	SupЕ SupF
Н ₃ —54	амберная	SupЕ SupF
ос—3	охровая	SupВ
ос—5	охровая	SupС

Минимальной средой (МС) служила М9 [5], L-аминокислоты добавлялись в концентрации 20 мкг/мл. В качестве полноценных сред (ПС) применяли мясопептонный бульон (МПБ), индикаторную среду Эндо и Т-среду, содержащую дрожжевой экстракт 5 г, пептон 10 г и NaCl 5 г на 1 л H₂O; после стерилизации добавляли глюкозу (0,1%).

Были использованы кристаллические препараты рифампицина («Lowson» Англия) и стрептомицинсульфата (отечественного производства). За исключением особо отмеченных случаев, концентрация рифампицина равнялась 50 мкг/мл, стрептомицинсульфата — 100 мкг/мл.

Выделение спонтанных рифампицинустойчивых мутантов. Клетки штамма WU36 — 10—11—12, взятые из отдельных колоний, выращивались в пробирках с МПБ до титра $3-5 \times 10^8$ клеток/мл. Затем из каждой культуры по $2-4 \times 10^7$ клеток переносились в пробирки с МПБ, содержащим 50 мкг/мл рифампицина и инкубировались 48 час. при 37°. Из пробирок с помутневшим бульоном клетки переносились на среду Эндо, содержащую рифампицин в той же концентрации, и инкубировались при 37°. Колонии, образовавшиеся после 48-часовой инкубации из серийных разведений пересевались еще трижды на ту же среду для получения чистых линий мутантов.

Методы анализа рифампицинустойчивых мутантов. Ауксотрофность и термочувствительность определялись по росту на месте капель бактериальных суспензий или штрихов на полноценной и минимальных синтетических средах при 37° и 42°. Способность поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В определялась по Бензеру [6]. Используемые мутанты фага приведены в табл. 1. Одноочный цикл размножения (ОЦР) фага Т4В определялся по Элио и Дельбрюку [7], лактозосбраживающая способность — по окраске колоний на индикаторной среде Эндо.

Бактерии выращивались в Т-среде при усиленной аэрации. Через определенные промежутки времени брались пробы для определения титра. На стадии логарифмического роста определялось значение времени генерации по формуле [8]:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{3,3 \lg \frac{B}{b}}$$

где g — время генерации, b — титр в момент t_1 , B — титр в момент t_2 .

Ночные культуры бактерий после 2-часового выращивания в свежей питательной среде высевались на чашки со средой Эндо. После 40-часовой инкубации при 37° исследовались размеры и форма колоний.

Результаты и обсуждение. Рифампицинрезистентные (риф-р) мутанты были получены у штамма WU36—10—11—12, содержащего две нонсенс мутации (амберную—в лейциновом гене, охровую—в тирозиновом) и SupE_{oc} супрессор, который подавляет проявление обеих нонсенс мутаций. Выбор этого штамма был обусловлен тем, что наличие системы нонсенс супрессии позволяло сравнительно легко отобрать риф-р мутации с плеiotропным действием, поскольку даже незначительные изменения выражения супрессорного гена (что могло произойти под влиянием риф-р мутации) должны были заметно повлиять на фенотип организма. Подобные изменения в проявлении каких-либо других генов могли остаться незамеченными.

Рост исходного штамма на полноценной агаризованной среде полностью подавляется концентрацией рифампицина 15 мкг/мл, а на минимальной—5 мкг/мл. Проверено 200 риф-р мутантов, которые по устойчивости к рифампицину подразделялись на две основные группы: 1—устойчивые к дозам антибиотика до 150 мкг/мл (мутанты groB401, groB402, groB403) и 2—способные расти при концентрации антибиотика более 400 мкг/мл (groB409, groB423).

Таблица 2
Минимальные концентрации рифампицина,
подавляющие рост риф-р мутантов на
ПС и МС при 37°

Группа	Штамм	Концентрация рифампицина, мкг/мл	
		МС	ПС
I	WU36—10—11—12	5	15
	{ groB 402	25	75
	{ groB 403	30	100
	{ groB 401	70	150
II	{ groB 409	>100	>400
	{ groB 423	>100	>400

Из табл. 2 видно, что как мутанты, так и исходный штамм на минимальной среде более чувствительны к рифампицину, чем на полноценной. При 27° риф-р мутанты по рифампицинчувствительности не отличаются от родительской культуры.

С целью отбора риф-р мутантов, отличающихся от исходного штамма помимо устойчивости к рифампицину и по другим признакам, был проведен их физиологический анализ. Исследовались следующие свойства штаммов: ауксотрофность, термочувствительность, супрессирующая способность SupI_{oc} супрессора, способность поддерживать

развитие дикого фага Т4В, способность сбраживать лактозу, время генерации и морфология колоний.

Ауксотрофность и термочувствительность. Ауксотрофность определялась высевом штаммов на минимальную среду. В результате этих опытов были выделены 3 ауксотрофных риф-р мутанта (groB401, groB409 и groB423). При идентификации ауксотрофности в первую очередь была проверена зависимость роста этих мутантов от лейцина и тирозина, поскольку, как было указано, даже небольшие нарушения супрессии нонсенс мутаций в лейциновом и тирозиновом генах могли привести к их фенотипическому проявлению. Причем, мутант может нуждаться или в одной из указанных аминокислот, или одновременно в обеих.

Таблица 3

Рост риф-р мутантов на ПС и МС при 37° и 42°

Температура	Штамм	ПС	МС	МС с добавками		
				лей	тир	лей + тир
37°	WU36—10—11—12	3	3	3	3	3
	groB 401	3	0	3	0	3
	groB 402	3	3	3	3	3
	groB 403	3	3	3	3	3
	groB 409	3	0	3	3	3
	groB 423	3	0	0	0	3
42°	WU36—10—11—12	3	3	3	3	3
	groB 401	3	0	0	0	3
	groB 402	3	3	3	3	3
	groB 403	3	0	0	0	0
	groB 409	3	0	3	0	3
	groB 423	3	0	0	0	3

Обозначения: лей—лейцин, тир—тирозин, 3—нормальный рост, 0—отсутствие роста.

Результаты опытов (табл. 3) свидетельствуют о том, что groB401 нуждается в лейцине, groB423—в лейцине и тирозине, а groB409 растет при добавке в среду либо лейцина, либо тирозина.

Наблюдается зависимость потребности в факторах роста от температуры инкубации. Сравнив данные, приведенные в табл. 3, можно заметить, что мутант groB401, нуждающийся при 37° в лейцине, при 42° нуждается и в лейцине, и в тирозине; groB409 при высокой температуре растет лишь на средах, содержащих лейцин, в то время как при 37° рост его поддерживается также тирозином. Мутант groB403 не растет при высокой температуре ни на одной из использованных сред, кроме сред, содержащих дрожжевой экстракт. Попытка идентифицировать потребность в факторах роста этого мутанта методом Холлидея [9] не увенчалась успехом.

Для того, чтобы определить обусловлена ли ауксотрофность этих мутантов нарушением супрессии нонсенс мутаций, была проверена способность SupEос супрессора подавлять нонсенс мутации в фаговом геноме.

Способность риф-р мутантов поддерживать развитие нонсенс мутантов фага T4B. О супрессирующей способности SupEос супрессора судили по развитию фагов, производных T4B, содержащих амберную и охровую мутации (табл. 4).

Данные, представленные в табл. 4, показывают, что только у мутанта гроВ423 полностью утрачена способность супрессировать как амберные, так и охровые мутации фагов T4B. У остальных мутантов в зависимости от температуры полностью или частично утрачивается способность супрессировать только амберные мутации фага T4B. Однако следует отметить, что мутант гроВ403 в отличие от исходной культуры приобретает способность при 37° поддерживать развитие фагов H-78 и H₂-36. Эти результаты говорят в пользу предположения о том, что ауксотрофность риф-р мутантов может быть обусловлена утратой способности SupEос эффективно супрессировать амберные или амберные и охровые мутации, особенно при 42°.

ОЦР фага T4B. Большинство выделенных риф-р мутантов нормально поддерживает развитие дикого фага T4B. Мутант гроВ402 отличается по этому свойству от родительского штамма и других риф-р мутантов. Как видно из табл. 4, фаг T4B очень слабо развивается на гроВ402, о чем свидетельствуют также результаты опыта по определению одиночного цикла и кинетики размножения фага T4B (рис. 1).

Выход фага в случае исходного штамма составляет 240 фаговых частиц на клетку, а у мутанта гроВ402 в 30 раз меньше (8 фаговых частиц).

Родительский штамм независимо от температуры нормально сбраживает лактозу. Мутант гроВ401 при 27° на среде Эндо образует колонии светло-розового цвета. Это свидетельствует о том, что он при низкой температуре либо не сбраживает лактозу, либо сбраживает много хуже, чем исходный штамм. При высоких температурах (37° и 42°) эта способность частично восстанавливается.

Эксперименты по определению времени генерации показывают, что риф-р мутанты растут медленнее исходной культуры WU36—10—11—12. Время генерации (мин): WU36—10—11—12—25, гроВ409—30, гроВ401—43, гроВ403—58, гроВ402—60.

Среди риф-р мутантов оказались также колонии которых морфологически отличаются от колоний родительского штамма. Колонии мутантов гроВ402 и гроВ403 много меньше колоний WU36—10—11—12. При инкубации более 30 час. соотношение размеров колоний не изменяется. Колонии мутанта гроВ401 плоские, шероховатые, с изрезанными краями и неправильной формы.

Таблица 4

Развитие консенс мутантов фага T4B

Фаг	Ш т л м м											
	WU36—10—11—12		гpo B 401		гpo B 402		гpo B 403		гpo B 409		гpo B 423	
	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°
H—78	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—
H ₂ —16	+++	+++	—	—	+	+	+++	+	++	+	—	—
H ₂ —36	—	—	—	—	—	—	+++	++	—	—	—	—
H ₂ —44	+++	+++	—	—	+	+	+++	++	++	+	—	—
H ₂ —54	+++	+++	++	—	+	+	+++	++	++	+	—	—
oc—3	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	—	—
oc—5	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	—	—
T4B	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Обозначения: +++ — нормальный рост фагов, ++ — ослабленный рост, + — очень слабый рост — — отсутствие роста.

Таким образом, результаты анализа позволили выделить 5 риф-р мутантов, которые помимо устойчивости к рифампицину отличаются от исходного штамма еще по одному или более признакам.

У штамма *E. coli* В/г WU36—10—11—12 получено 200 спонтанных риф-р мутантов. Чтобы практически исключить возможность отбора множественных мутантов, мутагены не применялись.

По своему основному признаку—рифампицинрезистентности—мутанты отличаются друг от друга. Ряд мутантов устойчив к высоким концентрациям рифампицина (400 мкг/мл и более), в то время как рост трех мутантов (гроВ401, гроВ402 и гроВ403) подавляется концентрацией антибиотика до 150 мкг/мл. *In vitro* синтез РНК, осуществляемый ферментами, выделенными из этих мутантов, также более чувствителен к рифампицину [10].

Было отобрано 5 риф-р мутантов (гроВ401, гроВ402, гроВ403, гроВ409 и гроВ423), которые отличаются друг от друга и от исходного штамма по ряду фенотипических признаков: аутокотрофности, термочувствительности, способности поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В, кинетике развития и выходу фага Т4В, способности сбраживать лактозу, времени генерации, морфологии колоний.

Результаты *in vitro* изучения синтеза РНК, выделенной из этих мутантов РНК-полимеразой, в присутствии рифампицина свидетельствуют о том, что рифампицинрезистентность мутантов обусловлена изменением свойств РНК-полимеразы [10].

Так как условия отбора риф-р мутантов практически исключали отбор множественных мутантов, можно предположить, что изменение одновременно с рифампицинустойчивостью ряда свойств клетки является результатом плейотропного действия риф-р мутаций.

Фялпал ВНИИ генетики,
г. Чаренцаван

Поступило 13.II 1978 г.

E. coli В/г ՇՏԱՄԻ ՄՈՏ ՌԻՖԱՄՊԻՑԻՆԱԿԱՅՈՒՆ ՌԵՔՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ
ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄՏԱՅՈՒՄԸ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

E. coli В/г շտամի մոտ ստացվել է ուսումնասիրվել են 200 ռիֆամպիցինակալուն ՌՆԹ-պոլիմերազային մոտանտների, Փորձերի տվյալները ցույց տվեցին, որ հինգ մոտանտների մոտ արտահայտվում է այդ տիպի մոտացիաների բարձր պլեյոտրոպ էֆեկտ: Փոփոխվում են նաև շերմազգայնությունը, աուքսոտրոֆությունը, նոնսենս մոտացիաների սուպրեսսացման ունակությունը, գեներացիոն ժամանակը: Նշված փոփոխությունները կապված են ՌՆԹ-պոլիմերազի հատկությունների փոփոխման հետ:

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RIFAMPICYNE- RESISTANT RNA-POLYMERASE MUTANTS OF ESCHERICHIA COLI B/r

M. G. OGANESSIAN, A. V. ARUTYUNIAN

200 rifampicyne-resistant RNA-polymerase mutants of *Escherichia coli* B/r have been isolated and studied. The results presented in the paper indicate that 5 mutants demonstrate high pleiotropic effect. Subject to a change are such properties as thermosensitivity, auxotrophy, nonsense mutations suppressing ability and generation time of mutants, and this is related to the changes of RNA-polymerase properties.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Speyer J. F., Karam J. D., Lenny A. B.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 693, 1966.
2. *Оганесян М. Г.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 3, Ереван, 1970.
3. *Оганесян М. Г.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 30, Ереван, 1970.
4. *Оганесян М. Г.* Ингибиторы вирусной активности, 161, Рига, 1972.
5. *Адамс М.* Бактериофаги, 394, М., 1961.
6. *Benzer S., Champe S. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 47, 1025, 1961.
7. *Ellis E. L., Delbrück M. J.* Gen. Physiol., 22, 365, 1939.
8. *Тимаков В. Д., Гольдфарб Д. М.* В кн.: Основы экспериментальной медицинской бактериологии, 260, М., 1958.
9. *Hollday R.* Nature, 178, 1987, 1956.
10. *Оганесян М. Г., Арутюнян А. В., Озолинь О. Н., Камзолова С. Г.* ДАН СССР, 233, 487, 1977.

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СРЕДЫ НА ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАЦИЙ

М. Г. ОГАНЕСЯН, А. В. АРУТЮНЯН

Для доказательства плеiotропного проявления РНК-полимеразных мутаций рифампицинрезистентные аллели из различных мутантов были перенесены в исходную культуру при помощи трансдукции. Большинство рекомбинантов повторяло свойства РНК-полимеразного мутанта. Перенос тех же аллелей в два других генетически отличающихся штамма показал, что в зависимости от генетического окружения плеiotропный эффект РНК-полимеразных мутаций проявляется по-разному.

В 1970 г. соавтором данной статьи было выдвинуто предположение о возможных ошибках на разных стадиях процесса транскрипции, допускаемых мутантными РНК-полимеразами [1]. Ранее нами у *E. coli* В/г была выделена большая группа рифампицинрезистентных (риф-р) мутантов, у которых изменен ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы. У пяти мутантов наряду с резистентностью к рифампицину изменились и другие свойства (плеiotропный эффект) [2].

В настоящем сообщении приводятся данные, свидетельствующие о том, что отмеченные изменения являются результатом плеiotропного проявления мутаций в РНК-полимеразном гене и подвержены влиянию генотипической среды.

Материал и методика. Были использованы штаммы *E. coli* K12 Δ Ura⁺ Hfr argH SupE (получен от С. З. Миндлин), CH327 F⁻ thl argH trp SupE str-r, а также *E. coli* В/г WU36-10-11-12 leu^{am} tyro^c SupE^{oc} (получен от Пирсона, США) и его риф-р производные, свойства которых описаны в табл. 1.

Применялись фаги Т4В и его производные с различными нонсенс мутациями [3], а также трансдуцирующий фаг Р1. В качестве минимальной использовалась среда М9 [4], а полноценных—мясо-пептонный бульон и агар (МПБ, МПА), а также индикаторная среда Эндо для определения лактозосбраживающей способности культур и Т-среда [5] для осуществления трансдукции. В работе был использован кристаллический препарат рифампицина («Lowson», Англия).

Перенос риф-р аллелей мутантов в исходный штамм был осуществлен трансдукцией с помощью фага Р1. Трансдукционная смесь высевалась на чашки методом агаровых слоев [4]. Трансдукционные скрещивания проводились по следующей методике. Трансдуцирующий фаг выращивался в высоком титре на донорной культуре, полученным затем заражали реципиентную культуру. Трансдукционную смесь инкубировали 20 мин, затем центрифугированием освобождали от неадсорбированных фаговых частиц. Осадок ресуспендировали и высевали на соответствующие селективные среды для отбора трансдуктантов.

Таблица 1

Характеристика риф-р мутантов

Риф-р мутант	Морфология колоний	Время генерации, мин	Ауксотрофность		Развитие фагов, чувствительных к супрессорам	
			37°	42°	37°	42°
гро В401	крупные, разрезанные	43	лейцинзависимый	лейцин- и тирозинзависимый	Sup E** Sup B	Sup B
ро В402	мелкие	60	прототроф	прототроф	*	*
ро В403	мелкие	58	прототроф	ауксотроф	Sup E Sup B	Sup E** Sup B
гро В409	крупные	30	лейцин- или тирозинзависимый	лейцинзависимый	Sup E** Sup B	Sup E** Sup B
гро В423	крупные	25	лейцин- и тирозинзависимый	лейцин- и тирозинзависимый	не развиваются	
Исходный штамм WU36—10—11—12	крупные	25	прототроф	прототроф	Sup E Sup B	Sup E Sup B

*—свойство определить не удается, так как сам дикий фог Т4В развивается плохо.

**—фаги, чувствительные к SupE супрессору, развиваются слабо.

Результаты и обсуждение. Нами выделены спонтанные риф-р мутанты, отличающиеся друг от друга и от родительского штамма по рифампицинрезистентности и рядом других свойств (табл. 1).

Предполагалось, что причиной изменения ряда фенотипических признаков мутантов является плеiotропный эффект РНК-полимеразных мутаций. Правильность этого можно было проверить переносом аллелей рифампицинустойчивости в геном родительского штамма, а также замещением аллелей рифампицинустойчивости аллелем рифампицинчувствительности в геномах риф-р штаммов. Если при проверке первым способом оказалось бы, что родительский штамм приобрел характерные признаки мутанта, а при проверке вторым—произошел возврат к исходному фенотипу, предположение можно было бы считать правильным.

Анализ риф-р колоний, полученных в результате переноса риф-р аллелей мутантов в исходный штамм. Приводятся результаты анализа риф-р колоний, полученных после трансдукционных скрещиваний каждого мутанта с исходным штаммом.

гpоB401 × *WU36—10—11—12*. У 96% проверенных риф-р колоний, выросших из посева трансдукционной смеси, изменены следующие свойства. Способность сбраживать лактозу: при 27° лактоза сбраживается слабо или не сбраживается, а при 37° эта способность в некоторой степени восстанавливается, но остается ниже уровня родительского штамма. Способность поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В: амбер-мутанты фага при 37° образуют мутную зону лизиса, что свидетельствует об их плохом развитии, а при 42° вообще не образуют таковую. При 37° клетки нуждаются в лейцине, а при 42°—в лейцине и тирозине. Время генерации, как и у мутанта *гpоB401*, составляет 43 мин (у исходной культуры *WU36—10—11—12* — 25 мин). Колонии плоские, шероховатые, с разрезанными краями.

Сравнив описанные свойства риф-р колоний со свойствами мутанта *гpоB401* (табл. 1), можно заключить, что они являются рекомбинантными по риф-р аллелю, поскольку характерные свойства мутанта *гpоB401*, обусловленные данной риф-р мутацией, проявляются и у трансдуктантов.

гpоB402 × *WU36—10—11—12*. У подавляющего большинства риф-р колоний (92%) изменены некоторые свойства. Выход фагового потомства в расчете на каждую зараженную клетку равен 8, что в 30 раз меньше, чем у реципиента. Время генерации как и у мутанта *гpоB402*—60 мин. Колонии примерно вдвое меньше, чем у реципиента.

Как видим, характерные признаки мутанта *гpоB402* передаются вместе с риф-р аллелем, на основании этого можно заключить, что они являются результатом плеiotропного проявления риф-р мутаций.

гpоB403 × *WU36—10—11—12*. Свойства 95% риф-р колоний совпадают с характерными свойствами донора (мутанта *гpоB403*). Поддерживают развитие амбер-мутантов Н-78 и Н₂—36, которые не растут на газоне реципиента, развитие их как и других амберных мутан-

тов фага Т4В зависит от температуры. При 37° риф-р колонии являются прототрофами, а при 42° не растут ни на одной из синтетических сред, предложенных Холлидеем для идентификации ауксотрофности [6]. Время генерации—58 мин, как и у мутанта гроВ403. Колонии примерно вдвое меньше колоний реципиента.

гроВ409 × *WU36—10—11—12*. Мутант гроВ409 отличается от исходного штамма временем генерации (30 мин), а также зависящих от температуры ауксотрофностью и способностью поддерживать развитие амбер-мутантов фага Т4В. Анализ риф-р трансдуктантов, образовавшихся в результате данного скрещивания, показал, что они приобрели вместе с риф-р аллелем все свойства мутанта гроВ409. Такой результат является доказательством того, что характерные свойства этого мутанта обусловлены риф-р мутацией.

гроВ423 × *WU36—10—11—12*. Реципиентный штамм *WU36—10—11—12*, в отличие от вышеописанных скрещиваний, в данном случае не приобрел вместе с риф-р аллелем характерные свойства донора. По-видимому, фенотип мутанта гроВ423 и соответствующая потребность в лейцине и тирозине обусловлены не риф-р мутацией, а какой-то другой.

Таким образом, анализ риф-р рекомбинантов, полученных в результате переноса риф-р аллелей мутантов в исходный штамм, показал, что характерные свойства мутантов гроВ401, гроВ402, гроВ403 и гроВ409 обусловлены соответствующими мутациями рифампицину-стойчивости, поскольку при переносе риф-р аллелей этих мутантов в исходный штамм последний одновременно приобретает фенотипические свойства мутанта.

Зависимость плейотропного эффекта риф-р мутаций от генотипа организма. Было исследовано влияние риф-р мутаций на фенотип двух отличных по генотипу штаммов *E. coli* K12—*AUiga*⁺ и *CH327*. Скрещивания проводились с помощью фага P1. Риф-р рекомбинанты отбирались среди *arg*⁺ (в случае *AUiga*⁺) и *thi*⁺ (в случае *CH327*) трансдуктантов. При анализе их контролем служили *AUiga*⁺ *arg*⁺ *CH327 thi*⁺ рекомбинанты, не получившие риф-р аллель.

В табл. 2 приведены данные о влиянии риф-р мутаций на способность котрансдуктантов расти на полноценной и минимальной средах при различных температурах.

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что мутации гроВ401, гроВ402 и гроВ409 подавляют рост рекомбинантов штамма *AUiga*⁺ при 42° на минимальной среде. Соответствующие рекомбинанты штамма *CH327* (*CH/401*, *CH/402*, *CH/403* и *CH/409*) при тех же условиях частично утрачивают способность к росту.

Данные о способности рекомбинантов поддерживать рост амберных мутантов фага Т4В представлены в табл. 3.

По данным табл. 3, мутации гроВ401 и гроВ409 одинаково влияют на способность обоих штаммов поддерживать развитие амбер-мутантов фага Т4В. Влияние мутации гроВ403 на то же свойство штам-

Таблица 2

Рост риф-р рекомбинантов штаммов АУига⁺ и СН327 на полноценной (ПС) и минимальной (МС) средах при 37° и 42°

Штамм	ПС		МС	
	37°	42°	37°	42°
АУига ⁺	3	3	3	3
АУ/401*	3	3	3	0
АУ/402	3	3	3	0
АУ/403	3	3	3	0
АУ/409	3	3	3	0
АУ/423	3	3	3	3
СН327	3	3	3	3
СН/401	3	1	3	1
СН/402	3	2	3	2
СН/403	3	3	3	3
СН/409	3	3	3	2
СН/423	3	3	3	3

Оценка роста: 3—нормальный рост, 2—ослабленный, 1—очень слабый, 0—отсутствие. *—в знаменателе приведены номера мутантов, из которых переносился риф-р аллель.

мов зависит от генотипа: АУ/403 при 42° значительно хуже поддерживает развитие фагов, чем при 37°, однако в штамме СН327 эта же мутация не влияет на способность культуры обеспечивать рост мутантов фага Т4В.

Мутация groB402 в разных штаммах *E. coli* K12 примерно одинаково влияет (подавляет) на выход фага Т4В. У АУ/402 выход фага составляет 8 бляшкообразующих частиц, а у СН/402—6, т. е. примерно в 30 и 40 раз меньше, чем у исходных штаммов АУига⁺ и СН327 соответственно.

Влияние риф-р мутаций на морфологию колоний также зависит от генотипа. Так, если в штамме СН327 мутация groB403 не влияет на размер колоний, в случае штамма АУига⁺ она приводит примерно к двукратному уменьшению их.

У рифампицинчувствительных рекомбинантов, полученных в результате скрещивания независимых риф-р штаммов, исследовались следующие признаки: зависимость роста от температуры, способность поддерживать развитие фага Т4В и его амбер-мутантов (при 37 и 42°), а также морфология бактериальных колоний. При анализе не были обнаружены какие-либо различия между рифампицинчувствительными рекомбинантами и контрольным штаммом СН327. Таким образом, изменение ряда признаков у риф-р рекомбинантов СН/401, СН/402 и СН/409 обусловлено плейотропным эффектом РНК-полимеразных мутаций.

При включении риф-р аллелей в геном родительского штамма последний приобретает также характерные признаки мутанта. А при

Таблица 3

Развитие амбер-мутантов фага T4B на риф-р рекомбинантах штаммов ANuga⁺ и CH327

Штамм	Ф а г											
	H-78		H ₂ -16		H ₂ -36		H ₃ -44		H ₃ -54		T4B	
	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°
AY uga ⁺	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AY/401	+	—	++	+	++	+	+	—	++	+	+++	+++
AY/403	+++	+	+++	+	+++	++	+++	—	+++	+	+++	+++
AY/409	+++	—	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
AY/423	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH/401	++	—	+	—	+++	++	—	—	++	+	+++	+++
CH/403	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH/409	+++	—	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
CH/423	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Зоны лизиса: +++—прозрачная, ++—мутная, +—очень мутная, —отсутствует.

замещении риф-р аллелей диким аллелем рифампицинчувствительности, клетки одновременно утрачивают характерные свойства соответствующего мутанта. Указанное свидетельствует о том, что наблюдаемые нарушения свойств риф-р мутантов обусловлены изменениями РНК-полимеразы.

Очевидно, что разные риф-р мутации специфически влияют на определенные свойства клетки. Так, мутация гроВ401, нарушающая супрессию нонсенс мутаций, способность сбраживать лактозу и другие свойства клетки, не влияет на развитие дикого фага Т4В. В то же время мутация гроВ402, нарушающая рост дикого фага Т4В, не влияет на прототрофность клетки или ее способность сбраживать лактозу. Одной из особенностей мутанта гроВ403, в отличие от гроВ401 и гроВ409, является то, что он нормально поддерживает развитие нонсенс мутантов фага Т4В, более того на нем развиваются еще 2 фага с амбер-мутацией (Н-78 и Н₂-36), этого не наблюдается в случае родительского штамма.

Обнаружено, что специфическое влияние риф-р мутаций на какое-либо свойство клетки зависит от генотипа организма. Например, риф-р рекомбинанты АУ/403 и СН/403 по-разному поддерживают развитие амбер-мутантов фага Т4В при 42°.

Биохимическое изучение мутантов [2] показало, что некоторые их свойства (термочувствительность гроВ403, нарушенная способность гроВ402 поддерживать развитие фага Т4В и др.) не могут быть объяснены прямым выражением структурных изменений в РНК-полимеразе, а, возможно, связаны с нарушениями работы мутантной РНК-полимеразы.

Филиал ВНИИ генетики,
г. Чаренцаван

Поступило 10.III 1978 г.

ԳԵՆՈՏԵՊԻԿ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՌԻԲ-ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ՊԼԵՅՈՏՐՈՊ ԷՖԵԿՏԻ ՎՐԱ

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտացիաների պլեյոտրոպ արտահայտումը ապացուցելու համար տարբեր մոլտանտների ըիֆ-ր ալելները փոխադրվել են ծնողական կոլտուրայի մեջ տրանսդուկցիայի օգնությամբ: Ռեկոմբինանտների մեծամասնությունը կրկնել է ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտանտի հատկությունները: Այդ նույն ալելների փոխադրումը գենետիկորեն տարբերվող երկու այլ շտամների մեջ ցույց տվեց, որ կախված գենետիկական միջավայրից, ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտացիաների պլեյոտրոպ արտահայտությունը հանդես է գալիս տարբեր ձևով:

THE INFLUENCE OF GENETIC CONSTITUTION ON PLEYOTROPIC EFFECT OF RNA-POLYMERASE MUTATIONS

M. G. OGANESSIAN, A. V. ARUTYUNIAN

To prove the pleiotropic effect of RNA-polymerase mutations rifampicyne-resistant alleles from different mutants have been transduced to the initial culture. The majority of the recombinants demonstrated the properties of PNA-polymerase mutants. The transformation of the same alleles into the two other genetically different strains shows that pleiotropic effect of PNA-polymerase mutations appears in different ways depending on the genetic environment.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян М. Г. В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 30, Ереван, 1970.
2. Оганесян М. Г., Арутюнян А. В., Озолинь О. Н., Камзолова С. Г. ДАН СССР, 233, 487, 1977.
3. Оганесян М. Г., Барегимян И. Н., Биологический журнал Армении, 27, 7, 16, 1974.
4. Лдамс М. Бактериофаги, 394, М., 1961.
5. Оганесян М. Г., Чахалян А. Х. Биологический журнал Армении, 27, 8, 16, 1974.
6. Holliday R. Nature, 178, 1987, 1956.

ВЛИЯНИЕ УДОБРЕНИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ПРИ ОСВОЕНИИ ЭРОДИРОВАННЫХ ПОЧВ

Л. А. ХАЧИКЯН, Э. Ф. ШУР-БАГДАСАРЯН, С. Д. ДОЛУХАНИЯ

Установлено, что систематическое внесение азотных удобрений приводит к резкому повышению фитомассы житняка, высеянного на сильноэродированных каштановых почвах, и оказывает благоприятное действие на их микробиологическую активность. С увеличением общего числа микроорганизмов происходит так же изменение видового состава их, обнаруживаются бактерии из рода *Pseudomonas* и *Sorangium*. Наблюдаются большие сдвиги в нитрифицирующей способности этих почв.

Одним из главных факторов, влияющих на повышение плодородия эродированных почв при освоении их под кормовые угодья, является внесение недостающих элементов питания растений, в частности азота. Вследствие слабой обеспеченности смытых почв азотом жизненность высеянных трав крайне низка, и сильно изреженный травостой не способен приостановить эрозионные процессы.

В последние годы изучению влияния удобрений на микробиологическую активность эродированных почв начали уделять должное внимание [1—7].

Цель данной работы состояла в изучении влияния азотных удобрений на биологическую активность смытых почв, занятых под многолетние травы.

Материал и методика. Исследования проводились в 1973—1975 гг., испытывались многолетние травы (житняк ширококолый), высеянные на сильноэродированных каштановых почвах с выходами на поверхность диатомитов. Опыт заложен на территории почвенно-эрозионного опорного пункта Сиспанского района НИИ почвоведения и агрохимии МСХ АрмССР.

Исходя из того, что диатомиты обладают довольно высокой обеспеченностью подвижными формами фосфора и калия и крайне слабой — легкогидролизуемого азота, в почву опытного участка вносили азот в виде аммиачной селитры в дозе 60 кг/га действующего его начала. Контролем служил неудобренный посев житняка. Для определения веса надземной и подземной массы житняка вырезывали монолиты площадью 50×50 см глубиной 20 см (в 4-кратной повторности) и после их расчленения проводили весовой учет фитомассы в воздушно-сухом состоянии.

Для микробиологических исследований применяли методику почвенных суспензий с использованием следующих питательных сред: мясо-пептонный агар (МПА)—для учета бактерий, усваивающих органический азот, крахмало-аммиачный агар (КАА)—актиномицетов и бактерий, усваивающих минеральные формы азота, почвенный агар (ПА)—общего количества бактерий, смесь равных объемов мяса-пептон-

ного агара и сусло-агара (МПА+СА)—спорообразующих бактерий в пастеризованном посеве (по Мишустину), сусло-агар (СА)—грибов, агар Гетчинсона—аэробных микроорганизмов, разрушающих целлюлозу (по Пушкинской), модифицированный агар Эшби—олигонитрофилов, жидкая среда Виноградского—количества нитрофикаторов. Нитрофицирующую способность почвы определяли по методу Ваксмана. Физико-химические свойства почвы изучали по общепринятой методике.

Результаты и обсуждение. Долголетние опыты показали, что без недостающего в почве азота посевы житняка развиваются слабо и почти не дают генеративных побегов; надземная и подземная фитомасса в среднем за ряд лет составила соответственно 3,6 и 15,3 ц/га.

Систематическое внесение удобрений способствовало резкому повышению фитомассы житняка на сильноосмытых каштановых почвах, что свидетельствует о высокой биогенности их. Надземные и подземные части житняка ширококолосого были соответственно в 7 и 8 раз больше, чем в необогащенном посеве. При этом на обогатенных участках высота растений и их генеративность резко отличалась от контроля (рис.). Кроме того, полевая влажность в верхнем слое поч-

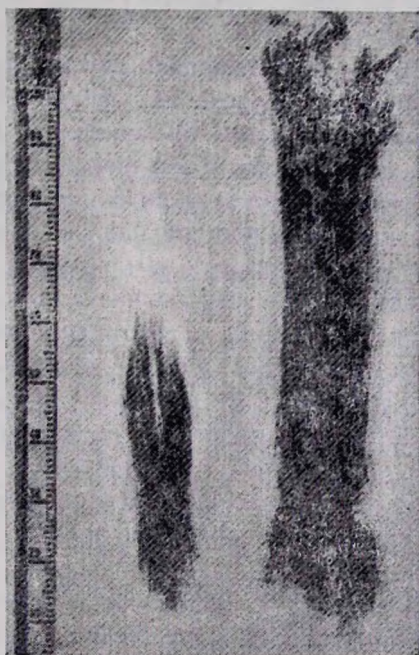


Рис. Влияние азотных удобрений на развитие житняка ширококолосого. Слева направо: житняк на сильноосмытых почвах без удобрений и с удобрением.

вы (9—10 см) была летом на 5,0% выше, чем на контрольном участке с крайне изреженным посевом.

Значительное накопление надземной и подземной массы житняка в результате внесения азотных удобрений, улучшение питательного

и водного режимов почвы создали благоприятные условия для активизации микробиологических процессов, о чем свидетельствует резкое увеличение общего числа микроорганизмов, в том числе бактерий, актиномицетов и грибов (табл. 1). Одновременно происходит измене-

Таблица 1

Влияние удобрений на численность микроорганизмов (млн/г почвы) в
сильноэродированных каштановых почвах, засеянных житняком
ширококолосым

Вариан- ты	Глубина, см	Гумус, %	N мг на 100 г почвы	Бактерии	Актиноми- цеты	Грибы	Соотношение микроорга- низмов, %		
							бактерии	актино- мицеты	грибы
Контроль	0—10	1,6	2,5	18,10	0,27	0,49	95,9	1,4	2,7
	10—20	1,5	2,2	13,40	0,09	0,10	98,6	0,6	0,8
	20—30	0,7	1,6	11,90	0,06	0,05	99,0	0,5	0,5
№	0—10	2,0	3,1	29,56	1,19	0,96	93,2	3,7	3,1
	10—20	1,7	2,8	23,42	0,39	0,28	97,2	1,6	1,2
	20—30	1,4	2,8	16,15	0,19	0,18	97,7	1,2	1,1

ние видового состава их. В измененной среде появились разрушающие целлюлозу миксобактерии, не обнаруженные в удобренной почве. Резко увеличилось количество темноокрашенных грибов—*Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys* и актиномицетов — *Act. albus*, *Act. coelicolor*, активно участвующих в разложении целлюлозных компонентов. Интенсивное разложение поступающих в значительном количестве растительных остатков привело к заметному повышению гумуса и незначительному увеличению легкогидролизуемого азота.

Большие сдвиги произошли в нитрифицирующей способности сильноэродированных каштановых почв. В верхнем слое почвы накопление нитратов увеличивалось с 9,9 до 104 мг на 100 г почвы.

Интенсивное протекание процессов нитрификации при внесении азотных удобрений объясняется, по-видимому, высокой обеспеченностью сильносмытых почв с выходом диатомитов, подвижными формами калия и фосфора, что подтверждается исследованиями Вавуло [1].

Повышение биологической активности отмечается и в нижнем слое почвы (20—30 см), что явилось результатом чрезвычайной загруженности его корневой системой житняка ширококолосого.

Для светло-каштановых почв характерно отсутствие азотобактера. С увеличением биологической продуктивности житняка под влиянием удобрений азотобактер обнаруживается в микробном цепозе. Из споровых аммонификаторов преобладают *Bac. megaterium* и *Bac. mesentericus*, хорошо усваивающие азотсодержащие соединения.

В микрофлоре, участвующей в азотном обмене смытых почв, особое место занимают бактерии, усваивающие минеральный азот. Количество их в контроле составляло 23,1, в то время как численность бак-

терий, усваивающих органический азот,—13,1 млн/г почвы. Внесение азотных удобрений приводит к резкому увеличению этих микроорганизмов (табл. 2). Преобладание бактерий, усваивающих минеральный

Таблица 2

Влияние удобрений на численность микроорганизмов (млн/г почвы),
участвующих в азотном обмене сильноэродированных каштановых
почв, занятых под житняком ширококолосым

Вариан- ты	Глубина, см	Бактерии		Олигонитрофилы	Скорые аммо- нификаторы	Нитрификаторы	Целлюлозоразру- шающие
		растущие на среде с минераль- ным азотом	растущие на среде с органиче- ским азотом				
Контроль (без удоб- рений)	0—10	29,1	13,1	4,7	2,0	1,4	0,29
	10—20	20,4	6,4	3,1	1,9	1,3	0,13
	20—30	19,8	4,0	2,4	1,7	1,3	0,11
С удобре- нием	0—10	35,3	23,6	28,4	3,8	1,7	0,44
	10—20	29,7	17,0	14,0	2,9	1,6	0,26
	20—30	25,2	7,1	12,0	1,8	1,5	0,15

азот в эродированных каштановых почвах, свидетельствует об энергичном протекании минерализационных процессов и сравнительно незначительном накоплении гумуса.

После внесения удобрений среди микроорганизмов, усваивающих азот, обнаруживаются бактерии из рода *Pseudomonas*. Под воздействием удобрений количество олигонитрофилов повышается в 6 раз, оказывая существенное влияние на азотный баланс эродированных почв.

Таким образом, результаты микробиологического изучения сильноэродированных каштановых почв с выходами диатомитов выявили на фоне внесения удобрений тесную взаимосвязь между поступающими в значительном количестве растительными остатками и активностью отдельных физиологических групп микроорганизмов. Изменение видового состава микроорганизмов и их соотношения под воздействием удобрений указывает на своеобразие почвообразовательных процессов и способствует повышению плодородия сильноэродированных каштановых почв.

Институт почвоведения и
агрохимии МСХ АрмССР

Поступило 7.VII 1977 г.

**ՊԱՐԱՐՏԱՅՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆ ԷՐՈԶԱՑՎԱԾ ՀՈՂԵՐԻ ՅՈՒՐԱՅՄԱՆ
ԸՆԹԱՅՔՈՒՄ ՆՐԱ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՎՐԱ**

Լ. Ա. ԽԱԶԻՅԱՆ, Է. Յ. ՇՈՒՐ-ԲԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ, Ս. Դ. ԴՈՂՈՒՆՅԱՆՅԱՆ

*Ուսումնասիրությունները կատարվել են հողագիտության և ագրոքիմիա-
յի գիտահետազոտական ինստիտուտի Սիսիանի հակաէրոզիոն հենակետի*

ուժեղ լվացված մակերես դուրս եկած դիատոմիտներով հարուստ բաց շագանակագույն հողերում, որոնք ապահովված չեն մատչելի ազոտով:

Հետազոտություններով բացահայտված է, որ ազոտային պարարտանյութի երկարատև սիստեմատիկ օգտագործումը լայնահասկ սեզի ցանքսի տակ ավելացնում է նրա վերգետնյա և ստորգետնյա կենսազանգվածը չպարարտացված տարբերակի համեմատությամբ մոտ 7—8 անգամ, ստեղծելով նպաստավոր պայմաններ հողի խոնավության ավելացման և մանրէաբանական պրոցեսների ակտիվության համար:

Պարարտացման ֆոնի վրա օլիգոնիտրոֆիլների քանակը ավելանում է մոտ 6 անգամ, որն ունի էական ազդեցություն էրոզացված հողերի ազոտի բալանսի վրա: Բուսական մնացորդների զգալի կուտակումը պարարտացման ֆոնի վրա խթանում է նաև ազոտ յուրացնող առանձին ֆիզիոլոգիական խմբերին պատկանող մանրէների կենսագործունեությունը և ազդում նրանց տեսակային կազմի վրա:

Հաստատված է սերտ կապ էրոզացված հողերում կուտակված բուսական մնացորդների, առանձին ֆիզիոլոգիական խմբերին պատկանող մանրէների միջև: Մանրէների տեսակային կազմի և նրանց փոխհարաբերության փոփոխությունը ցույց է տալիս, որ ազոտային պարարտանյութի երկարատև ու սիստեմատիկ օգտագործումը նպաստում է ուժեղ էրոզացված բաց շագանակագույն հողերի բելրիիության բարձրացմանը:

MINERAL FERTILIZATION EFFECT ON THE BIOLOGICAL INDICES DURING THE IMPROVEMENT OF ERODED SOILS

L. A. KHACHIKIAN, E. F. SHUR-BAGDASSARIAN, S. D. DOLUKHANIAN

Systematic application of nitrogenous fertilizers on severely eroded chestnut soils resulted in a sharp increase of the phytomass of the sown perennial grasses and exerted a favourable effect on the microbiological activity.

With the increase of the total amount of microorganisms some bacteria of *Pseudomonas* and *Sorangium* origin have been revealed. At the same time greatly improved the nitrification ability.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вавуло Ф. П. Микрофлора основных типов почв БССР и их плодородие, Минск, 1972.
2. Ломов С. П. Агрохимия, 5, 1970.
3. Паринкина О. М. Сб. работ Центрального музея почвоведения им. В. В. Докучаева, вып. 3, Л., 1960.
4. Сколон И. С. Тр. бот. ин-та им. В. Л. Комарова. «Геоботаника», сер. III, 18, 9, Л., 1970.
5. Хачикян Л. А., Шур-Багдасарян Э. Ф., Симомян Б. Н. Тр. НИИ почвоведения и агрохимии МСХ АрмССР, 10, 1975.
6. Черемисинов Г. А. Эродированные почвы и их продуктивность использования. М., 1968.
7. Шахובהва Б. Б. Изв. АН Тадж. ССР, I (58), 1975.

ДИНАМИКА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ОРГАНАХ ВИНОГРАДНОЙ
ЛОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗ РАЗВИТИЯ

А. Б. АФРИКЯН, А. С. АРУТЮНЯН

В условиях Армении определена динамика некоторых микроэлементов (Mn, Zn, B) в листьях и побегах виноградного растения в зависимости от фаз развития и ярусности. Установлено, что верхний ярус побега богат указанными микроэлементами, по сравнению с нижним, средним и плодовым ярусами.

Динамика микроэлементов в разных органах и частях виноградного растения изучалась немногими авторами [1—4], а в отношении Армении такого рода данные вообще отсутствуют.

Наши исследования преследуют цель изучить динамику содержания микроэлементов в листьях и побегах виноградного растения в условиях Армении, выявить сходство и различия между изучаемыми микроэлементами (Mn, Zn, B) в зависимости от фаз вегетации и ярусности.

В результате многолетних опытов по спектральному определению микроэлементов в листьях и побегах виноградного растения [5] нами изучена динамика Mn, Zn, B по основным фазам роста и развития (на контрольных растениях).

Материал и методика. Исследования велись в лабораторных и полевых условиях в течение 1971—1976 гг. на Мердзаванской экспериментальной базе Института виноградарства, виноделия и плодоводства МСХ АрмССР. Почва опытного участка бедна гумусом, в верхних горизонтах его количество не превышает 1,07%. Почвенная среда щелочная (рН 8,3), что обусловлено наличием карбонатов щелочноземельных металлов. Содержание связанного CO_2 варьирует в пределах 1,03—11,38%, а CaCO_3 —2,34—25,86%. В верхних горизонтах содержится небольшое (0,24%) CaCO_3 , а в нижних—значительное количество гипса (23,02%). Содержание азота и фосфора низкое. По механическому составу почва опытного участка относится к тяжелосуглинистым.

Таким образом, исследуемая почва является маломощной, тяжелосуглинистой, карбонатной, бедной гумусом и питательными веществами (за исключением калия) и относится к почвам бурого типа.

Исследовался сорт Кахет (виноградники посадки 1960 года). Густота посадки—1,5×2,5 м. Нагрузка кустов—по силе роста. Опыты проводились в трехкратной повторности, по 25—30 кустов в каждой, с одним защитным рядом. Удобрения вносились весной, по 100 кг/га действующего начала основных питательных элементов, по следующей схеме: контроль (без удобрения), NK, NP, PK, NPK. Отбор и фиксация образцов для анализа проводились согласно общепринятой методике [6]. Образцы после озоления исследовались спектрографически [7]. Пересчет микроэлементов сделан в мг/кг абсолютно сухого материала.

Результаты и обсуждение. Динамика содержания марганца в листьях и побегах представлена в виде кривых (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях количества марганца в листьях в первую половину вегетации, особенно в листьях нижнего яруса. Так, концентрация марганца в листьях минимальна в период цветения, в период интенсивного роста ягод она достигает максимума, далее резко снижается до исходной (период до цветения). Этот же уровень сохраняется в фазу физиологической зрелости. В листьях остальных ярусов содержание марганца одинаковое, с менее выраженным пиком в период роста ягод. Любопытно отметить, что характер изменения содержания марганца по всем ярусам у побегов такой же, как у листьев, во все периоды вегетации.

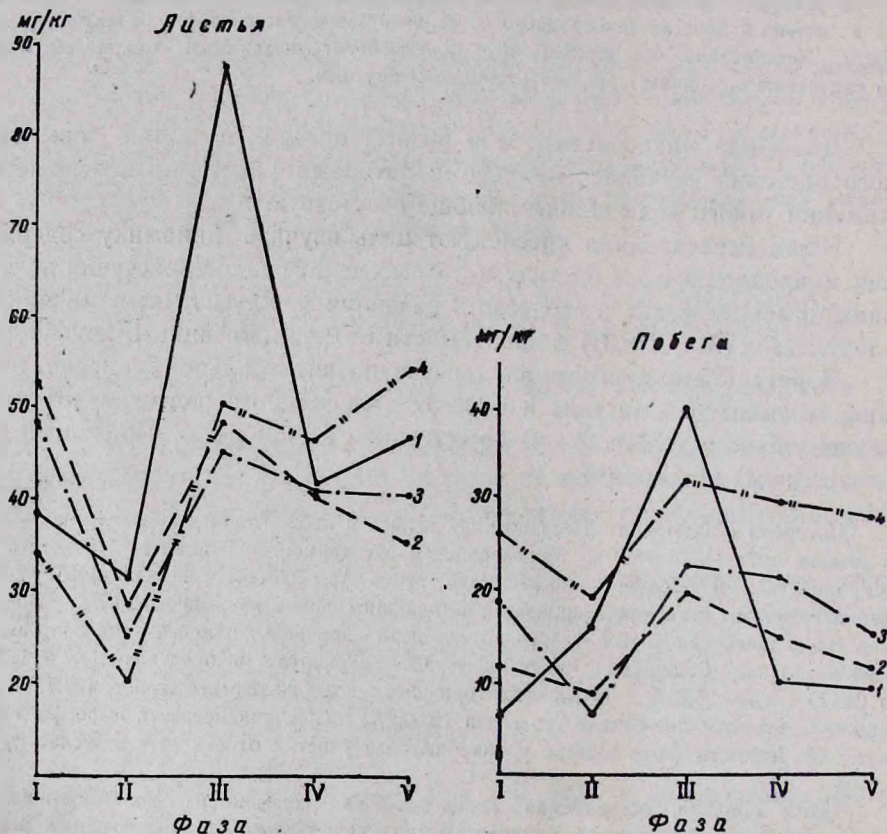


Рис. 1. Динамика содержания марганца в листьях и побегах винограда в период вегетации, мг/кг. Фазы вегетации: I—до цветения, II—цветение, III—рост и формирование ягод, IV—начало созревания ягод, V—физиологическая зрелость ягод. Условные обозначения: 1. — нижний ярус, 2. — — — плодовый ярус, 3. — · — · — средний ярус, 4. — — — — — верхний ярус.

Таким образом, как в листьях, так и в побегах всех ярусов (в последних исключая нижний ярус) наблюдается четко выраженный минимум содержания марганца.

Содержание цинка в листьях и побегах (рис. 2) также изменяется по фазам вегетации, но не так синхронно, как это имело место в случае с Мп (рис. 1). Наиболее богаты цинком листья в начале вегетации, в фазе цветения его количество резко снижается. В период формирова-

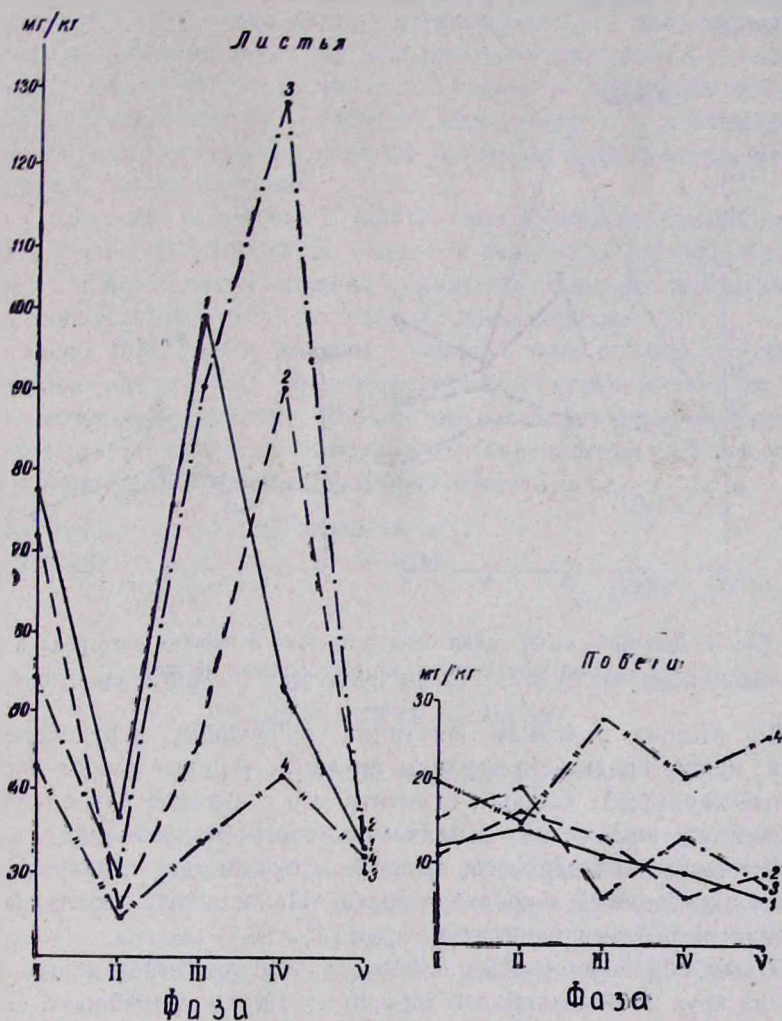


Рис. 2. Динамика содержания цинка в листьях и побегах винограда в период вегетации, мг/кг (обозначения те же).

ния ягод наблюдается сдвиг в сторону накопления этого микроэлемента в листьях всех ярусов. Характерной особенностью его динамики является пик в начале созревания ягод (лишь в листьях нижнего яруса максимум сдвинут на более ранний срок—период интенсивного роста ягод). В период физиологической зрелости уровень цинка в листьях вновь снижается. Следовательно, в отличие от Мп концентрация цинка в листьях имеет два минимума—в фазы цветения и полной физиологической зрелости.

В побегах содержание цинка в течение вегетации резко не меняется и носит своеобразный характер. Здесь отсутствуют пики минимума в фазу цветения. Концентрации цинка, как показывают кривые (рис. 2), в нижнем и плодовом ярусах одинаковы, сохраняется высокий уровень его в первые две фазы вегетации, а далее отмечается плавное снижение.

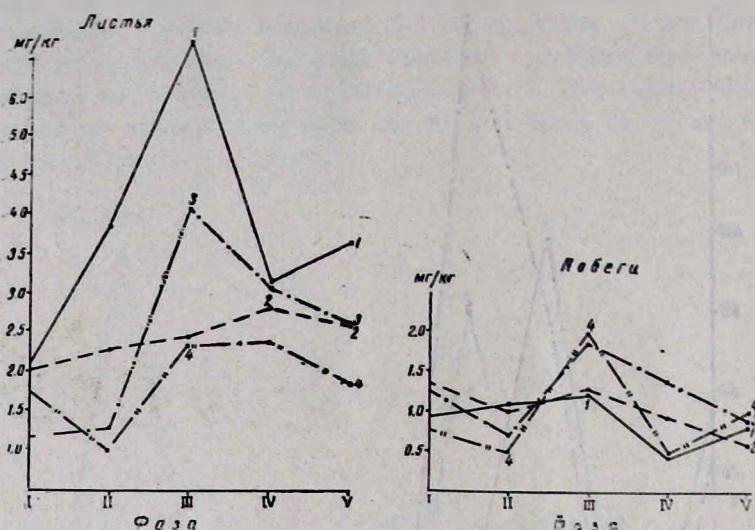


Рис. 3. Динамика содержания бора в листьях и побегах винограда в период вегетации, мг/кг (обозначения те же).

Во вторую половину вегетации происходит перераспределение цинка между средним и верхним ярусами (кривые имеют противоположный характер). Следует отметить, что в верхнем ярусе побегов накапливается наибольшее количество этого микроэлемента (25—30 мг/кг). В листьях верхнего яруса содержание его низкое. Наиболее богаты цинком листья среднего яруса. Наши данные совпадают с результатами опытов крымских авторов [4].

Таким образом, можно заключить, что листья среднего яруса и верхний ярус побега наиболее хорошо отражают потребность виноградного растения в цинке.

На рис. 3 показана динамика бора в листьях и побегах виноградного растения в течение вегетации. Содержание бора в листьях нижнего, среднего ярусов возрастает в первый период вегетации и снижается в фазу созревания ягод. Лишь в листьях верхнего яруса отмечается снижение его в фазу цветения.

В листьях плодового яруса концентрация бора равномерно возрастает, сохраняя относительную стабильность в течение всей вегетации. Наглядно видно, что начальное накопление бора в листьях нижнего и среднего ярусов и его дальнейшая транслокация обеспечивают определенный уровень в листьях плодовой и верхней зоны.

В побегах отмечаются различия в динамике бора по ярусам. Любопытен факт, что максимум его во всех зонах побега приходится на один и тот же период вегетации—период интенсивного роста ягод. В плодовом ярусе побега, как и в листьях, количество бора мало изменяется в течение вегетации.

Резюмируя полученные данные и сравнивая их с имеющимися литературными данными, в частности с результатами опытов в условиях Крыма [4], можно констатировать, что основные закономерности, связанные с прохождением фаз развития, однотипны, т. е. в большинстве случаев отмечается четко выраженный минимум в содержании марганца и цинка в период цветения.

На основании полученных данных мы вправе заключить, что в листьях в период формирования ягод, а в некоторых случаях в начале созревания, происходит накопление указанных микроэлементов и выраженный скачок в сторону увеличения их концентрации.

Согласно полученным данным, верхняя зона побегов выделяется способностью накапливать большие запасы микроэлементов по сравнению с остальными частями стебля, что позволяет рекомендовать эту зону в качестве индикаторного органа для определения степени обеспеченности виноградного растения микроэлементами.

Ереванский государственный медицинский институт,
НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства

МСХ АрмССР

Поступило 7.IV 1978 г.

ՄԻԿՐՈԷԼԵՄԵՆՏՆԵՐԻ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԽԱՂՈՂԻ ՎԱՋԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ ԿԱԽՎԱԾ ԱՃՄԱՆ ՖԱԶԵՐԻՑ

Ա. Բ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ, Ա. Ս. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Մեր հետազոտությունները լրացնում են պտղատու խաղողի շիվի տարբեր հարկերի տերևներում և ընձյուղներում միկրոէլեմենտների պարունակության վերաբերյալ եղած գրականության տվյալները: Դրանք թույլ են տալիս բացահայտելու վեգետացիոն փուլերից կախված յուրաքանչյուր ուսումնասիրվող միկրոէլեմենտների (Mn, Zn, B) ընդհանրությունը և տարբերությունը:

Ցույց է տրված, որ շիվի վերին հանգույցները մյուս հարկերի համեմատությամբ ավելի հարուստ են միկրոէլեմենտներով:

DYNAMICS OF MICROELEMENTS IN THE ORGANS OF GRAPE DEPENDING ON THE GROWING PHASES

A. B. AFRIKIAN, A. S. ARUTYNIAN

Dynamics of some microelements (Mn, Zn, B) in leaves and shoots of vine has been determined depending on the phases of development in Armenia. It has been found that the upper storey of the shoot is the

richest in the abovementioned microelements as compared with the lower, fruit and middle ones.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Двери Д., Зырин Н. Г. *Агрохимия*, 2, 1965.
2. Хатиашвили Р. М., Бахтадзе И. С. Сб. Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине (тез. докл. V Всесоюз. совещ.). 1, Улан-Уде, 1966.
3. Зырин Н. Г., Стоилов Г. П., Симонов В. Д. Вестн. Московск. ун-та, серия «Биология, почвоведение», 1, 1968.
4. Микроэлементы в почвах и использование микроудобрений в виноградарстве (на примере Крымской области). М., 1972.
5. Африкан А. Б. Биологический журнал Армении, 30, 3, 1977.
6. Методические рекомендации по проведению растительной диагностики питания виноградного куста. Ялта, 1974.
7. Боровик-Романова Т. Ф., Фарафонов М. М., Грибовская И. Ф. Спектральное определение микроэлементов в растениях и почвах. М., 1973.

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССЫ ЛИШАЙНИКОВ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ФИТОМАССЫ АЛЬПИЙСКИХ СООБЩЕСТВ

А. Н. ЗИРОЯН, А. А. АБРАМЯН

Изучались проективная поверхность и масса лишайников в альпийских сообществах горы Арагац. Поверхность и сухая масса их варьируют соответственно в пределах 1,6—9,7% и 4,4—18,5 г/м². Сухая масса основных видов лишайников составляет 16,6—60,1 мг/см².

В настоящее время большое внимание уделяется вопросам изучения фитомассы растительных сообществ. При определении продуктивности надземной части сообщества обычно учитываются травянистые растения и мхи. Массе же лишайников, являющихся существенным компонентом общей фитомассы, при этом придается недостаточное значение. В последние годы начато изучение массы лишайников лишь как отдельного компонента ценоза [1—5]. Однако для правильной оценки общей фитомассы необходимо определять также массу лишайников как неотделимую часть ценоза.

Одновременно с изучением фитомассы основных фитоценозов южного макросклона горы Арагац [6] нами впервые в Армении предпринята попытка выявить видовой состав и определить массу лишайников в наиболее распространенных альпийских сообществах.

Материал и методика. Работа выполнялась в 1976—1977 гг. на высокогорном стационаре Института ботаники АН АрмССР.

Для определения фитомассы использовались методы Родина и др. [7] и Бязрова, Старостина [3]. На каждом участке, типичном для данной растительной группировки, были заложены пробные площадки размером 0,25 м², в 8-ми повторностях—всего 32 площадки. На каждой учетной площадке отдельно фиксировались все виды лишайников и определялась их проективная поверхность (%) в основном при помощи специальной рамки с сеткой [8], а для видов с небольшим покрытием применялся песовой метод контуров с использованием кальки. Лишайники отделялись от субстрата и после доведения до абсолютно сухого состояния определялась их масса. Далее путем сжигания образцов в муфельной печи при 600° в течение 8-ми часов определялось содержание органических веществ и золы.

Полученные данные обработаны статистически.

Альпийский пояс на южном макросклоне начинается с высоты 2700—2800 м и достигает 3500—3600 м, выше начинается субнивальный пояс. На изученном участке в окрестностях высокогорного озера Кари (высота 3200 м над ур. м.) хорошо развиты ковровые фитоценозы, в которых доминируют стержнекорневые, розеточные и шпалерные формы [9]. Проективное покрытие ковровых группировок составляет 80—90%. Почвы горно-луговые. Материнские породы верхней зоны г. Арагац представ-

лены андезитами, базальтами и дацитами, которые на крутых склонах проявляются в виде осыпей и морей каменных россыпей—чиггиллов,—занимающих значительные пространства.

Результаты и обсуждение. В сообществах альпийского пояса нами изучено 10 видов эпилитных лишайников (табл. 1), из них 1 вид, *Cladonia chlorophaea*, встречающийся на почве. Лишайниковый покров в разных местообитаниях не одинаков как по набору видов и количественному соотношению их, так и по проективной поверхности и массе. При этом наибольшие масса и покрытие ($18,5 \text{ г/м}^2$ и $9,7\%$) отмечены в сообществах, где преобладают камни от 5 до 30 см в поперечнике, при 80—100%-ном покрытии. Наименьшие масса и покрытие ($4,4 \text{ г/м}^2$ и $1,6\%$) отмечены на участках, где покрытие камней достигает 10—30%. Значительная разница наблюдается также в биомассе лишайников разных видов, приходящейся на единицу проективной поверхности субстрата (табл. 2). Наибольшая масса отмечена у *Placolecanora melanophthalma*— $60,1 \text{ мг/см}^2$, наименьшая—у *Parmelia stenophylla*— $16,6 \text{ мг/см}^2$. У изученных лишайников отмечены видовые различия в содержании органических веществ, что обусловлено, по-видимому, различной степенью фотосинтетической активности.

Изучение фитомассы альпийских сообществ показало (табл. 3), что лишайники составляют значительную часть надземной массы, достигая 1,3 ц/га, или 12% надземной массы.

Из сказанного следует, что при изучении продуктивности сообществ, в которых лишайники принимают заметное участие, необходимо учитывать и их массу.

Статистическая обработка полученных данных о проективной поверхности и массе лишайников показала, что при 8-кратной повторности средние квадратические отклонения (E), а следовательно и коэффициент их вариации (V), в зависимости от характера площадок резко различаются (табл. 1). В связи с этим показатели точности (P) варьируют соответственно в пределах 10,8—18,0 и 9,6—20,5%, в среднем составляя 15,2 и 14,1%. Такая точность опыта при определении общей фитомассы сообществ в основном может считаться удовлетворительной, поскольку, как отмечает Василевич [10], не всегда рационально получать среднее с ошибкой 2—5%, нужно стремиться не к более точным методикам, а к наиболее быстрому и легкому пути получения среднего с точностью 10—15%. Данные наших вычислений показали, что для изучения поверхности и массы лишайников с ошибкой $\pm 5\%$ и $\pm 10\%$ в альпийском сообществе необходимо брать в среднем соответственно 75 и 19 учетных площадок по $0,25 \text{ м}^2$.

Для получения достоверных данных о массе отдельных видов лишайников с точностью $\pm 5\%$ и $\pm 10\%$ необходимо соответственно брать поверхности для *Placolecanora melanophthalma* 106 и 27 см^2 , *Parmelia stenophylla*—157 и 39 см^2 , *Lecidea atrobrunnea*—43 и 11 см^2 , *Rhizocarpon geographicum*—129 и 32 см^2 (табл. 2).

Состав, проективная поверхность и масса лишайников в альпийских сообществах

Местообитания	В и д н										Проективная поверхность, %						Сухой вес, г м²					
	Rhizocarpon geographicum	Lecidea atrobrunnea	Aspicilia sp.	Cladonia chlorophaea	Parmelia stenophylla	Placolecanora melanophthalma	Placolecanora muralis	Hypogymnia encausta	Gasparrinia elegans	Aspicilia caelincinerea	Acarospora fuscata	M ± m	F	V, %	P, %	Количество плоидов (n) при подсчете ошибок		M ± m	F	V, %	P, %	
																±5%	±10%					
Крупнокаменные (d = 50—100 см) покрытие 60—80%	+	●	—	—	+	+	—	—	+	—	—	5,24 ± 0,85	2,10	45,8	16,2	84,0	21,0	15,20 ± 1,83	5,19	34,1	12,0	
	Среднекаменные (d = 30—70 см) покрытие 40—60%	+	—	—	+	+	●	+	+	—	+	2,95 ± 0,53	1,50	50,8	18,0	100,0	25,0	13,00 ± 2,66	7,53	18,0	20,5	
		Мелкокаменные (d = 5—30 см) покрытие 50—100%	●	+	+	—	+	—	—	—	+	—	9,68 ± 1,05	2,97	30,7	10,8	37,7	9,4	18,50 ± 1,77	5,01	27,0	9,6
			Малокаменные (d = 10—30 см) покрытие 10—30%	+	+	●	+	—	+	—	—	—	+	1,60 ± 0,25	0,71	43,1	15,7	78,7	19,7	4,41 ± 0,62	1,76	39,9
В среднем на 1 м²											4,87	1,89	42,6	15,2	75,1	18,8	12,78	4,87	9,8	14,1		

Условные обозначения: ● — доминант; + — присутствие; — — отсутствие.

Таблица 2

Вес сухой массы и содержание органических веществ
доминирующих видов лишайников

В и д	Количество пло- щадок (n)	Сухой вес, мг/см ²						Органические в-ва, %
		M±m	E	V, %	P, %	Количество пло- щадок при полу- чении ошибки		
						±5%	±10%	
Placolecnora me- lanophthalma	23	60,13±6,57	31,5	52,4	10,9	106,1	26,5	95
Lecidea atrobrun- nea	30	33,17±1,98	10,9	32,8	5,6	43,0	10,8	79
Aspicilia sp.	30	23,10±1,27	7,0	30,3	5,5	37,0	9,2	86
Rhizocarpon geo- graphicum	23	19,70±2,35	11,2	56,8	11,9	129,1	32,3	83
Parmelia stenop- hylla	23	16,56±2,14	10,3	62,2	12,9	156,6	39,0	94

Таблица 3

Общая фитомасса альпийских сообществ г. Арагац

Фитомасса		Сухой вес		% надзем- ной массы	% фитомас- сы
		г на 1 м ²	ц на 1 га		
В том числе	Надземная	109,3	10,9	100	13,4
	травы	78,1	7,8	71,5	9,6
	мхи	18,4	1,8	16,8	2,3
	лишайники	12,8	1,3	11,7	1,5
	Корни	707,0	70,7	—	86,6
	Общая	816,3	81,6	—	100

Таким образом, проведенные исследования показывают, что при изучении надземной фитомассы растительных сообществ наравне с другими компонентами следует учитывать и массу лишайников. При этом определения с точностью от $\pm 10\%$ до $\pm 15\%$ сокращают объем работ более чем в 4—9 раз, что очень важно при фитоценологических обследованиях.

Институт ботаники АН АрмССР

Поступило 3.III 1978 г.

**ՔԱՐԱՔՈՍՆԵՐԻ ԶԱՆԳՎԱԾԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՆՊԻԱԿԱՆ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱԶԱՆԳՎԱԾԻ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՈՒՄ**

Ա. Ն. ԶԻՐՈՅԱՆ, Ա. Ա. ԱՐՐԱՆԱՄՅԱՆ

Քարաքոսների տեսակային կազմը, հողի և քարերի մակերեսին նրանց ծածկվածությունն ու կենսազանգվածը ուսումնասիրվել է Արագածի հարավային լանջի (ծովի մակերևույթից 3200 մ բարձրության վրա) ալպիական մի քանի համակեցություններում: Ալպիական դոտում հայտնաբերվել է քարաքոսների 11 տեսակ, քարաքոսապատվածությունը կազմել է 1,6—9,7%, բացարձակ չոր դանգվածը 4,4—18,5 գ/մ²: Քարաքոսների հիմնական տեսակների մոտ չոր նյութի պարունակությունը տատանվում է 16,6—60,1 մգ/սմ² սահմաններում:

ON THE SIGNIFICANCE OF DETERMINATION OF LICHEN MASS AT THE ESTABLISHMENT OF PHYTOMASS IN ALPINE ASSOCIATIONS

A. N. ZIROYAN, A. A. ABRAMIAN

The structure, projection cover and the total production of lichens have been studied in the alpine associations of the mount Aragatz. The projection cover and the total, production of lichens vary accordingly in the ranges of 1,6—9,7%, and 4,4—18,5 g/m². The production of the dominant species varies from 16,6 to 60,2 mg/sm².

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мартин Ю. Л. Мат-лы отчетн. сессии Ин-та экол. растений и животных. Уральск. ФАН СССР за 1969 г., Ботаника, Свердловск, 1970.
2. Бязров Л. Г. Лесоведение, 5, 1971.
3. Бязров Л. Г., Старостина И. Е. Бот. журн., 62, 2, 1977.
4. Кондратьева М. А. Сельмное Всесоюзн. совещ., по вопр. изуч. и освоения флоры и растительности высокогорий. Тезисы, Новосибирск, 1977.
5. Versegny K. Acta Biol. Ac. Sci. Hungariae, 28, 1, 1977.
6. Սիլանյան Վ. Ե., Զիրոյան Ա. Ն. Կյուղ. գիտ. տեղեկագիր, 3, 1975.
7. Родин Л. Е., Ремезов Н. П., Базилевич Н. И. Методические указания к изучению динамики и биологического круговорота в фитоценозах. Л., 1968.
8. Бязров Л. Г. Бот. журн., 59, 10, 1974.
9. Наринян С. Г. Тр. Бот. ин-та АН АрмССР, 13, 1962.
10. Василенич В. И. Статистические методы в геоботанике. Л., 1969.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 581.192

АМИНОКИСЛОТЫ В СТЕБЛЯХ ТОМАТОВ

А. А. АНАНЯН, Е. О. ТАРОСОВА, С. В. АВЕТИСЯН

Селекционная работа определила ведущее положение томатов среди овощных культур. Посредством комплексных методов гибридизации в растительном организме активизируются биохимические процессы, в частности азотистый обмен, имеющий большое значение.

Так, продуктивность и высококачественность растений зависят от максимального использования ими азота [1]. Существует мнение, что одним из важных показателей, раскрывающих биосинтетические возможности генотипа, является азотоустойчивость [2]. Селекционеру важно иметь данные биохимического состава вегетативной массы растений, так как отдельные органы их имеют различный химический состав.

В настоящем сообщении представлены данные аминокислотного комплекса в стеблях у межсортовых гибридов и их родительских форм.

Материал и методика. Объектом исследований были установленные сорта и перспективные гибриды томатов с их родительскими формами, генеалогия которых описана нами ранее [3]. Растения выращены в полевых условиях на экспериментальной базе селекционной станции. Для анализа отбирались типичные растения в период их массового плодоношения. Свежий материал подвергали экстракции в кипящем этаноле. Использован метод распределительной хроматографии на бумаге [4].

Результаты и обсуждение. Результаты исследований спирторастворимых и спиртонерастворимых аминокислот представлены в табл. 1, 2 и на рис. 1, 2.

По литературным данным [5, 6], при качественном анализе аминокислот в стеблях томатов выявлены ГАМК (гамма-аминомасляная кислота), аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты и следы цистина, последний обнаружен лишь в начале плодоношения.

Постоянное наличие значительного количества ГАМК в растениях томатов отмечают некоторые авторы [5], указывающие на важную роль ее в обмене азотистых веществ. Ими замечено также, что количество ГАМК в стеблях увеличивается к плодоношению.

Таблица 1

Спирторастворимые аминокислоты в стеблях томатов, мг% сырого вещества

Сорта, гибриды	ЦИС	ЛИЗ	АРГ	Х	АСП	СЕР	ГЛИ	ГЛУ	ТРЕ	АЛА	ПРО	ТИР	ГАМК	ВАЛ	Ф-АЛА	ЛЕЙ-ИЛЕЙ	Сумма
Маслен 202	6,9	7,2	7,2	15,3	12,0	4,5	5,9	60,0	9,8	6,3	9,6	13,6	16,3	11,5	48,0	33,2	267,3
Ахтубинский 85	5,1	7,2	4,5	10,1	7,9	4,1	4,8	15,6	4,8	5,4	6,3	8,1	18,4	11,5	21,6	15,9	151,3
Юбилейный 261	6,8	5,7	4,4	10,0	6,2	4,5	5,3	20,7	7,0	7,2	6,2	8,0	18,2	9,5	23,7	25,2	168,6
Манитоба	5,1	10,1	5,4	5,0	7,3	4,0	5,3	22,2	6,2	7,6	6,6	5,4	20,3	9,5	21,3	38,0	179,3
Гибрид 345	5,1	8,7	4,4	10,0	7,1	3,0	4,7	11,2	5,6	4,9	6,2	8,0	7,6	9,5	16,6	40,4	153,0
Каринэ 388	5,0	8,6	5,3	7,5	6,2	2,5	4,7	12,7	4,7	4,8	6,2	7,9	12,5	7,5	16,4	90,0	132,5
Рулжерс	6,6	8,7	4,4	7,6	5,5	4,0	4,7	43,1	4,8	6,7	9,5	8,0	17,5	11,4	16,6	22,8	182,1
Гарин 270	6,9	7,2	5,4	7,6	9,6	4,1	4,8	38,4	6,3	5,8	9,6	10,9	21,9	11,5	24,0	20,1	194,4
Гибрид 271	6,7	8,6	5,3	7,5	10,9	5,0	5,2	19,6	8,2	7,1	12,5	10,7	13,1	13,1	28,2	42,5	201,2

Таблица 2

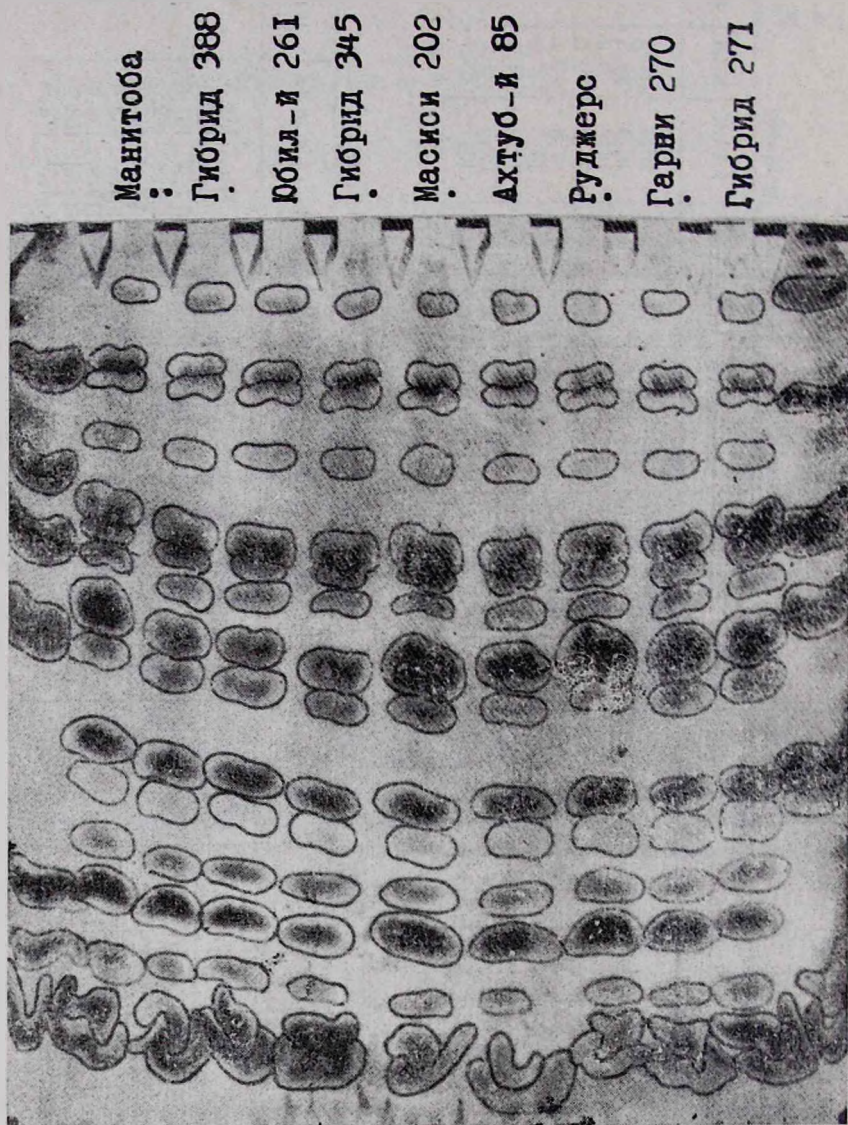
Аминокислоты суммарных белков в стеблях томатов, мг% сырого вещества

Сорта, гибриды	ЦИС	ЛИЗ	АРГ	АСП	СЕР	ГЛИ	ГЛУ	ТРЕ	АЛА	ТИР	ВАЛ	Ф-АЛА	ЛЕЙ-ИЛЕЙ	Сумма
Маслен 202	79,7	90,6	82,4	58,8	55,2	73,4	155,8	70,7	73,4	127,8	90,6	138,6	385,2	1482,2
Ахтубинский 85	51,2	68,3	51,2	54,3	47,3	68,3	98,6	65,2	52,0	90,8	86,9	118,8	407,7	1260,6
Юбилейный 261	60,1	101,1	68,3	63,7	77,3	80,1	115,6	76,5	64,6	117,5	101,9	167,5	341,5	1435,7
Манитоба	77,6	77,6	51,1	79,4	58,2	104,0	167,5	79,4	65,2	113,8	120,8	162,3	308,7	1465,6
Гибрид 345	57,8	87,6	57,8	56,9	53,4	87,6	150,7	78,9	62,2	82,3	98,1	148,1	284,8	1306,2
Каринэ 388	73,6	83,6	55,2	71,0	51,0	80,3	116,9	75,3	70,2	117,9	104,5	153,9	376,5	1429,9
Рулжерс	111,8	100,7	66,5	65,4	52,3	81,6	146,0	84,6	61,4	117,9	112,8	149,0	352,7	1492,7
Гарин 270	87,2	87,2	65,4	69,3	51,5	73,3	108,0	77,3	73,3	104,1	111,0	106,0	396,6	1410,2
Гибрид 271	92,8	117,1	79,1	79,1	69,6	101,3	172,0	108,6	81,2	110,8	144,5	178,3	501,3	1835,7

В исследуемых нами сортах и гибридах томатов обнаружены следующие аминокислоты: цистин, лизин, аргинин, аспарагиновая кисло-

Спирторастворимые аминокислоты

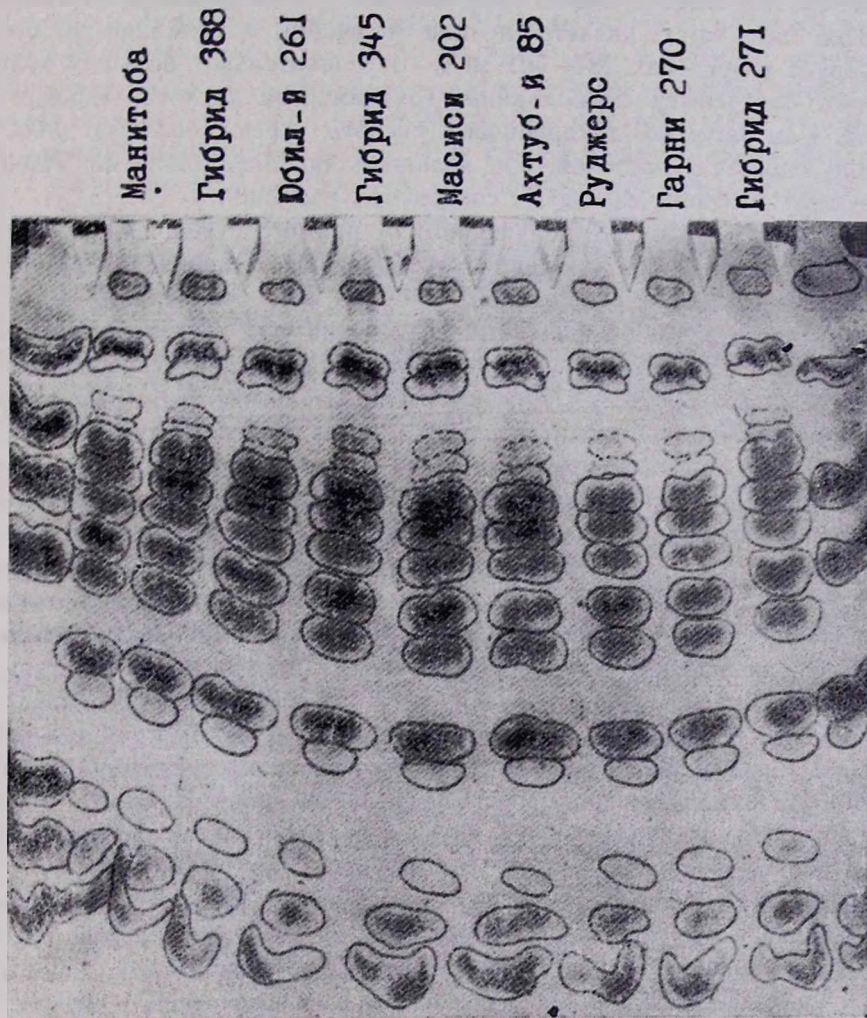
в стеблях томатов



растворимой фракции количественно определены 15 аминокислот и одна неидентифицированная кислота—Х аминокислота. Содержание их во фракциях неодинаковое. В спирторастворимой фракции преобладающими являются лейцин-изолейцин, глутаминовая кислота, фенилаланин и ГАМК. ГАМК и глутаминовая кислота играют большую

Аминокислоты суммарных белков

в стеблях томатов



аминокислот почти равное. Установлено, что в содержании отдельных аминокислот имеются различия между сортами и гибридами. Наблюдаются сортовые различия в сумме аминокислот спирторастворимой фракции. Наибольшее накопление аминокислот в стеблях томатов отмечается у сорта Масис-202—267,3 мг%. Этот сорт отличается способностью в течение всего периода роста и развития растений образовывать многочисленные плодовые стебли, чем и обуславливается его повышенная продуктивность.

В спиртонерастворимой фракции обнаружено 13 аминокислот, в основном они количественно представлены в этой фракции. Преобладающей здесь также является лейцин-изолейцин, содержание которого варьирует в пределах 284—501 мг%. В сравнительно больших количествах содержатся фенилаланин, глутаминовая кислота, тирозин и валин. Как известно, дикарбоновые кислоты играют большую роль в обмене веществ у растений, они являются наиболее важными аминокислотами в обмене азотистых соединений растения.

У сорта Каринэ 388, полученного от прямого скрещивания Манитоба×Юбилейный 261 суммарное содержание аминокислот намного превышает таковое у реципрокного гибрида 345, полученного при обратном скрещивании Юбилейный 261×Манитоба. В дальнейшем установлено, что гибрид 271, полученный при повторных скрещиваниях Юбилейный 261×Руджерс, превосходит родительские формы по содержанию всех видов аминокислот. Аналогичные данные получены у гибрида 271 и по сумме аминокислот спирторастворимой и спиртонерастворимой фракции. Содержание суммарных аминокислот из исследуемых сортов наиболее высокое у гибрида—271—2039,9 мг%, он резко выделяется и по содержанию аминокислот суммарных белков. Сравнительно высоким содержанием суммарных аминокислот отличается также сорт Масис 202—1749 мг%. Низкое содержание аминокислот наблюдается у раннеспелого сорта Ахтубинский 85, однако корни его характеризуются высоким накоплением их [7]. По всей видимости, благодаря сортовой особенности этого сорта происходит их быстрая транспортировка. У остальных сортов содержание аминокислот суммарных белков в стеблях варьирует в пределах 1410—1492 мг%.

У томатов может довольно интенсивно происходить реутилизация азота вегетативных органов на формирование плодов [8].

Известно, что стебли являются органами, которые транспортируют аминокислоты, но они и потребляют их на синтез белков. Таким образом, подтверждается важная роль стеблей как органа, запасающего питательные вещества и играющего основную роль в регулировании обмена и перераспределении их в растениях.

Республиканская селекционно-семеноводческая
станция овощных и бахчевых культур
МССР АрмССР

Поступило 16.1 1978 г.

Հիբրիդիզացիայի կոմպլեքս մեթոդների միջնորդությամբ բուսական օրգանիզմում ակտիվանում են բիոբիմիական պրոցեսները, որտեղ մեծ դեր ունի ապոսային փոխանակությունը:

Ուղիղ տրամախաշման կոմբինացիայում Կարինե 388 սորտի մոտ ամինաթթուների դոմարային քանակը բավականին բարձր է, քան հակադարձ տրամախաշման կոմբինացիայի հիբրիդ 345-ի մոտ: Հետագայում կրկնակի խաչածեման շնորհիվ ստացված հիբրիդ 271-ը քանակապես գերազանցում է ծնողական ձևերին, ինչպես բոլոր ամինաթթուներով, այնպես էլ սպիրտում լուծվող և չլուծվող ֆրակցիաներում ամինաթթուների ընդհանուր քանակով: Ուսումնասիրվող սորտերից հիբրիդ 271-ի մոտ ամինաթթուների գոմարային քանակը ամենաբարձրն է, վաղահաս Ախտուբինսկի 85 սորտը տարբերվել է ամինաթթուների ամենացածր պարունակությամբ: Հատկանշական է, որ այս սորտի արմատները բնորոշվում են ամինաթթուների բարձր կուտակմամբ: Հավանաբար նրա մոտ կատարվում է ամինաթթուների արագ տեղափոխում, որը սորտային առանձնահատկություն է:

Քանի որ ամինաթթուները բույսի մեջ են անցնում ցողունի միջոցով, ուստի խիստ կարևոր է վերջինիս դերը բուսական օրգանիզմում՝ տվյալ օրգանի նյութափոխանակությունը կարգավորելու, սննդարար նյութերը պահեստավորելու և վերաբաշխելու գործում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Демолон А. Рост и развитие культурных растений, М., 1961.
2. Жученко А. А. Генетика томатов, Кишинев, 1973.
3. Анимян А. А., Аветисян С. В., Таросова Е. О., Бабоян В. С. Биологический журнал Армении, 27, 10, 1974.
4. Тер-Карпетян М. А., Таросова Е. О., Анимян А. А. Биологический журнал Армении, 24, 1, 1971.
5. Шутов Д. А., Беляев Н. В. Известия МФ АН СССР, 3, 57, 1959.
6. Шутов Д. А., Беляев Н. В. Известия МФ АН СССР, 4, 82, 1961.
7. Анимян А. А., Аветисян С. В., Таросова Е. О. Биологический журнал Армении, 31, 1, 1978.
8. Гулякин И. В., Гусев М. И., Погосян Е. А. Докл. ТСХА, 103, 1965.

РЕФЕРАТЫ

УДК 595.772:591.464

МОРФОЛОГИЯ ТЕРМИНАЛИЙ САМЦОВ
ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ ВИДОВ СЛЕПНЕЙ
(DIPTERA, TABANIDAE)

А. Е. ТЕРТЕРЯН

За последние 25—30 лет у нас в СССР и за рубежом повысился интерес к морфологии полового аппарата самок слепней. Сейчас для дифференциации видов успешно используются детали половых придатков (терминалий) самок (Коллин, Филипп и Каскарон, Ивата и Нагатоми, Штакельберг и Тертерян, Шевченко, Олсуфьев). Большой вклад в систематику семейства Tabanidae внес крупный австралийский ученый Маккерас на основании изучения терминалий самок и самцов. Однако следует отметить, что терминалиям самцов посвящено крайне мало работ. Подробное изучение придатков генитального аппарата самцов в сравнительно-морфологическом плане было проведено у нас в СССР (Тертерян).

В статье впервые дается изображение и подробное описание строения мужских терминалий палеарктических видов слепней. Использовался материал Зоологического ин-та АН СССР, предоставленный нам для изучения покойным проф. А. А. Штакельбергом. Всего нами обработано 62 вида и подвида слепней. Ниже приводится их список в систематическом порядке. *Pangonius pyritosus* Lw., *Silvius vituli* F., *Nemorius vitripennis* Mg., *Chrysops* (*Chrysops*) *caecutiens caecutiens* L., *nigripes* Ztt., *sepulcralis* F., *pictus* Mg., *relictus* Mg., *valdus* Lw., *parallelogrammus* Zell., *suavis* Lw., *ricardoe* Pl., *dissectus* Lw., *rufipes* Mg., *Chr.* (*Heterochrysops*) *flavipes punctifer* Lw., *mlukoslewiczi* Big., *Haematopota italica* Mg., *desertorum* Szil., *pluvialis* L., *crassicornis* Wahlb., *tamerlani* Szil., *Heptatoma pellucens* F., *Nanorhynchus crassinervis* Willen, *Phillipomyia aprica* Mg., *Hybomitra* (*Mauchaemyia*) *caucas* Szil., *H.* (*Hybomitra*) *altaica* Ols., *tarandina* L., *lurida* Flin., *arpadi* Szil., *lundbecki* Lyn., *bimaculata* Macq., *caucasica* End., *nigricornis* Ztt., *muehlfeldi* Br., *clureai* Ség., *hunnorum* Szil., *montana* Mg., *montana staegeri* Lyn., *erberi* Br., *peculiaris* Szil., *H.* (*Sipala*) *acuminata* Lw., *Atylotus fulvus* Mg., *rusticus* L., *quadriarius* Lw., *flavoguttatus* Szil., *pulchellus carybenthinus* Szil., *Tabanus bifarius* Lw., *quatuornotatus* Mg., *mistshenkoi* Ols., *golovi mediasiaticus* Ols., *leleani turcestanica*

Ols., bromius bromius L., bromius flavofemoratus Strob., maculicornis Ztt., swiridowi Portschi., sudeticus Zell., bovinus L., pleskei Kröb., autumnalis autumnalis L., autumnalis brunnescens Szil., Therlopectes carabag-hensis Portschi.

В сравнительном плане рассмотрены характерные черты строения мужских терминалий по всем родам. Подробно разбираются различия между естественными таксонами в плане строения придатков мужских терминалий (VII и VIII-й сегменты брюшка, эпандрий, строение гонокситов и их вооруженные поля, форма гоностиля, фаллус с аподемой, фаллосома, парамеры).

Сравнительно-морфологическое изучение мужских терминалий палеарктических видов наводит на мысль, что по совокупности морфологических структур (терминалии самца, вооружение ног у взрослых слепней, строение личинок) некоторые таксоны, помещенные в подсемейство Tabaninae, не совсем равноценны (Леклерк, Олсуфьев). Несколько критически мы оцениваем объем трибы Diachlorini, входящей в подсемейство Tabaninae. По ряду признаков (характер вооружения гонокситов, особенности хетотаксии ног у взрослых и др.), из трибы Diachlorini должен быть выделен род *Nanorhynchus* Ols., вместе с родом *Haematopota* Mg. он составит одну естественную группу-трибу *Haematopotini*, которая обладает общностью многих систематических признаков.

Наши исследования показали, что в роде *Chrysops* Mg. вид *Chr. sepulcralis* по совокупности признаков на терминалях самцов должен быть выделен в отдельную группу. В роде *Haematopota* Mg. по тем же признакам может быть выделен вид *H. tamerlani*. По строению мужских терминалий *Hyb. bimaculata* можно выделить в особую группу в подроде *Hybomitra* End. Это подтверждается исследованием кариотипа вышеупомянутого вида (Иванищук). Сравнительное изучение терминалий самцов широко распространенного вида *Hybomitra montana* свидетельствует о том, что данный вид является сборным и нуждается в дальнейшем изучении.

125 с., 58 ил., библиогр. 23 назв.

Институт зоологии АН АрмССР

Поступило 10.IV 1978 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ



Amc 404

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ ՈՒՆ

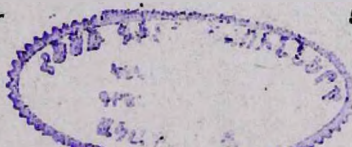
Աղաչանով Մ. Ի., Երիցյան Լ. Ն., Զեբկասով Ա. Ի., Մխիթարյան Վ. Գ. Վիտամին E-ի ազդեցությունը առնետների ուղեղի ֆոսֆոլիպիդների ճարպաթթվային կազմի վրա ալրվածքային հիվանդության ղեկավարում	561
Խաչատրյան Գ. Ս., Սոսիսյան Լ. Հ. Կատեխոլամինների պարունակությունը գլխուղեղի սինապսներում ԿՆՀ տարրեր ֆունկցիոնալ վիճակներում	566
Կարաբաշյան Լ. Վ., Էփրյան Ն. Գ., Մովսիսյան Ս. Գ. Միզանյութի ազդեցությունը գլխուտամատղեհորդոզնադայի կոնֆորմացիոն և կատալիտիկ ակտիվության վրա	572
Հովհաննիսյան Վ. Ս., Համբարձումյան Վ. Դ. Առնետների լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի գլխուտամինադայի ակտիվության կարգավորման առանձնահատկությունները	581
Ասլանյան Ի. Հ., Աղունց Գ. Թ., Գառնաշյան Ա. Հ. Հավերի և սպիտակ առնետների հյուսվածքների անօրգանական տրիմետաֆոսֆատադայի մի քանի առանձնահատկություններ	588
Սիմեոնյան Ա. Ա., Բաղդյան Ռ. Բ. ԱՏՖազային ակտիվության տեղաբաշխումը լյարդի միտոքոնդրիաների թաղանթային կառուցվածքներում և մզվածքում հավերի օնտոգենետիկ զարգացման ընթացքում	597
Զիֆլիկյան Մ. Դ., Նուրյան Ն. Հ. Գամա-ամինակարապաթիլի կարգավորող ազդեցությունը առնետի ուղեղի մեզո-դիենցենֆալիկ հատվածից H3-նորադրենալինի անջատման վրա	601
Բաբսեղյան Վ. Հ., Սարգսյան Լ. Վ., Աղունց Գ. Թ. Սպիտակ առնետների երկկամների հիմնային ֆոսֆատադայի ակտիվության կարգավորման որոշ հարցերի մասին	606
Հակոբյան Թ. Ն., Կարաբաշյան Լ. Վ., Հաբաթյանյան Ա. Ա., Գալոյան Ա. Ա. Էնդոպեպտիդների ակտիվության որոշման նոր զգայուն մեթոդ	612
Հովհաննիսյան Մ. Գ., Հաբաթյանյան Ա. Վ. E. coli B/r շտամի մոտ ուիթամպիցենակայուն ՌՆԹ-պոլիմերազային մոտանմաների ստացումը և ուսումնասիրումը	616
Հովհաննիսյան Մ. Գ., Հաբաթյանյան Ա. Վ. Գենոմային միջավայրի ազդեցությունը ՌՆԹ-պոլիմերազային մոտանմաների պլեյոտրոպ էֆեկտի վրա	624
Խաչիկյան Լ. Ա., Շուր-Բաղդասարյան Է. Ֆ., Դուլիսյան Ս. Գ. Պարարտացման ազդեցությունն էրոզացված հողերի յուրացման ընթացքում նրա կենսաբանական ցուցանիշների վրա	632
Աֆրիկյան Ա. Բ., Հաբաթյանյան Ա. Ս. Միկրոէլեմենտների դինամիկան խաղողի վաղի օրգաններում կախված աճման ֆազերից	637
Զիրոյան Ա. Ն., Աբրահամյան Ա. Ա. Քարաքոսների զանգվածի որոշման նշանակությունը ալպիական համակենցությունների կենսազանգվածի հետազոտությունում	643

Համառոտ հաղորդումներ

Անանյան Ա. Ա., Տարսովա Ե. Հ., Ավետիսյան Ս. Վ. Ամինաթթուները լուրիկի ցողուններում	648
--	-----

Ռեֆերատներ

Տերունյան Հ. Ե. Մոզերի արունների պալեոարկտիկ տեսակների տերմինալների մորֆոլոգիան	654
---	-----



СО Д Е Р Ж А Н И Е

Экспериментальные

<i>Агаджанов М. И., Ерицян Л. П., Черкасов А. И., Мхитарян В. Г.</i> Влияние витамина Е на жирнокислотный состав фосфолипидов мозга крыс при ожоговой болезни	561
<i>Хачатрян Г. С., Степанян Л. А.</i> Содержание катехоламинов в синапсосомах головного мозга при различных функциональных состояниях ЦНС	566
<i>Карабамян Л. В., Экизян Н. Г., Мовсесян С. Г.</i> Влияние мочевины на конформацию и каталитическую активность глутаматдегидрогеназы	572
<i>Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г.</i> Особенности регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции печени крыс	581
<i>Асланян И. Г., Адуц Г. Т., Гаспарян А. А.</i> Некоторые показатели неорганической триметафосфатазы тканей белых крыс и кур	588
<i>Симонян А. А., Бадалян Р. Б.</i> Распределение АТФазной активности в мембранных структурах и экстрактах митохондрий печени в процессе онтогенетического развития кур	597
<i>Чифликян М. Д., Есаян Н. А.</i> Регулирующее действие ГАМК на высвобождение норадреналина— H^3 из мезо-дienceфальной области мозга крыс	601
<i>Барсегян В. О., Саркисян Л. В., Адуц Г. Т.</i> О некоторых вопросах регуляции активности щелочной фосфатазы почек белых крыс	606
<i>Акопян Т. Н., Карабамян Л. В., Арутюнян А. А., Галоян А. А.</i> Новый чувствительный метод определения активности эндопептидаз	612
<i>Оганесян М. Г., Арутюнян А. В.</i> Получение и исследование свойств рифампицинрезистентных РНК-полимеразных мутантов <i>E. coli</i> В/г	616
<i>Оганесян М. Г., Арутюнян А. В.</i> Влияние генотипической среды на плеiotропный эффект РНК-полимеразных мутаций	624
<i>Хачикян Л. А., Шур-Багдасарян Э. Ф., Долуханян С. Д.</i> Влияние удобрений на биологические показатели при освоении эродированных почв	632
<i>Африкян А. Б., Арутюнян А. С.</i> Динамика микроэлементов в органах виноградной лозы в зависимости от фаз развития	637
<i>Зиролян А. Н., Абрамян А. А.</i> Значение определения массы лишайников при установлении фитомассы альпийских сообществ	643

Краткие сообщения

<i>Ананян А. А., Тиросова Е. О., Аветисян С. В.</i> Аминокислоты в стеблях томатов	648
--	-----

Рефераты

<i>Тертерян А. Е.</i> Морфология терминалий самцов палеарктических видов слепней (<i>Diptera, Tabanidae</i>)	654
<i>«Биологический журнал Армении», 1978</i>	558

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 Issues per year

Vol. XXXI, № 6

YEREVAN

June, 1978

CONTENTS

Experimental

<i>Agadjanov M. I., Yeritsian L. N., Cherkassov A. I., Mkhitarian V. G.</i> The effect of vitamin E on fatty acid contents of cerebral phospholipids in rats during burns	561
<i>Khachatryan G. S., Stepanian L. H.</i> The contents of catecholamins in the brain sinaptosomes at different functional states of the central nervous system	566
<i>Karabashian L. V., Eklizian N. G., Movsessian S. G.</i> Action of urea on conformation and enzymatic activity of glutamate dehydrogenase	572
<i>Hovhannissian V. S., Hambartsumian V. G.</i> Regulation of glutaminase activity in mitochondrial fraction of rat liver	581
<i>Aslanian I. G., Adunts G. T., Gasparian A. A.</i> Several properties of inorganic trimetaphosphatase of white rat and hen tissues	588
<i>Symonyan A. A., Badallan R. B.</i> The distribution of ATP-ase activity in the mitochondrial membranes and extracts of hen liver during ontogenetic development	597
<i>Chiflikian M. D., Yessalan N. H.</i> Regulation of H ³ noradrenaline release in mesodiencephalic region of rat brain by gamma-aminobutyric acid . .	601
<i>Barsegian V. O., Sarkissian L. V., Adunts G. T.</i> On the regulation of rat kidney alkaline phosphatase activity	606
<i>Akopian T. N., Karabashian L. V., Arutyunian A. A., Galoyan A. A.</i> A new sensitive assay for determination of endopeptidase activity	612
<i>Oganessian M. G., Arutyunian A. V.</i> Isolation and characterization of rifampicyne-resistant RNA-polymerase mutants of <i>Escherichia coli</i> B/r . .	616
<i>Oganessian M. G., Arutyunian A. V.</i> The influence of genetic constitution on pleiotropic effect of RNA-polymerase mutations	624
<i>Khachikian L. A., Shur-Bagdassarian E. F., Dolukhanian S. D.</i> Mineral fertilization effect on the biological indices during the improvement of eroded soils	632
<i>Afrikian A. B.</i> Dynamics of microelements in the organs of grape depending on the growing phases	637
<i>Ziroyan A. N., Abramian A. A.</i> On the significance of determination of lichen mass at the establishment of phytomass in alpine associations	643

Short Communications

<i>Ananian A. A., Tarosova E. H., Avetisyan S. V.</i> Aminoacids in tomato stems	648
--	-----

Abstracts

<i>Terterian A. E.</i> The morphology of the terminals in male palaearctic horsefly species	654
<i>"Biological Journal of Armenia", 1978</i>	559