

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГРАВИТАЦИОННОГО ПОЛЯ

С. С. ОГАНЕСЯН

Рассмотрено влияние длительного и кратковременного воздействия гравитационного поля и перегрузок на биологические объекты. Анализируются современные данные о возможном действии гравитационных сил на эволюцию животного мира, формообразовательные процессы, а также внутриклеточные явления. На основе данных, полученных в условиях воздействия на животных невесомости и хронических гравитационных перегрузок в течение двух—трех недель, обсуждаются механизмы адаптации мышечной системы и роль генетического аппарата клеток и регуляции белкового состава мышечных волокон.

Среди абиогенных факторов биогенеза важную роль играет гравитационное поле земли. Будучи неотъемлемой составной частью среды обитания, гравитация осуществляет свое действие двояким образом, ибо является векторной силой. Следовательно, изменения ее величины отражаются как на размере животных, так и на симметричности строения тела. Действие гравитационных сил исследуется в двух аспектах. Многочисленные работы посвящены физиологическому действию постоянной и кратковременной гравитационных перегрузок или невесомости [1—6]. Не меньше внимания привлекает изучение значения гравитации в формировании видов в эволюционном развитии животного мира [7—9]. Проблема возможного влияния гравитационных сил на микроуровне остается нерешенной.

Некоторые авторы полагают, что окружающие нас объекты условно можно разделить на два мира: «Ньютоновский мир» крупных тел, поведение которых определяется гравитационными силами, и «мир микросистем Джипса», где взаимоотношения объектов зависят в основном от молекулярных сил и колебаний температуры. Такое разделение предложил Вент [10] на основе оценки подверженности макро- и микрообъектов влиянию сил различной природы. Весьма привлекательно представление Вернадского [11], что жизнь проявляется в двух физически различных пространствах: в поле тяготения живем мы, а в поле молекулярных сил—мельчайшие организмы. Слабость гравитационных сил по сравнению с силами взаимодействия молекул, такими как электростатическое, ван-дер-ваальсовое взаимодействие, позволяют исключить прямое воздействие гравитации на поведение и развитие микрообъектов и течение процессов жизнедеятельности на молекулярном уровне, однако вопрос об их влиянии на клеточном уровне еще не решен.

Современные представления о роли тяготения как фактора, определяющего размеры и форму тела животных, в свою очередь влияющих на интенсивность энергообмена и развитие отдельных органов-систем, основаны на теории геометрического подобия [5, 12, 13]. Еще Галилей [14] в своих трудах по механике установил зависимость между размером тела и ускорением его свободного падения.

$$X = ag^{-\beta}, \quad (1)$$

где a и β являются постоянными, а X — размером тела. Это уравнение легло в основу описания механического подобия, используемого также для живых и растительных объектов:

$$Y = ax^b, \quad (2)$$

где a и b являются постоянными, y и x — морфо-физиологическими параметрами, определяемыми особенностями биологического объекта. Из уравнения (2) следует, что изменение масштаба животного приводит к изменению его линейных размеров не пропорционально увеличению масштаба, а по степенной зависимости от их численного значения. Интересно отметить, что зависимость интенсивности энергообмена от веса тела животного описывается подобным типом выражения:

$$Q = aW^b, \quad (3)$$

где Q — мощность дыхания, W — вес тела, а a и b — постоянные.

Высказывание Галилея о невозможности бесконечного увеличения масштаба животных организмов и постоянном поле тяготения основывалось на вероятности разрушения тела под нагрузкой растущего веса. Таким образом, чтобы сохранился данный вид при изменениях линейных размеров тела животного должна изменяться также физическая природа биологических тканей. Так, увеличение линейных размеров тела животного приводит к росту нагрузки пропорционально кубу увеличения размеров, в то же время прочность структур скелета (площадь поперечного разреза костей) растет лишь пропорционально квадрату линейных размеров [15]. Развивая эти представления, Фейман [16] указывает, что масштаб тела животных не только ограничивается гравитацией сверху, но и снизу атомарно-молекулярной природой тканей. Такой вывод весьма существен, ибо мы являемся свидетелями нахождения в космическом пространстве и на метеоритах аминокислот, предшественников аденинов и других органических соединений, состоящих из легких элементов с простыми электронными орбитами. Не значит ли это, что существование на других планетах живых объектов, сильно отличающихся по размерам и физической природе от земных существ, маловероятно?

Уменьшение размеров тела животных чревато упрощением организма, исчезновением некоторых органов, особенно тех, которые связаны с биомеханической функцией и обеспечением деятельности мышц, составляющих большую часть массы тела. Повышенная гравитация на больших планетах в таком случае должна привести к изменению ка-

чества опорных и механохимических систем, участвующих в локомоции. С другой стороны, длительное пребывание в невесомости или на планетах с меньшей величиной поля тяготения может привести к противоположным результатам.

Рассмотрение проблемы геометрического подобия именно в этом аспекте привело к использованию понятия «критический размер» в биологии. Одним из первых приложений этого понятия к биологическим явлениям является работа Ранневского [17], где предложена гипотеза, объясняющая деление клетки как результат достижения ею своего критического размера, когда нарушается оптимальное соотношение поверхности клетки и ее объема. Ввиду постоянства скорости диффузии веществ через мембрану уменьшение величины соотношения ее и объема клетки приводит к уменьшению потока энергии, что в свою очередь создает «голод» в области ядра и стимулирует деление клетки, заканчивающееся восстановлением нормального значения величины соотношения поверхность/объем.

В таких случаях используется размерный коэффициент пропорциональности, для учета значения изменений массы и площади поверхности объекта. Физический смысл этого коэффициента, определяемого графически по $L_{кр}$, заключается в том, что у крупномасштабных объектов факторы, связанные с объемом, численно превосходят таковые, связанные с поверхностью при достижении объектов своего предельного размера. Иначе говоря, для тел, близких по масштабу к клеткам животных и растений, вариации объема имеют менее определяющее значение, чем поверхности. Именно с этой позиции использован метод геометрического подобия для оценки ряда явлений в животном и растительном мире. Так, Гюнтер [19—21], основываясь на л-теореме [18] и применив теорию геометрического подобия в биологии, нашел ряд зависимостей, сходных с аллометрическими представлениями Гексли [22]. В этих исследованиях оказалось полезным введение дополнительного числа основных единиц для характеристики поведения инертной гравитационной массы, где совершаются химические процессы. Согласно Дюльдину [18], в поле тяготения ширина, высота и длина живых объектов приобретают различный физический смысл, что позволяет вместо скалярной ввести различные размерности. Тогда в гравитационном поле, в противоположность невесомости, все эти направления не будут эквивалентны, и изменение масштаба организма будет сопровождаться изменением его качества, т. е. нарушится физическое подобие при изменениях геометрического подобия тел. Смит [23], основываясь на законе Коупа, считает, что увеличение масштаба некоторых видов животных в процессе эволюции сделало невозможной их адаптацию к земным условиям, в то же время консервативность их физической природы привела к вымиранию этих видов, лишь некоторые из них, вернувшись в водную среду, как, например голубые киты, могли продолжить свое существование.

В одном из последних обзоров [15] рассмотрены важнейшие вопросы гравитационной биологии, такие как образование специфических рецепторных органов у растений и животных, чувствительных к изменению величины гравитационного поля. Экспериментальный материал, полученный с помощью биоспутников земли [6], указывает на большую зависимость ряда биологических явлений (направление роста растений, частота мутационных изменений хромосом, рост и деление клеток) от кратковременного влияния невесомости, хотя еще невозможно исключить действие других факторов космического полета.

В настоящей работе важно рассмотреть вопрос об опосредованном влиянии гравитационных сил на активность генетического аппарата и генный контроль над синтезом белков. Тут необходима оценка значения непосредственного воздействия изменений в величине поля тяготения на состояние наследственного аппарата клеток. Предложены некоторые представления, рассматривающие действие гравитационных сил на субклеточном уровне. Поллард [24] и Кондо [25] теоретически рассмотрели возможность воздействия гравитации на статистическое распределение и тепловое движение внутриклеточных частиц. Ен-саяном [26] проведены некоторые эксперименты для оценки действия невесомости на течение электрохимических процессов и показано большое значение фактора тепловой конвекции. Распределение митохондрий и других внутриклеточных частиц, согласно Полларду [24], может изменяться при умеренных колебаниях гравитационного поля, хотя в условиях невесомости внутриклеточное распределение частиц остается постоянным. Однако нельзя считать этот вопрос решенным даже в первом приближении, требуются специальные эксперименты и земных и космических условиях. При предварительном рассмотрении можно получить некоторую информацию, сравнивая величину гравитационных сил с электростатическими силами взаимодействия молекул. Учитывая, что величина гравитационных сил в этих масштабах явлений составляет около 10^{-26} часть электростатического взаимодействия, обычно отрицают какое-либо ощутимое воздействие их на молекулярном уровне. Например, для частиц размером меньше 0,05 мк диффузионные силы и тепловое движение превосходят по значимости действие поля тяготения, равного 250.000 G. Влияние же механических сил в гравитационном поле, равном земному, на статистическое распределение макромолекул в цитоплазме оказалось значительно меньше, чем на клеточные органеллы, размер которых достигает нескольких микрон [24]. Естественно, нужно учитывать возможность направленного движения частиц в клетке в связи с наличием цитоплазматических сокращающихся трубочек и других структурированных систем, осуществляющих векторно-тензорное движение внутриклеточных органелл и частиц. Однако в указанных работах не учтены эти моменты. Таким образом, здесь цитоплазматическая сеть и структурированность цитоплазматического матрикса противодействуют случайному распределению и влиянию гравитации. Частичная оценка значения двух типов сил при-

вела к выводу уравнения статистического распределения частиц внутри клетки в поле тяготения:

$$n/p_0 = e^{-\theta(1-\rho)gh/kl}, \quad (4)$$

где n — число частиц в объеме, h — расстояние перемещения частиц в поле притяжения, p_0 — число частиц в единице объема при исходном уровне, θ — объем частицы, $(\rho-1)$ — разность плотности частицы и среды. Расчеты показали, что n/p_0 для митохондрий составляет 9×10^{-3} , а для ядрышка — 7×10^{-6} . Отсюда следует, что для организмов диаметром более 1 мм гравитационное воздействие может иметь большое значение.

Еще в начале нашего века было предложено [28] разделить все организмы на две группы по влиянию на них поля притяжения. Впоследствии было показано, что изолированные клетки в культуре ткани не реагируют на ускорения вплоть до 200 G [29]. Результаты наблюдений на кораблях типа «Союз» окончательно не ответили на вопрос о прямом влиянии невесомости на частоту мутаций и aberrаций хроматидного и хромосомного типа [6]. Они скорее подтвердили возможность действия комплекса факторов космического полета, среди которых нужно отметить высокоэнергетические частицы — адроны, способные вызывать лавину вторичного излучения при сильных взаимодействиях с биологическими объектами [30]. Однако в этих исследованиях указывается, что невесомость способствует повышению частоты повреждений, вызванных облучением. Все же эти данные пока недостаточны для окончательной оценки роли поля тяготения в радиочувствительности клеток и тканей [31].

Особое значение имеет гравитационное поле в деятельности скелетных мышц и сердечно-сосудистой системы. Эксперименты в наземных условиях с использованием центрифуг до допустимых величин ускорений и наблюдения у космонавтов выявили изменения в мышечных волокнах: атрофию скелетных мышц, изменения в их ультраструктуре, усиление выброса солей Ca, детренированность, которые преобладают специальным тренировочным режимом [6].

У животных, в течение 22-х дней пребывавших в состоянии невесомости на борту корабля «Космос-605», нами выявлено значительное возрастание активности миофибриллярных катепсинов в разных группах скелетных мышц [32]. В табл. I приведены данные о протеолитической активности миофибрилл белых крыс, находящихся в условиях невесомости, а также в идентичных условиях на земле, где исключалось влияние фактора невесомости. Было установлено, что по сравнению с контрольной группой животных, находящихся в виварийных условиях на обычном режиме содержания, в опытной группе значительно повышается активность катепсинов, однако через месяц после приземления происходит восстановление их исходной активности. При этом в полетной группе животных активированные катепсины значительно больше выражены, что указывает на особую роль фактора невесомости в развитии атрофических процессов.

Таблица 1

Изменение каталитической активности миофибрилл при невесомости и ограничении движений белых крыс в период реадaptации, мкг тирозина/мг белка, 60 мин, 37°, среднее 10-ти определений

Мышцы	Группы животных	Невесомость (полетный эксперимент)		Ограничение движения (синхронный эксперимент)	
		через 2 дня после выхода из опыта	через 26 дней после выхода из опыта	через 2 дня после выхода из опыта	через 26 дней после выхода из опыта
Трехглавая мышца	Опытная Контрольная	24,6±1,1 9,0±1,6	16,1±0,4 13,2±0,5	19,0±0,59 9,4±0,4	5,8±0,36 2,3±0,1
Длинный и общий разгибатели пальцев передней конечности	Опытная Контрольная	35,5±1,7 13,3±0,6	21,9±0,3 14,4±3,3	26,6±1,0 13,4±1,8	7,8±0,78 3,2±0,54
Задняя группа мышц бедра	Опытная Контрольная	19,5±0,7 8,4±2,9	11,7±0,9 7,2±1,1	17,4±0,9 8,1±2,9	8,0±0,45 5,4±2,6
Четырехглавая мышца	Опытная Контрольная	— —	— —	19,8±2,9 7,5±0,36	8,8±1,7 4,4±0,6
Полуперепончатая мышца	Опытная Контрольная	— —	— —	17,3±0,84 8,8±1,2	7,57±0,33 1,8±0,1

Таблица 2

Действие длительной гравитационной перегрузки на протеолитическую активность очищенных миофибрилл белых крыс, мкг тирозина, мг белка, 60 мин, 37°
средние данные 10-ти опытов с квадратическими отклонениями

Группы животных	Млокарл	Бедренные мышцы
Контрольная группа	23,3±1,7	14,4±1,6
Гравитационная перегрузка 4 G, в течение 12-ти дней, по 20 мин ежедневно	37,1±2,6	25,1±2,7
Гравитационная перегрузка 5 G, в течение 14-ти дней, по 40 мин ежедневно	37,0±1,8	26,8±2,0
Через месяц после прекращения воздействий гравитационной перегрузкой	22,3±1,8	15,2±1,1

Из табл. 2 видно, что не только невесомость, но и гравитационная перегрузка, вызванная двухнедельным вращением белых крыс на центрифуге с ротором, имеющим радиус 1,6 м, приводит к четкому повышению протеолитической активности мышечных элементов. Это и ясно, так как распад и синтез белков взаимно связаны, и, по-видимому, в мышечных волокнах они регулируются не частотой сокращения, а нагрузкой, приложенной на данную мышечную группу гравитационным полем. Характерно, что в разных типах мышц (белые и красные скелетные, сердечная мышца) интенсивность обновления белков неодинакова и зависит, как уже хорошо известно, от их антигравитационной функции. Прекращение ежедневных центрифугаций животных при ус-

корениях 4—5G в течение 20—40 мин приводит к постепенному восстановлению исходной катепсической активности во всех типах исследованных мышц (табл. 2). Интересно отметить, что уже при ускорении, равном 4 G, происходит полная активация катепсинов мышечных миофибрилл, дальнейшее повышение величины ускорения не вызывает дополнительного увеличения их активности. Таким образом, величина гравитационного поля является важным фактором, регулирующим ферментативный аппарат обновления мышечных белков через изменение напряжения мышечных волокон.

Не лишено основания предположение, что снятие нагрузки на мышечные волокна или их перегрузка при повышении величины гравитационного поля могут вызвать изменения в содержании белков, секвестрирующих ионы Ca , вымывающиеся из организма и при длительном постельном режиме, т. е. при гипокинезии [6]. Недавно обнаружены различного типа белки в мышечных мембранах, способные связывать и высвобождать Ca^{2+} [33]. В процессе возбуждения высвобождается из этих источников Ca^{2+} и его концентрация в цитозоле растет от 10^{-8} M до 10^{-6} M, т. е. почти в тысячу раз. Высвобожденный Ca^{2+} запускает механохимический процесс и от его количества зависит величина развиваемого мышцей напряжения. Следовательно, здесь должна быть найдена прямая корреляция между мощностью Ca -транспортирующего аппарата мышечных мембран и антигравитационной функцией мышц. Поэтому один из возможных путей потери Ca^{2+} в мышцах — это уменьшение содержания Ca -связывающих белков при уменьшении нагрузки, падающей на мышцу. К таким белкам относится миофибриллярный белок тропонин, открытый Эбаши в 1964 г. [34], состоящий из трех субъединиц, одна из которых специфически связывает ионы Ca . По аминокислотному составу и физико-химическим свойствам она сходна с Ca -связывающими белками мышечных мембран — парвальбуминами [35].

Нам у белых крыс, приземлившихся после 22-дневного полета на корабле «Космос-605», обнаружено снижение содержания субъединицы тропонина, связывающей ионы Ca в скелетных мышцах. При гравитационных перегрузках, создаваемых центрифугированием в течение 2-х недель ежедневно по 20 и 40 мин при 4—5G, наблюдается возрастание содержания Ca -связывающей субъединицы тропонина (табл. 3). Здесь необходимо упомянуть, что на ранних стадиях эволюции за синтез тропониноподобного белка был ответствен один ген, который амплифицировался, и образовались независимые гены для разных типов Ca -связывающих белков мембран и миофибрилл [35]. Отсюда легко предположить, что изменения нагрузки, падающей на мышцу, могут избирательно регулировать активность генетических участков, ответственных за контроль над синтезом отдельных Ca -связывающих белков.

Представление о генетической обусловленности регуляции относительного количества отдельных специализированных мышечных бел-

Таблица 3

Субъединичный состав очищенного тропонина задней группы бедренных мышц белых крыс в условиях гравитационных перегрузок и в период реадaptации (разделение субъединиц методом электрофореза на 10% ПААГ в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия)

Группы животных	Относительное содержание субъединиц тропонина, %		
	Тропонин—Т (белок, связывающий тропомиозин)	Тропонин—I (ингибитор АТФазы)	Тропонин—С (белок, связывающий ионы Са)
Контрольная группа	20,2±8,9 n=5	42,9±8,0 n=5	36,8±10,5 n=5
Гравитационная перегрузка 4 G по 20 мин, в течение 12-ти дней	21,9±6,9 n=8	32,6±8,5 n=8	45,5±4,9 n=8
Гравитационная перегрузка 5 G по 40 мин, в течение 14-ти дней	24,0±5,6 n=5	27,0±4,2 n=5	48,8±5,6 n=5
Группа реадaptации. Через месяц после прекращения гравитационной перегрузки	18,0±3,2 n=5	47,2±2,5 n=5	35,0±2,5 n=5

ков и их изопроteinового состава в зависимости от биомеханического профиля работы мышц было выдвинуто нами в 1973 г. [36—38], что в дальнейшем нашло подтверждение в ряде работ других авторов [39—41].

Таблица 4

Изменение активности Mg^{2+} -АТФазы миозина П миокарда и скелетных мышц белых крыс под влиянием гравитационной перегрузки и в период реадaptации (активность выражена в мкг Фп, мин⁻¹, мг⁻¹ белка, 25°, рН 7.4, средние данные с квадратическими отклонениями)

Группы животных	Миокард	Бедренные мышцы	Камбаловидная мышца
Контрольная группа	4.48±1.25 n=6	5.43±0.41 n=8	3.15±0.88 n=8
Подопытная группа. Гравитационная перегрузка 4 G, 12 дней, 20 мин	8.22±1.28 n=6	18.2±0.88 n=8	9.64±1.28 n=6
Достоверность разницы с контрольной группой	p<0.05	p<0.001	p<0.01
Подопытная II группа. Гравитационная перегрузка 5 G, 14 дней, 40 мин	16.85±0.06 n=7	28.2±0.36 n=8	17.4±0.12 n=6
Достоверность разницы с контрольной группой	p<0.001	p<0.001	p<0.001
Рeadaptационная группа. Через месяц после прекращения перегрузки 4 G, 30 дней, 20 мин	7.61±0.10 n=5	23.5±0.49 n=7	10.65±0.18 n=7
Достоверность разницы с контрольной группой	p<0.05	p<0.001	p<0.001

В нашей лаборатории показано, что гравитационная перегрузка в течение 2-х недель вызывает сдвиги в количественном соотношении отдельных миофибриллярных белков и изоферментов АТФазы миозина в скелетных и сердечной мышцах. Из табл. 4 видно, что повышение АТФазной активности актомиозинового комплекса зависит от длительности и интенсивности гравитационной перегрузки. Одновременно наблюдаются изменения физико-химических свойств АТФазы, которые сопровождаются нарушениями в белковом составе актомиозинового комплекса. Уменьшается содержание именно субъединицы тропонина-1, ингибитора АТФазы актомиозина. Это обнаруживается и при электрофоретическом разделении тропонина на полиакриламидном геле (табл. 3). С другой стороны, значительно снижается степень активации АТФазы актомиозина катехоламинами, которые повышают АТФазную активность также в отсутствие ионов Са (рис.). Полученные данные

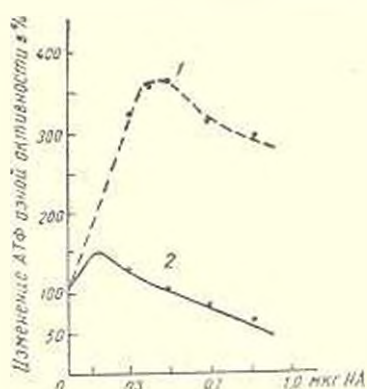


Рис. Действие норадrenalина на Mg^{2+} -АТФазную активность нативного актомиозина скелетных мышц в отсутствие ионов Са. Инкубационная смесь состоит из: 1 мг белка, 10^{-6} М ЭГТА (этиленгликоль бис-(аминоэтил)-тетраацетат), 2×10^{-3} М Mg^{2+} -АТФ, 0.02 М трис-НСl буфера, pH 7.4, 0.15 М KCl. 1—контрольная группа животных, 2—группа животных, подвергнутая гравитационной перегрузке в течение 12-ти дней.

подтверждают вывод о том, что изменения в белковом составе актомиозинового комплекса обуславливают сдвиги в его ферментативной активности. Иначе говоря, это связано с регулированием генетических участков, ответственных за синтез различных субъединиц миофибриллярных белков в условиях гравитационных перегрузок или невесомости.

Так как мышечная система составляет большую часть массы тела животных, многочисленные биохимические реакции в других органах направлены на энергетическое обеспечение их двигательной функции. Следовательно, изменение величины гравитационного поля в длительный период существования Земли в случае уменьшения массы мышц в процессе эволюции животных может ограничить потребность в энергосинтетических реакциях и функционировании ряда внутренних органов. Одним из примеров такого эффекта служит появление кроветворной функции скелета у позвоночных в силу изменения массы их тела в

процессе эволюции, т. е. в конечном итоге благодаря гравитационному полю земли [42, 43].

Гравитационное поле на Земле—постоянно действующий фактор среды и потому длительные драматические изменения его величины могут вызывать глубокие сдвиги в физико-химических параметрах, обмене веществ и в молекулярной структуре тканей животного организма в результате нарушения принципов, основанных на необходимости сохранения геометрического подобия. Решение вопросов практического характера требует дальнейшего детального исследования действия длительных космических полетов, в частности фактора невесомости и гравитационных перегрузок, на животный и растительный мир. И пока трудно предвидеть, к каким новым приспособительным изменениям приведет длительное изменение величины гравитационного поля и какие органы или функции живых организмов разовьются или атрофируются в этих условиях.

Институт кардиологии МЗ АрмССР,
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 19.IV 1978 г.

ԱԳՈՂԱԿԱՆ ԴԱՇՏԻ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ ԱԶԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ս. Ս. ՇՈՎԱՆԵՍՅԱՆ

Աշխատանքը նվիրված է ձգողական ուժի և գերծանրաբեռնվածության կենսաբանական ազդեցությանը: Քննվում են ժամանակակից պատկերացումները և փորձնական տվյալները՝ ձգողական դաշտի դերի վերաբերյալ կենդանական աշխարհի էվոլյուցիայի ընթացքում ձևակազմավորման, հատուկ ձգողական ուժերի զգայարանների առաջացման և ներբջջային պրոցեսների կազմակերպման գործում: Հենվելով ստացված փորձնական տվյալների վրա, անկախելիության (սկոռմոս—605) և գերծանրաբեռնման պայմաններում առաջ է քաշվում մի նոր տեսակետ ձգողական դաշտի մեծության փոփոխման նշանակության վերաբերյալ՝ մկանային համակարգի և մկանային բջիջների ժառանգական ապարատի գործունեության կարգավորման մեջ:

THE BIOLOGICAL EFFECT OF GRAVITATIONAL FIELD

S. S. OGANESSIAN

Literature data on the effect of gravitation overloading and the role of gravitation in micro- and macroorganisms have been summarized. The importance of "critical size" in the observed effects of gravitation, as well as the effect of centrifugation and weightlessness on the molecular characteristics of the muscle and myocard in experimental conditions have been discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев П. В., Котовский А. Р. Сб. Проблемы космической биологии. 6, 93, М., 1967.
2. Газенко О. Г., Гюрджян А. А. Сб. Проблемы космической биологии. 6, 22, М., 1967.
3. Еремин А. В., Кисян Н. Н., Колосов И. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 37, 1967.
4. Котовская А. Р., Ешаков Н. Х. и др. Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 337, 1966.
5. Основы космической биологии и медицины. Советско-Американское изд. под ред. О. Г. Газенко и М. Кальвина, 2, 1, М., 1975.
6. Проблемы космической биологии. 33, М., 1976.
7. Северцев А. Н. Главные направления эволюционного процесса. М., 1934.
8. Циолковский К. Э. Путь к звездам. М., 1961.
9. Шмальгаузен И. И. Происхождение наземных позвоночных. М., 1964.
10. Went F. W. The Size of Man. Americ. Scient., 56, 400, 1968.
11. Вернадский В. И. Биологические очерки. М., 1940.
12. Польшбах Л. Р. Проблемы космической биологии. 33, 74, М., 1976.
13. Раздорский В. Ф. Архитектоника растений. М., 1955.
14. Галилей Г. Избр. тр. 2, М., 1964.
15. Смитт А. Основы космической биологии и медицины. Под ред. О. Г. Газенко и М. Кальвина. М., 1975.
16. Фейнман Р. Характер физических законов. М., 1968.
17. Raschevsky N. Mathematical Biophysics. N. Y., 1960.
18. Дюлодин А. А. Проблемы космической биологии. 33, 7, М., 1976.
19. Günther B., Guerra E. Acta Physiol. Latino-Amer., 5, 169, 1955.
20. Günther B. Pflug. Arch. Ges., Physiol., 337, 283, 1972.
21. Günther B., Martinova C. J. Theoret. Biol., 20, 107, 1968.
22. Huxley J. On Problem of relative Growth., Lond., 1932.
23. Smith A., Pace N. Environment. Physiol., 1, 122, 1972.
24. Pollard E. Theoret. Biol., 8, 113, 1965.
25. Kondo S. Japan. J. Genet., 43, 467, 1968.
26. Ensaffan M. Proc. Aerospec. Med. Assoc., 1, 95, 1967.
27. Pletsch F. In Biophysical Research Methods. Ed. Über F., N. Y., 1950.
28. Thompson D. A. On Growth and Form. Cambridge, 1917.
29. Haldane J. P. Possible Worlds and other papers. N. Y., 1928.
30. Аксенов Н. Г., Юров С. С. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 11, 1975.
31. Аксенов Н. Г., Юров С. С. Природа, 12, 40, 1977.
32. Газенко О. Г., Оганесян С. С., Элонн М. А. Космическая биология и авиакосмическая медицина, 1978. (в печати)
33. Metssner G., Fleischer I. Calcium Binding Proteins. Warsaw, 281, 1974.
34. Ebashi S., Ebashi F. J. Biochem. (Tokyo), 55, 604, 1964.
35. Pechere J., Capony L., Riden L., Eurap J. Biochem., 23, 421, 1971.
36. Оганесян С. С., Заминян Т. С., Кошкарян А. О. и др. J. Molec. and Cellular Cardiol., 5, 1, 1973.
37. Оганесян С. С. Биофизические основы и регуляция процесса мышечного сокращения, 3. Пушино-на Оке. 1972.
38. Оганесян С. С., Заминян Т. С. и др. Метаболизм миокарда. Мат-лы 2-го Советско-Америк. симп., 189, М., 1977.
39. Conway G., Hazzaliti R. J. Molec. Cell. Cardiol., 7, 219, 1975.
40. Katagiri J., Morkin E. Acta Biochem. Biophys., 342, 282, 1974.
41. Swinghedow B., Schwartz K., Leger J., Basic Res. Cardiol., 72, 254, 1977.
42. Коржуев П. А. Эволюция, гравитация, невесомость. М., 1976.
43. Коржуев П. А. Проблемы космической биологии. 33, 31, М., 1976.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НРД В ЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Н. М. АВАКЯН, И. Е. ВАСИЛЮК, Ю. П. МОЖАРОВ,
 А. С. НАНАСЯН, Дж. О. ОГАНЕСЯН

Предложен новый метод обработки цитохимических препаратов на основе измерительной установки для обработки снимков трековых камер (НРД). По сравнению с традиционными методами измерений, предложенный резко сокращает время обработки, увеличивает точность измерения и дает объемную информацию о распределении уникальных клеточных структур.

Цитохимический анализ клеток является одним из важнейших экспериментальных методов биологических исследований. Обработанные соответствующим образом препараты, подлежащие исследованию, фотографируются; снимок в дальнейшем подвергается фотометрической обработке. Конечной целью этой обработки является определение количества уникальных клеточных структур (РНК, ДНК, белковых веществ и т. п.), их распределение в пределах клетки, характер его. Указанные параметры характеризуются величиной и изменением оптической плотности этих веществ.

Принятая традиционная методика фотометрической обработки снимков биологических объектов не позволяет производить подобную обработку за короткий срок с желаемой точностью и не дает объемной информации. Измерительная установка для обработки снимков трековых камер в ядерной физике с помощью оптико-механического сканирующего устройства НДР [1] может быть с успехом применена также для обработки снимков биологических объектов, т. е. для микроденситометрических измерений при выполнении следующих условий: видеоканалы сканирующего устройства должны быть линейными (если измеряется коэффициент пропускания) или логарифмическими (если измеряется оптическая плотность); необходимо наличие фотометрического блока, наличие аппарата стробирования сканирующего луча по строке.

Первые два пункта очевидны и уже реализованы в электронике НРД вычислительного центра Ереванского физического института [2]. Выполнение третьего пункта обеспечивается с помощью аппарата динамических прецизионных масок [3], также входящих в состав оборудования НРД ЕФН.

Работа НРД в режиме микроденситометрических измерений реализуется следующим образом.

Сканирование производится не лучом, а узкой маской, последовательно перемещаемой по строке сканирования в заданных пределах, при этом функции электронных масок не ограничиваются только стробированием луча по строке (т. е. генерацией команды на цифровое видеосигнала через заданные расстояния по строке сканирования). они могут быть использованы также для формирования линейных размеров измерительной апертуры.

В пределах маски фотометрируется интегральный сигнал от сканирования лучем; координаты зон, где проводились измерения, определяются по положению маски на сканирующей строке; столик перемещается в новую позицию для измерений по следующей строке разложения и т. п.

Таким образом, производится дискретное фотометрирование на заданной площади с сеткой, определяемой в одном направлении шагом перемещения маски по строке, в другом — величиной перемещения активной платформы столика от строки к строке, т. е. полностью сканирующих линий. Возможности ИРД ЕФИ при работе в режиме микроденситометрических измерений рассмотрены в работе Василюка и др. [4].

Цель данной работы — определить с помощью ИРД распределение ДНК, РНК и SH-соединений и их концентрацию в клетках.

Материал и методика. Объектом исследования являлись меристематические клетки корешков пшеницы сорта Безостая 1. Для приготовления постоянных препаратов корешки обезжизнялись и пропитывались парфеном. Толщина срезов — 7 мк. Для выявления SH-соединений корешки окрашивались методом Барнета и Зеллмана. ДНК клетки была окрашена по Фельгену. Часть препаратов окрашивалась метиловым зеленым и ирионином, при этом происходило двойное окрашивание, ДНК окрашивалась в синий цвет, а РНК — в зеленый. Обработанные препараты фотографировались на микроскопе МБИ-6 (пленка Микрат-200). Полученные фотосленки сканировались на ИРД шагом 32 мк. С кадра снималось порядка 1200 строк. Для снятия полной информации с кадра и записи на магнитную ленту было затрачено 3 минуты.

Результаты и обсуждение. Так как данные, полученные на ИРД и спектрофотометре ИФО—451, измеряются условными единицами, мы не можем их сравнивать. Но об однозначности этих данных свидетельствует тот факт, что соотношение оптических плотностей ДНК, РНК и SH-соединений, полученных на ИРД и спектрофотометре, полностью совпадает. В обоих случаях оно равно 2:1:0.7. Однако ИРД не только позволила определить среднюю оптическую плотность исследуемых веществ, но и дала возможность установить объемную форму их распределения и накопляемость в клетках.

SH-соединения. Средняя оптическая плотность SH-содержащих соединений в клетках при определении на установке ИРД — 15 ± 0.2 усл. ед. Но в клетке эти соединения распределены неравномерно. Наибольшая часть их накоплена в клетках с плотностью до 10 усл. ед.

Более значительное накопление SH-соединений (до 20 усл. ед.) отмечается в меньших количествах точек, а начиная с оптической плотности 60 усл. ед. кривая накопления падает до нуля.

Картина распределения SH-соединений в клетках представлена следующим образом (рис. 1): под клеточной оболочкой они имеют очень большую плотность накопления, потом она падает до минимума и находится на уровне оптической плотности этих соединений в ядре. Затем скачкообразно достигает максимума. Второй, но не столь значительный, пик накопления SH-соединений отмечается в ядрышке.

ДНК. В ядре средняя оптическая плотность ДНК составляет 46 ± 2 усл. ед. Но распределена она неравномерно. Плотность накопления ДНК постепенно увеличивается от оболочки к центру ядра. Далее к ядрышку замечается некоторое уменьшение ее. В ядрышке количество ДНК резко падает, но в распределении ее выявляется обратная закономерность: от оболочки к центру плотность ДНК уменьшается (рис. 2). Больше всего в ядре имеется ДНК с плотностью от 20 до 50



Рис. 1.

Рис. 1. Распределение SH-соединений в клетке.



Рис. 2.

Рис. 2. Распределение ДНК в ядре.



Рис. 3. Распределение РНК в клетке.

усл. ед. Число точек накопления ДНК уменьшается с увеличением плотности, а с оптической плотностью 170—190 усл. ед. их практически нет.

РНК. В клетке РНК имеет среднюю оптическую плотность 23 ± 1 усл. ед. Но наиболее распространенная форма плотности РНК в клетке — от 10 до 20 усл. ед. С увеличением плотности уменьшается число точек с РНК. Так как при окраске окрашивались и РНК и ДНК,

то при сканировании получилась суммарная картина распределения обоих веществ. В цитоплазме плотность РНК увеличивается начиная с оболочки клетки. Достигнув максимума, она вновь уменьшается к оболочке ядра (рис. 3). Самый высокий пик оптической плотности отмечается в ядрышке, что и соответствует самой высокой накопленности РНК.

Таким образом, предварительные цитохимические исследования на НРД указывают на целесообразность применения ее в биологических исследованиях, так как обеспечивает более точную, быструю и объемную информацию.

Цитохимический анализ меристематических клеток корешков пшеницы сорта Безостая 1 дает основание утверждать, что ДНК, РНК и SH-соединения в клетках распределены неравномерно, каждое из этих веществ имеет свою определенную объемную форму распределения. Соотношение между количеством клеточных ДНК, РНК и SH-соединений постоянно и составляет $2 : 1 : 0,7$.

Ереванский физический институт, ГРНАЭ
НИИ земледелия МСХ АрмССР

Получено 28.11.1978 г.

ՏՐԵԿԱՅԻՆ ԽՑԻՒԻ ՆԿԱՐՆԵՐԸ ՄՇԱԿՄԱՆ ՍԱՐԲԻ ՕԳՏԱԿԱՐԾՈՒՄԸ ԲԶՋԱՔՐՈՒԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՄԵՋ

Ս. Մ. ԱՎԱԴԻԱՆ, Ի. Ե. ՎԱՍԻՆՅԱՆ, Գ. Մ. ՄՈՋԻԱՐՈՎ,
Ա. Ս. ՆԱՆԱՍՅԱՆ, Ջ. Օ. ՕՂԱՆԵՍՅԱՆ

Առաջարկված է ցիտոքիմիական պրեպարատների մշակման նոր մեթոդ, որի չիմքում ընկած է արեկային խցիկի նկարները, հաշվարկային սարքի օգտագործումը: Տրադիցիոն չափման մեթոդների համեմատությամբ առաջարկված մեթոդը խիստ կրճատում է մշակման ժամանակը, ավելացնում չափման ճշտությունը և տալիս է եղակի ստրուկտուրաներ տարածական պատկերը:

THE USE OF NRD IN CYTOCHEMICAL RESEARCHES OF BIOLOGICAL OBJECTS

Ts. M. AVAKIAN, I. E. VASSINYUK, Y. B. MOZHAROV,
A. S. NANASSIAN, J. O. OGHANESSIAN

A new method of processing cytochemical preparations based on the use of equipment for track chamber pictures has been proposed.

As compared to traditional methods, the new approach markedly shortens the processing time, increases accuracy and produces spatial structure pictures.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Benof et al. The HPD Mark-2 Flying-Spot Digitizer et CERN, 68-4, 1968.
2. Вассинюк И. Е. и др. Мат-лы сем. по обработке физической информации. Агнеран, 235, 1976.
3. Вассинюк И. Е., Нанасян А. С. Препринт ЕФН-80 (74)
4. Вассинюк И. Е. и др. Мат-лы сем. по обработке физической информации. Агнеран, 261, 1975.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ДНК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

В. М. АСЛАНЯН, Ю. С. БАБАЯН, В. В. САГАТЕЛЯН, Мик. К. ПОГОСЯН

Разработан метод, позволяющий определить нуклеотидный состав ДНК на основе анализа дифференциальных кривых плавления, полученных спектрофотометрически.

Нуклеотидный состав ДНК определяется химическим методом посредством деградации ее молекул на отдельные нуклеотиды. Для ДНК с квазислучайным распределением азотистых оснований нуклеотидный состав можно определить методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности [1]. Этим же методом можно найти число блоков, входящих в ДНК, и нуклеотидный состав каждого блока [2].

Материал и методика. Нативные ДНК тимуса теленка, печени крысы, *E. coli* были выделены по методу Георгиева, а ДНК фага T2—фенольным методом. Для всех ДНК A_{260}/A_{280} лежало между 1,8—1,9, а A_{260}/A_{230} —между 2,2—2,4, следовательно, содержание белка и РНК в исследуемых ДНК меньше 0,1%. Молекулярный вес ДНК тимуса теленка, фага T2, печени крысы и *E. coli* порядка 10^7 . Все образцы ДНК изучали в цитратно-солевом растворе. Тепловую денатурацию ДНК проводили в буфере 0,1 SSC (1 SSC=0,15 M NaCl+0,015 M цитрат Na, pH 7,0). Кривые плавления получены на спектрофотометре PVE UNICAM SP-8000 с приставками, при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК. Скорость нагрева была 0,25°/мин. Данные кривых плавления были взяты с цифрового вольтметра В7-16 и самописца самого прибора PVE UNICAM.

Исходные кривые плавления получены спектрофотометрически. Для выяснения особенностей и характера поведения кривых плавления был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Известно, что молекулы ДНК состоят из блоков [3, 5]. Так как оптическая плотность аддитивная величина, то можно всю кривую оптической плотности представить как сумму оптических плотностей всех блоков. Каждый блок вносит свой относительный вклад в кривую плавления и зависит от размера и ГЦ-содержания самого блока. Известно, что для квазислучайно распределенной ДНК зависимость оптической плотности от температуры представляет собой Гауссовую кривую, а так как в блоках нуклеотидные пары распределены квазислучайно, то сложные ДКП гетерогенных ДНК представлены в виде совокупности Гауссовых кривых*

$$\sum_{i=1}^N \frac{B_i}{\sigma_i} e^{-\frac{(T-T_i)^2}{2\sigma_i^2}}$$

* Примечание: Вычисление σ_i для нашей задачи свидетельствует о том, что эта величина связана с интервалом плавления ΔT_i i -го блока, т. е. с кооперативностью данного блока $1/2\pi\sigma_i^2 \sim \Delta T_i$ (той же результат получен и в работе Берестецкой Л. В. и др.) [4]. Зная, что ΔT зависит от относительного содержания ГЦ пар, оценим среднее значение и границы изменения σ . Так как ΔT изменяется от 2,5° до 3,2° для квазислучайно распределенных ДНК [3], то $\sigma = 1.15^\circ \pm 0.12^\circ$.

где B_i , σ_i и T_i —три параметра Гауссовой кривой: T_i —температура плавления i -го блока.

Полагаем, что каждая из Гауссовых кривых соответствует определенному блоку ДНК. Каждый блок, характеризуемый величиной B_i вносит свой относительный вклад в оптическую плотность (B_i —статистический вес каждого блока).

Качественно было определено число блоков для каждой ДНК и T_i каждого блока, а потом при помощи ЭВМ БСМ-6 методом минимизации вычислялась величина $[y - F(T)]^2$ для каждой точки (взято приблизительно 50 точек). Здесь y —значение ДКП для каждой температуры, а

$$F(T) = \sum_{i=1}^N \frac{B_i}{\sigma_i} e^{-\frac{(T-T_i)^2}{2\sigma_i^2}}.$$

Принимая, что с возрастанием ГЦ-содержания линейно растет температура плавления блоков [3], можно ГЦ-содержание каждого блока вычислить по формуле

$$X_i = \frac{T_i - T_{AT}}{T_{GC} - T_{AT}},$$

где T_i —температура плавления i -го блока, которая соответствует максимуму данной Гауссовой кривой. X_i —относительное ГЦ-содержание, T_{AT} и T_{GC} —температуры плавления чистых полидезоксиген-АТ и полидезоксиген-ГЦ в соответствующем буфере (в случае 0,1 SSC $T_{AT} = 50^\circ$, $T_{GC} = 100^\circ$) [5].

Зная ГЦ-содержание X_i и статистический вес B_i каждого блока, можно подсчитать валовое ГЦ-содержание молекулы ДНК:

$$X = \sum B_i X_i.$$

(Вычисление B_i смотри в разделе «Результаты и обсуждение»).

Результаты и обсуждение. Кривые плавления и ДКП (разложенные на Гауссовы кривые) для ДНК тимуса теленка печени крысы, *E. coli*, T2 представлены на рис 1—4.

Как видно из рис. 4, даже для ДНК с довольно большим молекулярным весом, выделенных из простых организмов (например, фага T2), распределение нуклеотидных пар нельзя считать квазислучайным: в молекулах имеются блоки с мало различающимся ГЦ-составом.

Вычислим статистические суммы B_i каждого блока.

Сумма площадей всех Гауссовых кривых равна площади, ограниченной ДКП и осью температуры. Поэтому статистический вес каждого блока можно определить как отношение площади данного блока к площади, ограниченной ДКП и осью температуры. Для значительного упрощения расчетов за статистический вес i -го блока можно принять также отношение величины гипохромности в точке пересечения Гауссовой кривой данного блока со следующей $(i+1)$ -й Гауссовой кривой минус гипохромность в точке пересечения с $(i-1)$ -й предыдущей Гауссовой кривой к величине общей гипохромности. Несмотря на то что найденный таким методом статистический вес не является истинным для валового ГЦ-состава, и в этом случае получаются довольно хорошие результаты. Отличие B_i от истинного статистического веса очевидно будет меньше для совокупности Гауссовых кривых с меньшим взаимным перекрытием.

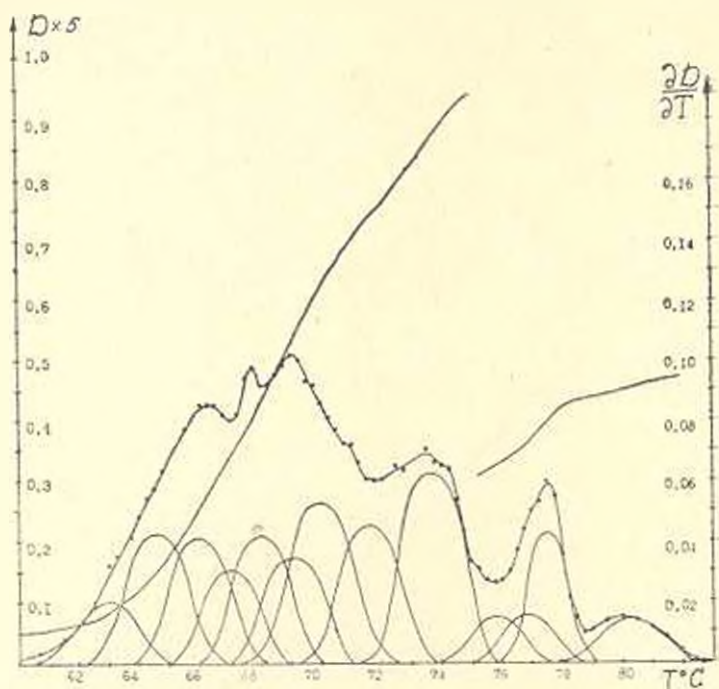


Рис. 1. Кривая плавления и ДКП для ДНК тимуса теленка в 0,1 SSC.

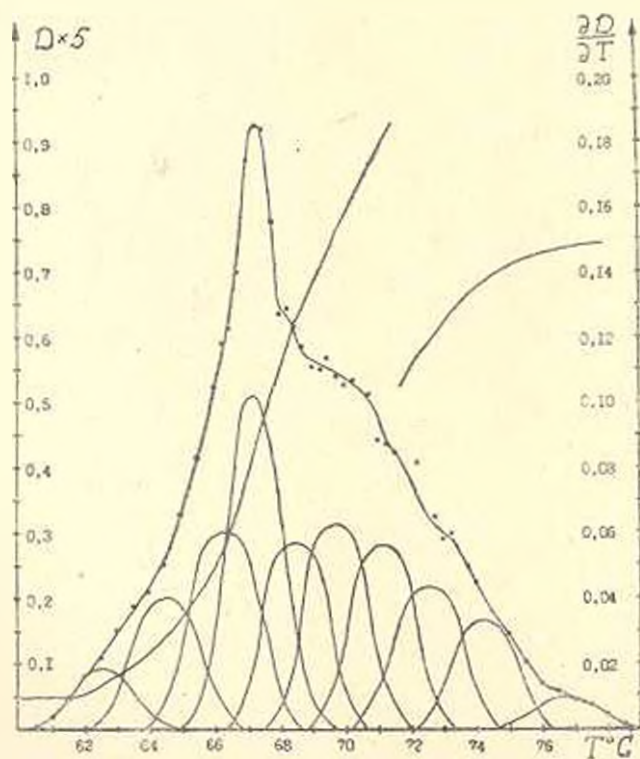


Рис. 2. Кривая плавления и ДКП для ДНК печени крысы в 0,1 SSC.

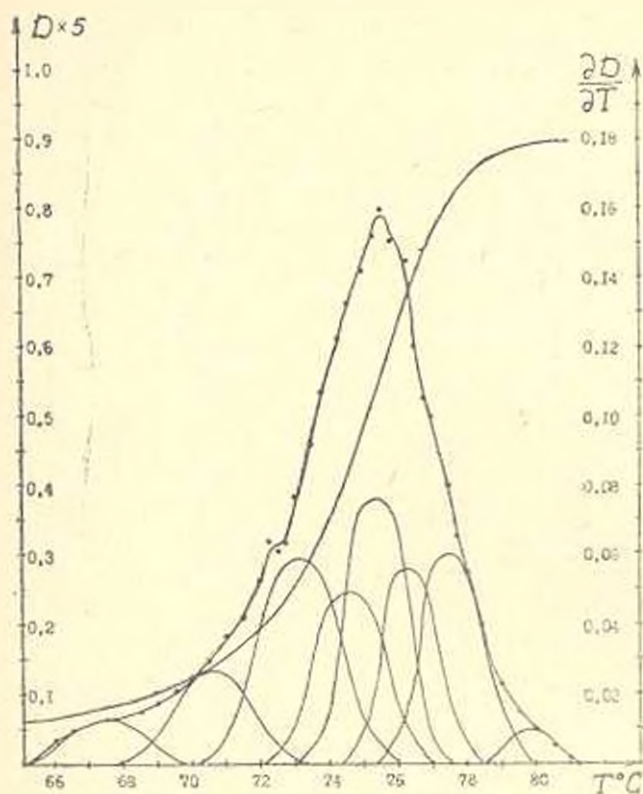


Рис. 3. Кривая плавления и ДКП для ДНК *E. coli* в 0,1 SSC.

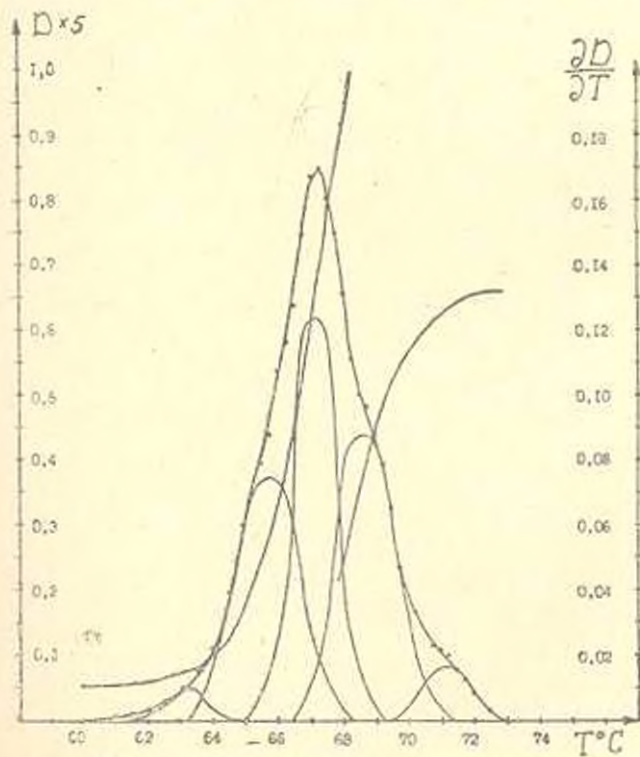


Рис. 4. Кривая плавления и ДКП фага T2 в 0,1 SSC.

Результаты вычислений (B_i — вычислено первым способом) приведены в табл. 1—4, а конечные результаты — в табл. 5. Как видно из

Таблица 1

ДНК из тимуса теленка

№ блока	Температура плавления блока в буфере 0,1 SSC (T_m)	Статистический вес блока (B_i)	% ГЦ содержания блока (X_i)
1	63,0	0,370	26,0
2	64,6	0,0961	29,2
3	66,0	0,0986	32,0
4	67,05	0,0625	34,1
5	68,05	0,1017	36,1
6	69,15	0,0803	38,3
7	70,0	0,1336	40,0
8	71,6	0,0962	43,2
9	73,65	0,1512	47,3
10	75,75	0,0287	51,5
11	76,9	0,0342	53,6
12	77,5	0,0605	55,0
13	80,0	0,0373	60,6

Таблица 2

ДНК фага T2

№ блока	Температура плавления блока в буфере 0,1 SSC (T_m)	Статистический вес блока (B_i)	% ГЦ содержания блока (X_i)
1	65,75	0,2907	31,5
2	67,1	0,3408	34,2
3	68,6	0,3216	37,2
4	71,2	0,0468	42,4

Таблица 3

ДНК из печени крысы

№ блока	Температура плавления блока в буфере 0,1 SSC (T_m)	Статистический вес блока (B_i)	% ГЦ содержания блока (X_i)
1	62,6	0,0420	25,2
2	61,5	0,0915	29,0
3	66,3	0,1390	32,6
4	67,3	0,1962	34,6
5	68,45	0,1278	36,9
6	69,7	0,1320	39,4
7	71,1	0,1207	42,2
8	72,5	0,0862	45,0
9	74,3	0,1723	48,6
10	76,8	0,0231	53,6

Таблица 4

ДНК E. coli

№ блока	Температура плавления блока и буфере 0,1 SSC (T _m)	Статистический вес блока (В _i)	% ГЦ содержания блока (X _i)
1	67,5	0,0402	35,0
2	70,6	0,0866	41,2
3	73,1	0,1999	46,2
4	74,6	0,1519	49,2
5	75,4	0,1995	50,8
6	76,3	0,1349	52,6
7	77,5	0,1651	55,0
8	79,8	0,0219	59,6

Таблица 5

Процентное валовое ГЦ содержание в молекулах ДНК

Метод	ДНК			
	тимуса теленка	печени крысы	E. coli	флаги 72
СФ	41,31±0,2	39,12±0,2	49,3±0,1	34,76±0,1
Химический	42 [6]	40 [2]	50 [2]	35 [7]

табл. 5, значения валового содержания ГЦ нуклеотидных пар в молекулах, полученные нами и химическим методом другими авторами, довольно хорошо совпадают для всех анализируемых ДНК. Незначительные отклонения, возможно, определяются различиями в методах выделения ДНК. Преимущества предложенного способа очевидны. Прежде всего, адекватная информация не требует химической дегградации молекул ДНК. Этим методом, более доступным и менее трудоемким, можно найти число блоков, входящих в ДНК данного молекулярного веса, и относительное ГЦ-содержание отдельных блоков.

Ереванский государственный университет,
института молекулярной физики и биофизики

Поступило 28.11.1978 г.

**ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմի որոշումը
ԴՆ-ՍՊԵԿՏՐՈՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿՈՎ**

Վ. Մ. ԱՐԱՆՅԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱՐԱՅԱՆ, Վ. Վ. ՍԱՂԱԹԵՅԱՆ,
ԽԻՐ. Կ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

Մշակված է մեթոդ, որը թույլ է տալիս որոշել ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմը սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով ստացված հալման դիֆերենցիալ կորերի անալիզի հիման վրա:

DETERMINATION OF NUCLEOTIDE CONTENT IN DNA BY UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

W. M. ASLANIAN, Y. S. BABAIAN, W. W. SAGATELIAN,
Mik. K. POGOSSIAN

A method is worked out that allows to determine the content of nucleotide in DNA on the basis of differential melting curve analysis received by means of spectrophotometry.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Mandel M. *et al.* J. Bacteriology, 101, 333, 1970.
2. Wiesbaden Gary *et al.* Biopolymers, 15, 1591, 1976.
3. Lazurkin Yu. S. *et al.* Biopolymers, 9, 1253, 1970.
4. Berestetskaya *et al.* Biopolymers, 13, 193, 1974.
5. Huguet T., Jounin L. ВЛВ, 262, 431, 1972.
6. Шугалин А. В., Франк-Каменецкий М. Д. Молек. биол. 5, 766, 1971.
7. Любченко Ю. Л., Трифонов В. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Молекуляр. биология, 5, 772, 1971.
8. Lyubchenko Yu. L. *et al.* Biopolymers, 15, 1019, 1976.

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ОРГАНИЗАЦИИ ТРОПОНИН-ТРОПОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА

В. М. АСЛАНЯН, Н. М. ГЕВОРКЯН, М. А. САРКИСЯН

Исследовано влияние температуры, мочевинны и ионной силы раствора на стабильность тропонин-тропомиеозинового комплекса и его компонентов. Обнаружено существенное повышение резистентности комплекса по сравнению с чистым тропомиеозин к действию 1 М мочевины. Делаются некоторые предположения относительно характера взаимодействия тропомиеозина с тропонином.

Известно, что процесс мышечного сокращения сопровождается конформационными перестройками в тропонин-тропомиеозинном комплексе (ТН—ТМ), стимулируемыми связыванием тропонином ионов кальция. Однако ряд вопросов, имеющих существенное значение для понимания молекулярных основ обсуждаемого процесса, остается по сей день невыясненным, например, механизм передачи действия этих ионов от места связывания на весь комплекс; факторы, способные влиять на характер взаимодействий, осуществляемых в системе ТН—ТМ; физическое воздействие тех или иных агентов, вызывающих перераспределение сил, стабилизирующих данный комплекс.

Для выяснения механизма работы комплекса ТН—ТМ необходимо исследовать его физическую организацию, т. е. его пространственную структуру, с одной стороны, и взаимодействия, которые приводят непосредственно к образованию комплекса и стабилизируют его — с другой. Изменение конформации должно быть связано с изменением баланса этих взаимодействий. А попытка выявления характера сил, участвующих в формировании функционально важного комплекса ТН—ТМ, является закономерным шагом на пути выяснения механизмов работы всей мышцы как целого и возможностей направленного воздействия на нее.

Материал и методика Сократительные белки выделялись из переходных скелетных мышц кролика. Тропонин выделялся согласно методике Гризи и Гергели [1], а тропомиеозин — Драбиковского и Гергели [2], после чего оба белка подвергались лиофильной сушке. Методом кругового оптического дихроизма (К/Д) исследовалось влияние температуры, мочевины и ионной силы на стабильность комплекса, его компонентов и на характер взаимодействий, реализуемых в этой белковой системе.

Результаты и обсуждение. В предыдущей работе [3] было показано наличие в структуре суперспирали тропомиеозина крупных гидрофобных блоков, а также группировок, чувствительно обогащенных заря-

женными аминокислотными остатками. Подобная гетерогенность наблюдается и в структуре тропопина, глобулу которого можно представить в виде существенно стабилизированного гидрофобными взаимодействиями ядра, окруженного оболочкой с явным превалированием заряженных групп. О такой организации тропопиновой глобулы свидетельствуют системы кривых, представленные на рис. 1 и 2. Они характеризуют изменение абсолютного эффекта $\Delta\epsilon_{220}$ КД при длине 220 нм. Уменьшение этого эффекта под влиянием тех или иных дестабилизирующих агентов указывает на снижение степени регулярности макромолекулы, связанное со снижением содержания α -спиральности в белке. Так, на рис. 1 представлены кривые температурного плавления тропопина в присутствии различных концентраций нейтральных солей (в нашем случае KCl). Почти 3/4 всех структурированных участков

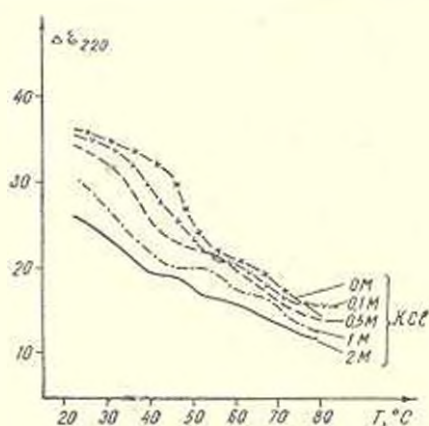


Рис. 1. Температурное изменение абсолютного эффекта КД в зависимости от концентраций KCl. $C_{\text{ТН}} = 0.1$ мг/мл, 50 мМ трис-HCl, pH 7.8, 10^{-3} М ЭГТА.

разрушается при температурах ниже 55° , а последняя четверть начинает плавиться только при температуре выше 60° . Первая ступень чрезвычайно чувствительна к возрастанию концентрации соли — уже 0.1 — 0.5M существенно дестабилизирует выплавляемые в этой области α -спиральные участки. При этом интересно, что высокотемпературная ступень во всей этой серии кривых оказывается практически неувязивимой, что выражается в постоянстве ее высоты. Эту особенность можно объяснить наличием в тропопине упомянутого выше гидрофобного ядра, содержащего $\sim 25\%$ α -спиральных участков. Таким образом, качественно независимо от концентрации соли в растворе (вплоть до 1M KCl) в первую очередь раскручиваются именно поверхностные α -спиральные участки, в стабилизации которых преобладающую роль играют электростатические взаимодействия.

Для дальнейшей проверки наших представлений было рассмотрено влияние второго агента — мочевины, являющейся, с одной стороны, антигидрофобным фактором, а с другой — фактором, понижающим ди-

электрическую проницаемость воды и тем самым несколько усиливающим электростатические взаимодействия. В конкуренции же за образование водородных связей с пептидной группой она незначительно отличается от воды, поэтому прямое действие на водородные связи, участвующие в стабилизации регулярной структуры белка, можно не рассматривать. При сравнении кривой температурного плавления свободного от мочевины раствора белка с раствором, содержащим ее в концентрации 0,5 М (рис. 2), бросаются в глаза четкое проявление

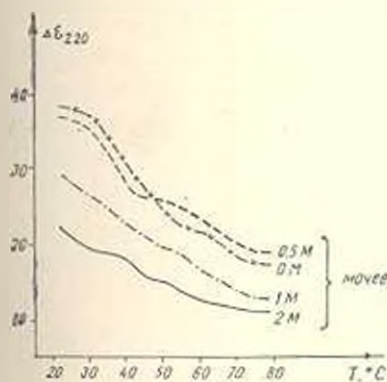


Рис. 2.

Рис. 2. Температурное изменение абсолютного эффекта КД в зависимости от концентрации мочевины. $C_{\text{ТН}} = 0,1$ мг/мл, 0,1 М КСl, 50 мМ трис-HCl, pH 7,8, 10^{-4} М ЭГТА.

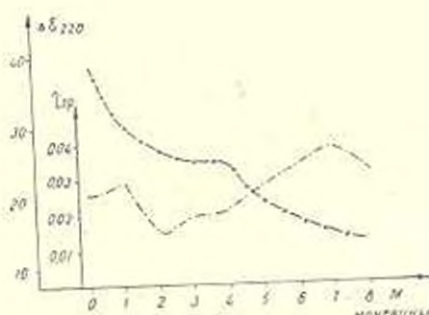


Рис. 3.

Рис. 3. Конформационные перестройки в тропонине при комнатной температуре в зависимости от содержания мочевины в растворе белка с 50 мМ трис-HCl, pH 7,45.

ступеней в последнем случае и явное смещение второй ступени вверх и влево. Это можно объяснить следующим образом. Наверняка α -спиральные участки на поверхности глобулы в определенной мере поддерживаются и гидрофобными взаимодействиями. Таким образом, на участках, расположенных вблизи поверхности глобулы, гидрофобный фактор ослаблен. И если этот эффект не компенсируется достаточным усилением электростатики, поддерживающей α -спиральную структуру, будет иметь место общая дестабилизация этих α -спиральных участков. Но те из них, на которых электростатическое притяжение превышает гидрофобный фактор, окажутся в присутствии мочевины стабилизированными. Им соответствует начальная часть кривой плавления чистого белка, которая в 0,5 М мочевины смещается влево. Дальнейшее повышение содержания мочевины приводит к деструкции почти всех α -спиральных участков, соответствующих первой ступени кривой плавления и 0,5 М мочевины. Кривая зависимости эффекта КД от температуры из ступенчатой превращается в размытую волнистую, что связано с потерей кооперативности, свидетельствующей о дестабилизации всей молекулы в целом. Интересно, что в присутствии 0,7 М КСl даже в растворах с высокой концентрацией мочевины электростатические

взаимодействия достаточно сильны, чтобы при комнатной температуре стабилизировать компактную структуру глобулы. Так, существенное уменьшение степени спиральности белка при концентрациях мочевины до 3М сопровождается значительным уменьшением вязкости (рис. 3). Похоже, что такая, более компактная, но с пониженной степенью спиральности конформация более или менее стабильна в области от 2 до 4М мочевины. Дальнейшее повышение концентрации мочевины вызывает набухание тропоминовой глобулы, о чем свидетельствует рост вязкости более чем в два раза при переходе от 2 к 7М раствору мочевины.

Далее оказывается, что по-разному организованные участки молекул тропомиозина и тропонина, обладая различной стабильностью, претерпевают интересные и весьма существенные конформационные перестройки в процессе формирования белкового комплекса, и вопрос в том, как реализуются и коррелируют свойства обоих компонентов в этом процессе.

Обратимся к рис. 4. Здесь кривая плавления комплекса (в присутствии 0,7М KCl) расположена левее двух его компонентов. Во всяком случае, плавление комплекса начинается при заметно более низких тем-

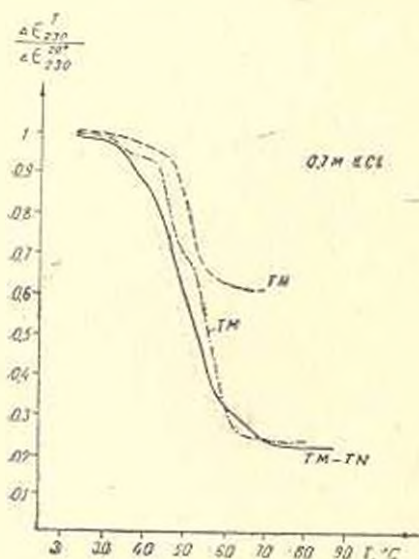


Рис. 4.

Рис. 4. Температурное изменение относительного эффекта КД (0,7 М KCl, трис-HCl, pH 7,45, 10^{-4} М ЭГТА).

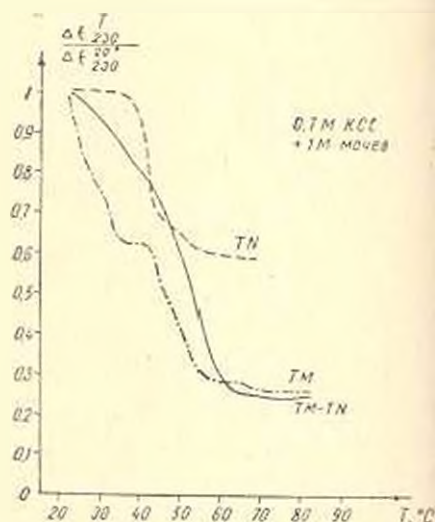


Рис. 5.

Рис. 5. Температурное изменение относительного эффекта КД (1 М мочевины, 0,7 М KCl, трис-HCl, pH 7,45, 10^{-4} М ЭГТА).

пературах, чем у тропомиозина. Температуры плавления комплекса, тропомиозина и тропонина равны соответственно 49, 53 и 50°. Далее, на рис. 5 представлены кривые температурного плавления комплекса $TN-TM$ в присутствии 1М мочевины. На фоне существенной чувствительности как тропомиозина, так и тропонина к мочевины поражает удив-

вительная инертность к ней комплекса. Об этом свидетельствует и температура плавления комплекса, которая не претерпевает изменений и остается равной 49° . Происходит лишь частичный сдвиг влево верхней части кривой плавления комплекса, что определяется дестабилизацией гидрофобных участков, но в значительно меньшей степени, чем у тропомиозина (с кривой плавления которого и имеет в основном смысл сравнивать ее, так как тропонин в степень спиральности комплекса вносит незначительный вклад).

Чем обусловлены столь существенные изменения в характере кривых плавления при переходе от комплекса к его компонентам? С уверенностью можно сказать, что образование комплекса сопровождается общей дестабилизацией тропомиозина, т. е. повышением его лабильности. Кроме того, оно связано со значительными конформационными изменениями, трансформируемыми вдоль всей молекулы тропомиозина, а не носит локального характера, как можно было бы ожидать исходя из компактности молекулы тропонина. В пользу этого говорит также тот факт, что взаимодействие ТН—ТМ влечет за собой агрегацию тропомиозиновых молекул [4, 5] за счет образования связи между его электростатически липкими концами [6, 7], в то время как связывание тропонина с тропомиозином происходит на значительном расстоянии от конца тропомиозиновой палки [8, 9].

Почему же комплекс столь инертен к действию мочевины? Очевидно, в результате того, что присутствие 0.7М КСI по крайней мере дестабилизирует структуру глобулярной оболочки, гидрофобное ядро тропонина становится более доступным. Это и приводит к прямому взаимодействию его с одним или несколькими участками, насыщенными гидрофобными остатками, на молекуле тропомиозина. Логично предположить, что ядро тропонина взаимодействует с тем (или с теми) участком(ами) макромолекулы тропомиозина, который в отсутствие тропонина плавится уже при комнатной температуре в растворе 1М мочевины.

Итак, образование связи тропомиозина с тропонином сводится к взаимодействию гидрофобного ядра тропониновой глобулы с предполагаемым гидрофобным блоком на макромолекуле тропомиозина. В то же время раздвинутые в стороны от участка взаимодействия с тропомиозином электростатические аминокислотные остатки тропонина могут, с большой вероятностью, дополнительно укреплять эту связь за счет электростатического притяжения заряженных групп, расположенных на суперспирали тропомиозина. Это, по нашим представлениям, и приводит к суммарному эффекту, выражающемуся в повышении упорядоченности белкового комплекса.

Ереванский государственный университет.
Кафедра молекулярной физики и биофизики

Получено 30.V 1978 г.

ՏՐՈՊՈՆԻՆ-ՏՐՈՊՈՄԻՈՅԻՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍԻ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՄԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆԻԱՆ, Ն. Մ. ԳԵՎՈՐԿԻԱՆ, Մ. Ա. ՍԱՐԿԻՍԻԱՆ

Հետազոտված է ջերմաստիճանի, միզանյութի և յուծույթի իոնային ուժի ազդեցությունը տրոպոնին-տրոպոմիոզին կոմպլեքսի և նրա բաղադրիչների կայունացման վրա: Հայտնաբերված է մեկ միզանյութի ազդեցության նկատմամբ կոմպլեքսի դիմադրելիության զգալի մեծացում, մաքուր տրոպոմիոզինի համեմատությամբ: Իսկ նախափորձյալն է տալիս որոշ ենթադրություններ անել տրոպոմիոզինի տրոպոնինի հետ փոխազդեցության բնույթի մասին:

ON THE FEATURES OF TROPONIN-TROPOMYOSIN COMPLEX
ORGANIZATION

W. M. ASLANIAN, N. M. GEVORKIAN, M. A. SARKISSIAN

In the present paper stability of tropomyosin-troponin complex and its components as a function of temperature in the presence of urea and at different ionic strength has been investigated.

These studies show the rise of resistance of the complex, as compared to tropomyosin alone, to the action of 1 M urea.

The results obtained give a chance to make some suppositions about the nature of tropomyosin-troponin interaction.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Greaser M. L., Gergely J. J., Biol. Chem., 248, 6, 1973.
2. Drabikowski W., Gergely J. JBC, 237, 4312, 1962.
3. Асланян В. М., Геворкян Н. М., Туманян В. А. Биофизика (в печати).
4. Hitchcock S. J. Mol. Biol., 81, 409—413, 1973.
5. Yamamoto K. et al. J. Biochem., 73, 1111—1114, 1972.
6. Асланян В. М. и др. Биофизические основы и регуляция мышечного сокращения. Мат-лы Всесоюз. симп., Пушкино, 1972.
7. William D. et al. J. Biochem., 47, 1969.
8. Ebashi S. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 37, New York, 1973.
9. Stewart M. Proc Roy. Soc., 190, 1099, 257—266, 1975.

ПЛАВЛЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ГОМОЛОГИЧНЫМИ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ГИСТОНАМИ

Г. А. ПАПОСЯН, Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН

Исследованы параметры плавления комплексов ДНК ТТ и ЭК с гомологичными и гетерологичными гистонами. С увеличением количества гистонов наблюдается повышение общей скрепочной активности и других параметров плавления. Показана зависимость ДНК-гистоновое взаимодействие от ГЦ-состава ДНК. Частичная денатурация ДНК существенно отражается на характере плавления комплексов. Полученные результаты свидетельствуют о наличии определенной специфичности во взаимодействии гомологичного гистона с ДНК.

Одним из способов изучения структуры и функций нуклеогистонов является исследование методом плавления взаимодействия комплексов ДНК как с тотальными гистонами, так и с отдельными гистоновыми фракциями. Исследование плавления этих комплексов может дать ответ на такие вопросы как скрепочная активность гистонов, термическая стабильность комплексов, распределение гистонов вдоль молекулы ДНК, избирательность взаимодействия их с определенными последовательностями ДНК и т. д.

Проведенные нами ранее эксперименты по плавлению комплексов ДНК с нефракционированными гистонами (НФГ) выявили существенную разницу в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов [1].

Настоящая работа посвящена исследованию некоторых особенностей взаимодействия гомологичного гистона с ДНК методом плавления.

Материал и методика. В экспериментах использовали ДНК ТТ (тимуса теленка), ЭК (эритроцитов кур), СЛ (спермы ласухи) и ПС (печени сазана) с ГЦ-составами 0,44, 0,42, 0,49, 0,39 соответственно, выделенные фенольным методом. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури, оно составляло менее 1%.

Нефракционированные гистоны (НФГ) ТТ и ЭК получали выделением из соответствующих тканей кислотной экстракцией по Джонсу [2] с последующим отделением от негистонного белка хроматографированием на карбоксиметицеллюлозе (КМЦ), «Reanal» (Венгрия) и СМ-32 «Waters» (Англия). Чистоту гистоновых препаратов определяли гелем электрофорезом по модифицированному Барриажским методом Джонса [3]. Концентрацию гистонов в растворе определяли по Лоури, а также спектрофотометрически, принимая поглощение раствора гистона 1 мг/мл равным 1,25 ОД при 230 нм [4], а концентрацию ДНК — спектрофотометрически, принимая коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{260} = 6600$.

Исследуемые препараты растворялись в $5 \cdot 10^{-2}$ М фосфатном буфере, рН 7,0. Все препараты перед употреблением dialизировались при 4° в течение 48 час. при соотношении диализат/буфер = 1/1000.

Комплексобразование между гистонами и ДНК проводили медленным добавлением гистона соответствующей концентрации к раствору ДНК, при интенсивном перемешивании и в весовых соотношениях гистон/ДНК, равных 0,25, 0,5, 0,75, и 1,00. Реконструированные комплексы приготавливались градиентным диализом из 2 М NaCl.

Плавление ДНК и ее комплексов с гистонами проводили в герметически закрытых кюветах спектрофотометра СФ-4А, помещаемых в термостатическую ячейку с точностью термостатирования $\pm 0,1^\circ$. Температуру в кюветах определяли с помощью медь-константановой термопары.

В экспериментах по плавлению комплексов гистонов с предварительно частично денатурированными молекулами ДНК комплексирование проводили в кюветах добавлением гистона соответствующей концентрации, предварительно нагретого до той же температуры, а растворы перемешивали в кюветах специальной мешалкой.

Кривые плавления, приведенные на рисунках, строили по изменению поглощения образцов при 260 нм в зависимости от температуры; они представляют собой усредненные данные 6 экспериментов. Измерение поглощения образцов проводили спустя 8—10 мин после установления теплового равновесия в кюветах. Для исключения возможных систематических ошибок, плавление комплексов ДНК с гистонами проводили одновременно с плавлением образца чистой ДНК.

Общую скрепочную активность (ОСА) определяли как интегральную площадь между кривыми плавления чистой ДНК и ее гистоновыми комплексами при выбранных масштабах графика. Этот параметр позволяет определять суммарные изменения по всем интервалам плавления и довольно сильно увеличивает чувствительность метода.

Эксперименты проводили и гомологичных (ДНК и гистоны выделены из одного источника) и гетерологичных (ДНК и гистоны выделены из разных источников) комплексах.

Результаты и обсуждение. Установленная нами ранее разница в плавлении гомологических (гом.) и гетерологических (гет.) ДНК-гистоновых комплексов, практически не наблюдаемая при весовом соотношении гистон/ДНК = 0,25, достигает максимума в интервале весовых соотношений 0,50—0,75 и практически исчезает при весовом соотношении 1,00.

При сопоставлении кривых плавления нуклеогистонов с одинаковым соотношением гистон/ДНК наблюдаются более высокие температуры плавления (T_m) гетерологичных нуклеогистонов по сравнению с гомологичными (рис. 1).

Поскольку соотношение гистон/ДНК одинаково для обеих систем, то разницу в плавлении этих систем можно, вероятно, объяснить только неодинаковым распределением гистонов вдоль молекулы ДНК при комплексировании. Это предположение подтверждается экспериментами по ренатурации денатурированных комплексов [1] и при определении свободных от гистонов участков в комплексах [5].

Увеличение ионной силы приводит к смещению участка кривой плавления до ступеньки, из чего следует, что на этих участках плавятся практически свободные от гистонов отрезки ДНК. При определении температуры плавления этих участков, выявилась их обогащенность ГЦ-па-

рами, что хорошо согласуется с данными о предпочтительном взаимодействии гистонов с АТ-богатыми участками ДНК [6—12] и др.

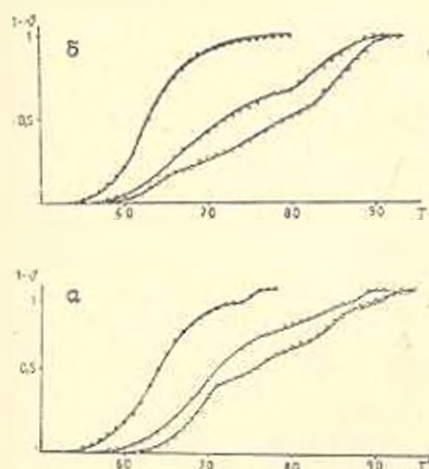


Рис. 1. Кривые плавления комплексов ДНК ТТ (а) и ЭК (б) с гистонами ГТ и ЭК при весовом соотношении гистон/ДНК=0,75. По оси абсцисс температура, по оси ординат относительный гиперхром. ●—●—● — свободная ДНК, ○—○—○ — гомологичная система, △—△—△ — гетерологичная система.

Изменение ГЦ-состава плавящихся до ступеньки молекул ДНК в зависимости от соотношения гистон/ДНК показано в табл. 1.

Таблица 1

Зависимость ГЦ-состава свободных от гистонов участков ДНК
от соотношения гистон/ДНК

Соотношение гистон/ДНК	ДНК ТТ				ДНК ЭК			
	Тм		ГЦ-состав		Тм		ГЦ-состав	
	гом.	гет.	гом.	гет.	гом.	гет.	гом.	гет.
Свободная ДНК	64,0	64,0	0,44	0,44	63,0	63,0	0,42	0,42
0,25	64,5	65,5	0,45	0,47	63,5	64,5	0,43	0,44
0,50	65,5	67,0	0,47	0,50	65,0	66,0	0,46	0,48
0,75	69,0	70,0	0,54	0,56	67,0	70,5	0,50	0,55
1,00	73,0	73,5	0,62	0,63	70,0	71,0	0,58	0,60

Как видно из таблицы, максимальная разница между ГЦ-составами свободных от гистонов участков гомологичных и гетерологичных комплексов наблюдается в интервале соотношений гистон/ДНК (0,50—0,75). Вероятно, это именно тот интервал, где избирательность взаимодействия проявляется максимально, поскольку количество гистона относительно мало, и неспецифическое взаимодействие не маскирует специфическое. При низких соотношениях гистон/ДНК (0,25) общее коли-

чество гистонов недостаточно для выявления специфичности, а при высоких (1.0) неспецифическое взаимодействие практически полностью маскирует специфическое. Аналогичная картина наблюдается при определении ОСА (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость ОСА гистонов от ГЦ-состава ДНК (в условных единицах ОСА)

Гистон ДНК	ДНК ПС с ГЦ 0,39	ДНК ЭК с ГЦ 0,42				ДНК ТТ с ГЦ 0,44			ДНК СЛ с ГЦ 0,49
	гет. гис- тон ТТ	гом. гис- тон ЭК	гет. гис- тон ТТ	Δ	гом. гис- тон ТТ	гет. гис- тон ЭК	Δ	гет. гис- тон ТТ	
0,25	20,4	14,3	17,6	3,3	10,9	15,8	4,9	9,5	
0,50	41,5	24,7	40,6	15,9	13,7	30,9	17,2	17,0	
0,75	77,1	45,1	65,5	20,4	38,0	55,2	17,3	30,6	
1,00	59,3	66,7	77,9	9,2	70,8	73,0	2,2	45,2	

Для исследования ОСА гистонов в зависимости от ГЦ-состава ДНК нами были проведены эксперименты по плавлению комплексов гетерологичных гистонов (гистон ТТ) с ДНК СЛ и ДНК ПС. Данные этих экспериментов также приведены в табл. 2.

Неуклонное повышение температуры плавления с увеличением соотношения гистон/ДНК и данные о предпочтительном взаимодействии гистонов с АТ-богатыми блоками ДНК приводят к выводу о главной роли АТ-последовательностей в специфическом взаимодействии.

В экспериментах с реконструированными днализом комплексами разность между кривыми плавления гомологичных и гетерологичных систем возрастает, что свидетельствует о более избирательном взаимодействии гистонов с ДНК.

Таким образом, эксперименты показали, что гистоны, комплексируясь с ДНК, оставляют свободными довольно большие участки, обогащенные ГЦ парами. Отсюда можно сделать естественный вывод, что разница, наблюдаемая в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов, обусловлена неодинаковым взаимодействием гистонов с АТ-богатыми участками ДНК.

Для исследования зависимости ОСА гистонов от ГЦ-состава ДНК нами были проделаны эксперименты по плавлению комплексов гистонов с частично денатурированными молекулами ДНК. Мы использовали факт линейного увеличения ГЦ-состава нерасплавленных участков ДНК одновременно с увеличением температуры. Эксперименты были проведены с ДНК ТТ и ЭК, предварительно расплавленными до 60, 62, 64 и 66°.

Как видно из результатов плавления, ОСА гистонов с повышением температуры предварительного расплавления ДНК уменьшается. Одновременно наблюдается резкое уменьшение разности между кривыми плавления гомологичных и гетерологичных комплексов. Если при 60° эта разность достигает значительной величины, то при предварительном расплавлении до 66° она уменьшается или вовсе исчезает (табл. 3).

Таблица 3

Зависимость ОСА от температуры предварительного расплавления ДНК
(соотношение гистон/ДНК, 0,50)

T°	ДНК ЭК					ДНК ТТ				
	ГЦ*	гом.	гет.	Δ	гет. гом.	ГЦ*	гом.	гет.	Δ	гет. гом.
25	0,42	24,7	40,6	15,9	1,64	0,44	13,7	30,9	17,2	1,25
40	0,48	15,0	25,9	20,9	1,73	0,49	20,4	21,1	10,7	2,07
62	0,50	18,0	20,1	4,1	1,31	0,51	9,2	14,5	5,3	1,58
64	0,53	10,3	13,1	2,8	1,27	0,53	6,7	8,5	1,8	1,27
66	0,56	7,8	10,2	2,4	1,30	0,55	6,6	6,7	0,1	1,02

T° — температура предварительного плавления ДНК до добавления гистона.

ГЦ* — расчетный ГЦ состав нерасплавленных участков.

Нами были проведены также эксперименты по плавлению комплексов гистонов с ренатурированными до 0° на точки плавления молекулами ДНК. Из рис. 2 видно, что несмотря на ренатурацию разница между гомологичными и гетерологичными комплексами практически отсутствует, а плавление сходно с плавлением комплексов, приготовленных с предварительно расплавленной ДНК.

Полученные результаты дают основание полагать, что гомологичные и гетерологичные гистоны по-разному взаимодействуют с молекулами ДНК. Одновременно наблюдается выраженная двухфазность плавления; первая фаза соответствует плавлению свободных, а вторая — комплексированных участков.

Гистоны, предпочитительно связываясь с АТ-богатыми участками, увеличивают средний ГЦ-состав свободных участков [6—12]. Труднее интерпретировать наблюдаемую разницу в плавлении гомологичных и гетерологичных комплексов. Более высокий уровень ступеньки в гомологичной системе свидетельствует о большей кооперативности во взаимодействии гистонов с ДНК.

Вероятно, гомологичные гистоны при добавлении к ДНК предпочтительно взаимодействуют с участками, уже занятыми гистонами, оставляя большинство блоков ДНК свободными от гистонов до определенной концентрации, а гетерологичные гистоны взаимодействуют даже с АТ-последовательностями ГЦ богатых блоков, более равномерно распределяются по ДНК и тем самым увеличивают ГЦ-состав свободных участков на большую величину, чем гомологичные [7] (табл. 1).

Поскольку в настоящее время достаточно однозначно показано, что первая фаза плавления соответствует чистой ДНК [8, 11—13], то посредством определения ее T_m можно с достаточной точностью вычислить ГЦ-состав свободных от гистонов участков.

При повышении ионной силы первая фаза плавления смещается в область высоких температур, а разница между гомологичными и гетерологичными комплексами уменьшается. Возможно, в этом случае исчезает ряд факторов, ответственных за специфическое взаимодействие гистонов с ДНК. Вероятнее всего это изменение В-конформации ДНК или

деформация молекулы на отдельных, возможно, АТ-богатых участках, или и то и другое.

Значительный интерес представляет зависимость ОСА от ГЦ-состава ДНК. Сравнивая полученные результаты по плавлению комплексов гистонов с ДНК различного ГЦ-состава в гетерологичных системах, можно обнаружить следующую закономерность: скрепочная активность гистонов линейно возрастает с уменьшением ГЦ содержания. Эта закономерность наблюдается при всех соотношениях гистон/ДНК и подтверждает предпочтительность во взаимодействии гистонов с АТ-богатыми участками ДНК. Труднее объяснить пересечение полученных для различных соотношений гистон/ДНК прямых в одной точке, соответствующей ГЦ содержанию в 56—57% (рис. 2).



Рис. 2. Плавление комплексов гистонов ТТ и ЭК с ренатурированными из точки T_m молекулами ДНК ТТ, при несомом соотношении гистон/ДНК = 0,50. ●—●—●—ДНК ТТ, ○—○—○—ДНК ТТ+гис. ТТ, ▲—▲—▲—ДНК ТТ+гис. ЭК, ◐—◐—◐—ДНК ТТ рен. + гис. ТТ, △—△—△—ДНК ТТ рен. + гис. ЭК.

На наш взгляд, это указывает на то, что для комплексов гистонов с ДНК необходимо минимум четыре АТ, из каждых десяти взаимодействующих с гистонами пар оснований. Результаты, полученные при плавлении комплексов гистонов с частично денатурированными молекулами ДНК, хорошо согласуются с полученными прямыми и подтверждают данное предположение.

Эксперименты по плавлению комплексов гистонов с ренатурированными молекулами ДНК показывают роль ренатурированных участков и специфическом взаимодействии.

Несмотря на ренатурацию, разница между плавлениями гомологичных и гетерологичных систем практически отсутствует. Поскольку разница в ОСА между системами в данном случае оказывается больше, чем для неренатурированной ДНК (2,4 вместо 1,8), то можно рассчитать вклад ренатурированных участков и увеличении ОСА.

Из экспериментов следует, что за основную долю специфичности (около 80%) ответственны участки ДНК с АТ содержанием 65—100% (уровень ренатурации из T_m — 64° — 20%, T_m ренатурированных участков — 57,5, АТ содержание 65—100%), а на участки с АТ содержанием 47—65% приходится 20% специфического взаимодействия (2,4 ед. ОСА из 16).

Таким образом, особенности во взаимодействии гомологичных гистонов с ДНК являются не артефактом, а результатом специфического

взаимодействия. В реконструированных нуклеогистонах специфичность как и кооперативность взаимодействия гистонов выражена гораздо сильнее. Специфичность проявляется вследствие большей кооперативности при взаимодействии гомологичных гистонов с ДНК, что приводит к менее равномерному распределению гистонов в гомологичной системе и отражается на кривых плавления.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 27.IX 1977 г.

ՀՈՄՈԼՈԳ և Կ ՀԵՏԵՐՈԼՈԳ ԳԵՑ-ՀԻՍՏՈՆԱՅԻՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ՀԱՄԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Հ. Ի. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Պ. Ի. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ

Ստացվել է ուսումնասիրվել է հոմոլոգ և հետերոլոգ սխտեմներում Գեց-հիստոնային կոմպլեքսների հալման կորերի տարրերությունը, որը թույլ է նշմարված հիստոն-Գեց 0,25 կշռային հարաբերություններում, հասնում է մարսիմումի 0,50—0,75 հատվածում և գրեթե չի նկատվում 100 հարաբերություններում:

Բարդ հալման կորերի անսլիզը ղգալիորեն հետապոսովում է մեր մշակած ընդհանուր ամրակային ակտիվություն որոշող պարամետրի օգնությամբ (Ը և Ա): Հիստոնների Ը և Ա կախվածությունը Գեց-ի ԳՑ պարունակությունից ունի ղծային բնույթ և արտացոլում է հիստոնների խնամակցությունը Գեց-ի ԱՏ հարուստ հատվածների նկատմամբ:

INVESTIGATION OF DNA MELTING WITH HOMOLOGIOUS AND HETEROLOGIOUS HISTONES

G. H. PANOSYAN, H. R. VASIDAPETIAN, P. H. VARDEVANYAN

The parameters of DNA CT and CE melting with homologious and heterologious histones have been investigated. Change of total fastening activity and other parameters of melting may be observed with the increase of the amount of histones.

The dependence of DNA histone interaction on G—C composition of DNA and partial denaturation of DNA has also been shown.

The obtained results show that there is certain specifity in the interaction of homologious histone with DNA.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Варձապետյան Բ. Բ., Կարապետյան Ա. Դ., Փանոսյան Գ. Ա. Биологический журнал Армении, 27, 8, 29, 1974.
2. Johns E. W., Philips D. M. P., Simons P., Butler I. A. V. Biochem. J., 80, 189 1961.
3. Варшавский А. Я., Микельсаар У. Н., Ильин Ю. В. Молек. биол., 6, 4, 507, 1972.
4. Ohlenbush H. H., Olivera B. M. J. Mol. Biol., 25, 229, 1967.
5. Варձապետյան Բ. Բ., Փանոսյան Գ. Ա., Խաչատրյան Ա. Դ. Биологический журнал Армении, 30, 7, 39, 1977.

6. *Leng M., Felsenfeld G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **56**, 1325, 1966.
7. *Gottesfeld J. M., Melvin C. R., David C. R., David M. R., Vivian M., William V.* Biochemistry, **11**, 8, 1422, 1972.
8. *Shih T. Y., Bonner J. J.* Mol. Biol., **48**, 3, 469, 1970.
9. *Renz M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 733, 1974.
10. *Sponar J., Sormova Z.* Eur. J. Biochem., **29**, 99, 1972.
11. *Li H. J.* Biopolymers, **11**, 4, 835, 1972.
12. *Subirana Y. A. J.* Mol. Biol., **74**, 363, 1972.
13. *Leffak M., Hwan J. C., Shih T. Y.* Biochemistry, **13**, 6, 1116, 1974.

ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ КЛЕТКАМИ *STREPTOCOCCUS FAECALIS* И *ESCHERICHIA COLI*

С. С. ДУРГАРЬЯН, С. М. МАРТИРОСОВ, Л. С. ПЕТРОСЯН

Изучались особенности обмена ионов подорода клетки на ионы калия среды у грамположительных бактерий *Streptococcus faecalis* ВКМ В-602 и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* К-12 (А). Установлены зависимости величины и скоростей поглощения калия и секреции протонов от свойств внешней среды. Экспериментальные результаты находят наиболее полное объяснение, если допустить существование активной аккумуляции ионов калия бактериями.

Транспорт протонов играет важную роль в трансформации энергии и секреции кислоты у микроорганизмов. Сейчас накопилось большое количество данных, доказывающих наличие протонных насосов в мембранах этих объектов [1]. Значительно хуже изучена природа поглощения калия у микроорганизмов, где эти ионы играют важную роль в регуляции осмотического давления клеток. Для грамположительных бактерий предполагается, что их протонный насос является электрогенным и в период своей деятельности генерирует разность потенциалов на мембране в (—200) мВ, а ионы калия по градиенту этого поля втягиваются в клетку, распределяясь пассивно между бактериями и средой [2]. Для грамотрицательных организмов допускалось, что насос электронеутрально обменивает один протон клетки на один ион калия среды с затратой энергии АТФ, что приводит к накоплению ионов калия [3]. Кроме того, в отношении *E. coli* установлено, что насос включается и ответ на изменение осмотического давления среды [4, 5]. Более детальный анализ показал, что, по-видимому, у *E. coli* через насос переносятся два иона подорода из клетки в среду и один ион калия в обратном направлении, следовательно, он в данном случае электрогенен [6]. Таким образом, понески доказательства в пользу активного поглощения ионов калия бактериями в настоящее время становятся целесообразными. Экспериментальные данные настоящей работы легче интерпретируются с точки зрения энергозависимого поглощения калия.

Материал и методики. В опытах использовались бактерии *Streptococcus faecalis* ВКМ В-602 и *Escherichia coli* К-12 (А). Культуры хранились на косяках рыбкостного агара под слоем вазелинового масла при температуре 3—5° и ежемесячно пересеивались. Ростовая среда, в которой выращивались *E. coli* до поздней стационарной фазы (46—52 час.) при 37° без аэрации, представляет собой водный раствор 2%-го пептона, 0,5%-го NaCl, 0,2%-го K_2HPO_4 и глюкозы.

Условия выращивания *St. faecalis* описывались ранее [7].

Бактериальные клетки осаждались центрифугированием и течение 20 мин при $n=3600$ г, отмывались и вновь осаждались при тех же условиях центрифугирования. 2 мл сконцентрированной бактериальной суспензии вносилось в 18 мл экспериментального раствора, основу которого составляли фосфатный буфер (H_3PO_4 и $C_4H_{11}NO_3$), хлориды калия и натрия и сульфат магния. Источники питания—глюкоза или молочная кислота—добавлялись по мере необходимости. В течение всего опыта экспериментальная ячейка находилась в контролируемых термостатических условиях (12, 25 и 37°).

В качестве отмывочных растворов использовались дистиллированная вода и растворы сахарозы различных концентраций.

Если бактерии переносятся из одной среды в другую с той же толщиной, такой перенос является изотоническим, а осмотический шок, испытываемый клетками, равен нулю. При переносе бактерий из среды с более низким в среду с более высоким осмотическим давлением клетки подвергаются положительному осмотическому шоку. Если толщина второй среды меньше, чем первой, клетки испытывают отрицательный осмотический шок.

Осмотичность растворов определялась расчетами.

Концентрация бактерий в 1 мл жидкой среды определялась числом бактерий на твердые питательные среды с последующим подсчетом колоний. В процессе подготовки концентрации бактериальной суспензии возрастала в 20 раз. Такая высокая концентрация бактерий, близкая к М-титру, исключает деление клеток и обеспечивает постоянство их числа, что подтверждалось специальными тестами [8]. Кроме того, было установлено, что в процессе центрифугирования и отмывок, ведущих к созданию различных осмотических шоков, клетки не погибают. Такого рода проверки исключают возможность зависимости изменения активности ионов во внешней среде от изменения числа клеток в популяции.

Изменение активности H^+ , K^+ и Na^+ во внешней среде регистрировалось потенциометрическим методом с помощью катхонселективных электродов, как описано ранее [7].

Для клеток *E. coli* количество глюкозы в ростовой среде имело существенное значение. Концентрация глюкозы в ростовой среде 55 мМ ингибирует поглощение калия—скорость и общее его количество—по сравнению с 22 мМ глюкозы, когда калий не только быстрее поглощается, но и удерживается клетками.

Так как целью нашей работы было исследование двухфазного поглощения калия у *E. coli*, клетки выращивались в ростовой среде с 11 мМ глюкозы (рис. 1). В некоторых опытах в качестве источника питания использовалась молочная кислота. При этом бактерии специально не адаптировались к новому виду источника энергии.

Результаты и обсуждение. Поглощение калия и осмотичность среды. В присутствии глюкозы бактерии секретируют кислоту и поглощают ионы калия. Характер поглощения ионов калия у клеток *E. coli* определяется осмотическим шоком, которому они подвергались при переносе из отмывочного раствора в экспериментальный. Зависимость поглощения калия клетками *E. coli* от времени при разных осмотических переносах представлена на рис. 2. На всех кривых можно выделить две фазы, из которых первая имеет продолжительность 5—7 мин и определяется величиной осмотического шока. Характерным для этой фазы является постоянство скорости поглощения калия в первые минуты и постепенное удлинение ее (смещение пиков вправо) с увеличением осмотического шока. Две нижние кривые (—55 мосМ и —115 мосМ) соответствуют отрицательным осмотическим шокам. В этих двух случаях поглощение в первой фазе заменяется истечением калия из клеток. Кривые

«+80 мосМ» и «+180 мосМ» можно рассматривать как переходные случаи.

С пятой по двадцатую минуту у анаэробно выращенных *E. coli* в щелочных средах наблюдается истечение калия [5].

Вторая фаза поглощения калия является более растянутой, не зависит от величины осмотического шока и наблюдается во всех описанных случаях. Создается впечатление, что общая кривая кинетики поглощения калия является суперпозицией двух кинетических процессов, а, возможно, и двух режимов работы мембранной транспортной системы у осмочувствительных бактерий. Шульц, Эпштейн и Соломон предположили наличие у *E. coli* двух систем, обеспечивающих протонно-калиевый и калий-натриевый обмен [9]. В наших же опытах не было зарегистрировано никакого перемещения ионов натрия у *E. coli* как при положительном, так и при отрицательном осмотических шоках.

Совершенно иной характер поглощения калия, сопровождающийся секретцией кислоты, наблюдается у осморезистентных клеток *St. faecalis*. Этот процесс происходит в одну фазу и может повторяться много часов подряд при повторных добавках глюкозы в среду [7].

Источники энергии и pH среды. Кривые 1 и 2 (рис. 3) иллюстрируют случай, когда клетки *E. coli*, подвергнутые одному и тому же положи-

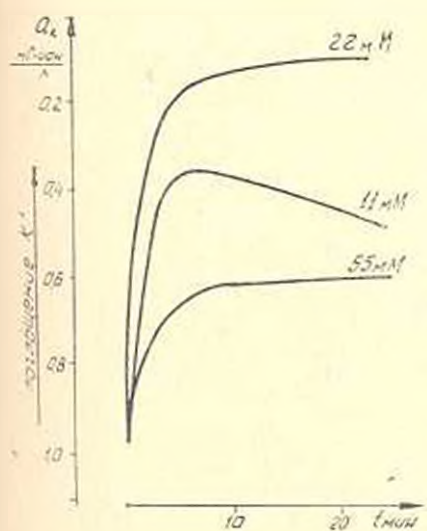


Рис. 1.

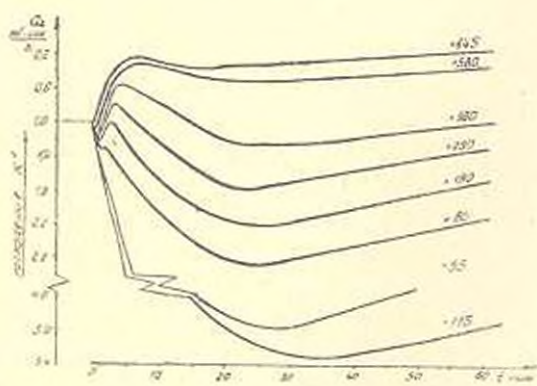


Рис. 2.

Рис. 1. Особенности кинетики энергезависимого поглощения калия клетками *E. coli* в зависимости от количества глюкозы в ростовой среде; a_k — активность ионов калия в среде, pH 7,5.

Рис. 2. Изменения активности ионов калия в экспериментальной среде для клеток *E. coli*, подвергнутых различным осмотическим шокам. Начальная активность калия в экспериментальной среде 1 мг-ион/л, pH 8,0, содержание глюкозы 50 мМ. Положительные значения параметра $\Delta\text{ос}$ соответствуют положительному осмотическому шоку, отрицательные — отрицательному. Ростовая среда содержит 11 мМ глюкозы.

тельному осмотическому шоку (+580 мосМ), переносятся в глюкозные среды, отличающиеся только рН. При более низком рН (6,5) калий поглощается и удерживается клетками (кр. 1); при рН 7,5 различаются две фазы поглощения, разделенные фазой выхода калия из клеток (кр. 2). Однако начальные скорости энергозависимого поглощения калия при разных рН равны. Если во внешней среде отсутствует источник энергии, то пассивное истечение калия при одинаковых значениях рН определяется тоничностью экспериментального раствора (кр. 3 и 5). При осмотическом давлении внешней среды, равном 425 мосМ (кр. 5), наблюдается довольно длительный выход калия, тогда как при тоничности 900 мосМ (кр. 3) почти мгновенно наступает равновесие. В начальный период скорости пассивного истечения калия совпадают. Гораздо большую роль в удержании клетками калия играет рН наружной среды, что хорошо видно при сравнении кр. 4 с кр. 3 и 5. Благодаря более низкому значению рН, равному 6,5, калий почти не покидает клетки, хотя величина тоничности экспериментального раствора занимает промежуточное положение. Во всех приведенных случаях бактерии отмывались в дистиллированной воде, поэтому величина осмотического шока совпадает с тоничностью раствора. Добавка глюкозы вызывает секрецию протонов и поглощение ионов калия.

Если экспериментальная среда вместо глюкозы содержит молочную кислоту, то у клеток *E. coli* при положительном осмотическом шоке и рН 7,5 наблюдается первая фаза поглощения калия, хотя и сильно отличающаяся по величине от первой фазы при глюкозозависимом поглощении. Наиболее существенным является полное отсутствие второй фазы (кр. 6 рис. 3).

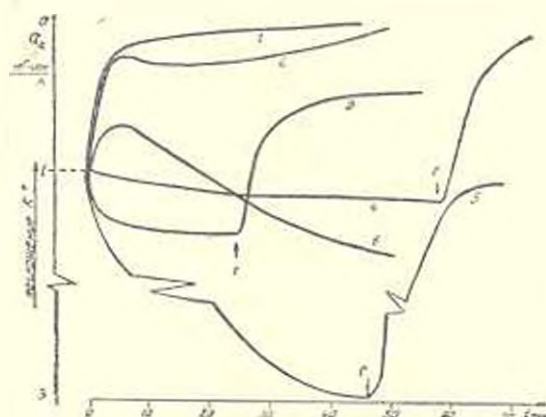


Рис. 3. Влияние рН среды и ее тоничности на удержание калия клетками *E. coli* в присутствии глюкозы (кр. 1 и 2), молочной кислоты (кр. 6) и без источников питания в среде (кр. 3, 4 и 5). Начальная активность калия в среде—1 мг-ион/л. Кр. 1 и 2: начальное значение рН среды 6,5 и 7,5 соответственно, осмотический шок +585 мосМ. Кр. 3 и 5: начальное значение рН среды 7,5, осмотический шок +900 и +425 мосМ. Кр. 4: осмотический шок +650 мосМ, рН 6,5. Кр. 6: вместо глюкозы в экспериментальной среде содержится 30 мМ молочной кислоты, рН 7,0.

Из рис. 3 видно, что поглощение калия у *E. coli*, так же как и у *St. faecalis*, может иметь место только при наличии в среде источника энергии [7]. Несмотря на различия в свойствах бактерий—осмочувствительных *E. coli* и осморезистентных *St. faecalis*—общим является факт энергозависимого обмена протонов клетки на ионы калия среды.

Зависимость от $(a_K)_u$. Характер зависимости скорости переноса иона через мембрану от его активности в наружной среде может содержать в себе косвенную информацию о природе переноса. Эпштейн и Шульц на клетках *E. coli*, подвергнутых гипертоническому шоку, показали, что начальная скорость поглощения калия в области концентраций калия во внешней среде от 0,16 до 8,0 мг-ион/л подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, с максимальной скоростью 10 пМ/см²·сек [4]. Насыщение наступает в области 5—6 мг-ион/л калия во внешней среде.

Качественно похожие результаты получены нами при анализе диаграмм, приведенных на рис. 4а. Кинетика поглощения калия записывалась при содержании калия во внешней среде, равном 1, 3, 5 и 10 мг-ион/л. Начальный поток калия, направленный в клетку, возрастает с увеличением концентрации его во внешней среде и достигает насыщения в области 5—6 мг-ион/л, что совпадает с данными Эпштейна и Шульца [4]. Однако в нашем случае величина потока насыщения составляет 4000 пМ/см²·сек.

Если бы ионы калия поступали в клетку по градиенту электрического поля, генерируемого на мембранах бактерий в присутствии глюкозы [10—12], например благодаря деятельности протонного насоса, то проводимость для калия g_K была бы, согласно законам электродиффузии, пропорциональна активности этих ионов в среде

$$g_K = \frac{p_K I^3 E (a_K)_u}{R^2 T^2 (1 - e^{-FE/RT})},$$

где E — трансмембранный потенциал, $(a_K)_u$ — активность калия в наружной среде, p_K — проницаемость мембран бактерий к ионам калия, R , T и F — газовая постоянная, абсолютная температура и число Фарадея. В этом случае увеличение концентрации калия во внешней среде должно было бы вызвать пропорциональное увеличение величины потока.

Насыщение может наблюдаться только в том случае, когда перенос калия через мембрану связан с некоторыми отдельными ее элементами, число которых, естественно, ограничено.

Для второй фазы поглощения у *E. coli* на 20—21-й минутах величина потока линейно возрастает с возрастанием концентрации калия во внешней среде от 0,2 до 4,0 мг-ион/л (рис. 4б). Эта область измерений недостаточна для определения характера зависимости потока калия от $(a_K)_u$. Существенным является тот факт, что максимальная величина потока (100 пМ/см²·сек) во второй осмочувствительной фазе во много раз меньше, чем в осмочувствительной фазе, согласно нашим результатам, но хорошо совпадает с данными Эпштейна и Шульца для осмочувствительной фазы у *E. coli* [4].

Возможно, в мембранах *E. coli* имеются две системы для регуляции распределения ионов между клеткой и средой, выявляемые в эксперименте как две фазы: осмочувствительная и осмонсочувствительная. Не исключена и другая возможность. Одна и та же система работает в раз-

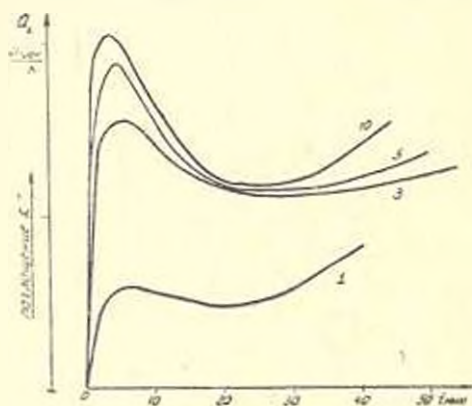


Рис. 4а. Поглощение ионов калия клетками *E. coli* при различных начальных активностях калия в среде, равных соответственно 1, 3, 5 и 10 мг-ион/л; во всех случаях осмотический шок равен +185 мосМ, начальное значение рН среды 7,5.

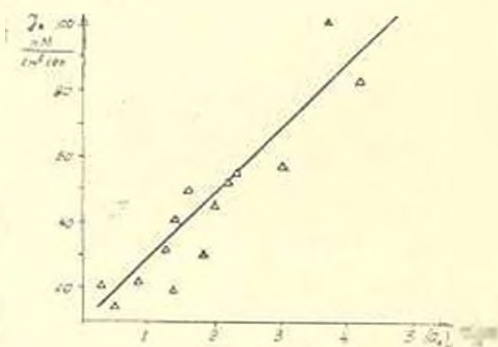


Рис. 4б. Зависимость направленного в клетку потока от его активности в наружной среде в период второй фазы поглощения калия у *E. coli*; рН экспериментального раствора 7,5. Каждый треугольник соответствует одному измерению.

ных режимах в зависимости от потребностей клетки. В стрессовом состоянии, когда клетка подвергается значительному перепаду осмотических давлений внешней среды, система работает с максимальной скоростью. А в состоянии равновесия та же система с меньшими затратами энергетических ресурсов клетки просто обеспечивает жизнедеятельность организма.

В отношении *St. faecalis* не наблюдалось какой-либо заметной разницы в скорости поглощения ионов калия в зависимости от их концентрации во внешней среде.

Действие валиномицина. Известно, что валиномицин увеличивает проницаемость мембран для ионов калия. Нами проверялось его действие на характер поглощения калия как в отношении *St. faecalis*, так и *E. coli*. В ранее выполненных экспериментах изучалось влияние валиномицина на поглощение калия без учета возможного воздействия его на мембранный потенциал [2, 13]. В наших опытах действие валиномицина

проверялось на пассивном и активном перемещении ионов калия. И у *St. faecalis*, и у *E. coli* он увеличивает скорость пассивного истечения калия (рис. 5а), создавая в бактериальных мембранах каналы проводи-

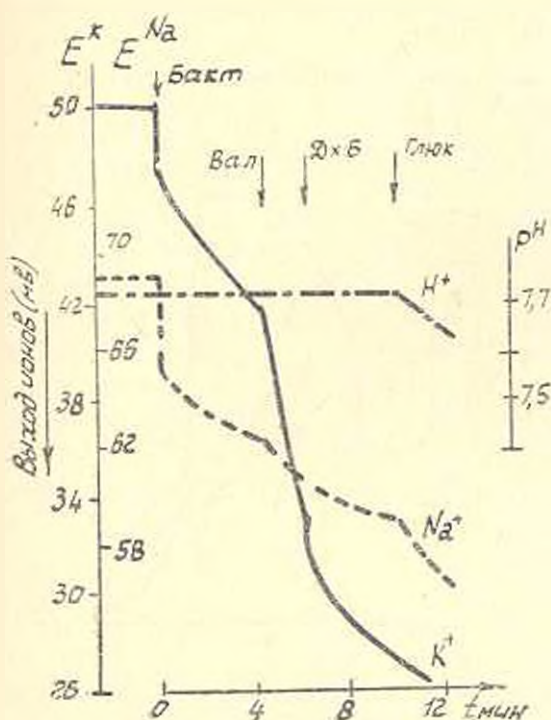


Рис. 5а. Действие валиномицина на пассивное истечение калия из клеток *St. faecalis*, pH 7,7, начальная активность калия в среде 1 мг-ион/л; конечные концентрации валиномицина 10^{-7} М, ДХБ (декахлор-о-хэрборан) 5×10^{-5} М. Приведены одновременно записанные изменения активности ионов H^+ и Na^+ . Стрелками указаны добавки: бактерии, валиномицин, ДХБ и глюкоза.

мости для калия. Действие валиномицина на активное поглощение калия клетками *St. faecalis* показано на рис. 5б: поглощение калия сменяется его истечением. На клетки *E. coli* действие его проявляется в некотором уменьшении скорости поглощения без изменения направления движения ионов. Действие валиномицина на клетки *E. coli* не во всех случаях проявляется однозначно, особенно при его аппликации после первой фазы [14]. Это может иметь место, если он не всегда способен встраиваться в бактериальную мембрану и служить электрическим шунтом.

Более подробно проанализируем действие валиномицина на свойства мембраны, определяющие ионный обмен между клеткой и средой.

Если при введении валиномицина величина мембранного потенциала E не изменяется, то, благодаря увеличению пассивной проницаемости мембраны, скорость проникновения ионов калия в клетку по градиенту электрического поля должна возрасть [10–12]. Несколько более

сложным представляется случай, когда валиномицин увеличивает проницаемость мембраны p_K , но при этом одновременно уменьшается мембранный потенциал E . Так как p_K и E не являются независимыми величинами, а связаны между собой следующим образом: $E = 1 (\ln p_K)$,

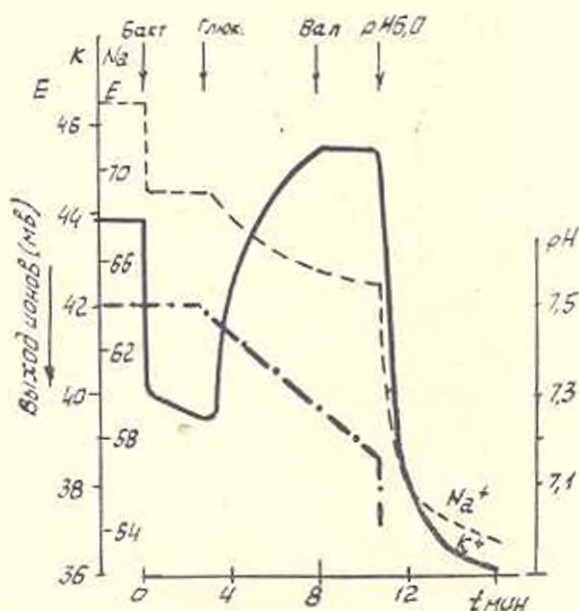


Рис. 56. Действие валиномицина на энергезависимое поглощение калия и присутствие глюкозы у *St. faecalis*, pH 7,5, начальная активность калия в среде 1 мг-ион/л; конечная концентрация валиномицина 10^{-7} М. Одновременно записано изменение активности H^+ и Na^+ в наружной среде. Стрелками указаны добавки: бактерии, глюкоза, валиномицин и концентрированная HCl.

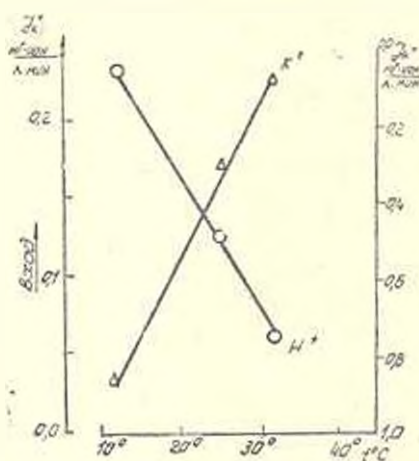


Рис. 6. Зависимость скорости секреции H^+ и поглощения K^+ у *St. faecalis* от температуры экспериментальной среды. Начальная активность калия—1 мг-ион/л, pH 7,1. Каждый знак—среднее значение пяти измерений. Ошибка не превышает размер знака.

то проводимость мембраны будет определяться ее проницаемостью в большей степени, чем изменение E . Увеличение p_K скажется на потоке в большей степени, чем уменьшение E . Таким образом, если калий поступает в клетку по градиенту электрического поля, то при одновременном уменьшении E и увеличении p_K поток калия в клетку должен возрасти, что противоречит нашим опытам (см. [14], а также рис. 5).

Рассмотрим, наконец, энергозависимое поступление ионов калия в клетку с помощью протонно-калиевого насоса [3, 6]. Ионы калия непрерывно и с постоянной скоростью, определяемой работой протонно-калиевого насоса, поступают в клетку. Покидают же клетку они пассивно, и скорость этого процесса определяется проницаемостью мембраны. Регистрируемое в опыте поглощение калия является, таким образом, суммой двух противоположно направленных процессов. Накопление значительных концентраций калия в клетках бактерий возможно, если поступающий по электрическому полю калий почти весь связывается и становится неактивным, или если ионы калия закачиваются в клетку с помощью ионообменного протонно-калиевого насоса. В первом случае присутствие валлиномицина должно ускорить процесс поглощения калия по электрическому полю, а во втором — замедлить его из-за более ускоренного одновременного истечения его из клеток. Именно этот факт и отмечался в наших опытах.

Зависимость от температуры. Снижение температуры экспериментального раствора должно вести как к уменьшению скорости гликолиза, так и скорости секреции кислоты. Легко показать, опираясь на анализе потоков, что не более 25% АТФ клетки затрачивается на активную секрецию H^+ [6]. Следовательно, и при умеренных температурах (10—20°) клетки будут иметь возможность транспортировать ионы H^+ через насос и генерировать разность электрических потенциалов на мембране. Если калий входит в клетку по градиенту электрического поля, то скорость его поступления не должна изменяться. Однако из рис. 6 следует, что скорость поглощения калия в 5 раз падает, и, по-видимому, здесь имеет место не простая диффузия.

Ереванский физический институт ГННАЭ

Поступило 28.II 1978 г.

ԿԱԼԻՈՒՄԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԿԱՆՈՒՄԸ STREPTOCOCCUS FAECALIS ԵՎ, ESCHERICHIA COLI ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ս. Ս. ԳԻՐԻՎԱՐՅԱՆ, Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Լ. Ս. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են St. faecalis BKM B—602 դրամդրական մանրէների և E. coli K—12 (λ) դրամբաքառական մանրէների մոտ բջջի ջրածնի իոնների՝ միջավայրի կալիումի իոններով փոխանակման առանձնահատկությունները:

Հայտնաբերված են կալիումի կլանման և պրոտոնների արտադատման քանակությունների և արագությունների կախվածությունները արտաքին մի-

շավաչրի հատկություններից՝ էներգիայի աղբյուրներից, օսմոտիկությունից, թթվայնությունից, կալիումի ակտիվությունից, վալինոմիցինի և պրոտոնաֆորի անկալությունից:

Փորձնական արդյունքները ստանում են առավել լրիվ բացատրություն, եթե ենթադրել մանրէների կողմից կալիումի իոնների ակտիվ ակումուլյացիայի գոյությունը:

POTASSIUM ION ACCUMULATION BY THE CELLS OF STREPTOCOCCUS FAECALIS AND ESCHERICHIA COLI

S. S. DURGARIAN, S. M. MARTIROSOV, L. S. PETROSYAN

Peculiarities of exchange of hydrogen ions from cells for external potassium ions by grampositive and gramnegative bacteria *Streptococcus faecalis* BKM—602 and *Escherichia coli* K—12 (1) have been investigated.

Dependence of the value and rate of potassium uptake and hydrogen secretion on the properties of external medium has been estimated.

The experimental data obtain a most complete explanation if we assume the existence of active potassium accumulation by bacteria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Harold F. M. Bacterial. Rev., 36, 172, 1972.
2. Harold F. M., Buarda J. R., Pavlasova E. J. Bact., 101, 152, 1970.
3. Epstein W., Schultz S. G. In Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms. L. B. Guze (ed.) 186 The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1968.
4. Epstein W., Schultz S. G. Jour. Gen. Physiol., 49, 221, 1965.
5. Ализанян М. А., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. ДАН АН СССР, 57, 91, 1973.
6. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 5, 561, 1978.
7. Ализанян М. А., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. Биологический журнал Армении, 26, 27, 1973.
8. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. М., 1967.
9. Schultz S. G., Epstein W., Solomon A. K. Jour. Gen. Physiol., 47, 329, 1963.
10. Hirata G., Allenendorf K., Harold F. M. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 70, 1804, 1973.
11. Griniulene B., Chmlellauskalte V., Telyudaz V., Dzheja P., Grintus L. Bioenergetics, 7, 17, 1975.
12. Harold F. M., Papineau D. J. Tembrane Biol., 8, 27, 1972.
13. Горнева Г. А., Рябова Н. Д., Финова Г. СБ.: Биофизика мембран, 1, 318, 1971.
14. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 5, 554, 1978.

ОУАБАИН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОТОКИ НАТРИЯ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН

На основании литературных данных об оуабанин-нечувствительных потоках натрия построена и рассчитана модель системы, осуществляющей этот транспорт. Получены качественные кривые, отражающие зависимость потоков натрия от внешней и внутриклеточной концентрации натрия и АТФ. Такой набор кривых позволит в дальнейшем путем сопоставления их с экспериментальными данными найти пути усовершенствования схемы с целью более точного описания процессов, лежащих в основе оуабанин-нечувствительного транспорта ионов.

Исследование противогradientного переноса ионов представляет интерес для понимания механизма поддержания ионного гетерогенитета клетки. Известно, что за противогradientный сопряженный транспорт ионов натрия и калия ответственен натриевый насос, представляющий собой АТФазу, активируемую ионами натрия и калия, потребляющий энергию гидролиза АТФ и угнетаемый специфическим ингибитором Na^+/K^+ -АТФазы-оуабанином. Разработан ряд моделей, объясняющих пути работы оуабанин-чувствительного насоса [1—4]. По данным Гаррахана с соавторами [5], одна и та же система ответственна за оуабанин-чувствительные Na^+/K^+ и Na^+/Na^+ обмены, значимость каждого из которых зависит от отношения $\text{АТФ}/\text{АДФ} \cdot \text{P}_n$ [6].

Помимо оуабанин-чувствительного Na^+/Na^+ обмена, существует и оуабанин-нечувствительный Na^+/Na^+ обмен, который подробно исследован на эритроцитах [7—15]. Впервые он был обнаружен на эритроцитах человека Любовицем и Виттемом [16]. В присутствии оуабанина выход ионов натрия против электрохимического градиента оказался значительно выше расчетного диффузионного потока. Для объяснения этого явления пришлось предположить существование переносчика. Относительно механизма оуабанин-нечувствительных потоков натрия есть две точки зрения, причем имеются доказательства как в пользу первой, так и второй гипотезы: оуабанин-нечувствительный Na^+/Na^+ обмен представляет собой обменную диффузию [13]; оуабанин-нечувствительный выход ионов натрия осуществляется с затратой энергии помповым механизмом, который может существовать наряду с обменной диффузией [15, 17].

В пользу первой гипотезы свидетельствуют следующие данные. Оуабанин-нечувствительный выход ионов натрия зависит не только от внутриклеточной концентрации натрия $[\text{Na}]_{\text{вн}}$, но и от наружной $[\text{Na}]_{\text{н}}$.

[17, 18]. Причем зависимости потоков натрия от внутриклеточной концентрации и от наружной подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, это дает возможность считать, что ионы натрия обмениваются в отношении 1:1 [13]. Наблюдается строгий параллелизм между изменением входа и выхода ионов натрия под действием ингибиторов SH-групп, а также при изменении температуры и pH среды [12, 13]. Однако эти потоки нечувствительны к изменению концентрации АТФ, что указывает на независимость их от источников энергии [13]. Все данные находятся в хорошем соответствии с основными критериями обменной диффузии, постулированными Юсевичем [19]:

ионы проходят через мембрану в комплексе с переносчиком без траты энергии;

постоянная скорости транслокации комплекса одинакова в противоположных направлениях;

наблюдается строгий параллелизм между изменением входа и выхода ионов при изменении внутренней и внешней концентрации ионов;

ингибирование одного потока вызывает равной величины ингибирование противоположного потока;

кривая активации этого процесса подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

В настоящее время имеются данные, указывающие на возможность существования наряду с механизмом обменной диффузии механизма оуабалин-нечувствительного активного транспорта (помпа II), работающего при низких концентрациях Na_0 или в безнатриевых растворах.

Так Саксом [15] было показано, что в безнатриевом растворе в оуабалине имеется выход ионов натрия, который тормозится фуросемидом, но растет при повышении наружной концентрации натрия. По данным Реттори [14], этикетированная кислота уменьшает оуабалин-нечувствительный выход ионов натрия как в присутствии, так и в отсутствие наружного натрия, не оказывая влияния на его вход.

Механизм, вызывающий оуабалин-нечувствительные потоки натрия, может быть либо полностью отличным от механизма, совершающего оуабалин-чувствительные $Na:K$ и $Na:Na$ обмены, либо все эти обмены могут быть функциями одной и той же системы, но с различными свойствами при разных условиях. В пользу последнего предположения есть два аргумента: фуросемид ингибирует не только оуабалин-нечувствительные, но и оуабалин-чувствительные потоки натрия, имеющие место в бескальцевой среде и являющиеся свойствами $Na:K$ насоса [15]. Следовательно, если указанные движения ионов натрия являются свойствами не одной системы, а двух независимых систем, то можно сделать вывод, что фуросемид одинаково ингибирует обе системы; зависимость действия фуросемида на скорость выхода ионов натрия от концентрации Na_0 и оуабалина показывает, что если бы оуабалин-чувствительный и оуабалин-нечувствительный выходы ионов натрия совершались двумя механизмами, следовало бы предположить одинаковое

сродство обоих механизмов к наружному каллию и оуабанну. Естественнее предположить наличие одного и того же механизма [15].

Относительно источников энергии для оуабанн-нечувствительных потоков Na мало данных, хотя известно, что они могут быть отличными от АТФ. Так, используя реконструированные тении эритроцитов, Аскари и Рао [20] показали, что тении, изолированные и инкубированные в присутствии инозина, способны проявлять оуабанн-нечувствительный выход ионов натрия, как и в присутствии АТФ.

Несмотря на многочисленные данные относительно оуабанн-нечувствительных потоков натрия, до сих пор не было сделано попытки построить модель, отражающую пути, по которым осуществляется оуабанн-нечувствительный транспорт ионов. В основу предлагаемой модели положена идея о том, что одна и та же система осуществляет как оуабанн-нечувствительный Na:Na обмен, так и оуабанн-нечувствительный активный вынос натрия. Источником энергии выбран АТФ, хотя им может быть какой-либо другой макроэрг [20]. При построении модели мы пользовались 3 основными постулатами [1], сформулированными на основе известных экспериментальных данных:

а) переносчиком ионов в мембране является мембранная АТФаза, которая при различных условиях может работать, как Na-K-АТФаза, или Na-АТФаза [3];

б) ферментно-субстратный комплекс переходит от внутренней границы мембраны к наружной в фосфорилированной форме [2, 3];

в) на наружной границе мембраны сродство переносчика к натрию меньше, чем на внутренней [2, 21].

В схеме (рис. 1) предполагается, что на переносчик E , представляющий собой мембранную АТФазу, садится ион натрия, затем к форме E_1Na присоединяется АТФ. Далее, в результате действия АТФазы происходит фосфорилирование фермента и комплекс $(E_1Na \sim P)$ АДФ переходит на наружную границу мембраны.

Если предположить, что сродство переносчика E_1 к натрию на наружной границе мембраны меньше, чем на внутренней [13], то у наружной границы мембраны этот комплекс отсоединит в среду ион натрия и перейдет в форму (E'_2-P) АДФ. Предполагается, что большая часть энергии расходуется на этой стадии, где происходит также конформационный переход переносчика из формы E'_1 в форму E'_2 . Комплекс (E'_2-P) АДФ переходит от наружной границы мембраны к внутренней. Предположение о том, что АДФ отщепляется у наружной границы мембраны, а не у внутренней, содержит следующий смысл: во-первых, после отщепления АДФ образовалась бы форма E'_1-P , чувствительная к оуабанну, в то время как рассматриваемый механизм описывает оуабанн-нечувствительный обмен, и во-вторых, АТФаза отщепляла бы АДФ в клетку у внутренней границы мембраны так же, как и для системы натрий-кальевого насоса. У внутренней границы мембраны комплекс (E'_1-P) АДФ освобождает АДФ в клетку и к форме E'_2-P присо-

сдвигается ион калия, что облегчает дефосфорилирование комплекса E_2-P [2]. Далее, после отщепления неорганического фосфата в клетке образуется комплекс E_2K , который способен отсоединить ион калия, что приводит комплекс в первоначальную форму E , и на этом транспортный цикл завершается.

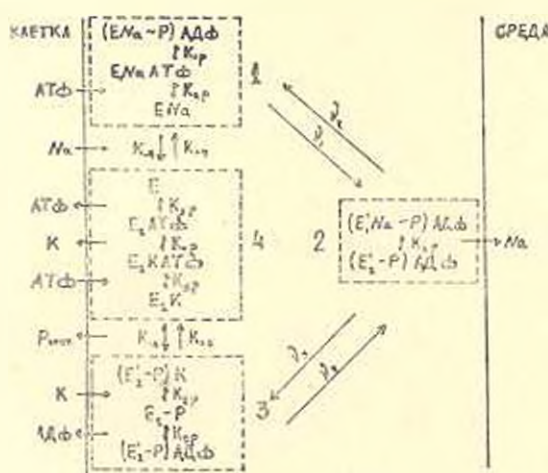


Рис. 1. Модель оузабани-неуветнительного транспорта ионов натрия. Принимается, что состояния, пазтые и пунктирные прямоугольники, шходятся в равновесии. Все константы равновесия обозначаются через k_{ip} , константы скорости переходов от одной границы к другой — v_i , константы переходов у внутренней границы мембраны, направленные по часовой стрелке — через k_{i1} , против часовой стрелки — k_{i2} .

С возрастанием наружной концентрации ионов натрия равновесие в состоянии 2 может сдвинуться, и вероятность присоединения наружного иона натрия увеличивается, что приводит к $Na:Na$ обмену по пути $1 \rightarrow 2 \rightarrow 1$ без затраты энергии, т. е. по типу обменной диффузии.

Таким образом, предлагаемая система может одновременно работать и как помповый механизм и как механизм обменной диффузии, но значимость каждого из них зависит от концентрации ионов натрия в наружной среде (при низких концентрациях Na_{out} — помповый механизм и при высоких — обменная диффузия).

Выходящий поток ионов натрия для этой схемы рассчитывался с помощью диаграммного метода Хилла [22]. Расчет показал, что этот поток равен:

$$J_{Na_{вых}} = \frac{E_1}{D} \cdot v_1 \cdot \theta_1 \cdot (k_{12} \cdot \theta_2 + k_{13} \cdot Na_{out}) + k_{14} \cdot \theta_1 \cdot (k_{15} \cdot Na_{out} + k_{16} \cdot \theta_2),$$

где k_{ip} — константы равновесия, v_i — константы перехода из одного состояния в другое, E_1 — полная концентрация переносчиков во всех формах, D — сумма всех направленных диаграмм, θ_i — доли концевых комплексов с переносчиком, расположенных в концах каждого равновесия.

ного состояния. Необходимо иметь в виду, что в состоянии 1 имеются, помимо указанных, еще и комплексы $(\text{ENa}_n \sim \text{P})$ АДФ, $\text{E}_1 \text{Na}_n \text{АТФ}$, ENa_n , которые учитываются в расчете, однако опущены в схеме, чтобы не затруднять чтения модели. Они возникают из-за того, что те ионы натрия, которые пришли из наружной среды, не успевают еще обменяться с внутренними ионами натрия, так как этот обмен происходит на следующей ступени при переходе из состояния 1 в состояние 4.

Полученное выражение для выходящего потока натрия содержит как помповую, так и обменную компоненту, причем вклад каждой из этих компонент в $J_{\text{Na вых}}$ зависит от наружной концентрации натрия.

Таким образом, предложенная схема делает наглядной последовательность ступеней процесса, ведущего к оубани-нечувствительному транспорту и позволяет рассчитывать потоки натрия.

По полученным аналитическим выражениям потоков можно построить качественные кривые зависимости выхода ионов натрия от внутриклеточных концентраций ионов натрия и АТФ (рис. 2).

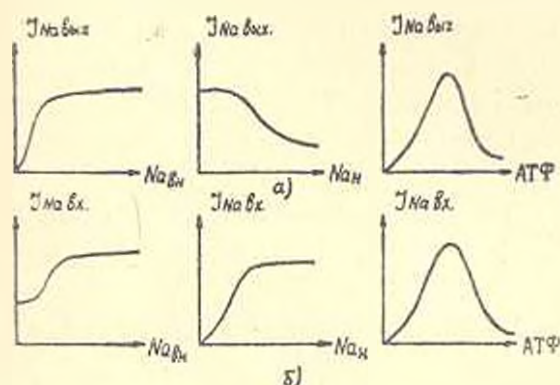


Рис. 2. Качественные кривые зависимости выходящего (а) и входящего (б) потоков натрия от Na_n и $\text{Na}_в$ и АТФ.

Смысл такого рода построения в том, чтобы предсказать результаты будущих экспериментов. Ясно, что такой набор кривых зависимостей потоков от концентраций позволит в дальнейшем, путем их сопоставления с экспериментальными результатами, найти пути совершенствования схемы с целью более точного описания процессов, лежащих в основе оубани-нечувствительного транспорта ионов.

Отметим, что все сказанное относилось к эритроцитам, и предложенную схему нельзя механически переносить на мышцы и аксоны, так как несмотря на некоторые общие черты между этими тремя тканями имеются и существенные различия. Например, оубани-нечувствительный выход натрия нечувствителен к $\text{K}_в$ в мышцах [23] и эритроцитах [5], но чувствителен к $\text{K}_в$ в аксонах [24]. Наибольшее различие между этими тканями проявляется при замене натрия на литий: в аксонах и в мышцах оубани-нечувствительный поток натрия растет [25], а в эритроцитах падает [5]. По-разному действуют двухвалент-

ные катионы на оубаин-нечувствительный поток натрия в аксонах, мышцах и эритроцитах [5, 16, 26—28].

Кроме того, морфологическое строение мышц,—ее компартиментализация,—существенно отличает ее от эритроцитов и аксонов и затрудняет однозначную трактовку полученных результатов. Детальное изучение оубаин-нечувствительного транспорта натрия и установление локализации транспортной системы является одной из самых актуальных задач в настоящее время.

Бреванский физический институт ГКИАЭ

Поступило 28.11 1978 г.

ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ ՕՈՒԱԲԱԻՆ-ՌԵԶԻՍԵՆՏՆԱՅԻՆ ՀՈՍԳԵՐԸ

Տ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՏՈՒՄՅԱՆ, Ս. ՅԱ. ԱԴԱՄՅԱՆ

Նատրիումի օուաբաին-ռեզիստենտային տրանսպորտին վերահերող զրական տվյալների հիման վրա բերված և հաշված է համակարգի մոդելը, որն իրականացնում է այդ տրանսպորտը: Ստացված են որակական կորեր, որոնք արտացոլում են նատրիումի հոսքերի կախվածությունը նատրիումի և ԱՌՆ-ի կոնցենտրացիաներից: Սրանց առկայությունը հնարավորություն կտա հետազայում փորձնական տվյալների հետ համադրման ճանապարհով զանի սխեմայի կատարելագործման ուղիները, իոնների օուաբաին-ռեզիստենտային տրանսպորտի հիմքում ընկած պրոցեսները ավելի ճշգրիտ նկարագրելու նպատակով:

OUABAIN — INSENSITIVE SODIUM FLUXES

T. G. HAMBARTSUMIAN, S. Ya. ADAMIAN

Based on the literature data the model of ouabain-insensitive sodium transport system has been given and calculated. Qualitative curves reflecting the dependence of sodium fluxes on Na_{in} , Na_o and ATP concentrations have been obtained. These curves will allow, by comparison with the experimental results, to improve the scheme to give more precise description of the processes of ouabain-insensitive ion transport.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амбарцумян Т. Г., Мартыросов С. М. Биологический журнал Армении, 28, 3, 102—103, 1975.
2. Лушко В. К., Магыншева М. К., Гревинерская Т. Н., Колчинская Л. И. Сб. Биофизика мембран, 412—417, 1973.
3. Post R. L., Hegyvary C., Kume S. J. Biol. Chem., 25, 1972.
4. Stone A. J. Biochem et Biophys. Acta, 150, 578, 1968.
5. Garrahan P. J., Glynn I. M. J. Physiol., 192, 159, 1967.
6. De Weer P. J. Physiol., 56, 583, 1970.
7. Beauge L. A. Biochem et Biophys. Acta, 401, 1, 95, 1975.

8. Beauge L. A., Sjodin R. A. J. Gen. Physiol. 52, 3, 408, 1968.
9. Dunn T. J. J. Clin. Invest. 49, 1804, 1970.
10. Glynn J. M., Karlish S. J. Ion Energ. transp. in biol. syst. (C. S. B. A.), 205, 1975.
11. Lubowitz H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1, 153, 1972.
12. Motais R., Sola F. J. Physiol. 233, 2, 423, 1973.
13. Motais R. J. Physiol. 233, 2, 395, 1973.
14. Rettori O., Lenoir J. J. Physiol. 222, 1, 880, 1972.
15. Sachs J. R. J. Gen. Physiol. 57, 3, 259, 1971.
16. Lubovits H., Whittam R. J. Physiol. 202, 1969.
17. Hoffman J. F., Kregenow A. Proc. N.-Y. Acad. Sci. 137, 1966.
18. Manery J. F., Dryden E. E., Still J. S. Can. J. Phys. Pharm. 55, 1977.
19. Ussing H. H. Acta. Scand. Physiol. 17, 1, 1950.
20. Askari A., Rao S. N. Abstract. bioph. soc. 1968.
21. Keynes R. D., Swan R. C. J. Physiol. 147, 591, 1959.
22. Hill T. L. J. Theor. Biol. 10, 442, 1966.
23. Sjodin R. A., Beauge L. A. J. Gen. Physiol. 61, 2, 222, 1973.
24. Baker P. F., Shaw T. G. J. Physiol. 200, 459, 1968.
25. Keynes R. D. J. Physiol. 178, 305, 1965.
26. Baker P. F., Hodgkin A., Meves H. J. Physiol. 170, 541, 1964.
27. Keynes R. D., Steinhardt R. A. J. Physiol. 198, 3, 581, 1968.
28. Henderson E. Pflüger. Arch. 1, 1976.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Р. Р. КАЗАРЯН, Ю. М. ДЕМНИ, С. Г. ПИРАЦУЯН, А. Г. МАНВЕЛЯН

Проведен флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени белых крыс. Установлены максимумы спектров возбуждения и эмиссии. Диссоциация хроматина усиливает интенсивность возбуждения и эмиссии, незначительно сдвигая их максимумы в ультрафиолетовую область. При гормональной индукции аргиназы изменений в указанных флуоресцентных характеристиках хроматина не происходит.

При изучении структуры белков, их физико-химических свойств все чаще применяется флуоресцентный анализ. При этом исследуется как собственная флуоресценция белков, так и свечение в комплексе с флуоресцентными красителями.

Исследование хроматина с применением метода флуоресцентного анализа, насколько нам известно, не проводилось, хотя не исключается возможность изменения флуоресцентных характеристик его при определенных структурных перестройках дезоксирибонуклеопroteinного (ДНП) комплекса, лежащего в основе различных функциональных состояний хромосом.

В связи с этим мы поставили задачу изучить флуоресцентные характеристики хроматина, выделенного как из печени интактных белых крыс, так и животных, которым вводили гидрокортизон, вызывающий индукцию аргиназы и ряда других катаболических ферментов [1, 2].

Материал и методика. Использовались белые крысы весом 120—150 г. Хроматин печени получали после предварительного выделения ядер, осуществленного с помощью модифицированного сотрудниками кафедры биофизики ЕГУ метода Видмала и Тата [3], с очисткой ядерной фракции центрифугированием при 16.000 g в течение 50 мин в растворе 2,2 М сахарозы в присутствии 1 мМ $MgCl_2$. Все растворы были приготовлены из 0,01 М трис-НСl буфере (pH 7,5).

Для получения хроматина ядра 3—4 раза промывали 0,021 М ЭДТА + 0,075 М NaCl буфером (pH 8), а затем по два раза 0,05, 0,01 и 0,002 М трис-НСl буфером (pH 8). Каждый этап промывки проводили центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин. Во все использованные растворы добавляли 0,5 мМ метабисульфит калия для предотвращения действия протеза.

В экспериментах использовали также хроматин, выделенный из печени крыс после кортикостероидной индукции гидрокортизоном. Суспензию гормона вводили внутримышечно (с расчетом 5 мг на 100 г веса тела) в течение четырех дней. На четвертый день через 4—5 час после введения гормона, в период высшей активации синтеза РНК [4, 5], а также аргиназы (КФ 3.5.3.1) [1, 2], тирозин- α -кетоглутарат

трансаминазы (КФ 2.6.1.5), триптофанпирролазы (КФ 1.11.1.4) и некоторых других катаболических ферментов [1, 5] животных забивали и выделяли хроматин.

Диссоциацию хроматина проводили с помощью раствора 2 М NaCl, приготовленного на 0,01 М трис-HCl буфере (рН 8). Выделенный хроматин имел следующие спектральные характеристики $A_{290/260}=0,75$, $A_{280/260}=0,57$, $A_{330/260}=0,0157$. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [6], ДНК—по Динсу [7], РНК—спектрофотометрически после гидролиза 1 N HClO₄.

Соотношение белок/ДНК во всех исследованных препаратах составляло 2:1, соотношение РНК/ДНК—0,04:1. Спектральные характеристики получали из спектрофотометра СФ-16. Спектры экстинкции и эмиссии хроматина регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре МРФ-2А фирмы «Hitachi» (Япония), в кварцевых прямоугольных кюветах при комнатной температуре (при чувствительности прибора SS-1, SS-5), в многократных разбавлениях в 2×10^{-3} М трис-HCl буфере (рН 8).

Для изменения рН среды использовали 0,1 N HCl и 2,5 N NH₄ OH.

Результаты и обсуждение. Поглощение и возбуждение белков в ультрафиолетовой области объясняется исключительно наличием в составе их ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана. В свободном состоянии эти аминокислоты имеют максимумы спектров возбуждения при 260, 275 и 287 нм и максимумы спектров эмиссии—при 282, 303 и 348 нм соответственно, обуславливая идентичную флуоресценцию белков, в состав которых входят [8—12].

Изучение флуоресценции хроматина, выделенного из печени белых крыс, показало, что при возбуждении 260 и 275 нм характерные для фенилаланина и тирозина спектры эмиссии отсутствуют, четко выявляется один пик эмиссии, при 340 нм, с максимумом спектра возбуждения при 295 нм (рис. 1), т. е. обнаруживается триптофановая флуоресценция, сдвинутая в коротковолновую область по сравнению с максимумом спектра эмиссии свободного триптофана (348 нм).

В связи с этим следует учесть, что в некоторых белках в зависимости от условий окружения ароматических аминокислот может происходить миграция энергии, благодаря чему максимумы спектров эмиссии тирозинового и триптофанового остатков могут смешаться как в ультрафиолетовую, так и в длинноволновую область [13, 14]. Так, работами Конева [10] показано, что сывороточный альбумин, яичный альбумин, α -глобулин, сыворотки казенна, стурнин и ряд других белков имеют спектры флуоресценции с максимумами эмиссии при 313 и 350 нм, т. е. эмиссии, характерные для тирозина и триптофана, но несколько сдвинутые в длинноволновую область. Кимура и Тинга [15], изучая флуоресценцию ферридоксина из коры надпочечников, обнаружили значительное смещение спектра флуоресценции тирозинового комплекса в длинноволновую область, со спектром эмиссии при 330 нм, т. е. в область, характерную для триптофанилов. Такой же сдвиг эмиссии (340—350 нм) тирозинового комплекса показали в своих экспериментах Марданиян и др. [16], исследуя различные ферредоксинны типа «b» животного и растительного происхождения. С другой стороны, работами Велика [11], Тила и Вебера [9] показано, что у некоторых белков смещены максимумы эмиссии спектра флуоресценции триптофана в коротковолновую область (340 нм).

Учитывая эти литературные данные, можно предположить, что отмеченная в наших экспериментах эмиссия при 340 нм. вероятно, обусловлена триптофанильными остатками, флуоресценция которых несколько сдвинута в коротковолновую область. Для подтверждения это-

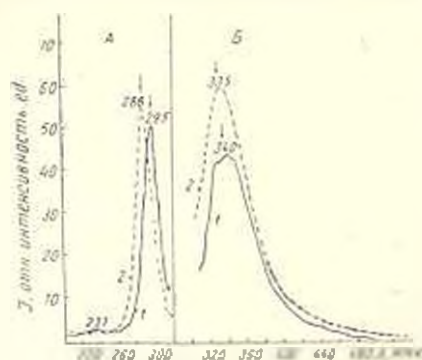


Рис. 1. Спектры экзитации (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного из печени белых крыс. Ширина щелей монохроматоров экзитации и эмиссии—4 нм. 1. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере, pH 8. 2. Диссоциированный хроматин, разбавленный $\times 10$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере, pH 8.

го предположения нами изучалась эмиссия основного флуоресцирующего комплекса хроматина при различных значениях pH среды. При этом мы исходили из того положения, что при изменении pH среды максимум эмиссии спектра флуоресценции белков сохраняется на постоянном уровне (340 нм), если она обусловлена остатками только триптофанов [12, 17]. Постепенное изменение исходного pH в кислую сторону (рис. 2) у нативного хроматина приводит к резкому снижению квантового выхода флуоресценции, однако положение максимума спектра флуоресценции при этом не меняется, что может свидетельствовать об обуславливании спектра эмиссии хроматина при 340 нм триптофанильными остатками.

Нами изучалась также флуоресценция хроматина при его диссоциации, когда при определенных ионных условиях среды появляются свободные участки ДНК, что, как известно, обусловлено перераспределением связанных с ДНК гистонов [18, 19]. Полученные данные показали, что при диссоциации хроматина (рис. 1) повышается квантовый выход флуоресценции, а максимумы спектров возбуждения и эмиссии несколько сдвигаются в коротковолновую область (288 против 295 нм и 335 против 340 нм), не выходя за пределы, характерные для триптофанильных остатков.

Наши исследования показали, кроме того, что закисление pH среды у диссоциированного хроматина (рис. 3), как и в случае с нативным, приводит к снижению квантового выхода флуоресценции без существенных изменений положения максимума спектра флуоресценции; структура диссоциированного хроматина не претерпевает необратимой

денатурации, в то время как в случае с нативным дальнейшее закисление, начиная с pH 4 (рис. 2), приводит к необратимой кислотной де-

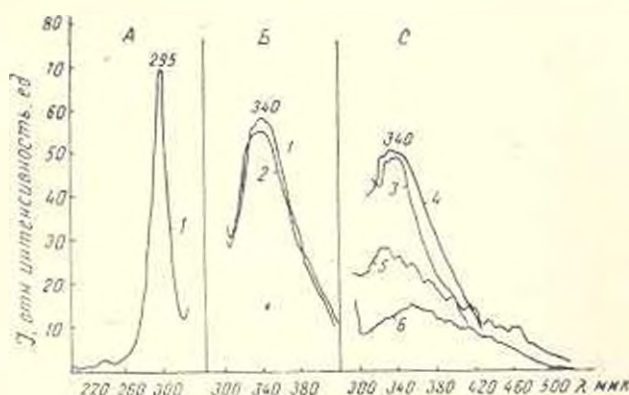


Рис. 2. Спектры экстинкции (А), эмиссии (Б), (С) нативного хроматина, разбавленного $\times 20$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—5 нм. 1. pH 8. 2. pH 7. 3. pH 6. 4. pH 5. 5. pH 4. 6. pH 3.

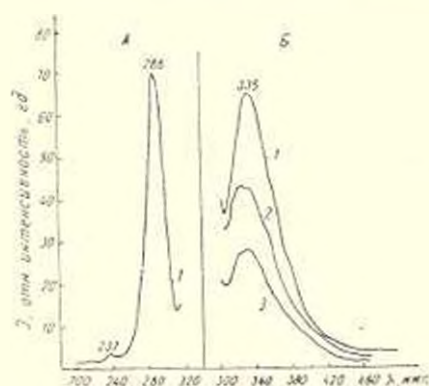


Рис. 3. Спектры экстинкции (А) и эмиссии (Б) диссоциированного хроматина, разбавленного $\times 10$ в 2×10^{-3} М трис-НСI буфере. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—4 нм. 1. pH 8. 2. pH 1. 3. pH 8.

натурации его структуры. Отсутствие этого эффекта у диссоциированного хроматина представляет определенный интерес. Однако для объяснения этого явления необходимы дополнительные исследования, что не входит в задачу данной работы.

Таким образом, как при изменении pH среды, так и диссоциации хроматина основной флуоресцирующий комплекс хроматина остается характерным для триптофанов.

Нами изучалась также и флуоресценция хроматина, выделенного из печени крыс после введения гидрокортизона (гормональной индукции). При индукции аргиназы и других катаболических ферментов в вышеуказанных флуоресцентных характеристиках хроматина изменений не наблюдалось.

Авторы признательны М. А. Давтяну за помощь при обсуждении данной работы.

Ереванский государственный университет,
филиал: ВНИИ клинической и экспериментальной
хирургии МЗ СССР, Ереван

Поступило 15.V 1978 г.

ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԻԻ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՅԼՈՒՈՐԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ռ. Ռ. ԿԱԶԱՐԻԱՆ, Ի. Մ. ԴՅՈՄԻՆ, Ս. Գ. ԿՐԱՏՍՅԱՆ, Ա. Գ. ՄԱՆՎԵԼԻԱՆ

Կատարվել է սպիտակ սունկտների լյարդից ստացված բրոմատինի ֆլու-
րեսցենտային անալիզ: Որոշվել են էքստինցիայի և էմիսիայի սպեկտրների
մաքսիմումները, որոնք համապատասխանաբար հավասար են 295 և 340 մմկ:
Բրոմատինի միայն մի էմիսիայի սպեկտրի առկայությունը 340 մմկ-ի դեա-
րում պայմանավորված է տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայով, որը ապաս-
տրիպտոֆանի էմիսիայի սպեկտրի մաքսիմումի համեմատությամբ մի փո-
քրր շարժված է դեպի կարճալիք շրջանը: Բրոմատինի դիսոցիացիան սաստ-
կացնում է էքստինցիայի և էմիսիայի ինտենսիվությունը, չնչին չափով տե-
ղաշարժելով նրանց մաքսիմումները դեպի ուլտրամանուշակագույն շրջանը
(288 և 335 մմկ համապատասխանաբար): Արգինազայի հորմոնայ (հիդրո-
կորտիզոն) ինդուկցիայի դեպքում բրոմատինի նշված ֆլուորեսցենտային
ցուցանիշներում փոփոխություններ տեղի չեն ունենում:

STUDIES OF THE RAT LIVER CHROMATIN BY FLUORESCENT ANALYSIS

R. R. KAZARIAN, Yu. M. DYOMIN, S. G. TIRATSUYAN, A. G. MANVELIAN

The fluorescent analysis of chromatin isolated from liver of white rats has been carried out. Maximums of excitement and emission spectra have been set. Dissociation of chromatin increases the intensity of excitement and emission, slightly removing their maximums to ultra-violet range.

In the case of hormonal (hydrocortison) induction of arginase, changes in the indicated fluorescent characteristics of chromatin do not take place.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А. Петросян Т. А. Биологический журнал Армении. 23. 5. 1970.
2. Kuchakin C. D. In Mechanisms of hormone action, 256. Edit. by P. Karlson. Academic Press, N. Y. and London, 1965.
3. Widnell C. C., Tata J. R. Biochem. J., 92, 313, 1964.
4. Knox W. E. In Synthesis of Molecular and Cellular structure. 13, P. Rudnick, Ed. The Ronald Press Co., N. Y., 1960.
5. Kenney F. T. J. Cell Compar. Physiol., 66, supp. 1, 125, 1965.

6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
7. Diske Z. Microchemie, 8, 9, 1930.
8. Shore V. G., Pardee A. B. Arch. Biochem. Biophys., 40, 100, 1956.
9. Teale F. W. Y., Weber G. J. Biochem., 65, 467, 1957.
10. Конец С. В. ДАН СССР, 116, 594, 1957.
11. Wallick S. F. J. Biol. Chem., 233, 1455, 1958.
12. Юденфрнд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, 192 М., 1965.
13. Владимирон Ю. А. ДАН СССР, 4, 960, 1961.
14. Владимирон Ю. А., Конец С. В. Биофизика, 5, 537, 1959.
15. Kimura I., Ting J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 45, 1227, 1971.
16. Марданян С. С., Демин Ю. М., Налбандян Р. М. Биодинамика, 6, 1024, 1977.
17. Введенский Н. С., Бурштейн Э. А., Готберг М. И. Механизмы мышечного сокращения, 4, М., 1972.
18. Parakhovsky A. J., Nglin Yu. V., Georgiev G. P. Nature, 250, 603, 1974.
19. Parakhovsky A. J., Nglin Yu. V., Georgiev G. P. Molecular Biol. Reports, 1, 201, 1973.

ПАРАМАГНИТНЫЕ ЦЕНТРЫ В ОБЛУЧЕННОМ Л-ЛЕЙЦИНЕ- N^{15}

Р. А. АСАТУРЯН

На основе анализа формы спектров ЭПР облученного Л-лейцина- N^{15} при ^{15}N изотопном замещении атомами N^{15} в различной концентрации выделены пять типов парамагнитных центров. При увеличении концентрации N^{15} существенных изменений в форме спектров ЭПР не наблюдается, что свидетельствует о малой вероятности локализации несвязанного электрона вблизи атома азота Л-лейцина- N^{15} .

Исследованию парамагнитных центров (ПЦ) облученных белков и составляющих их аминокислот посвящено большое число работ и монографий [1-7]. Анализ формы спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) облученных биологических объектов представляет собой сложную задачу, так как в образце образуется, как правило, несколько ПЦ. Однако применение метода изотопного замещения одних атомов на другие с известным ядерным спином существенно упрощает их интерпретацию.

Материал и методика. Использовались хроматографически чистые коммерческие препараты Л-лейцина- N^{15} из ГДР (Isocmerz) с обогащением N^{15} 9,89 ± 0,1, 50,5 ± 0,5 и 95,1 ± 0,1%. Образцы загружались в три идентичные ампулы из специального стекла, которые откачивались в вакууме 10^{-3} мм рт. ст. и запаивались. Использовали релаксационный метод разделения радикалов, основанный на различии их времен спин-решеточной релаксации [8], и термический метод разделения радикалов. Для выделения индивидуальной формы спектра ЭПР из общей смеси использовали графический метод вычитания.

Одновременное облучение трех разных образцов одинаковыми дозами проводилось при 77°K рентгеновскими лучами на установке РУП 200/20 при токе 15 мА и напряжении на вольфраховом аноде 183 кВ. Мощность дозы, измеренная ферросульфатным методом, равнялась 2420 рад/мин, а максимальная поглощенная образцом доза была 485-10³ рад.

Спектры ЭПР при 77°K регистрировались на серийном радиоспектрометре 3-сантиметрового диапазона типа ЭПР-2 при значениях токов СВЧ детектора 1,0 мА и 0,1 мА.

Результаты и обсуждение. Применение указанных методов позволило выделить в облученном Л-лейцине- N^{15} пять ПЦ и получить существенно новые результаты, отличающиеся от полученных ранее в литературе [9-11].

На рис. 1 представлены спектры ЭПР облученного образца Л-лейцина- N^{15} с изотопным обогащением 9,89%. Все спектры записаны при 77°K. Спектры а, б и в зарегистрированы непосредственно после облу-

чения различными дозами, а *а* и *б* — через сутки и 8 суток хранения при 77°K соответственно. Отношение интенсивности центральной компоненты к компонентам, отмеченным пунктирными стрелками, с расщеплением около 40 эрст при дозах $242 \cdot 10^3$, $363 \cdot 10^3$ и $485 \cdot 10^3$ рад равно соответственно 1.26, 1.76 и 1.84. Через сутки это отношение становится

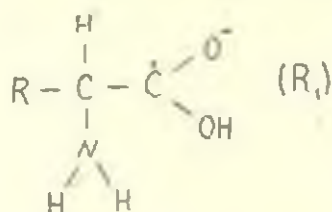


Рис. 1. Спектры ЭПР образца L-лейцина- N^{15} (9.89%) при 77°K непосредственно после облучения дозами $242 \cdot 10^3$ рад *а*, $363 \cdot 10^3$ рад *б* и $485 \cdot 10^3$ рад *в*. Спектр *г* — запись этого же образца через сутки после облучения, *д* — через 8 суток. Хранение при 77°K. Сплошная стрелка — положение линии ДФПГ, пунктирные стрелки — компоненты радикалов R_2 , сплошные стрелки с кружочком — компоненты радикалов R_3 .

1.27, а через 8 суток уменьшается до 0.94. Отношение центральной компоненты к боковым компонентам, отмеченным сплошными стрелками с кружочком, при дозе $242 \cdot 10^3$ рад равно 4.0, при $363 \cdot 10^3$ рад — 6.9 и при $485 \cdot 10^3$ рад — 6.1. Через сутки оно становится равным 4.0, а через 8 суток — 2.0. И наконец, отношение интенсивности компонент, отмеченных пунктирными стрелками, к боковым компонентам, отмеченным сплошными стрелками с кружочком, для спектра *а* равно 3.2, для *б* — 3.9 и для *в* — 3.3. Через сутки это отношение сохраняется (3.2), но зато через 8 суток резко падает до 2.1.

Совокупность приведенных данных дает основание считать, что спектры ЭПР на рис. 1 представляют собой суперпозицию, по крайней мере, трех различных ПЦ. Один из них — R_1 — дает вклад в центр спектра с g -фактором, близким к дифенилпикрилгидразилу (ДФПГ), и шириной 15 эрст. Другой — R_2 — представляет собой дублет (пунктирные стрелки) с величиной расщепления около 40 эрст. Третий ПЦ — R_3 — боковые компоненты которого отмечены сплошными стрелками с кружочком, представляет собой неразрешенный спектр — суперпозицию двух предыдущих ПЦ.

Из спектров *в* и *д* видно, что через сутки интенсивность центральной компоненты уменьшилась. Аналогично ее интенсивность упала и через 8 суток хранения при 77°K. Такое поведение ПЦ обычно связывают с присутствием заряженных радикалов, исчезающих еще и под действием света [6]. В работе Паттена и Горди [9] в облученном лейцине также был выделен синглет, но идентификации не было проведено. Каюшин и др. [5] в облученном лейцине синглетный спектр шириной 16 эрст приписали анион-радикалам типа



В нашем случае ширина линии синглетного спектра составляет 15 эрст., что находится в согласии с работой [5].

Перейдем к интерпретации дублетного спектра, имеющего величину расщепления 40 эрст. Согласно соотношению Мак-Коннела, величина расщепления для CH фрагментов изменяется от 20 до 30 эрстед. Очевидно, что при данной величине расщепления неспаренный электрон не может быть локализован на атоме углерода. В работе Хилла с сопр. [12] в γ -облученном полнокристаллическом льду при 77°K наблюдались OH радикалы в виде дублета с величиной расщепления ~ 40 эрстед. Они погибали при прогреве до комнатной температуры, что наблюдается и в нашем случае. По-видимому, наблюдаемый дублетный спектр должен принадлежать OH радикалам R_2 , образующимся при их отрыве от атома углерода карбоксильной группы.

На наш взгляд, Паттен и Горди [9] ошибочно приписали структуру дублетного спектра анион-радикалам R_1 , который должен давать синглетный спектр, а не дублетный.

Так как в центральную часть спектра в основном дают вклад R_1 и R_2 , то обнаружение дополнительных компонент R_3 в центре спектра затруднительно. Вследствие этого идентификация R_3 представляет собой сложную задачу. Отметим, однако, что компоненты радикалов R_3 , отмеченные сплошными стрелками с кружочком, ошибочно приписывались HCC , имеющим в центре синглетный спектр [9], что не следует из рис. 1.

На рис. 2 представлены спектры ЭПР (при 77°K) трех образцов облученного L -лейцина- N^{15} с различным обогащением N^{15} . Спектры *а*, *в* и *д* зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1,0 ма, а *б*, *г* и *е* — при 0,1 ма. Сравнивая *а* и *б*, где изотопное обогащение N^{15} минимально (9,89%), можно заметить, что форма спектров изменяется. Это дает нам дополнительное подтверждение того, что в исходном образце наблюдается несколько типов HCC с различными временами спин-решеточной релаксации [8]. Аналогичные изменения формы от мощности микроволнового генератора можно видеть и на спектрах *в* и *г*, а также *д* и *е*. Если сравнить формы спектров образцов L -лейцина- N^{15} при одинаковых значениях токов СВЧ детектора, но при различном обогащении изотопом N^{15} (спектры *а*, *в*, *д* и *б*, *г*, *е*), то можно заметить, что практически существенных изменений нет. Это дает нам основание считать, что в исходных облученных препаратах L -лейцина- N^{15} неспаренный электрон в наблюдаемых трех HCC не должен быть локализован на аминогруппе.

На рис. 3 при 77°K даны спектры ЭПР тех же образцов облученного Л-лейцина- N^{15} , но после прогрева до комнатной температуры. При сравнении спектров *a* и *б* легко видеть изменения их формы. Аналогичные изменения при различных токах СВЧ детектора наблюдаются и для спектров *в* с *г* и *д* с *е*. Анализ методом графического вычитания показал, что суммарные спектры *б*, *г*, и *е* (рис. 3) представляют собой



Рис. 2.



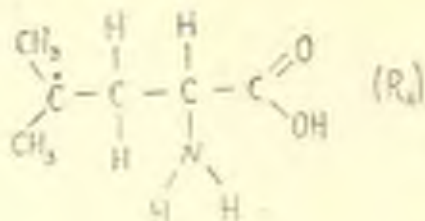
Рис. 3.

Рис. 2. Спектры ЭПР трех различных облученных дозой $485 \cdot 10^3$ рад образцов Л-лейцина- N^{15} , отличающихся изотонным замещением на N^{15} : первый—обогащение N^{15} равно 9.89 (*a*, *б*); второй—50.5 (*а*, *г*); третий—95.1% (*д*, *е*). Спектры *a*, *б*, *д* записаны при токе СВЧ детектора 1.0 ма, а *б*, *г*, *е*—при 0.1 ма. Облучение и запись при 77°K. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

Рис. 3. Спектры ЭПР тех же трех образцов, что и на рис. 2, но после прогрева до комнатной температуры. Спектры *a*, *б*, *д* зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1.0 ма, а *б*, *г*, *е*—при 0.1 ма. Запись при 77°K. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

суперпозицию двух различных типов радикалов. Для выявления индивидуальной формы их спектров рассмотрим следующие данные.

На рис. 4 записаны спектры ЭПР описываемых трех образцов Л-лейцина- N^{15} после прогрева до 368°K. Форма спектров ЭПР для всех трех образцов практически не зависит от мощности клистронного генератора (спектры *a* и *б*, *г* и *д*, *ж* и *з*), что позволяет однозначно утверждать о присутствии только одного типа радикалов, спектр которых состоит из 8 компонент СТС с расщеплением 25 эрстед. Этот спектр ранее был приписан радикалам R_1 , в которых имеется 7 эквивалентных протонов [9, 10]:



При комнатной температуре в результате растормаживания вращения соседней группы CH_2 выявляется дополнительное дублетное сверхтонкое взаимодействие с восьмым протоном этой группы, расщепляющим каждую из наблюдаемых восьми компонент на 8 эрст (рис. 4 в, е, и). Такие изменения формы спектров от температуры обратимы. Кроме того, при изотопном замещении атомами N^{16} форма спектров ЭПР практически не меняется. Это служит дополнительным подтверждением правильности интерпретации структуры радикалов R_4 , предложенной ранее в работе [9].

На рис. 5 представлен спектр ЭПР радикалов, полученный методом графического вычитания спектра рис. 4 з из спектра рис. 3 е. Обо-

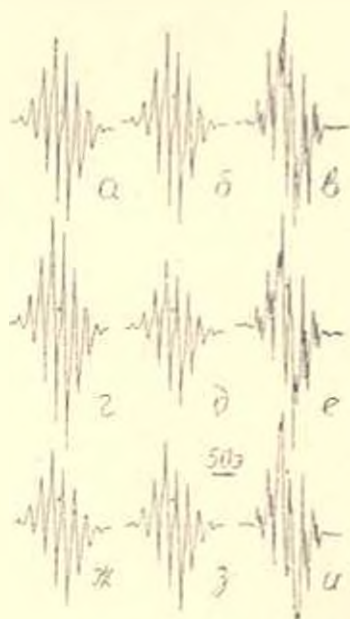


Рис. 4.



Рис. 5.

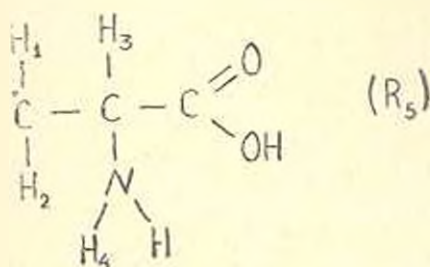
Рис. 4. Спектры ЭПР тех же образцов, что и на рис. 2, но после прогрева до 368°K . Спектры а, в, ж зарегистрированы при токе СВЧ детектора 1,0 мА, а б, д, з—при 0,1 мА. Спектры а, б, г, д, ж, з записаны при 77°K , а в, е, и—при комнатной температуре. Стрелки показывают положение линии ДФПГ.

Рис. 5. Спектр ЭПР радикалов R_4 , полученный методом графического вычитания спектра рис. 4 з из спектра рис. 3 е. Стрелка показывает положение линии ДФПГ.

значим их через R_3 . Нетрудно заметить, что имеем квинтетный спектр с интенсивной центральной компонентой вблизи g-фактора ДФПГ и меньшей расщепления около 25 эрст. Как видим, при сравнении спектров на рис. 3 б, г, е и рис. 4 б, д, з радикалы R_3 гибнут после прогресса до 368°K, так как менее термостабильны, чем R_1 , сохранившиеся в аналогичных условиях.

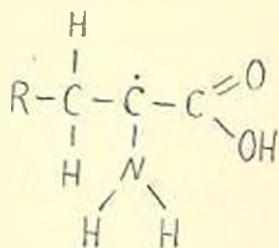
Они легко насыщаются даже при токе СВЧ детектора 1.0 ма (рис. 3, д, е). Действительно, спектр рис. 3 д практически почти не содержит компонент радикалов R_3 и в основном обусловлен радикалами R_1 , имеющими наиболее короткие времена спин-решеточной релаксации.

Величина расщепления и квинтетное число компонент с почти биномальным распределением интенсивности свидетельствуют о том, что неспаренный электрон в этом радикале должен быть локализован на четырех эквивалентных протонах. По-видимому, этот радикал должен иметь структуру, в которой неспаренный электрон локализован не в непосредственной близости от атома азота и в то же время не на достаточном удалении от него, так как в суммарном спектре рис. 3 б, г, е наблюдаются некоторые изменения при изотопном замещении на N^{15} , хотя и не очень существенные. Одним из возможных вариантов, удовлетворяющих этим требованиям, может быть структура типа



где H_1 , H_2 , H_3 и H_4 должны быть эквивалентными.

В работе Паттена и Горди [11] радикалы, образующиеся в облученном лейцине, идентифицированы в виде



Совокупность экспериментов, проведенных нами с использованием метода изотопного замещения, позволяет считать недостаточно обоснованной эту интерпретацию, так как в противном случае при обогащении атомами N^{15} наблюдались бы значительные изменения формы спектров ЭПР, чего нельзя сказать из наших экспериментов.

Ереванский физический институт

Поступило 28.II 1978 г.

Ռ. Ա. ԱՍԱՏՈՒՐԻԱՆ

Ճառագայթված Լ-լեյցին—N¹⁵-ի էՊՌ սպեկտրների ձևի անալիզի փման վրա նրա N¹⁵ ատոմների տարբեր կոնցենտրացիաներով իզոտրոպային տեղակայման ժամանակ անջատվել են հինգ տիպի պարամագնետային կենտրոններ: N¹⁵-ի կոնցենտրացիայի ավելացման ժամանակ էՊՌ սպեկտրների ձևի զգալի փոփոխություն չի ստացվել, որը վկայում է չզուգավորված էլեկտրոնի տեղակայման փոքր հավանականության մասին Լ-լեյցին N¹⁵-ի ազոտի ատոմի մոտ:

PARAMAGNETIC CENTRES IN IRRADIATED L-LEUCIN-N¹⁵

R. A. ASATURIAN

Based on the analysis of the form of EPR spectra for irradiated L-leucin-N¹⁵, five types of paramagnetic centres have been extracted by its isotopic substitution by N¹⁵ atoms in different concentrations. Since no essential changes in the form of EPR spectra with the increase of N¹⁵ concentration have been observed, the localization of non-matched electron near the nitrogen atom of L-leucin-N¹⁵ renders low-probable.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. М., 1973.
2. Ингрэм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М., 140, 1972.
3. Каюшин Л. П., Львов К. М., Пулатова М. К. Исследование парамагнитных центров облученных белков. 51, М., 1970.
4. Каюшин Л. П., Грибова Э. П., Азимова О. А. Электронный парамагнитный резонанс фотопрцессов биологических соединений. М., 1973.
5. Каюшин Л. П., Пулатова М. К., Кривенко В. Г. Свободные радикалы и их преобразования и облученных белках. М., 17, 1976.
6. Писежецкий С. Я., Котов А. Г., Милинчук В. К., Рогинский В. А., Тушиков В. Н. ЭПР свободных радикалов и радиационной химии. М., 1972.
7. Свободные радикалы в биологических системах. М., 1963.
8. Асатурян Р. А., Миромцев В. Н., Брук М. А., Абкин А. Д. Химия высоких энергий, 3, 256, 1969.
9. Patten R., Gordy W. Radiat. Res., 14, 573, 1961.
10. Jensen H., Henriksen Th. Acta Chem. Scand., 22, 2263, 1968.
11. Patten R., Gordy W. Radiat. Res., 22, 29, 1964.
12. Hill M., Wyard S. J. Phys., B, 1, 289, 1968.

ГЕНЕРАЦИЯ ЭЛЕКТРОДВИЖУЩЕЙ СИЛЫ В ОРИЕНТИРОВАННОЙ ФОСФОЛИПИДНОЙ ПЛЕНКЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИДРАТАЦИИ

А. А. ШАГИНЯН, Х. В. СТАМБОЛЦЯН

В фосфолипидной пленке, ориентированной самопроизвольно или под воздействием постоянного внешнего электрического поля, при гидратации возникает электродвижущая сила. Разделение и перенос заряда осуществляется в гидрофильной зоне фосфолипидных ламелл.

Исследования электрохимических свойств одного из основных компонентов клеточной мембраны — фосфолипида — проводятся главным образом на искусственных бимолекулярных фосфолипидных слоях (БФС) в водном окружении. БФС вводится в электрохимическую цепь таким образом, чтобы она замыкалась через толщу БФС, т. е. изучаются электрохимические процессы, протекающие в пространстве между его двумя поверхностями. Установлено, что в отсутствие модификаторов БФС представляет собой диэлектрик с высоким внутренним сопротивлением. Однако особенности структурной организации его (наличие четко разграниченных друг от друга зон локализации полярных и гидрофобных групп молекул фосфолипида) являются причиной анизотропии свойств БФС в направлениях перпендикулярной и параллельной поверхности его. При этом можно ожидать существования электрохимической активности полярных зон локализации аминных и фосфатных групп молекул фосфолипида в нем.

Для изучения электрохимических свойств БФС, вводимых в электрохимическую цепь таким образом, чтобы контакт между электродами осуществлялся через его гидрофильные зоны, нами исследовались ориентированные пленки общего фосфолипида, выделенного из головного мозга крупного рогатого скота и очищенного известными способами [1], а также яичного лецитина и синтетического дипальмитониллецитина (ДПЛ) производства фирмы «Сигма» (США), нанесенные на стеклянную пластинку между двумя распыленными токопроводящими идентичными металлическими слоями, используемыми в качестве электродов для регистрации электрических импульсов.

При гидратации фосфолипидной пленки была обнаружена генерация электродвижущей силы (ЭДС) на электродах. На рис. 1 и 2 приведены кривые зависимости напряжения (U) и силы (I) генерируемого

тока от концентрации паров воды в сосуде, где помещена фосфолипидная пленка. С повышением концентрации паров воды возрастают как U , так и I .

Для выяснения ориентации молекул фосфолипида в электрохимической цепи было исследовано двойное лучепреломление [2, 3] (ДЛП) пленок лецитина при падении поляризованного луча света перпендикулярно плоскости пленки. Величина ДЛП оказалась меньше нуля, что соответствует условию $\cos^2\theta - 1/3 > 0$ (θ угол между осью молекулы фосфолипида и лучом света), что в свою очередь, свидетельствует о том, что молекулы лецитина самопроизвольно ориентируются перпендикулярно плоскости стеклянной подложки.

С другой стороны, из фазовой диаграммы системы лецитин-вода видно, что при малых концентрациях воды в системе реализуются ориентированные жидкокристаллические фазы, представляющие собой параллельно расположенные друг относительно друга ламеллы (БФС) фосфолипида, в которых молекулы расположены упорядоченно [4].

На основании вышеприведенных данных по исследованию ДЛП и данных А. Тардьо, В. Лузати и др. [4] можно прийти к выводу, что в исследуемой нами электрохимической цепи молекулы фосфолипида расположены таким образом, что контакт между электродами осуществляется гидрофильными зонами БФС.

Кривые на рис. 1 и 2, наряду с данными ДЛП и рентгеноструктурного анализа [4], дают основание полагать, что генерация ЭДС связана с

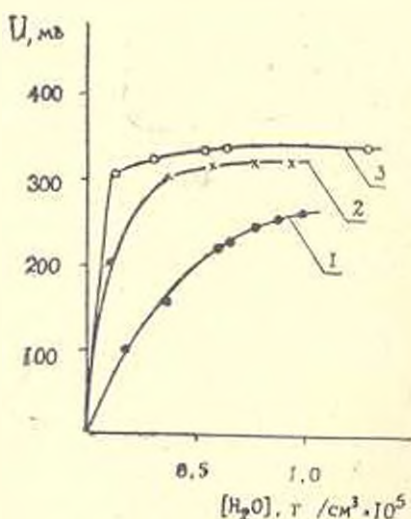


Рис. 1.

Рис. 1. Кривые зависимости ЭДС от концентрации паров воды для пленок 1—яичного лецитина, 2—ДЛП, 3—общего фосфолипида.

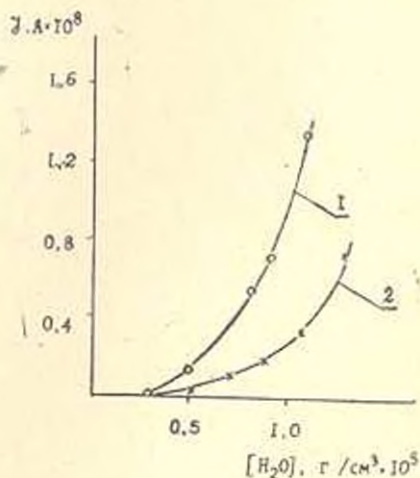


Рис. 2.

Рис. 2. Кривые зависимости силы генерируемого тока от концентрации паров воды для пленок 1—яичного лецитина, 2—ДЛП

возникновением определенной пространственной ориентации молекул фосфолипида в гидратированной пленке. Доказательством этого пред-

положения может служить и то, что ЭДС восстанавливается при дегидратации (вакуумной) пленки и ее повторной гидратации.

Упорядоченное расположение молекул фосфолипида в ламеллах и малый объем межламеллярной водной прослойки дают основание предполагать существование определенной ориентации и полярных групп молекул фосфолипида в ламеллах. Возможная неперпендикулярная ориентация полярных групп молекул фосфолипида к поверхности БФС, при наличии сил притяжения между фосфатными и амидными остатками гидрофильных групп молекул фосфолипида и малой величине объема межламеллярной водной прослойки, может привести к возникновению структурной асимметрии гидрофильных зон БФС. Возникновение ЭДС при этом, возможно, связано с появлением структурной асимметрии гидрофильных зон БФС.

Если эффект генерации ЭДС действительно связан с неперпендикулярной к поверхности БФС ориентацией полярных групп молекул фосфолипида, то следует ожидать усиление эффекта при воздействии на гидратированную фосфолипидную пленку постоянным электрическим полем.

С целью выяснения этого вопроса исследовалось влияние постоянного электрического поля на генерируемую в фосфолипидной пленке ЭДС. Как видно из кривых, приведенных на рис. 3, под влиянием внешнего поля ЭДС увеличивается. При этом фосфолипидным пленкам свойственно существование предельного значения ЭДС. Своего максимального значения (~ 2 в и $\sim 10^{-7}$ А) ЭДС достигает при ориентирующем поле с напряжением ≥ 4 в (исследовалось влияние напряжения внешне-

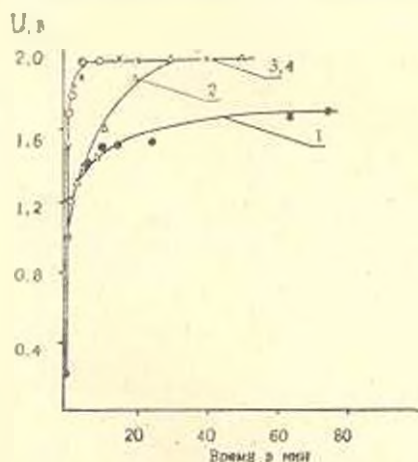


Рис. 3.

Рис. 3. Кривые зависимости ЭДС от продолжительности ориентации гидратированных лецитиновых пленок в постоянном электрическом поле напряжением: 1—2,6 в, 2—3,9 в, 3—7,6 в, 4—13 и 40 в.

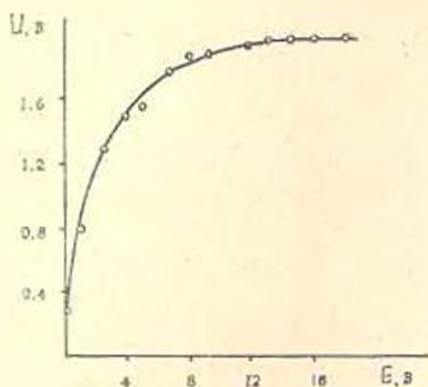


Рис. 4.

Рис. 4. Кривая зависимости ЭДС от напряжения внешнего ориентирующего электрического поля, под воздействием которого лецитиновая пленка находилась в течение 2 мин.

го поля до 10 в). Кривая влияния напряжения внешнего поля на ЭДС пленки лентина, подвергнутой воздействию внешнего поля в течение 2 мин, приведена на рис. 4. Запределивание ЭДС и зависимость времени достижения предельного значения ЭДС от напряжения внешнего поля непосредственно указывают на определяющую роль ориентационных факторов в генерации ЭДС.

Так как в гидратированной фосфолипидной пленке под воздействием внешнего электрического поля могут ориентироваться лишь полярные группы молекул фосфолипида, то можно с большой достоверностью утверждать, что определяющее значение в процессе генерации ЭДС имеет ориентация полярных групп молекул фосфолипида в пленке. Это может осуществляться самопроизвольно в гидратированных фосфолипидных пленках ламеллярной структуры, однако своего максимального значения она достигает под влиянием постоянного электрического поля. Доказательством определяющей роли ориентации полярных групп молекул фосфолипида в генерации ЭДС служит и то, что изменение направления ориентирующего поля вызывает и изменение направления генерируемого тока, что непосредственно связано с изменением направления ориентации полярных групп молекул фосфолипида и БФС.

Таким образом, генерация ЭДС при гидратации ориентированной фосфолипидной пленки связана с возникновением структурной асимметрии гидрофильных зон фосфолипидных ламелл, что зависит от соответствующей ориентации полярных групп молекул фосфолипида в ламеллах. С другой стороны, так как контакт между электродами осуществляется гидрофильными зонами ламелл, то можно утверждать, что при генерации ЭДС разделение и перенос заряда осуществляются в гидрофильной зоне фосфолипидных ламелл.

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР

Поступило 28.II 1978 г.

ՏԱՐԱՆԱԿԱՆՈՐԵՆ ԿՈՂՄՆՈՐՈՇՎԱՅ ՀԱՍՏԱՆՈՒԹՅԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹՈՒՄ ՀԻՒՐԱՏԱԾՄԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՄԲ ԷԼԵԿՏՐԱՇԱՐԺ ՈՒԻՒ ԱՌԱՋԱՑՈՒՄԸ

Ա. Ա. ՇԱՀՆՅԱՆ, Խ. Վ. ՍԱՄՐՈՂՅԱՆ

Ինչպես ինքնաբերաբար, այնպես էլ հաստատուն էլեկտրական դաշտի ներգործությամբ կողմնորոշված ֆոսֆոլիպիդային թաղանթում, հիդրատացման ազդեցությամբ, առաջ է գալիս էլեկտրաշարժ ուժ: Էլեկտրաշարժ ուժի առաջացումը պայմանավորված է ֆոսֆոլիպիդային լամելների ջրասեր մասերի կառուցվածքային անհամաչափությամբ, որն իր հերթին հետևանք է լամելներում ֆոսֆոլիպիդային մոլեկուլների բևեռային լամբերի որոշակի տարածական կողմնորոշման:

THE GENERATION OF ELECTROMOVING FORCE IN THE ORIENTED PHOSPHOLIPID FILMS UNDER THE INFLUENCE OF HYDRATION

A. A. SHAHINIAN, Kh. V. STAMBOLTSIAN

In the phospholipid films oriented spontaneously or under the influence of constant electrical field, the electromoving force is generated during hydration. Its rise is connected with the structural asymmetry of hydrophilic zones of phospholipid lamells, which is the consequence of the corresponding orientation of phospholipid molecule polar groups in lamells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Keane M. Техника липидологии. М., 1975.
2. Stein R. S. J. Polymer Sci., 24, 353, 1957.
3. Черкасов А. И., Витовская М. Г., Бушин С. В. Высокомолекулярные соединения, 18, 1628, 1976.
4. Tardieu A., Luzzati V., Reman F. C. J. Mol. Biol., 75, 711, 1973.

О МЕХАНИЗМЕ ОБРАЗОВАНИЯ РАДИКАЛОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ В γ -ОБЛУЧЕННЫХ РАСТВОРАХ ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Г. В. АБАГЯН

Методом ЭПР исследовано взаимодействие атомов водорода в замороженных сернокислых растворах пиримидиновых оснований: урацила и цитозина. Параллельно проанализированы превращения парамагнитных центров в γ -облученных замороженных растворах урацила, уридина и уридин-5-дифосфорной кислоты в обычной и тяжелой воде (диапазон температур 80—250°K).

Основную часть парамагнитных центров, сохраняющихся в растворе после повышения температуры до 120°K, составляют электроны, стабилизированные молекулой основания. При 160—200°K эти центры рекомбинируют с H^+ или D^+ , в результате чего образуются радикалы, по своей структуре тождественные радикалам присоединения атомов H или D к пиримидиновому кольцу.

Свободные радикалы, возникающие при облучении пиримидиновых оснований—одной из важнейших компонент нуклеиновых кислот—методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) изучались в ряде работ [1—4]. Существенное влияние на образование парамагнитных центров при облучении нуклеиновых кислот и составляющих их компонент оказывают активные продукты радиолиза воды—атомы водорода (H), гидроксильные радикалы (OH), гидратированный электрон (e^-).

Атомы водорода вступают в реакции присоединения или замещения: в соединениях, содержащих ненасыщенные связи (пиримидиновые основания), они присоединяются к пиримидиновому кольцу с расщеплением двойной $C=C$ связи; в насыщенных соединениях (дезоксирибоза) происходит отрыв одного из атомов водорода $C-H$ связи с выделением H_2 .

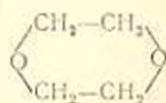
Ранее нами при облучении водных растворов ДНК, тимидина и 5-метилцитозина [5, 6] было высказано предположение о двухступенчатом механизме образования радикалов присоединения в пиримидиновых основаниях. Для подтверждения этой точки зрения в настоящей работе мы исследовали пути возникновения радикалов в γ -облученных замороженных водных растворах урацила, цитозина, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты—коммерческих препаратов без дополнительной очистки. В качестве модельного соединения был использован диоксан особой чистоты. Параллельно исследовали взаимодействие этих соединений с атомами водорода в растворах серной кислоты.

Опыты с γ -облучением проводили с обезгаженными растворами H_2O и D_2O (содержание изотопа в D_2O —99,5%). Непосредственно пе-

ред облучением образцы вакуумировали до остаточного равновесного давления водяных паров над ними 10^{-3} тор при 77°K. γ -облучение водных растворов (бидистилатов) проводили в пробирках из стекла «Луч» при температуре кипения жидкого азота (77°K), от источника Co^{60} мощностью 318 рад/сек, доза облучения 2 Мрад. Спектры ЭПР измеряли при 80°K на радиоспектрометре ЭПР-2 ИХФ, 3-сантиметрового диапазона.

Взаимодействие с атомами водорода осуществляли по методике, предложенной в работах Шалимова, Бажина и других [7, 8]. Водный раствор (бидистилат) исследуемого вещества ($2 \cdot 10^{-2}$ М) смешивали с растворами FeSO_4 и H_2SO_4 (D_2SO_4), замораживали и освещали ультрафиолетовым светом. Во избежание нежелательных реакций в растворах исследуемое вещество добавляли в заранее охлажденный сернокислый раствор (рН 1.5), и смесь сразу же замораживали до 77°K. Получалась прозрачная, бесцветная, стеклообразная матрица. Освещение ультрафиолетовым светом проводили лампой СВДШ-1000 с водяным фильтром, экспозиция 11 мин, охлаждение жидким азотом — в кварцевом сосуде Дьюара. Реакцию наблюдали методом ЭПР. После облучения растворов при 77°K ультрафиолетовым светом возникает интенсивный сигнал ЭПР от атомов водорода $\Delta H = 502$ Гс, при 110°K он исчезает, одновременно возникает и растет сигнал от исследуемого вещества. Атомы водорода реагируют с растворенным веществом с высокой эффективностью — 30% от общего числа образовавшихся атомов водорода вступают в реакцию при 110°K.

На рис. 1 приведены спектры ЭПР радикалов, образующихся при взаимодействии атомов водорода с урацилом (а) и цитозином (а'). Аналогичный спектр ЭПР (с несколько иными константами расщепления сверхтонкой структуры (СТС)) зарегистрирован в диоксане. Константы СТС спектров в урациле и цитозине совпадают с данными других исследователей [9—12], изучавших взаимодействие атомов водорода с сухими препаратами. Атом водорода присоединяется к двойной $-\text{C}_4=\text{C}_5-$ связи, приводя к образованию радикала $-\text{CH}_2-\text{CH}-$, с константами расщепления на α - и β -протонах, равными $a_{\text{H}_2} \approx 20$, $a_{\text{H}_1} \approx 20$, $a_{\text{H}_3} \approx 46$. Эта структура косвенно подтверждается наблюдением такого же радикала (с близкими константами СТС расщепления) в диоксане, где, в отличие от пиримидиновых оснований, он возникает в результате разрыва $\text{C}-\text{H}$ связей. В структуре диоксана, при данном методе иници-



прования, любой возможный разрыв $\text{C}-\text{H}$ связей приводит к образованию радикала только одного типа $-\text{CH}_2-\text{CH}-$.

На рис. 2 представлены результаты опытов по γ -облучению замороженных растворов уридин-5'-дифосфорной кислоты в H_2O и D_2O . Подоб-

ные превращения (но менее четко) наблюдаются в растворах уранила и уридина.



Рис. 1. Спектры ЭПР продуктов реакции атомов водорода с уранилом (а) и пшитозином (а').

Верхний ряд спектров ЭПР соответствует растворам уридин-5'-дифосфорной кислоты в H_2O . При $77^\circ K$ (рис. 2б) спектр близок к спектру облученного льда [13] (ОН радикалы—асимметричный дублет $\Delta H \approx 43$ Гс), однако в нем имеется также несколько дополнительных линий. При повышении температуры до $143^\circ K$ интенсивность спектра значительно падает, и в нем остается плохо разрешенный дублет с $\Delta H \approx 18$ Гс. Это свидетельствует о том, что при повышении температуры в основном ОН радикалы гибнут, не вступая во взаимодействие с молекулами растворенного вещества. При $193^\circ K$ и далее дублетный сигнал ЭПР превращается в многокомпонентный спектр ЭПР, характерный для радикалов присоединения, наблюдаемых при взаимодействии атомов водорода с уранилом.

Аналогичные изменения спектров ЭПР зафиксированы в растворе уридин-5'-дифосфорной кислоты в растворах D_2O (нижний ряд спектров). При $77^\circ K$ (рис. 2б') спектр состоит в основном из дублетной линии и сигнала парамагнитных центров, возникающих при облучении чистой D_2O . При повышении температуры до $120^\circ K$ все парамагнитные центры D_2O гибнут, по-видимому, не вступая во взаимодействие с молекулами растворенного вещества, и в спектре ЭПР остается лишь

дублетная линия (рис. 2 с'), причем интенсивность ее сохраняется практически постоянной. При температуре выше 190°K заметно превращение его в многокомпонентный спектр соответствующими радикалами —СНД—СН—с одним атомом водорода, замещенным на дейтерий.

Максимальная концентрация радикалов присоединения в водном растворе достигается при 193°K, а в растворе D₂O—при 213°K. При более высоких значениях температуры (250°K) они гибнут.

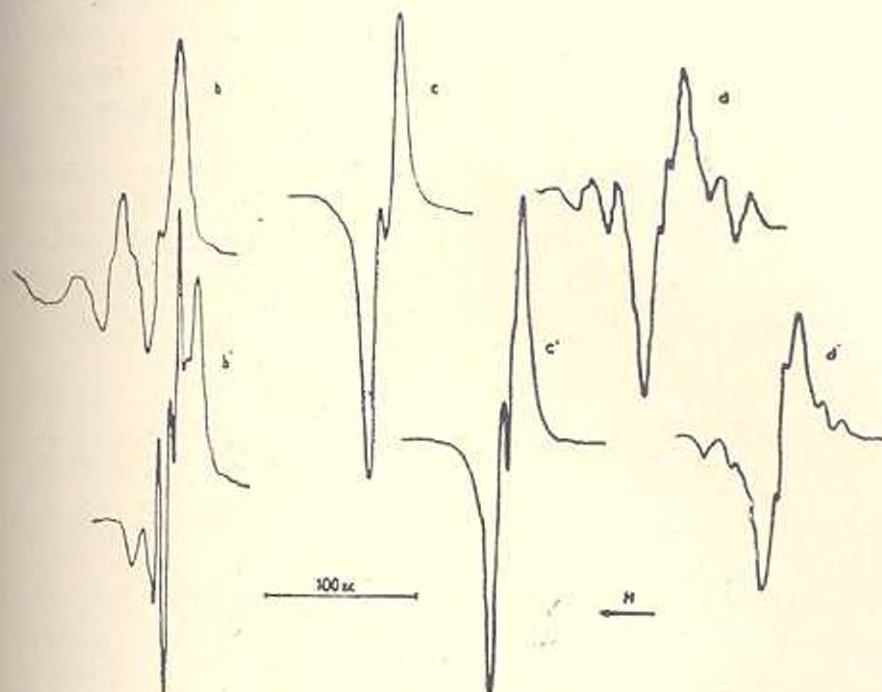


Рис. 2. Спектры ЭПР γ -облученных растворов уридин-5'-дифосфорной кислоты в H₂O (b, c, d) и в D₂O (b', c', d'). Концентрация 0,2 М. b, b'—при 77°K, c, c'—после отогрева образца до 143°K, d—до 200°K, d'—до 230°K. Масштаб спектров c, c' (по ординате) увеличен в 2,5 раза.

Взаимодействие атомов водорода с пиримидиновыми основаниями, как правило, приводит к образованию радикалов присоединения. Это подтверждается данными, полученными при взаимодействии их с атомами водорода в сернокислых растворах. В замороженных (сернокислых) растворах атомы водорода присоединяются к основаниям при температуре 110°K и выше, т. е. практически мгновенно. Атомы водорода реагируют с различными основаниями и нуклеозидами примерно с одинаковыми скоростями, причем скорость реакции определяется подвижностью их в твердой матрице.

При облучении замороженных водных растворов урацила, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты реакции OH радикалов не играют значительной роли в процессе радиолиза при 77°K и при последующем размораживании растворов. При 120—140°K радикалы OH становятся

подвижными и гибнут, не успев прореагировать с молекулами растворенного вещества (их исчезновение сопровождается значительным падением суммарной концентрации частиц без появления новых линий в спектрах ЭПР). Очевидно, постепенное размораживание растворов непригодно для исследования реакций радикалов ОН.

Атомы водорода при 77°K не стабилизируются кристаллической решеткой льда. Возможно, в процессе облучения они частично реагируют с основаниями, однако концентрация радикалов присоединения, возникающих при этом, невелика, во всяком случае, менее чем 10^{13} радикал/г, так как при 77°K спектр этих радикалов практически отсутствует.

При размораживании облученных при 77°K растворов урицила, уридина, уридин-5'-дифосфорной кислоты в области значений температур 120—200°K происходит интенсивное образование радикалов присоединения, и концентрация их увеличивается в несколько раз, и то время как в системе отсутствуют атомы водорода (рис. 2 d, d'). В растворах H_2O возникают радикалы типа $-CH_2-\dot{C}H-$, в растворах D_2O аналогичные, но дейтерозамещенные $-CHD-\dot{C}H-$ (скорость присоединения атомов D меньше, чем атомов H).

В промежуточной стадии, предшествующей образованию радикалов присоединения, возникают парамагнитные центры, соответствующие дублетному спектру ЭПР $\Delta H \approx 18$ гс. Спектр этих центров одинаков в растворах нуклеотида (уридин-5-дифосфорная кислота), нуклеотида (уридин) и основания (урицил) в обычной и тяжелой воде. Следовательно, СТС спектра вызвана взаимодействием неспаренного электрона с протонами основания, а не растворителя или остатка дезоксирибозы. Парамагнитные центры, соответствующие дублетному спектру ЭПР, накапливаются в ходе облучения растворов при 77°K, и концентрация их сохраняется постоянной при повышении температуры до 150—160°K. Радикалы ОН или ОД, погибая, не рекомбинируют с ними, т. е. эти центры, скорее всего, имеют не радикальную природу.

Можно предположить, что активное участие в образовании парамагнитных центров, соответствующих дублетному спектру ЭПР, принимает другая компонента радиолитиза воды — гидратированный электрон: в процессе облучения электроны стабилизируются на пиримидиновом основании с образованием ион-радикала, и именно этим парамагнитным центрам соответствует дублетный сигнал ЭПР ($\Delta H = 18$ гс). На самом деле, константа скорости реакции гидратированного электрона с пиримидиновыми основаниями довольно высока $k \approx 10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ [14], в то время как соответствующая величина при реакции с дезоксирибозой (рибозой) на несколько порядков ниже.

При повышении температуры электроны, стабилизированные молекулой основания, рекомбинируют с H^+ (или D^+), в результате чего образуются радикалы, аналогичные по своей структуре радикалам присоединения атомов H (или D) к кольцу урицила.

Таким образом, при γ -облучении водных растворов пиримидиновых оснований и соответствующих им нуклеотидов и нуклеозидов гидрати-

рованные электроны вносят основной вклад в образование радикалов присоединения. В первичном акте радиолиза они захватываются молекулой основания с последующим присоединением H^+ . При низкотемпературном облучении водных растворов этот путь образования радикалов присоединения является доминирующим.

Институт физических исследований АН АрмССР,
г. Аштарак

Поступило 28.II 1978 г.

γ -ՃԱՌԱԳԱՅԹՎԱՆ ՊԻՐԻՄԻԴԻՆԱՅԻՆ ՇԻՔԻՆԻ ԼՈՒՄԻՆԵՑՆԵՐՈՒՄ ՄԻԱՑՄԱՆ ՌԱԴԻԱԼՆԵՐԻ ԱՌԱՋԱՅՄԱՆ ՄԵԿԱՆԻԶՄԻ ՄԱՍԻՆ

Հ. Ո. ԱՐԱՂՅԱՆ

ԷՊՌ մեթոդով հետազոտվել են մինչև $110^\circ K$ ստուցված ծծմբական թթվի լուծույթում պիրիմիդինային հիմքերի՝ ուռացիլի և ցիտոզինի, ջրածնի և դեյտերիումի ատոմների հետ փոխազդեցությունից առաջացած ազատ ուղիկայիները: Միաժամանակ հետազոտվել են γ -ճառագայթված ուռացիլի, ուրիդինի, ուրիդին- 5^- -երկֆոսֆորային թթվի ստուցված լուծույթները ծանր և հասարակ ջրի մեջ:

$80^\circ K$ -ում ուռացիլի, ուրիդինի և ուրիդին- 5^- -երկֆոսֆորային թթվի ջրային լուծույթներում ճառագայթման ժամանակ H ատոմները և OH ռադիկալները երկրորդական դեր են խաղում:

Մինչև $120^\circ K$ պահպանվող կենտրոնների հիմնական մասը կազմում են հիմքի մոլեկուլներով կայունացված էլեկտրոնները: Ջերմաստիճանի $160-200^\circ K$ տիրույթում այդ կենտրոնները փոխազդում են H^+ կամ D^+ -ի հետ, որի հետևանքով առաջանում են ազատ ուղիկայիներ, որոնց կառուցվածքը նույնանման է պիրիմիդինի օղակին H կամ D ատոմներին միացումից առաջացած ուղիկայիններին:

THE MECHANISM OF THE FORMATION OF ADDITION RADICALS IN γ -IRRADIATED SOLUTIONS OF PYRIMIDINE BASES

G. V. ABAGHIAN

The method of Electron Spin Resonance (ESR) is applied to the study and analysis transforming the paramagnetic centres into irradiated frozen solutions of urazil, uridin and uridin-5-diphosphoric acid (temperature range $80-250^\circ K$).

Electrons stabilized by the molecule of the base constitute the principal part of paramagnetic centres to be found in the solution after the temperature has been raised up to $120^\circ K$. At $160-200^\circ K$ these centres recombine with H^+ or D^+ resulting in radicals that are identical in structure with those arising from the addition of H or D atoms to the pyrimidine cycle.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Schilds J., Gordy W.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **45**, 269, 1959.
2. Шен Пей Ген, Блюменфельд Л. А., Калмансон А. Э., Пасынский А. Г. Биофизика, **4**, 3, 263, 1959.
3. *Eisinger J., Shulman R. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **50**, 694, 1963.
4. *Cook L. B., Wyard S.* Internat. J. Radiat. Biol. **11**, 4, 357, 1966.
5. Абагян Г. В., Бутягин П. Ю. Биофизика, **14**, 5, 785, 1969.
6. *Abaghian G. V., Buttagin P.* Ju Studia Biophysica, **15/16**, 291, 1969.
7. Шалимон Б. Н. ДАН СССР, **134**, 145, 1960.
8. Бажин Н. М. и др. Кинетика и катализ, **6**, 6, 1105, 1965.
9. *Holmes D. E., Myers L. S., Ingals R. B.* Chem. Phys., **35**, 380, 1961.
10. *Cole T.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **54**, 1486, 1965.
11. *Herak N., Gordy W.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **56**, 1, 7, 1966.
12. *Holmes D. E., Ingals R. B., Myers L. S.* Internat. J. Rad. Biol., **12**, 415, 1967.
13. Mc. *Millman.* Chem. Phys. **33**, 609, 1960.
14. *Anbar M., Neta P.* Internat. J. Applat Rad. and Isotopes, **18**, 493, 1967.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ОТ ПАРАМЕТРОВ ВОЗДЕЙСТВУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, А. С. ТЕР-МАРКОСЯН

Исследован окислительно-восстановительный потенциал печени и мышцы белых беспородных крыс после воздействия электростатическими полями различных параметров. Показано повышение окислительно-восстановительных потенциалов; величина повышения и время восстановления зависят от вида ткани и дозы действующего фактора.

Научно-технический прогресс все более изменяет естественную экологическую среду обитания человека. В частности, в результате повсеместного применения синтетических материалов, электростатических полей (ЭСП) в технологических процессах, создания сверхвысокопотенциальных линий передач постоянного тока человек все чаще оказывается в сфере действия ЭСП, во много раз превышающего естественный фон.

Анализ литературных данных показывает, что ЭСП является фактором, на действие которого организм отвечает рядом обобщенных реакций. Однако оно обладает некоторыми особенностями и в ряде случаев действует как специфический фактор. В работах ряда авторов [1—3] приводятся косвенные данные, свидетельствующие об изменении уровня окислительно-восстановительных процессов после воздействия ЭСП. Однако вопрос, в какую сторону смещается окислительно-восстановительное равновесие, остается открытым.

Известно, что наиболее интегральным параметром, позволяющим судить об уровне окислительно-восстановительных процессов в тканях, являются окислительно-восстановительные потенциалы (ОВП). Целью данного исследования явилось определение зависимости ОВП от длительности воздействия и напряженности ЭСП, определение динамики изменений этого показателя после воздействия указанного фактора. Выявление этих зависимостей позволит дать количественную оценку окислительно-восстановительных процессов после воздействия ЭСП различных параметров.

Материал и методика. ЭСП создавалось при помощи установки конденсаторного типа со строго контролируемым параметрами поля. Подробное описание установки дано в наших предыдущих работах [4, 5].

Объектом исследования служили печень и мышца белых беспородных крыс-самцов весом 120—150 г. Потенциометрическое определение ОВП проводилось на приборе рН-310. В качестве измерительного электрода использовался электрод игольчатого типа. Для механической прочности и электроизоляции электрод запаян в стекле. При этом рабочая длина его составляла 3 мм, а толщина—0,3 мм. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод.

Определение ОВП производилось следующим образом: животное фиксировалось на столике, вскрывались брюшная полость, бедренная мышца, и измерительный электрод соответственно вводился в печеночную и мышечную ткань. При всех измерениях хлорсеребряный электрод приходился в контакт с подкожной клетчаткой через разрез в коже при помощи волокна стеклянной трубки, наполненной насыщенным раствором KCl. Из-за нанесенной при введении электрода травмы величина ОВП устанавливалась не сразу [6], она определялась через 15—20 мин после введения электрода в ткань и выражалась в милливольтях.

В первой серии экспериментов опытные животные подразделялись на 3 группы, по 50 животных в каждой. I группа подвергалась воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см, длительностью 1 час, II группа—длительностью 24 час, III—в течение 6 дней по 6 час, в день. К каждой группе имелись контрольные животные, по 10 на группу, которые содержались в идентичных условиях, но не подвергались воздействию ЭСП. Из всех трех групп сразу после воздействий, через 1, 4, 7, 14 суток брались по 10 животных для измерения ОВП в мышце и печени. Аналогичные измерения проводились у животных из контрольных групп.

Во второй серии экспериментов животные подразделялись на 9 групп. В первую, контрольную группу, входило 37 животных. 8 опытных групп, по 10 животных в каждой, подвергались воздействию ЭСП напряжениями 250, 500, 1000, 1500, 20000, 2500, 3000, 3500 в/см, длительностью 1 час. Сразу после воздействий проводились измерения ОВП печени. Параллельно этот показатель определялся у контрольных животных. Во избежание влияния циркадных ритмов все измерения проводились в одно и то же время суток. Результаты измерений представлены в виде разниц в ОВП опыта и контроля.

Результаты и обсуждение. Установлено, что ЭСП исследованных параметров приводит к увеличению ОВП, мерой которого является величина электродного потенциала, определяемого формулой Нернста

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}, \quad (1)$$

где E —величина ОВП, R —газовая постоянная, T —абсолютная температура, $[ox]$ —концентрация окисленных форм—акцепторов электронов, $[red]$ —концентрация восстановленных форм—доноров электронов, n —число переходящих электронов для биологических систем.

$$E_0 = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln [H^+], \quad (2)$$

где E_0 —величина стандартного ОВП, $[H^+]$ —концентрация водородных ионов. Из формулы (1) следует, что для данных условий всякое изменение ОВП должно определяться отношением $\frac{[ox]}{[red]}$, которое может увеличиться либо при повышении концентрации акцептора электронов, либо при снижении концентрации донора электронов. Ранее нами было показано [7, 8], что воздействие ЭСП приводит к увеличе-

нию снабжения тканей кислородом и угнетению скоростей дыхания митохондрий. Следовательно, в единицу времени кислорода в ткани будет поступать больше, а утилизироваться меньше. В тканях он является одним из основных акцепторов электронов. Таким образом, увеличение ОВП в тканях после воздействия ЭСП можно объяснить увеличением концентрации кислорода. В пользу такого объяснения говорят данные ряда работ [9—11], констатирующие уменьшение ОВП при кислородной недостаточности.

В табл. 1 представлены результаты первой серии опытов, из которых следует, что увеличение ОВП и период его восстановления зависят от вида ткани и длительности воздействия. Увеличение ОВП отчетливее выражено в печеночной ткани, что и следовало ожидать, так как она более активно участвует в окислительно-восстановительных процессах.

Таблица 1

Динамика изменений ОВП после воздействия ЭСП, мВ

Время после воздействия, сутки	Ткань	Длительность воздействия		
		час п = 20	сутки п = 20	6 суток по 6 час ежедневно п = 23
0	мышца	$8,2 \pm 0,591$ $\pm 2,82$	$22,5 \pm 1,536$ $\pm 7,81$	$15,1 \pm 1,527$ $\pm 7,92$
	печень	$30,5 \pm 3,79$ $\pm 2,47$	$59,0 \pm 3,65$ $\pm 6,70$	$37,8 \pm 1,03$ $\pm 15,97$
1	мышца	$0,9 \pm 0,334$ $\pm 0,09$	$12,6 \pm 0,761$ $\pm 3,63$	$8,62 \pm 1,698$ $\pm 4,14$
	печень	$-1,2 \pm 3,440$ $\pm 0,02$	$33,9 \pm 3,450$ $\pm 9,88$	$24,95 \pm 1,16$ $\pm 10,25$
4	мышца	$-0,1 \pm 0,234$ $\pm 0,075$	$3,2 \pm 0,85$ $\pm 0,882$	$3,62 \pm 0,863$ $\pm 0,15$
	печень	$0,4 \pm 4,720$ $\pm 0,026$	$3,0 \pm 3,476$ $\pm 0,70$	$4,25 \pm 1,440$ $\pm 1,37$
7	мышца	$-0,3 \pm 0,518$ $\pm 0,03$	$16,4 \pm 1,6$ $\pm 5,36$	$7,72 \pm 1,56$ $\pm 3,92$
	печень	$-0,1 \pm 3,22$ $\pm 0,05$	$50,8 \pm 4,052$ $\pm 14,27$	$23,65 \pm 2,08$ $\pm 7,96$
14	мышца	$0,1 \pm 0,354$ $\pm 0,01$	$0,6 \pm 0,578$ $\pm 0,16$	$-0,58 \pm 0,91$ $\pm 0,37$
	печень	$0,6 \pm 2,5$ $\pm 0,04$	$-1,2 \pm 3,05$ $\pm 0,29$	$-1,15 \pm 1,82$ $\pm 0,38$

Сравнительно небольшой эффект и быстрое восстановление при 1-часовом воздействии можно объяснить тем, что при этой экспозиции происходят незначительные отклонения от нормы, и организм быстро их нейтрализует. При 24-часовой экспозиции отмечаются значительные отклонения, для нейтрализации которых организму требуется больше времени.

Небольшая эффективность длительных дробных воздействий, по всей видимости, обусловлена адаптацией организма к данному фактору. Об адаптации к ЭСП неоднократно говорилось в ряде работ [3,

12]. Некоторая волнообразность восстановительного периода, в частности выбросы на 7-е сутки после воздействия при 24-часовой и недельной экспозициях, является следствием неоднородной по времени восстановительной реакции организма на данное воздействие. Аналогичная цикличность восстановительного периода после воздействия ЭСП отмечалась нами ранее [7, 8].

В табл. 2 представлены результаты второй серии опытов, согласно которым с увеличением напряженности, начиная с 500 в/см, происходит экспоненциальный рост ОВП, экспонента выходит на плато на-

Таблица 2

Зависимость ОВП от напряженностей ЭСП, мВ (n=47)

Напряженность ЭСП, в/см							
250	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
4.4 ± 2.8 ± 0.118	9.2 ± 2.16 ± 2.58	15.5 ± 2.69 ± 4.76	24.9 ± 2.34 ± 8.56	33.6 ± 1.37 ± 15.27	34.1 ± 1.48 ± 14.89	35.6 ± 1.6 ± 15.41	37.2 ± 1.86 ± 13.2

чина с 2000 в/см. ЭСП напряженностью до 500 в/см и длительностью 1 час неспособны вывести окислительно-восстановительные процессы из стационарного состояния. По всей видимости, в зависимости от длительности воздействия имеется конкретный диапазон напряженностей ЭСП, при котором нарушается нормальный ход окислительно-восстановительных процессов, кроме того, начиная с определенной напряженности нарушения этих процессов оказываются незначительными.

Изложенное дает основание полагать, что воздействию ЭСП приводит к существенному нарушению стационарного состояния окислительно-восстановительных процессов. Увеличение ОВП указывает на смещение донорно-акцепторного равновесия в сторону превалирования окислительных форм.

Глубина нарушений и время восстановления зависят от длительности и напряженности ЭСП.

Ереванский государственный медицинский институт,
лаборатория биофизики и молекулярной биологии ЦИИЛ

Поступило 3.IV 1978 г.

ՌԵՍԻԴԱԿԱՆԱԿՆՍԱՆ ՊԱՏԵՆԾԱԿՆԵՐԻ ԿԱՆԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ ՆԵՐՄՈՐՄՈՎ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ՊԱՐԱՄԵՏՐՆԵՐԻՑ

Գ. Դ. ԱՐՇՐՈՒՆԻ, Ա. Ս. ՏԻՐ-ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

Աշխատանքում հետազոտվել են սպիտակ առնետների լյարդի և մկանային հյուսվածքի օքսիդափերականցման պոտենցիալները՝ դանադան պարամետրներով էլեկտրաստատիկ դաշտերի ներգործությունից հետո: Յույց է տրված, որ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը առաջ է բերում օքսիդափերականցման պոտենցիալների մեծացում: Վերականգնման ժամանակը և մեծացման չափը կախված են ներգործող ֆակտորի զոզայից և հյուսվածքի տեսակից:

THE INVESTIGATION OF DEPENDENCE OF OXIDATIVE-REDUCTIVE POTENTIALS UPON THE PARAMETERS OF ELECTROSTATIC FIELD TREATMENT

G. G. ARTSRUNY, A. S. TER-MARKOSSIAN

The oxidative-reductive potentials (ORP) of liver and muscle of rats have been investigated following the treatment by electrostatic fields (ESF) of different parameters.

It has been shown that ORP increased under ESF treatment. The amount of increase and reduction time depends upon the variety of tissue and the dose of the treating factor.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Altmann G. Arch. Metentol. gephyr., Bloklmatol. sei. Radiat. research, 17, 269, 1969.
2. Schreinitke A. Lechr. gen. Hyg., 16, 7, 519, 1970.
3. Möse J., Schug S., Fischer G. Biomed. Techn., 17, 2, 55, 1972.
4. Арцруни Г. Г., Романов Г. В., Кутузов А. Д., Пирузян Л. А. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 435, 1973.
5. Арцруни Г. Г. Мат-лы научн. конф. мол. уч., посвящ. XXV съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.
6. Сумиrossoв Г. В. Окислительно-восстановительное равновесие и радиочувствительность организма, 31, М., 1970.
7. Пирузян Л. А., Арцруни Г. Г., Романов Г. В., Кутузов А. Д. Изв. АН СССР (сер. биол.), 5, 610, 1974.
8. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Мат-лы конф. мол. уч. межд. ин-ов Закавказск. респ., 103, Тбилиси, 1977.
9. Серяков В. Н., Дегя Л. И. Вестн. Московского университета, 6, 5, 87, 1970.
10. Владимиров В. Г., Юсинов В. С., Поддубенский Г. А. Разнобнология, 11, 1, 102, 1971.
11. Дечев Г. Д., Москона А. И. Биофизика, 10, 3, 490, 1966.
12. Катрушенко А. Г. Физиологические механизмы индивидуальной адаптации, 67, Л., 1967.

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ОТНОШЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ ПРИ ВОСПРИЯТИИ ЗНАКОМЫХ ПРЕДМЕТОВ ПОСЛЕ СЛОВЕСНОЙ ИНСТРУКЦИИ

Г. Г. ЧЯН

Изучено влияние словесной инструкции на характер пространственных отношений электрической активности коры головного мозга у детей при восприятии знакомых предметов. Показано, что словесная инструкция вызывает усиление процессов пространственной синхронизации биопотенциалов исследованных зон коры.

Согласно современным представлениям зрительное восприятие обеспечивается сложной многоуровневой системой с переменной структурой и большими возможностями переключений [1, 2]. Как указывал Анохин [3], в каждом конкретном случае задача, решаемая человеком, выступает в роли того «системообразующего фактора», который определяет соотношение различных уровней опознания, т. е. структуру управляющего механизма в данных условиях.

В работах Хризман и Зайцевой [4, 5], Зайцевой и Еремеевой [6] установлено, что у детей на ранних этапах развития — на 2—3-м году жизни — процесс восприятия и опознания зрительной информации на уровне центральных образований мозга происходит за счет реорганизации пространственно-временных отношений биопотенциалов мозга, их частотных характеристик и типичи межцентральных взаимодействий проекционных и ассоциативных зон.

В дальнейшем в связи с развитием регулирующей функции речи усложняется и зрительное восприятие, оно приобретает активный, целенаправленный характер [4, 7]. В связи с усложнением характера зрительного гнозиса ребенка развиваются и совершенствуются центральные механизмы мозга, реализующие процессы опознания предметов.

В данной работе была поставлена задача выявить особенности пространственной организации биопотенциалов мозга у детей 4—5-ти лет при восприятии знакомых предметов после словесной инструкции, направленной на активацию зрительной системы.

Материал и методика. Электрические процессы мозга регистрировались у детей 4—5-ти лет (16 человек) в состоянии покоя, при восприятии знакомого предмета до словесной инструкции и сразу после словесной инструкции «смотри». ЭЭГ отводили униполярно от 10-ти симметричных точек коры головного мозга: лобных, моторных,

нижнетеменных, затылочных и височных на 17-канальном энцефалографе фирмы «Саниэй» (Япония). Обработка ЭЭГ-кривых производилась методом корреляционного анализа, описанного подробно в работах Сологуб и Хришюк [8, 9]. Достоверности различий вычислялась по критерию U Вилкинсона—Манна—Уитни [10].

Для понимания значения словесных команд в регуляции функционального состояния мозга ребенка, в осуществлении процессов восприятия знакомых предметов нами оценивалась в сравнительном аспекте организация межцентральных корреляций биопотенциалов мозга непосредственно при восприятии предмета после словесной инструкции «смотри» и без этой инструкции.

Результаты и обсуждение. Анализ индивидуальных данных показал, что при предъявлении знакомого предмета (без предварительной инструкции) характер межцентральных отношений биопотенциалов коры головного мозга характеризуется значительной вариабельностью. После инструкции «смотри» отмечается значительное повышение общего уровня пространственной синхронизации (рис. 1). Так, у первого

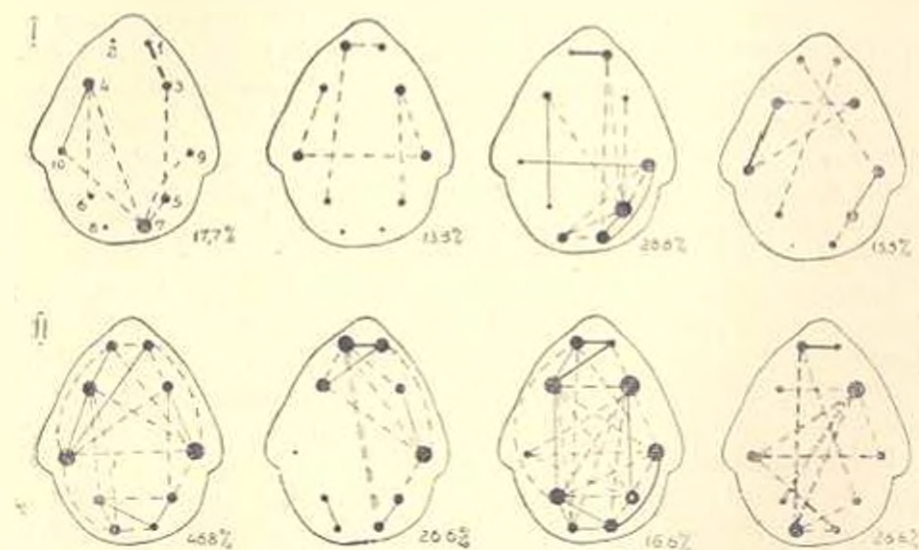


Рис. 1. Организация межцентральных корреляции биопотенциалов мозга у 4-х детей при предъявлении знакомого предмета без предварительной словесной инструкции (I) и после этой инструкции (II). Цифры под схемами—общее число значимых корреляций, %. Линии на схемах—наличие корреляций. Цифры на схемах—номера отведений электродов.

ребенка уровень взаимосвязанной электрической активности всех изучаемых зон до словесной команды составлял 17.7%, а после—48.8%. Отмечалось значительное повышение числа межцентральных корреляций моторных зон с височными и нижнетеменными зонами обоих полушарий, а также появление корреляций биопотенциалов лобных зон с моторными центрами, чего не наблюдалось при предъявлении знакомого предмета без словесной инструкции. Имело место не только увеличение количества связей, но и усиление их значимости за счет появления сильных межцентральных корреляций. Устанавливались сильные

внутриполушарные корреляции между височными и моторными, нижнетеменными и затылочными зонами обоих полушарий, а также моторной и лобной областями левого полушария и межполушарные корреляции потенциалов правой лобной с левой височной, правой затылочной с левой нижнетеменной зонами. У второго ребенка до словесной инструкции уровень пространственной синхронизации составлял 13,3%. Небольшое число слабых положительных связей устанавливалось между моторными и височными зонами обоих полушарий, лобной и нижнетеменной левого и симметричными центрами моторной и височной зон обоих полушарий. После словесной инструкции уровень пространственной синхронизации биоэлектрических потенциалов возрос вдвое (до 26,6%). Усилилась взаимосвязь лобных зон обоих полушарий за счет появления очень сильной связи. Сильные связи появились между нижнетеменными и затылочными зонами в обоих полушариях, а также между лобной правой и моторной левого полушария, моторной и височной правого полушария. У третьего ребенка при предъявлении предмета без словесной инструкции уровень пространственной синхронизации биоэлектрических потенциалов составлял 28,8%. Отмечались сильные связи между симметричными лобными и височными зонами левого полушария, а также между височной и затылочной, нижнетеменной и затылочной в правом полушарии. После словесной инструкции уровень пространственной синхронизации повышался до 66,6%. Возникли очень сильные связи между лобной правой и моторной левого полушария, а также между височной и затылочной зонами правого полушария. Сильные связи отмечались между лобной и моторной, моторной и нижнетеменной, нижнетеменной и затылочной зонами левого полушария, а также между нижнетеменной зоной левого и затылочной правого, нижнетеменной и моторной правого полушария и симметричными центрами лобных и затылочных зон обоих полушарий.

У четвертого ребенка при опознании знакомого предмета до словесной инструкции уровень пространственной синхронизации биоэлектрических потенциалов мозга составлял 15,5%. Очень сильная связь устанавливалась между моторной и височной зонами левого полушария, сильная связь — между височной и нижнетеменной правого полушария. Отсутствовали межцентральные взаимосвязи левой затылочной со всеми другими исследованными зонами, а зрительная кора правого полушария была связана слабой положительной связью с нижнетеменной зоной того же полушария. После словесной инструкции очень сильная связь возникала между лобными зонами обоих полушарий. Интересно отметить, что возникло большое число слабых отрицательных связей с фокусом в моторной коре правого полушария. Общий уровень межцентральных корреляций возрос у этого ребенка до 26,6%.

Изучение динамики распределения наиболее значимых межцентральных взаимосвязей (сильных и очень сильных) при предъявлении знакомого предмета (без инструкции и с инструкцией «смотри») пока-

зало, что общее число их без словесной инструкции составляло 4,7% (рис. 2). Фокусы максимальной взаимосвязанной активности находи-

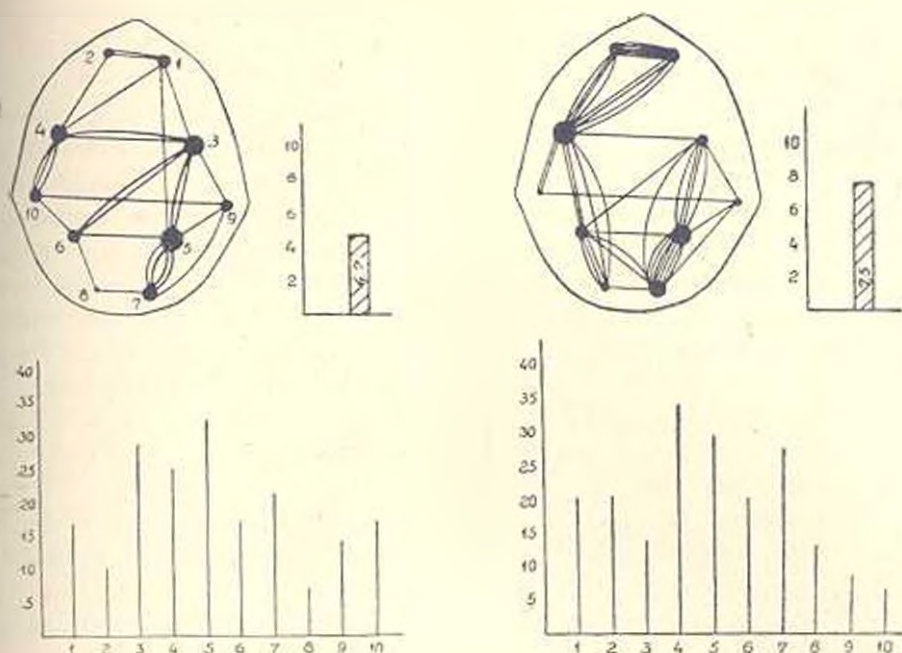


Рис. 2. Динамика распределения сильных и очень сильных взаимосвязей биопотенциалов при предъявлении знакомого предмета до словесной инструкции (слева) и после инструкции (справа). Столбики сверху от схем — общее число сильных и очень сильных корреляций биопотенциалов. Графики под схемами — изменение сильных и очень сильных корреляций биопотенциалов во всех исследованных центрах.

лись в моторных зонах обоих полушарий, а также в нижнетеменной и затылочной областях правого полушария. Наиболее тесные синхронные отношения биопотенциалов устанавливались между моторной и височной зонами левого полушария, нижнетеменной и затылочной правого полушария. После словесной инструкции «смотри» предъявление знакомого предмета вызвало повышение уровня пространственной синхронизации биопотенциалов неокортекса до 7,5%. В 2,5 раза возросло число межцентральных взаимосвязей симметричных центров лобных зон и в 4 раза — лобных зон обоих полушарий с моторной левой полушария ($P \leq 0,01$), в 2 раза увеличилось количество взаимосвязей моторной и нижнетеменной, а также нижнетеменной и затылочной зон правого полушария ($P \leq 0,01$). Значительные сдвиги произошли и в левом полушарии, где усилились взаимосвязи нижнетеменной зоны с затылочными зонами обоих полушарий. Фокусы взаимосвязанной активности отмечались не только в правом полушарии, как при предъяв-

лении предмета без предварительной команды, но и в левом—в моторной, нижнетеменной, лобной зонах и несколько меньше—в затылочной.

Проведенные исследования позволили установить, что у детей 4—5-ти лет пространственные отношения биопотенциалов мозга при опознании знакомых предметов после словесной инструкции «смотри» неоднозначны и существенно отличаются от межцентральных взаимосвязей биопотенциалов при отсутствии словесной инструкции. После словесной инструкции общий уровень пространственной синхронизации биопотенциалов у всех детей значительно повышался (в 2—3 раза). Отмечалось не только увеличение количества связей, но и повышение их значимости за счет появления сильных межцентральных корреляций. Наиболее взаимосвязанными оказались передние и задние ассоциативные зоны—лобные и нижнетеменные, а также проекционные затылочные зоны обоих полушарий. Сам факт появления высокосинхронных колебаний в теменно-затылочных отделах мозга свидетельствует об усилении функциональных отношений этих центров при опознании предметов и о важном значении нижнетеменных областей в регуляции зрительных функций у человека.

Эти факты согласуются с данными многочисленных электрофизиологических исследований, выполненных на нейрональном, системном и поведенческом уровнях [11—13].

Особое значение в опознании предметов у детей имеют не только нижнетеменные, но и лобные структуры мозга.

Полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе данными об облегчении зрительных вызванных потенциалов в ассоциативных лобных отделах мозга у детей школьного возраста в ситуации селективного внимания, создаваемой предварительной словесной инструкцией [7, 14].

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить, что словесная команда регулирует у детей 4—5-ти лет процессы активного восприятия зрительных сигналов и эта регуляция осуществляется путем расширения участия как задних, так и передних ассоциативных структур неокортекса. Выявлены существенные различия в пространственном распределении взаимосвязей различных зон коры при восприятии знакомых предметов без словесной команды и после инструкции «смотри». Они выражаются в усилении процессов пространственной синхронизации биопотенциалов исследованных зон коры при восприятии знакомых предметов после словесной команды. Особенно увеличивается число сильных корреляций в лобных и нижнетеменных ассоциативных зонах преимущественно левого полушария, а также проекционной зрительной зоне левого полушария.

Армянский государственный педагогический институт
им. Х. Абовяна

Поступило 15.V 1978г.

ԵՐԵՎԱՆԵՐԻ ԳԼԽՈՒԳԵՂԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՏԱՐԱԾԱԿԱՆ
ՀԱՐԱՐԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՄԱՆՈՒ ԱՌԱՐԿԱՆԵՐԻ ԸՆԿԱՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ՝
ԲԱՌԱՑԻՆ ՀՐԱՀԱՆԿԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ՉԹՅԱՆ

Հետազոտվել են 4—5 տարեկան հասակի 13 երեխա, էնցեֆալոգրաման
գրանցվել է հանգստի վիճակում, ծանոթ առարկայի ընկալման ընթացքում՝
առանց բառային հրահանգի և անմիջապես բառային հրահանգից հետո:

Կենսահոսանքների միջկենտրոնային հարարերությունների ուսումնասի-
րությունները ցույց են տվել, որ գոյություն ունեն հսկան տարրերություններ
դիստոգենի տարրեր գոնաների միջև եղած տարածական տեղադրված մեջ.
Երբ առարկան ընկալվում է բառային հրահանգից հետո և առանց նրա:

Կեղևի ուսումնասիրված զոնաներում բառային հրահանգը առաջացնում
է միջկենտրոնային կապերի ուժեղացում:

EXPANSIBLE RELATIONS OF CHILDREN'S BRAIN ELECTRIC
ACTIVITY DURING THE PERCEPTION OF FAMILIAR
SUBJECTS AFTER THE WORD INSTRUCTION

G. G. CHTIAN

The influence of word instructions on the nature of the electric
activity of children's brain during the perception of familiar subjects
has been investigated.

It has been shown that the word instruction results in the intensi-
fication of processes of expansible synchronization of the investigated
brain zone biopotentials.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лурия А. Р. Высшие корковые функции человека. М., 1962.
2. Анохин П. К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. М., 1968.
3. Анохин П. К. Принципиальные вопросы общей теории функциональных систем. М., 1971.
4. Хризман Т. П., Зайцева Л. М. Журн. высш. нервн. деят., 25, 1234, 1975.
5. Хризман Т. П., Зайцева Л. М. Журн. физиол. человека, 3, 22, 1977.
6. Зайцева Л. М., Еремеева В. Д. Функциональная организация деятельности моз-
га. 14. М., 1975.
7. Фарбер Л. А., Фрид Г. М. Журн. высш. нервн. деят., 21, 5, 1056, 1971.
8. Сологуб Е. Б. Электрическая активность мозга человека в процессе двигательной
деятельности. Л., 1973.
9. Хризман Т. П. Движения ребенка и электрическая активность мозга. М., 1973.
10. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики
для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследо-
ваниях. Л., 1969.
11. Батуев А. С., Васильева Л. А., Таирон О. П. Эволюция функций теменных долей
мозга. 167, Л., 1973.
12. Bental E., Bihari H. J. Neurophysiol., 26, 1963.
13. Bignall K. E. Exptl. Neurol., 17, 1967.
14. Фрид Г. М. Автореф. канд. дисс., М., 1972.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

С. Л. МКРТЧЯН, Г. Г. АРЦРУНИ

Исследовались процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях печени крыс после воздействия электростатического поля при различных экспозициях. Показано нарушение сопряжения при односторонней экспозиции и сравнительная адаптация к данному фактору при других, более длительных экспозициях.

Имеющиеся в литературе данные о влиянии электростатического поля (ЭСП) на биообъекты убеждают в его высокой биологической активности. Исследованиями ряда авторов было показано, что после воздействия ЭСП наблюдается снижение уровня адениловых нуклеотидов [1], увеличение снабжения тканей кислородом [2], повышение общего уровня газообмена [3]. Подобные изменения либо должны принести к изменению тканевого дыхания, либо явиться следствием его. Цель данной работы заключалась в выявлении изменений в терминальном окислении после воздействия ЭСП.

Материал и методики. Опыты проводились на белых беспородных крысах-самцах весом 200—250 г. Электростатическое поле напряженностью 2000 В/см создавалось при помощи установки конденсаторного типа, имеющей строго регулируемые электрические параметры [4, 5]. Исследовалось влияние трех экспозиций ЭСП: часовой, суточной, недельной (по 6 час. каждые сутки). Во избежание влияния циркадных ритмов все опыты проводились в одно и то же время суток.

Митохондрии печени крыс извлекались по известной методике [6], модифицированной Мосоловой с сотр. [7]. Животные забивались непосредственно после воздействия ЭСП, через 1, 4, 7 и 14 суток.

Поглощение кислорода в митохондриях определялось полярографически на полярографе I. Р-7 (ЧССР) по методике Эстабрука [8] с использованием модифицированной ячейки с мембранными электродами Кларка [9]. Среда инкубации содержала 0,25 М сахарозу, 0,1 М KCl, 0,1 М KH_2PO_4 , 0,5 М MgSO_4 , 200 мкМ АДФ. В качестве субстрата использовался сукцинат (10 мМ).

Измерялась скорость поглощения кислорода во всех трех метаболических состояниях: V_2 —дыхание «покоя», V_3 —активное дыхание, V_4 —дыхание «отдыха» (в нА О₂/мин/мг белка), Δt —время фосфорилирования (в сек); АДФ/О—отношение эстерифицированного фосфора к мкМ АДФ к утилизированному кислороду (и мкА); дыхательный контроль (ДК) по Чансу—отношение V_2/V_3 .

При односторонней и суточной экспозициях ЭСП исследовалось два цикла фосфорилирования (с двумя добавками АДФ).

Количество белка в ячейке, определяемое по Лоури, составляло 1,5—1,7 мг.

Результаты и обсуждение. При однократном воздействии ЭСП параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс изменялись следующим образом (табл. 1). Непосредственно после воздействия наблюдалось изменение лишь двух показателей — ΔI и АДФ/О. Первый из них увеличивался в обоих циклах фосфорилирования на 48 и 45% соответственно, а второй уменьшался на 32 и 22%. Сопоставляя эти данные с небольшой тенденцией к увеличению скоростей дыхания, можно прийти к выводу, что происходит некоторое снижение эффективности фосфорилирования и митохондрии переходят в рыхло-сопряженное состояние. В следующие сроки исследования никаких достоверных изменений не было отмечено.

Эксперимент с однократной экспозицией поля выявил несколько иные закономерности (табл. 2). Непосредственно после воздействия ЭСП скорость поглощения кислорода во всех трех метаболических состояниях резко угнеталась: V_2 — на 31, V_3 — на 50, V_4 — на 55%. В дальнейшем эти показатели несколько увеличивались, хотя и оставались на уровне ниже контрольного. На 7-е сутки скорости дыхания резко падали, а к 14-м возвращались к норме. ДК при данной экспозиции несколько увеличивался непосредственно после воздействия поля и нормализовался в последующие сроки эксперимента, за исключением 7-х суток. Продолжительность цикла фосфорилирования увеличивалась непосредственно после воздействия на 42% и на 7-е сутки — на 19%, оставаясь в остальные сроки близкой к норме. Изменение АДФ/О выражалось лишь в небольшом увеличении его в первые часы после воздействия. В табл. 3 представлены результаты, полученные при недельной экспозиции. Так, скорость переноса электронов вновь падала непосредственно после воздействия ЭСП (V_2 — на 23, V_3 — на 25, V_4 — на 13%), причем во втором цикле фосфорилирования эти показатели почти нормализовались. Через сутки происходило углубление этих нарушений в обоих циклах фосфорилирования. На 4-е сутки никаких достоверных изменений не отмечалось, в то время как позднее (7-е сутки) скорости дыхания вновь уменьшались.

Дыхательный контроль при недельной экспозиции поля почти не изменялся. M , как и при предыдущих экспозициях, увеличивалось непосредственно после воздействия ЭСП на 1-е и 7-е сутки и оставалось повышенным даже на 14-е. Причем эти отклонения также были довольно значительными. Эффективность фосфорилирования (АДФ/О) при этом почти не изменялась во все сроки эксперимента.

Суммируя изложенное, можно отметить определенную направленность и полнообразность изменений тканевого дыхания после воздействия ЭСП. Так, наибольшие отклонения от контрольного уровня наблюдаются в основном непосредственно после воздействия и через 1 сутки, затем они повторяются через 7 суток. Возможным объяснением этого может быть определенная адаптация животных к данному фактору. Аналогичная цикличность наблюдалась в экспериментах по выживаемости животных после сочетанного воздействия радиацией и ЭСП [10], а

Таблица 1

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 час

	Контроль	Сроки исследования				
		непосредственно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	11-е сутки
V_2	$51 \pm 2,2$	$54 \pm 2,7$ $t = 0,46$	$55 \pm 0,9$ $t = 1,66$	$51 \pm 1,7$ $t = 0$	$48 \pm 2,3$ $t = 0,94$	$52 \pm 1,7$ $t = 0,37$
	$63 \pm 3,6$	$63 \pm 2,9$ $t = 0$	$75 \pm 0,8$ $t = 3,21$	$69 \pm 2,6$ $t = 1,35$	$63 \pm 3,5$ $t = 0$	$63 \pm 4,4$ $t = 0$
V_3	$161 \pm 9,4$	$172 \pm 5,4$ $t = 1,02$	$193 \pm 11,3$ $t = 2,18$	$179 \pm 7,7$ $t = 1,47$	$165 \pm 8,8$ $t = 0,31$	162 ± 13 $t = 0,06$
	$176 \pm 9,4$	$170 \pm 1,1$ $t = 0,04$	207 ± 12 $t = 0,65$	$192 \pm 9,7$ $t = 1,51$	$171 \pm 10,9$ $t = 0,35$	$175 \pm 15,5$ $t = 0,05$
V_4	$63 \pm 3,6$	$74,4 \pm 4,4$ $t = 1,93$	$76 \pm 0,9$ $t = 3,51$	$68 \pm 1,9$ $t = 1,22$	$64 \pm 3,2$ $t = 0,22$	$65 \pm 4,4$ $t = 0,35$
	$68 \pm 4,3$	$66 \pm 3,3$ $t = 0,55$	$78 \pm 4,3$ $t = 1,64$	$67 \pm 3,2$ $t = 0,19$	$65 \pm 3,8$ $t = 0,17$	$68 \pm 4,2$ $t = 0$
ЛК	$2,57 \pm 0,22$	$2,38 \pm 0,12$ $t = 0,76$	$2,55 \pm 0,13$ $t = 0,08$	$2,67 \pm 0,22$ $t = 0,1$	$2,57 \pm 0,11$ $t = 0$	$2,51 \pm 0,09$ $t = 0,25$
	$2,7 \pm 0,21$	$2,56 \pm 0,15$ $t = 0,55$	$2,69 \pm 0,15$ $t = 0,001$	$2,76 \pm 0,12$ $t = 0,25$	$2,7 \pm 0,15$ $t = 0$	$2,55 \pm 0,16$ $t = 0,57$
Δt	$68,4 \pm 4,56$	$101,1 \pm 8,93$ $t = 3,2$	$66,6 \pm 6,19$ $t = 0,23$	$73,7 \pm 3,57$ $t = 0,91$	$76,1 \pm 9,05$ $t = 0,76$	$76,8 \pm 6,53$ $t = 1,05$
	$68,5 \pm 4,95$	$99,3 \pm 8,97$ $t = 3,0$	$63,7 \pm 6,90$ $t = 0,57$	$76,9 \pm 11,88$ $t = 0,64$	$81,2 \pm 5,31$ $t = 1,74$	$74,3 \pm 5,24$ $t = 0,8$
АДФ/О	$1,42 \pm 0,043$	$0,97 \pm 0,043$ $t = 7,4$	$1,28 \pm 0,11$ $t = 1,16$	$1,22 \pm 0,051$ $t = 2,9$	$1,31 \pm 0,04$ $t = 1,92$	$1,29 \pm 0,036$ $t = 2,32$
	$1,27 \pm 0,08$	$0,99 \pm 0,02$ $t = 3,5$	$1,25 \pm 0,11$ $t = 0,15$	$1,09 \pm 0,11$ $t = 1,12$	$1,15 \pm 0,04$ $t = 1,35$	$1,2 \pm 0,044$ $t = 0,78$

V_2 , V_3 , V_4 —скорости потребления кислорода, нЛ/мин/мг белка ЛК— V_4/V_2 Δt —время фосфорилирования, сек. Количество животных в каждой серии экспериментов составляло 7—12.

В таблице представлены данные по двум индексам фосфорилирования.

Таблица 2

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 сутки

	Контроль	Сроки исследования				
		непосредственно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
V_1	$26 \pm 2,2$	$18 \pm 1,6$ $t = 2,86$	$21 \pm 5,4$ $t = 0,86$	$22 \pm 2,1$ $t = 1,33$	$17 \pm 1,6$ $t = 6,0$	$22 \pm 1,1$ $t = 1,6$
V_3	125 ± 11	$61 \pm 7,5$ $t = 8,16$	$92 \pm 7,9$ $t = 2,29$	$95 \pm 6,6$ $t = 4,18$	$72 \pm 8,2$ $t = 3,64$	$97 \pm 4,7$ $t = 2,16$
V_4	$56 \pm 6,3$	$25 \pm 1,8$ $t = 6,69$	$38 \pm 5,7$ $t = 2,14$	$38 \pm 2,6$ $t = 2,61$	$36 \pm 6,6$ $t = 2,22$	$46 \pm 3,8$ $t = 1,34$
ДК	$2,19 \pm 0,095$	$2,65 \pm 0,19$ $t = 2,09$	$2,58 \pm 0,12$ $t = 2,41$	$2,79 \pm 0,17$ $t = 3,07$	$2,64 \pm 0,52$ $t = 0,87$	$2,20 \pm 0,14$ $t = 0,58$
ΔI	$134,4 \pm 7,2$	$190,2 \pm 22,8$ $t = 2,31$	$145,2 \pm 13,2$ $t = 2,27$	$124,8 \pm 10,8$ $t = 0,77$	$159,6 \pm 7,8$ $t = 13,2$	$125,4 \pm 7,2$ $t = 0,87$
АДФ/О	$1,53 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,25$ $t = 4,9$	$1,55 \pm 0,05$ $t = 0,33$	$1,61 \pm 0,041$ $t = 1,73$	$1,60 \pm 0,18$ $t = 0,12$	$1,49 \pm 0,089$ $t = 0,35$

В таблице представлены данные по одному циклу фосфорилирования.

Таблица 3

Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в различные сроки после воздействия электростатического поля продолжительностью 1 неделя

	Контроль	Сроки исследования				
		немедленно после воздействия	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
V_2	$47 \pm 2,2$	$36 \pm 1,5$ $t = 4,07$	$31 \pm 1,9$ $t = 5,52$	$16 \pm 3,5$ $t = 0,24$	$37,8 \pm 4,2$ $t = 2,42$	$42 \pm 2,0$ $t = 1,72$
	$62 \pm 3,2$	$54 \pm 3,2$ $t = 1,77$	$41 \pm 2,7$ $t = 1,46$	$66 \pm 5,5$ $t = 0,62$	$54 \pm 4,6$ $t = 2,0$	$56 \pm 2,2$ $t = 1,58$
V_3	$150 \pm 7,9$	$113 \pm 7,4$ $t = 3,42$	$119 \pm 6,0$ $t = 3,13$	$116 \pm 13,9$ $t = 0,23$	$121 \pm 14,1$ $t = 2,07$	$126 \pm 3,7$ $t = 2,76$
	$159 \pm 9,4$	$116 \pm 8,3$ $t = 3,44$	$119 \pm 6,0$ $t = 3,13$	$156 \pm 17,9$ $t = 0,15$	$127 \pm 15,9$ $t = 2,2$	$134 \pm 4,6$ $t = 2,43$
V_4	$62 \pm 3,2$	$54 \pm 3,2$ $t = 1,77$	$41 \pm 2,7$ $t = 4,46$	$66 \pm 5,5$ $t = 0,62$	$54 \pm 4,6$ $t = 2,0$	$56 \pm 2,2$ $t = 1,58$
	$61 \pm 2,2$	$56 \pm 3,8$ $t = 1,16$	$45 \pm 3,2$ $t = 4,2$	$65 \pm 3,6$ $t = 1,0$	$50 \pm 2,1$ $t = 3,79$	$55 \pm 1,2$ $t = 2,6$
ДК	$2,36 \pm 0,13$	$2,04 \pm 0,06$ $t = 2,18$	$2,65 \pm 0,18$ $t = 1,31$	$2,21 \pm 0,15$ $t = 0,75$	$2,22 \pm 0,11$ $t = 0,81$	$2,24 \pm 0,086$ $t = 0,75$
	$2,6 \pm 0,14$	$2,02 \pm 0,12$ $t = 2,97$	$2,67 \pm 0,19$ $t = 0,3$	$2,32 \pm 0,18$ $t = 1,2$	$3,23 \pm 0,106$ $t = 2,05$	$2,41 \pm 0,08$ $t = 1,15$
Δt	$80,9 \pm 3,6$	$103 \pm 10,73$ $t = 1,98$	$100,9 \pm 5,34$ $t = 3,1$	$92,6 \pm 12,67$ $t = 0,8$	$116,96 \pm 8,45$ $t = 4,0$	$102,1 \pm 5,23$ $t = 3,33$
	$80,1 \pm 3,3$	$108,3 \pm 12,57$ $t = 2,16$	$102,4 \pm 6,41$ $t = 3,09$	$94,5 \pm 12,24$ $t = 1,13$	$122,2 \pm 10,67$ $t = 3,75$	$99,6 \pm 4,79$ $t = 3,75$
АДФ/О	$1,33 \pm 0,042$	$1,48 \pm 0,15$ $t = 1,0$	$1,35 \pm 0,045$ $t = 0,33$	$1,32 \pm 0,08$ $t = 0,11$	$1,17 \pm 0,067$ $t = 2,05$	$1,24 \pm 0,054$ $t = 1,43$
	$1,23 \pm 0,027$	$1,39 \pm 0,04$ $t = 3,07$	$1,27 \pm 0,075$ $t = 0,5$	$1,19 \pm 0,05$ $t = 0,73$	$1,16 \pm 0,044$ $t = 1,37$	$1,19 \pm 0,05$ $t = 0,7$

В таблице представлены данные по двум циклам фосфорилирования.

также при исследовании уровня газообмена после воздействия ЭСП [3]. Основываясь на предыдущих работах, показавших увеличение снабжения тканей кислородом после воздействия ЭСП [2], можно предположить, что это является одним из факторов, вызывающих описываемые изменения в цепи переноса электронов и сопряженном с ним синтезе АТФ. Так, снижение скоростей дыхания во всех трех состояниях при суточной и недельной экспозициях и одновременное увеличение времени фосфорилирования, возможно, являются следствием токсического действия повышенных концентраций кислорода. Эти данные согласуются с работой Елисейевой и др. [11], в которой показано аналогичное снижение скоростей дыхания и увеличение Δt при увеличении концентрации кислорода в опытах *in vitro*. В пользу этого предположения говорят также данные об угнетении фосфорилирования при окислении α -кетоглутарата [12], уменьшение восстановления НАД путем обратного транспорта электронов [13], снижение содержания АТФ в тканях животных, находящихся в атмосфере повышенного давления кислорода [14]. Однако, как было показано этими работами и подтверждено нашими исследованиями, при гипероксии наблюдается быстрая нормализация параметров окисления и фосфорилирования. Об этом свидетельствуют также более близкие к контрольным цифрам данные второго цикла фосфорилирования, проводящегося в той же пробе. Косвенным доказательством участия кислорода в процессе повреждения могут служить также полностью противоположные нашим данным результаты исследований тканевого дыхания при гипоксии [15, 16].

Сравнительно небольшие изменения интенсивности окисления при одночасовой экспозиции, вероятно, можно объяснить меньшим временем воздействия ЭСП. Однако снижение коэффициента АДФ/О, увеличение Δt и тенденция к интенсификации дыхания при этом говорят о выраженном нарушении эффективности фосфорилирования, т. е. о разобщении дыхания и накопления энергии. Тот факт, что этого не происходит при других, более длительных экспозициях нам кажется закономерным, так как при этом, возможно, включаются определенные механизмы адаптации, не успевающие сработать при кратковременном воздействии ЭСП.

Конечно, «кислородная» гипотеза действия ЭСП не исключает и другие механизмы влияния последнего на тканевое дыхание. Так, нарушение сопряжения дыхания и фосфорилирования при этом может происходить путем снижения мембранного потенциала митохондрий [17]. Изменение скорости транспорта электронов, возможно, происходит благодаря определенным сдвигам в структуре и функции компонентов дыхательной цепи, обеспечивающих этот перенос. Не исключены изменения в гем-белковой связи цитохромов дыхательных ансамблей аналогично изменению гем-глобиновой связи под действием ЭСП [10].

На данном этапе исследований трудно представить себе конкретные механизмы воздействия ЭСП на тканевое дыхание. Возможно, все они срабатывают одновременно или включается лишь один или некото-

рые из них. Несомненно, однако, что воздействие ЭСП при указанных режимах приводит к определенному угнетению дыхания, а в некоторых случаях и к подавлению окислительного фосфорилирования.

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра биохимии, лаборатория биофизики и
молекулярной биологии ЦИИЛ

Поступило 3 IV 1978 г.

ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԿԱՇԵՏԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԻԻ ՄԻՓՈՔՈՆՕՐԻԱՆԵՐԻ ՇՆՁԱՌՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս. Լ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Գ. Գ. ԱՐՏՐՈՒՆԻ

Հետազոտվել է տարբեր էքսպոզիցիաների պայմաններում էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը առնետների լյարդի միթոքոնդրիաներում օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման պրոցեսների վրա:

Ցույց է տրված, որ մեկժամյա էքսպոզիցիայի դեպքում խախտվում է այդ պրոցեսների զուգակցումը: Էքսպոզիցիայի աեղողությունը երկարացնելու դեպքում, շնորհիվ ադապտացիայի, այդ պրոցեսների զուգակցումը համեմատաբար կարգավորվում է:

THE EFFECT OF ELECTROSTATIC FIELD ON THE RESPIRATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIONS

S. L. MKRTCHIAN, G. G. ARTSRUNY

The oxidation and phosphorylation processes have been investigated after the influence of electrostatic field at different expositions.

The obtained results show the coherence desintegration at an hour long exposition and the comparative adaptation to the given factor at more prolonged expositions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Нортнол Ф. Г., Непомнящий Л. Н., Перусалимский П. Н. Гигиена труда и биологическое действие электромагнитных полей радиочастот 102, М., 1972.
2. Mase V. R., Fisher G. Arch. Hyg., 154, 6, 549, 1971.
3. Schretznicke A. Zentr. gen. Hyg., 16, 7, 519, 1970.
4. Арцруни Г. Г. Мат-ли конф. мол. уч., посвящ. XXV съезду КПСС, Ереван, 1975.
5. Арцруни Г. Г., Романов І. В., Кутурзов А. Л., Пирюзян Л. А. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 135, 1973.
6. Hageboom G. H., Schneider W., Pullade G. E. J. Biol. Chem., 172, 619, 1948.
7. Мосолова Н. М., Горская Н. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии. 45, М., 1975.
8. Estabrook R. W. Meth. In Enzym., 10, 41, 1967.
9. Шольц К. Ф., Островский Д. Н. Методы современной биохимии. 52, М., 1975.
10. Арцруни Г. Г. Канд. дисс., М., 1973.
11. Елисеева С. В., Котова Е. Н., Кондришова М. Н. Сб.: Митохондрии, структура и функции в норме и патологии. 122, М., 1971.

12. Barron E. S. O. Arch. Biochem., 59, 502, 1955.
13. Chance B., Coles G. A. Nature. 206, 257, 1965.
14. Sanders A. R., Holt U. H., Cavanaugh P. V., Woodhall B. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 121, 32, 1966
15. Толейкис А. И., Прайквичус А. К. Сб.: Митохондрии. Структура и функции в норме и патологии. 99, М., 1971.
16. Хватова Е. М., Шумитова Е. Н., Виринева Н. С. Сб.: Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов 32. М., 1977.
17. Скуличев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГАНГЛИОЗИДОВ НА СТРУКТУРНУЮ ЛАБИЛЬНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Э. Е. МХЕЯН, Э. С. СЕКОЯН, С. А. БАДЖИНЯН,
 О. П. СОЦКН, С. Э. АКОПОВ

Установлено, что ганглиозиды повышают интенсивность флуоресценции 1-антлин-
 нафталин-8-сульфоната (АНС⁻), связанного с сывороточным альбумином человека,
 между тем как квантовый выход флуоресценции триптофанилов белка они уменьшают.
 Указанные эффекты возрастают с увеличением концентрации ганглиозидов и удлинени-
 ем времени их контакта с сывороточным альбумином человека. Путем конформаци-
 онных изменений ганглиозиды вызывают сокращение расстояния между тирозином и
 триптофаном, а также между триптофаном и поверхностно расположенными зондами,
 что свидетельствует о приближении триптофана к поверхности белковой глобулы.
 Кроме того, они способствуют росту квантового выхода флуоресценции АНС⁻, свя-
 занного с липосомами.

Изучение мембранных механизмов, обеспечивающих проявление био-
 логической активности ганглиозидов, в том числе обнаруженного впер-
 вые нами их вазоконстрикторного действия [1], позволило установить,
 что нейрональные ганглиозиды обнаруживают способность вызывать
 конформационные изменения микросомальных мембран. Одновременно
 нами была выявлена возможность внедрения гидрофобной части молеку-
 лы ганглиозидов вглубь мембраны при их длительном контакте с мик-
 росомами мозга и печени и выдвинуто предположение о роли медленных
 конформационных изменений в белках [2].

В настоящем исследовании ставилась задача дальнейшего изучения
 механизмов действия ганглиозидов на мембранные структуры путем
 флуоресцентного анализа, влияния их на сывороточный альбумин чело-
 века (САЧ) и липосомы из яичного лецитина. Целесообразность про-
 ведения подобных исследований обусловлена тем, что, как свидетель-
 ствуют данные литературы, САЧ и липосомы могут служить моделями
 белковой и липидной фаз биологических мембран [3].

Материал и методика. Использовали сывороточный альбумин человека фирмы
 «Reanal» и липосомы, полученные из яичного лецитина по методу Паладиано-Алоса и
 Миллера [4]. Опыты проведены с помощью отрицательно заряженного зонда 1-ант-
 линнафталин-8-сульфоната (АНС⁻) и регистрации собственной флуоресценции трип-
 тофанилов белка. Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуорометре MPF-2A
 фирмы «Hitachi» (Япония), с автоматической коррекцией на чувствительность; спек-
 тры поглощения—на спектрофотометре USP-2. В тех случаях, когда оптическая

плотность превышала 0,1, учитывался эффект внутреннего фильтра [5]. Квантовый выход флуоресценции измерялся относительным методом [6]. Эффективность переноса энергии в случае миграции с тирозина на триптофан рассчитывалась по формуле

$$\gamma = \frac{q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}} - q_0^{\text{ТФ}} q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}}}{q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}} - q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}}} \quad [7], \text{ в остальных случаях — по формуле } \gamma = \frac{q_{\text{ТФ}} - q_0}{q_0} \quad [8] \text{ Ганглиозиды выделяли из серого вещества головного мозга людей, погибших от несчастных случаев, по методу Богоча в нашей модификации [9]:}$$

гликозиды выделяли из серого вещества головного мозга людей, погибших от несчастных случаев, по методу Богоча в нашей модификации [9]:

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные о влиянии ганглиозидов на флуоресценцию АНС-, связанного с САЧ, в условиях различной продолжительности контакта ганглиозидов с белком (рис. 1).

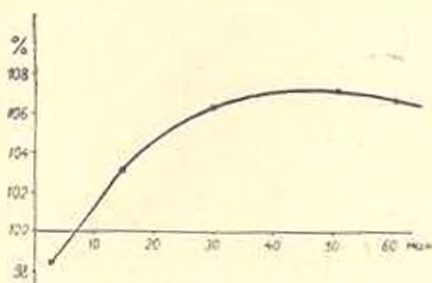


Рис. 1.

Рис. 1 Влияние ганглиозидов ($2 \cdot 10^{-4}$ ммоль) на интенсивность флуоресценции АНС-, связанного с САЧ, в зависимости от времени инкубации их с белком.

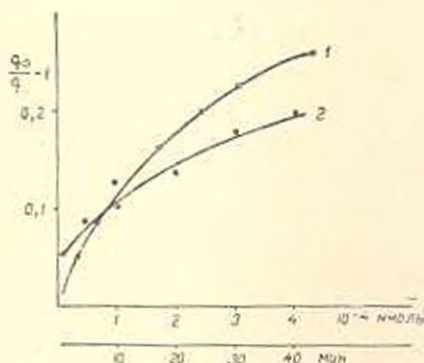


Рис. 2.

Рис. 2 Тушение ганглиозидами флуоресценции триптофанов САЧ в зависимости от концентрации (1) и времени их контакта с белком (2).

Как следует из графика, ганглиозиды в начальный момент контакта с белком вызывают некоторое тушение флуоресценции зонда, затем этот эффект сменяется усилением флуоресценции, которая достигает максимума к 30-й мин инкубации ганглиозидов с белком. Через 24 час. после преникубации отмечается еще больший рост интенсивности флуоресценции зонда. Потенцирующий эффект после 30-й мин инкубации белка с ганглиозидами растет с увеличением концентрации последних в среде. При этом имеет место взаимодействие двух противоположных эффектов: увеличение константы связи и уменьшение количества центров связывания. Равнодействующая этих двух сил регистрируется нами в виде увеличения интенсивности флуоресценции зонда, чем и можно объяснить ее относительно малый рост. По-видимому, в начальный момент контакта ганглиозидов с белком превалирует эффект изменения заряда белка, затем, в результате медленных конформационных изменений, происходит изменение константы связи с ростом квантового выхода флуоресценции белка и тушащий эффект сменяется противополо-

ложным. Измерение квантового выхода белка относительно триптофана подтверждает подобное предположение, при этом указанный показатель при концентрации ганглиозида 10^{-4} ммоль возрастает на 8, $2 \cdot 10^{-1}$ — на 10 и $4 \cdot 10^{-4}$ ммоль — на 13%.

Нами изучалось также влияние ганглиозидов на флуоресценцию триптофанилов белка. Как следует из рис. 2 (кр. 1), под воздействием ганглиозидов происходит выраженное падение квантового выхода флуоресценции триптофанилов, причем тушащий эффект возрастает с ростом их концентрации в среде (рис. 2). Обращает на себя внимание, что указанная зависимость, выраженная в Штерн-Фольмеровских координатах, представлена не прямой, а изогнутой линией, что свидетельствует либо о наличии двух или более видов центров связывания, либо о кооперативности связывания ганглиозидов с белком. Тушащий эффект ганглиозидов усиливается по мере увеличения времени их контакта с белком (рис. 2, кр. 2), что подтверждает предположение о медленных конформационных изменениях в САЧ.

В последующих опытах изучалось изменение эффективности миграции энергии с тирозина на триптофан белка, а также с триптофана белка на зонды АНС- и акридиновый оранжевый (AO^+). Согласно данным таблицы, ганглиозиды ($2 \cdot 10^{-4}$ ммоль) вызывают понижение эффективности миграции энергии с тирозина на триптофан, одновременно наблюдается аналогичный эффект в отношении переноса энергии с триптофана на АНС- и AO^+ (табл.). Эти данные указывают на уменьше-

Таблица

Изменение эффективности миграции энергии под воздействием ганглиозидов (п. 6)

Донор	Акцептор	Контроль	Ганглиозиды, $2 \cdot 10^{-4}$ ммоль	Ганглиозиды, $4 \cdot 10^{-4}$ ммоль
Триптофан	АНС-	$0,31 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,03$
Триптофан	AO^+	$0,18 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$
Тирозин	триптофан	$0,21 \pm 0,018$	$0,26 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$

ние расстояния между указанными элементами. Поскольку использованные нами заряженные зонды в отличие от нейтральных не проникают в гидрофобные карманы белковой глобулы, а находятся близко к поверхности [10], полученные результаты можно интерпретировать как выход единственного триптофанила белка на поверхность белковой глобулы. Об этом свидетельствует и длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции, говорящий о повышении полярности окружения триптофанила [11], что связано, по-видимому, с увеличением доступа полярного растворителя — воды — к триптофанилу белка.

Интересные данные получены в экспериментах с изучением влияния ганглиозидов на флуоресценцию АНС-, связанного с липосомами из яичного лецитина. Как следует из рис. 3, под воздействием ганглиозидов происходит значительное увеличение квантового выхода флуоресценции

зонда (рис. 3). Для изучения характера связывания АНС- с липосомами были построены графики Скэтчарда [12]. Концентрацию связанного и свободного зонда рассчитывали по Добренову [13]. Как следует из рис. 4, график Скэтчарда представляет собой прямую линию, что свидетельствует о наличии всего одного вида центров связывания зонда с липосомами. Константа связи АНС- с липосомами составляла $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, что приблизительно равно константе связи для ТНС- [14]. Концентрация центров связывания составляла 10^{-3} моль. Под воздействием ганглиозидов концентрация центров связывания практически не изменялась, а константа связи возрастала до $7 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$.

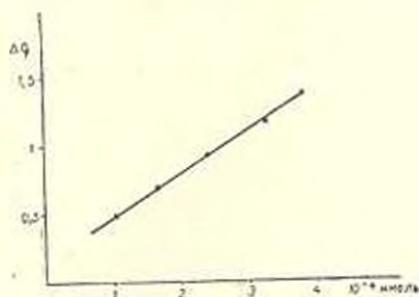


Рис. 3

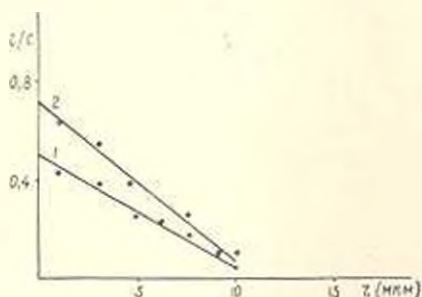


Рис. 4.

Рис. 3. Рост квантового выхода флуоресценции связанного с липосомами АНС- под действием различных концентраций ганглиозидов.

Рис. 4. Связывание АНС- с липосомами в отсутствие ганглиозидов (1) и при концентрации их $2 \cdot 10^{-4}$ моль (2) (график Скэтчарда).

Следовательно, ганглиозиды вызывают значительные конформационные изменения в липосомах. Препарация их в течение 1 час. не вызвала существенных сдвигов в характере влияния ганглиозидов на липосомы. После 24-часовой препарации при $3-4^\circ$ наблюдалось снижение активирующего действия ганглиозидов на флуоресценцию связанного с липосомами АНС- на $48,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$).

Сопоставляя приведенные здесь данные с результатами, полученными нами ранее, можно заметить однозначность и сходство эффектов ганглиозидов на биологические мембраны, САС и липосомы. Во всех случаях наблюдается рост квантового выхода флуоресценции АНС- с увеличением константы связывания зонда. Наиболее выраженно этот эффект проявляется на биологических мембранах и липосомах, в меньшей степени на белке. Следовательно, ганглиозиды, по-видимому, имеют сродство и к белковым и к липидным компонентам мембран. Это в свою очередь дает основание считать, что они могут действовать на участках белково-липидных контактов, тем более что с этими участками мембран, по имеющимся литературным данным, связывается и АНС- [15].

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра общей и клинической химии, кафедра фармакологии

Поступило 10 V 1978 г.

**ԳԱՆԳԼԻՈՋԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՌԻՈՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ԿՈՄՊՈՆԵՆՏՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՅՎԱՆՔԱՅԻՆ ԼԱՐՎՈՒԹՅԱՆ
ՎՐԱ՝ ՖԼՈՒՐԵՍԵՆՏ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԵԶՈՑՈՎ**

Է. Խ. ՄԻՈՏՅԱՆ, Է. Ս. ՍԵԿՈՅԱՆ, Ս. Ա. ԲԱԶԻՆՅԱՆ, Օ. Պ. ՍՈՑԿԻ, Ս. Է. ՇԱԿՈՊՈՎ

Բացահայտված է, որ գանգլիոզիդները մեծացնում են մարդկանց շիճուկային ալբումինի հետ կապված 1—անիլինանաֆթալին—8—սուլֆանատի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը, մինչդեռ գանգլիոզիդների ազդեցության ներքո սպիտակուցի ախտոֆանիլների ֆլուորեսցենցիայի բվանտային էլրը նվազում է: Էներգիայի միզրացիայի ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ գանգլիոզիդները կոնֆորմացիոն փոփոխությունների միջոցով կրճատում են թիոզինի և տրիպտոֆանի միջև էղամ տարածությունը, որը կարելի է դիտել որպես տրիպտոֆանի մոտեցում դեպի սպիտակուցային զոլորուլայի մակերևուր:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ գանգլիոզիդները նպաստում են լիպոսոմների հետ կապված գոնդի ֆլուորեսցենցիայի բվանտային էլրի մեծացմանը:

**THE INELUENCE OF GANGLIOSIDES ON THE STRUCTURAL
INSTABILITY OF BIOMEMBRANE COMPONENTS BY THE METHOD
OF FLUORESCENT ANALYSIS**

E. E. MKHETIAN, E. S. SEKON, S. A. BAZGIAN,
O. P. SOTSKII, S. E. AKOPOV

The Influence of gangliosides on the conformation of albumen and liposom has been studied. It has been indicated that gangliosides change the conformation of albumen molecules, whereas triptofan proteins transpass to the surface of the globule.

It has also been determined that gangliosides cause conformatting compensation in liposoms of the egg lecithine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мирзоян С. А., Мхетян Э. Е., Секон Э. С., Соцкий О. П. ДАН СССР, 201, 2, 507, 1971.
2. Мирзоян С. А., Мхетян Э. Е., Секон Э. С., Соцкий О. П., Акопов С. Э. Журн. эксперим. и клинич. мед., в печати.
3. Данилов В. С., Шенченко А. С., Ребров В. П., Орлов С. Н. Биофизика, 20, 822, 1975.
4. Parahadjopoulos D., Miller N. Biochim. Biophys. Acta, 135, 624, 1967.
5. Паркер С. Фотолюминесценция растворов, М., 1972, 210.
6. Parker C. A., Rees W. T. Analyst, 85, 857, 1960.
7. Kronman M. J., Holmes L. G. Photochem. Photobiol., 14, 113, 1971.
8. Азфинова Е. Я., Лухтштейн Г. И. Мол. биол., Итоги науки и техники, 8, 1975.
9. Мхетян Э. Е., Шахбатьян Ш. Л. Вопросы биохимии мозга, 10, 187, 1975.
10. Добрецов Г. Е., Биофизика, Итоги науки и техники, 4, 1975.
11. Бурштейн Э. А. Докт. дисс., Пушкино, 1973.
12. Scatchard G. Ann. N. Y., Acad. Sci., 51, 660, 1949.
13. Добрецов Г. Е. Мол. биол. Итоги науки и техники, 6, 1975.
14. Huang Ching-hsien, Chertton J. Biochemistry, 11, 735, 1972.
15. Rodd G. K., Vanderkool J. Biochim. Biophys. Acta, 265, 509, 1972.

К ПРИРОДЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Г. Т. КАЗАРЯН, Г. А. ПАНОСЯН, Г. И. ХАЧАТРЯН

Мембранный потенциал клеток высших растений уменьшается при действии оуа-ла, высоких концентраций красителя, гиббереллина и низкой температуры ($2-3^{\circ}$) повышается при действии низких концентраций красителя и гиббереллина. Высказывается предположение, что уменьшение мембранного потенциала обусловлено ингибированием насоса, имеющего электрогенную природу.

Ряд авторов показали [1—3], что мембранный потенциал (МП) клеток высших растений чувствителен ко многим факторам внешней среды. Предполагается, что влияние большинства факторов обусловлено неспецифическим характером взаимодействия с плазматическими мембранами. В то же время эксперименты с метаболитическими ингибиторами [4, 5] показывают, что величина МП зависит от интенсивности работы электрогенного насоса, локализованного на плазматической мембране клеток корешков овса, кукурузы и ячменя.

Целью настоящих исследований было изучение возможных изменений мембранного потенциала клеток coleoptилей пшеницы и корешков кукурузы при действии ингибиторов и стимуляторов.

Материал и методика. Метод получения 3-дневных coleoptилей и корешков пшеницы и кукурузы описан ранее [6]. В ряде экспериментов семена замачивали в различных (10^{-2} и 10^{-5} %-ных) растворах зеленого светлого (ЗС), грубого теста (ГТ), гиббереллина (10^{-3} и 10^{-6} М), приготовленных на 1 М растворе KCl. В таком растворе KCl регистрировали контрольные значения МП.

Исследовали вход и выход меченого иона Na^{22} . Coleoptили инкубировали в морозе с удельной активностью 0,05 мкюри/мл. Так как концентрация натрия и ионных тканей варьирует в пределах 10 мМ, в экспериментах использовали два ионных раствора NaCl 1 и 100 мМ, с целью получения, в одном случае, потока, направленного по градиенту концентрации, а в другом—против градиента. Стабильное распределение метки устанавливали в интервалах времени 3—240 мин. Изучения выхода Na^{22} coleoptили помещали в 100 мМ радиоактивный раствор и переносили в холодильник (4°) для подавления активного транспорта. Выход изучали в 1 и 100 мМ растворах KCl в интервалах времени 5—90 мин. Подсчет соединений проб производили на счетчике «Interlechnique» в лаборатории радиальной биофизики Ереванского физического института.

Для исследования влияния низкой ($2-3^{\circ}$) температуры на изменение МП клеток корешков кукурузы была изготовлена камера из оргстекла, куда помещали камеру перфузионной системы. Температуру контролировали электротермометром ГПЭМ-1, датчик которого помещали непосредственно в перфузионную камеру.

Метод регистрации мембранного потенциала описан ранее [5].

Результаты и обсуждение. Влияние оуабайна на МП растительных клеток. В ряде работ показано [7, 8], что оуабайн является классическим ингибитором активного транспорта катионов в клетках животных. При этом подавляется активность $(Na^+ + K^+)$ —стимулируемой АТФазы и уменьшается величина отводимого МП.

Относительно влияния оуабайна на растительные ткани имеются противоречивые данные. Так, по данным Лея [9], АТФаза клеток колеоптилей овса является оуабайн-нечувствительной. В других работах [10, 11] показано наличие в клетках колеоптилей ячменя $(Na^+ + K^+)$ —стимулируемой АТФазы, активность которой уменьшается при действии оуабайна.

В наших экспериментах было показано, что при действии 10^{-5} М раствора оуабайна, приготовленного на 1 мМ растворе KCl, МП уменьшается на 20—22 мв в течение 3—5 мин. При замене раствора оуабайна на 1 мМ KCl МП восстанавливается до исходного уровня за 6—9 мин.

По данным Скоу [7], при высоких внешних концентрациях калия, а также в бескальцевых (натриевых) растворах оуабайн не влияет на МП мышечных клеток краба. С этой точки зрения было интересно исследовать влияние оуабайна на потенциал-концентрационную зависимость МП клеток колеоптилей пшеницы в чистых растворах KCl и NaCl.

Использовали концентрации калия и натрия от 10 до 0,01 мМ. В первом варианте опыта в указанных растворах присутствовал оуабайн в концентрации 10^{-5} М, вторым вариантом, без оуабайна, являлся контрольным.

В табл. 1 приведены данные о влиянии оуабайна на потенциал-концентрационную зависимость МП.

Таблица 1

Влияние оуабайна (10^{-5} М) на потенциал-концентрационную зависимость МП клеток колеоптилей пшеницы в чистых растворах KCl и NaCl

Концентрация внешнего катиона, мМ	10	1	0,1	0,01
Опыт 1				
Величина МП по K ⁺				
Без оуабайна	44,8 ± 1,00	69,2 ± 1,00	94,8 ± 1,00	126,4 ± 1,18
С оуабайном	18,4 ± 1,00	37,3 ± 1,58	61,3 ± 1,47	91,2 ± 2,04
E по K ⁺	26,4	31,9	30,5	35,2
Опыт 2				
Величина МП по Na ⁺				
Без оуабайна	42,5 ± 1,00	75,3 ± 1,00	105,2 ± 1,00	132,6 ± 1,00
С оуабайном	30,0 ± 1,00	58,6 ± 1,00	81,5 ± 1,00	109,2 ± 1,64
E по Na ⁺	12,5	16,7	20,7	23,4

Общее число измерений в каждом варианте равно 160.

По данным табл. 1, оуабайн эффективен и в натриевых растворах. Однако в калиевых растворах ΔE в среднем в 1,7 раза больше, чем в

натриевых. Можно предположить, что АТФаза растительных клеток функционирует не только по типу ($K^+ - Na^+$) обмена, но и по типу ($Na^+ - Na^+$) обмена.

На животных клетках давно установлен факт влияния оуабалина на МП в какой-то определенной концентрации. С повышением концентрации ингибитора не наблюдается достоверных изменений величины мембранного потенциала—он выходит на стационарный уровень.

Так как подобных исследований на растительных клетках нам не известно, представляло определенный интерес выяснение влияния различных концентраций оуабалина от 10^{-6} до 10^{-3} М на МП клеток колеоптилей пшеницы. С повышением концентрации оуабалина наблюдается монотонное уменьшение МП. Это позволяет сделать предположение, что в данном случае наблюдается неспецифический характер взаимодействия оуабалина с плазматическими мембранами.

Рядом авторов показано [6, 12—14], что в присутствии дицикло-гексилкарбодимиды (ДССД)—специфического ингибитора протонного насоса митохондрий, бактерий и растений,—наблюдается снижение мембранного потенциала. Показано также, что 10^{-4} %-ный раствор ЗС вызывает гиперполяризацию МП. Если же в перфузат, где находится ингибитор, добавить 10^{-4} %-ный раствор ЗС, то действие ДССД на уменьшение МП не проявляется. Исходя из этого, было интересно выяснить, как взаимодействует оуабалин с красителем. Исследовали влияние двух концентраций (10^{-2} и 10^{-4} %-ный) красителя групп тест и 10^{-3} М оуабалина на МП клеток колеоптилей пшеницы (табл. 2).

Таблица 2
Влияние 10^{-2} и 10^{-4} %-ных растворов ГТ и 10^{-3} М раствора оуабалина на МП клеток колеоптилей пшеницы

Варианты опыта	Величина МП, мВ
Контроль	$72,9 \pm 1,15$
Контроль + оуабалин	$51,6 \pm 1,20$
Контроль + 10^{-2} % ГТ	$61,2 \pm 1,12$
Контроль + 10^{-2} % ГТ + + оуабалин	$65,2 \pm 1,00$
Контроль	$77,2 \pm 1,08$
Контроль + 10^{-4} % ГТ	$91,2 \pm 1,11$
Контроль + оуабалин	$56,2 \pm 1,06$
Контроль + 10^{-4} % ГТ + + оуабалин	$62,4 \pm 1,00$

Число измерений в каждом варианте равно 30.

Данные табл. 2 показывают, что деполяризация МП, вызванная 10^{-3} М раствором оуабалина, меньше, чем деполяризация, вызванная 10^{-2} %-ным раствором ГТ. Если к раствору, содержащему 10^{-2} %-ный краситель добавить оуабалин, то МП увеличится на 4 мВ в вари-

анте «контроль+ 10^{-2} % ГТ+оуабанин» и на 14 мв по сравнению с вариантом «контроль+оуабанин».

Иная картина наблюдается при использовании красителя в 10 %-ной концентрации. Если МП в 10^{-4} %-ном растворе ГТ равен 91 мв, то при добавлении оуабанина регистрируется потенциал на 29 мв меньше. Это говорит о том, что оуабанин снимает эффект красителя.

Влияние оуабанина на потоки меченого натрия в клетках колеоптилей пшеницы. Обнаружение оуабанин-чувствительной АТФазы в колеоптилях ячменя [10, 11] позволило сделать предположение о влиянии оуабанина на потоки натрия.

Исследовали время стационарного распределения метки в 3-дневных колеоптилях пшеницы, которые инкубировали в 1 и 100 мМ растворах NaCl. В табл. 3 приведены данные по измерению стационарного распределения Na^{22} в колеоптилях пшеницы.

Таблица 3
Установление времени стационарного распределения метки
в колеоптилях пшеницы

Время инкуба- ции, мин	Радиоактивность, проб, им/мин	
	100 мМ Na ⁺	1 мМ Na ⁺
3	746,4±66,4	464,0±42,8
5	847,2±79,6	719,2±39,2
10	1358,4±237,6	859,0±102,0
15	2189,2±377,6	1010,0±97,2
20	4536,4±1276,0	1590,0±321,6
30	3717,2±572,4	1610,0±120,4
45	3450,0±576,8	1432,0±151,4
60	3491,2±438,8	1893,2±118,4
180	8838,4±1270,8	2716,0±160,4
240	8178,0±678,8	3936,4±440,8

После установления времени стационарного распределения натрия исследовали выход Na^{22} из клеток колеоптилей в определенные интервалы времени. По истечении времени колеоптиль помещали в 1 и 100 мМ растворы KCl с оуабанином и без него. Установлено, что присутствие оуабанина не влияет на выход меченого натрия в указанных растворах KCl.

В полевых и лабораторных экспериментах нами было показано, что обработка семян пшеницы и кукурузы высокими (10^{-2} %) и низкими (10^{-5} %) концентрациями красителей ингибирует или стимулирует рост и развитие растений и приводит к формированию относительно более селективных мембран. Последнее выражается в том, что при обработке 10^{-2} %-ным раствором красителя регистрируется низкий, по сравнению с необработанными, мембранный потенциал, а при обработке 10^{-5} %-ным раствором красителя—высокий.

Было сделано предположение, что формирование мембран с иными физико-химическими свойствами приводит к изменению величины пото-

ков натрия. Исследовали влияние обработки семян пшеницы 10^{-2} и 10^{-5} %-ными растворами красителя ЗС на выход Na^{22} из клеток coleoptилей. Из рис. 1 видно, что нет достоверной разницы в величине выхода Na^{22} при различных обработках и в присутствии оуабина в инкубационном растворе (рис. 1).

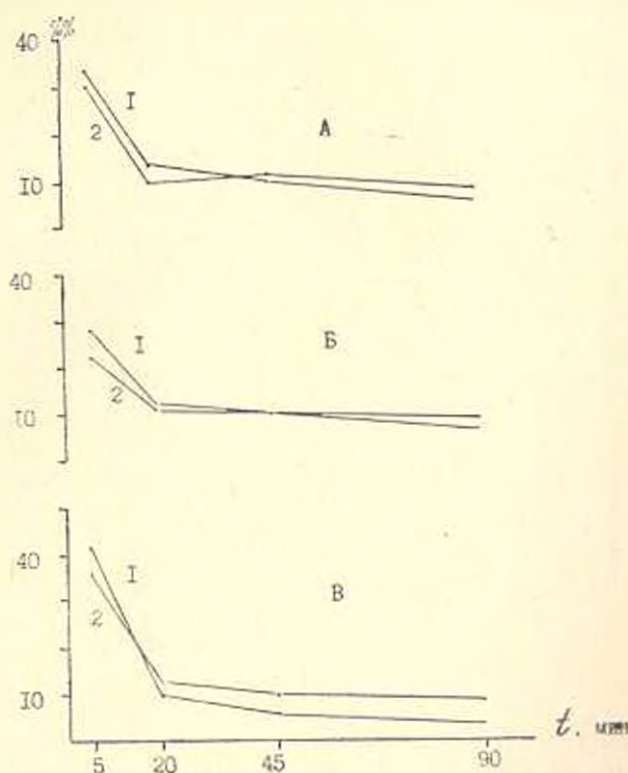


Рис. 1. Влияние оуабина на выход меченого натрия из клеток coleoptилей пшеницы, выросших из обработанных 10^{-2} и 10^{-5} %-ными растворами ЗС семян. А—контроль, Б—обработка 10^{-2} %-ным раствором ЗС, В—обработка 10^{-5} %-ным раствором ЗС, 1—в присутствии оуабина, 2—без оуабина.

Далее, исследовали влияние обработки семян 10^{-2} и 10^{-5} %-ными растворами ЗС на поглощение меченого натрия coleoptилями пшеницы (рис. 2). Оказалось, что при обработке как высокими, так и низкими концентрациями ЗС при инкубации в 1 мМ растворе NaCl (т. е. в случае, когда поток натрия направлен по градиенту) подавляется пассивный вход Na^{22} . Присутствие оуабина в инкубационной среде резко, на порядок, увеличивает пассивный вход натрия.

При инкубации coleoptилей в 100 мМ растворе NaCl на пассивную проницаемость натрия не влияют ни обработка различными концентрациями красителя, ни присутствие оуабина.

Таким образом, из экспериментов следует, что оуабин вызывает достаточно быструю деполяризацию клеточных мембран, снимает ги-

периодически эффект красителя и не оказывает влияния на поглощение и выход меченого натрия. Можно также предположить, что влияние оуабина на мембраны клеток высших растений обусловлено неспецифическим характером взаимодействия.

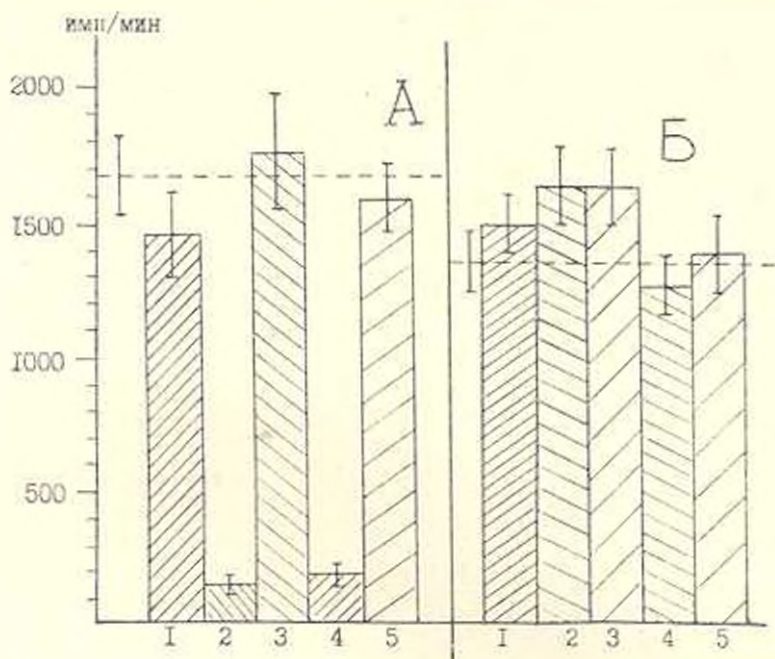


Рис. 2. Влияние оуабина на вход меченого натрия в клетки coleoptилей пшеницы, выросших из семян, обработанных 10^{-2} и 10^{-5} %-ными растворами ЗС в 1 и 100 мМ растворах КСl. А—1 мМ раствор КСl, Б—100 мМ раствор КСl, контроль—пунктирная линия, 1—контроль+оуабин, 2—обработка 10^{-2} %-ным раствором ЗС, 3— 10^{-2} %-ный раствор ЗС+оуабин, 4—обработка 10^{-5} %-ным раствором ЗС, 5— 10^{-5} %-ный раствор ЗС+оуабин.

Влияние низкой температуры на МП клеток корешков кукурузы. Исследовали влияние низкой ($2-3^{\circ}$) температуры, как ингибитора активных систем транспорта, на величину МП клеток корешков. Регистрацию МП проводили в двух растворах 1 мМ КСl: первый раствор имел температуру 24° , а второй— 3° . Низкая температура снижает МП в среднем на 16 мв по абсолютной величине.

Представлял определенный интерес расчет величины диффузионной составляющей мембранного потенциала при действии низкой температуры. Применяя уравнение Нернста

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^{+}]_{in}}{[K^{+}]_{out}},$$

где R , T и F имеют свои обычные значения, $[K^{+}]_{in}$ — концентрация калия в клетке, равная 50 мМ $[K^{+}]_{out}$ — концентрация калия в среде, равная 1 мМ, получим для 24° величину МП, равную 99,5 мв, а для

3°—92,5 мв. Разница между ними равна 7,0 мв, что и является значением диффузионной составляющей МП. В нашем эксперименте полученная разница в 16 мв превышает диффузионную составляющую на 9 мв, что является величиной насосного потенциала.

Известно, что гиббереллин является классическим стимулятором роста и развития растений. При этом проявление физиологического действия гормона зависит от концентрации: высокие концентрации подавляют рост и развитие растений, а низкие—резко интенсифицируют эти процессы.

Аналогичные результаты были получены в ранее проведенных нами экспериментах: достаточно низкие концентрации (10^{-2} %-ные) водных растворов красителей трифенилметанового ряда в значительной степени стимулируют процессы роста и развития, в то время как 10^{-2} %-ные растворы оказывают ингибирующий эффект.

Сходность действия красителей и гормона позволила предположить, что при обработке гормоном произойдет определенное изменение электрохимических свойств плазматических мембран. Результаты экспериментов показали, что при обработке 10^{-3} М раствором гормона регистрируется низкий по абсолютной величине мембранный потенциал, а при обработке 10^{-6} М раствором—высокий потенциал, по сравнению с необработанными растениями.

Было интересно выяснить влияние низкой температуры на клетки корешков кукурузы, выросших из семян, обработанных 10^{-3} и 10^{-6} М

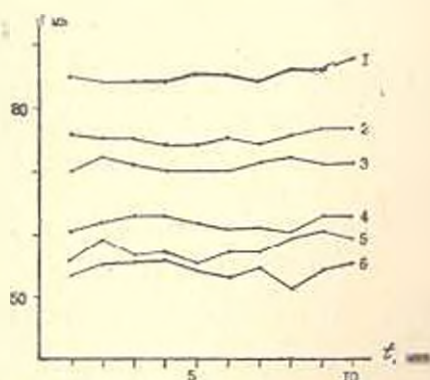


Рис. 3. Влияние низкой (2°) температуры на клетки корешков кукурузы, выросших из семян, обработанных 10^{-3} и 10^{-6} М растворами гиббереллина. 1 и 2—обработка 10^{-6} М раствором гиббереллина, 3 и 5—контроль, 4 и 6—обработка 10^{-3} М раствором гиббереллина, 1, 3 и 4—нормальная температура (24°), 2, 5 и 6—низкая температура (3°).

растворами гиббереллина. Из рис. 3 следует, что в этом случае доля диффузионной составляющей МП увеличивается. Используя приведенный метод расчета для обработанных гиббереллином семян, получим следующую закономерность: если в контроле величина насосного потенциала равна 6 мв, то при обработке 10^{-6} М раствором гормона эта величина равна 3 мв, а при обработке 10^{-3} М—0,5 мв.

Таким образом, обработка семян кукурузы различными концентрированными гиббереллина приводит к уменьшению активной компоненты, участвующей в формировании мембранного потенциала клеток высших растений.

Авторы признательны Ц. М. Авакяну, Л. Г. Микаеляну за помощь в проведении экспериментов с меченым натрием, и С. М. Мартиросову за помощь при обсуждении результатов данной работы.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 23.III 1978 г.

ԲՈՐԶՐԱԿԱՐԳ ԲՈՒՅՈՒՐԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԿԻ ԲՆՈՒՅԹԻ ՎԵՐԱՐԵՐՅԱԼ

Հ. Տ. ԶԱԶԱՐԻԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍԻԱՆ, Գ. Ն. ԽԱՉԱՏՐԻԱՆ

Ապացուցված է, որ օսոտրախնր, ներկի և հիբերելինի բարձր կոնցենտրացիաները և ցածր ջերմաստիճանը ($2-3^{\circ}$) իջեցնում են, իսկ ներկի և հիբերելինի ցածր կոնցենտրացիաները բարձրացնում են բարձրակարգ բույսերի բջիջների մեմբրանային պոտենցիալի արժեքը: Ննթադրվում է, որ մեմբրանային պոտենցիալի նվազումը պայմանավորված է էլեկտրոֆոնն բնույթ ունեցող պոմպի ինակտիվացմամբ:

ON THE NATURE OF THE MEMBRANE POTENTIAL OF HIGHER PLANT CELLS

G. T. KAZARIAN, G. A. PANOSSIAN, G. N. KHACHATRIAN

It has been shown that the membrane potential of higher plant cells decreases during ouabain treatment, low temperature and high hormone concentrations. This potential increases when low concentration of dye has been applied.

It has been supposed that the decrease of the membrane potential is the result of electrogenic pump inactivation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Կազարյան Դ. Դ., Ավակյան Լ. Մ., Ադժյան Խ. Շ. Научные доклады высшей школы, биол. науки, 3, 81, 1967.
2. Felle H. and Bentrap C. J. Membrane Biol., 27, 153, 1976.
3. Marre E., Ludo P., Caldogna F. and Colombo R. Atti Accad. naz. Lincei Rend. Cl. sci. fis., mat. e natur., № 6, 57, 1971.
4. Davis R. F. and Higinbotham N. Plant Physiol., 44, 1383, 1969.
5. Higinbotham N., Griggs Y. S. and Davis R. F. J. Membrane Biol., 3, 210, 1970.
6. Կազարյան Դ. Դ., Խաչատրյան Դ. Ն., Փանոսյան Դ. Ա. Биологический журнал Армении, 30, 12, 49, 1977.
7. Schatzmann H. Y. Biochim. Biophys. Acta, 94, 1, 89, 1965.
8. Skou Y. C. Physiol. Rev., 45, 596, 1965.
9. Leigh R. A. J. Exp. Bot., 26, 93, 508, 1975.
10. Fisher J., Hansen D. and Hodges T. Plant Physiol., 46, 812, 1970.
11. Тухая Н. Н., Мишустина Н. Е., Куркова Е. Б., Ватмистров Д. Б., Самойлова С. А. Физиол. раст., 23, 6, 1198, 1976.
12. Beechey R. B., Holloway C. T., Knight J. L., Robertson A. M. BBRC, 23, 75, 1966.
13. Harold F. M., Baarda J. R., Baron C. C., Abrams A. J. Biol. Chem., 244, 2261, 1969.
14. Singh A. P. and Bragg P. D. J. Bacteriol., 119, 129, 1971.

ИЗУЧЕНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ВЛАЖНОСТИ В МОМЕНТ ОБЛУЧЕНИЯ, ГАЗОВЫХ УСЛОВИЙ И ВЛАЖНОСТИ СРЕДЫ В ПОСТРАДИАЦИОННЫЙ ПЕРИОД

К. А. ВАРДАНЯН, Н. Г. ИОР-АРЕВЯН, С. Н. СЕМЕРДЖЯН

Двухдневное хранение облученных дозой D_{50} (доза, индуцирующая в момент облучения у 50% клеток хромосомные aberrации) семян в бескислородных условиях (азот) приводило к снижению поражения хромосом независимо от исходной влажности семян и влажности среды и пострадиационный период хранения, тогда как присутствие кислорода в пострадиационный период усиливало радиобиологический эффект.

Дальнейшее увеличение времени хранения (15 и 30 дней) либо почти не сказывалось на картине поражения (влажность среды 5 и 12%), либо приводило к его усилению (влажность среды 23%).

Одним из существенных методов исследования радиочувствительности биологических систем является модификация эффекта облучения с помощью различных физических, химических и биологических факторов, таких, как влажность, газовые условия среды, температура, возраст и хранение семян. Подобные исследования целесообразнее проводить на таких метаболически пассивных системах, как покоящиеся семена растений.

Анализ литературных данных показывает, что вопрос о влиянии хранения облученных семян на лучевое поражение не получил однозначного решения. Исследователи сталкивались либо с фактом усиления поражения [1—6], либо с тем, что хранение не влияло на конечный радиобиологический эффект [7, 8]. В ряде работ при хранении сухих облученных семян во влажной среде в течение первых 3-х суток отмечалось снижение поражения [9—11].

Многочисленными исследованиями установлена важная роль кислорода и влажности в реакциях лучевого поражения семян, причем степень участия кислорода в лучевом поражении в значительной мере зависит от влажности семян и условий хранения в пострадиационный период [12, 13].

Было показано, что при хранении облученных семян в атмосфере кислорода повышались радиобиологический эффект [14]. Хранение же при пониженной влажности семян и в отсутствие кислорода снижало или не оказывало влияния на уровень лучевого поражения [15—18].

Такую противоречивость литературных данных, на наш взгляд, можно объяснить тем, что основные модифицирующие факторы, влияющие на радиобиологический эффект в пострadiaционный период, не учитывались.

В связи с этим нами изучалась радиочувствительность семян пшеницы в зависимости от их влажности в момент облучения, а также от влажности, газовых условий среды и сроков хранения в пострadiaционный период.

Материал и методика. Опыты проводили на семенах озимой мягкой пшеницы сорта Белостая 1 с влажностью 5, 12 и 23%, для чего их в течение 15 дней выдерживали в эксикаторах над различными концентрациями H_2SO_4 .

Семена облучали на рентгеновской установке РЭМ-1 ($U = 185$ кВ, $I = 13$ мА, мощность дозы—600 р/мин) дозами 1, 5, 10, 15 и 20 кр. Радиобиологический эффект оценивали по проценту клеток с хромосомными aberrациями.

В целях объективной оценки влияния модифицирующих факторов (кислород, хранение) на конечный радиобиологический эффект для семян с различной влажностью с помощью кривых «доза—эффект» (рис. 1) находили дозу, индуцирующую у 50% кле-

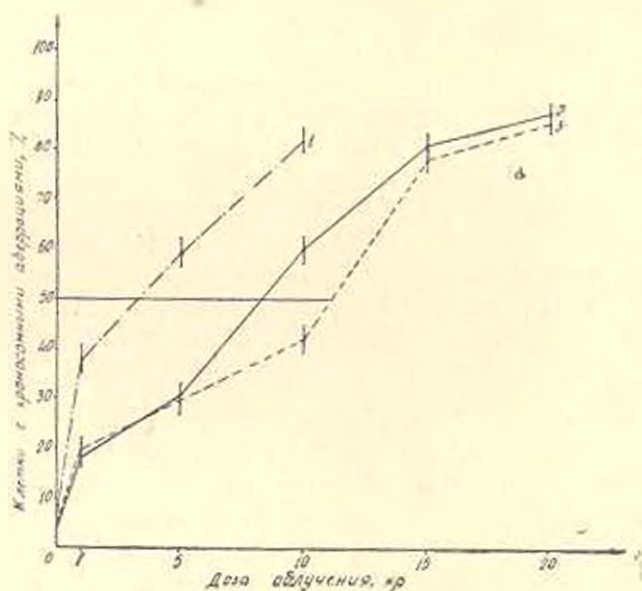


Рис. 1. Лучевое поражение пшеницы в зависимости от влажности семян в момент облучения. Семена с исходной влажностью: 1—5, 2—12, 3—23%. По оси абсцисс—доза облучения, кр.; по оси ординат—процент клеток с хромосомными aberrациями.

ток хромосомные aberrации (D_{50}). Оказалось, что для семян с влажностью 5, 12 и 23% эта доза соответственно равна 3, 14 и 8 кр. В дальнейших опытах семена облучали только этими дозами.

Часть семян сразу после облучения D_{50} проращивали, остальные помещали в эксикаторы с различной (5, 12 и 23%) влажностью среды, которые затем заполнялись кислородом или азотом. Сроки хранения в различных газовых условиях и в условиях влажности были 0, 2, 15 и 30 дней.

Были изучены следующие варианты: сухие семена, хранившиеся в сухой, воздушной-сухой и влажной среде, а также воздушно-сухие и влажные семена, хранившиеся в аналогичных условиях.

После каждого срока хранения семена замачивали в течение 18 час. в дистиллированной воде, а затем проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 24°. Кончики корешков от семян с влажностью 12 и 23% фиксировали через 24 часа после конца замачивания, а с влажностью 5%—через 26 часов, что соответствовало максимуму деления клеток и первому митозу. Фиксацию проводили смесью Батталья, состоящей из 5 частей 96° спирта, 1 части хлороформа, 1 части ледяной уксусной кислоты и 1 части формалина. Приготавливали временные давленные препараты, окрашенные реактивом Шиффа с применением холодного гидролиза. В каждом варианте опыта изучали не менее 500 ана- и телофаз для подсчета хромосомных aberrаций. В опыте учитывали парные и одиночные мосты, фрагменты, кольца.

В каждом варианте опыта подсчитывали также митотическую активность деления клеток, однако последние не претерпевали существенных изменений в результате пострадиационного хранения, поэтому данные не представлены.

Результаты и обсуждение. Модификация эффекта облучения семян с помощью 5%-ой влажности среды наблюдается, независимо от исходной влажности семян, уже на второй день как в опытах с хранением облученных семян в кислороде, так и в его отсутствие. Дальнейшее хранение до 30 дней не сказывается на уровне поражения (рис. 2). Од-

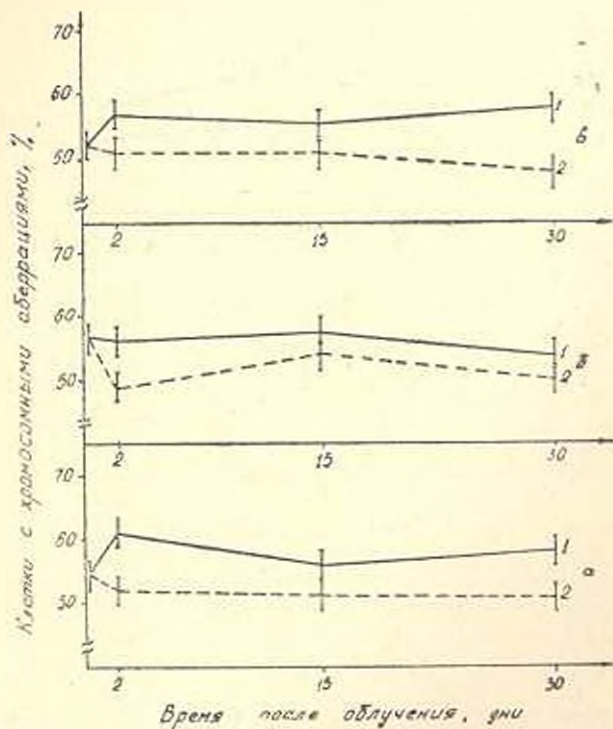


Рис. 2. Уровень поражения клеток в семенах с различной исходной влажностью (а—5; б—12; в—23%) в зависимости от влажности окружающей среды (5%) и газовых условий пострадиационного хранения (кислород—1, азот—2). По оси абсцисс—сроки пострадиационного хранения.

дни; по оси ординат—процент клеток с хромосомными aberrациями.

нако необходимо отметить, что хранение в условиях кислорода в основном увеличивает, а его отсутствие уменьшает поражение хромосом.

Аналогичная картина наблюдается в опыте, где семена хранились в условиях с 12%-ой влажностью среды (рис. 3). Исключение составляет опыт, где исходная влажность семян была 5%. В этом варианте на 30-й день хранения наблюдается уменьшение поражения как в присутствии кислорода, так и в его отсутствие. Вероятно, указанные условия являются оптимальными для восстановления лучевых повреждений хромосом.

Особый интерес представляют результаты опыта по хранению облученных семян в условиях с повышенной влажностью (23%) среды

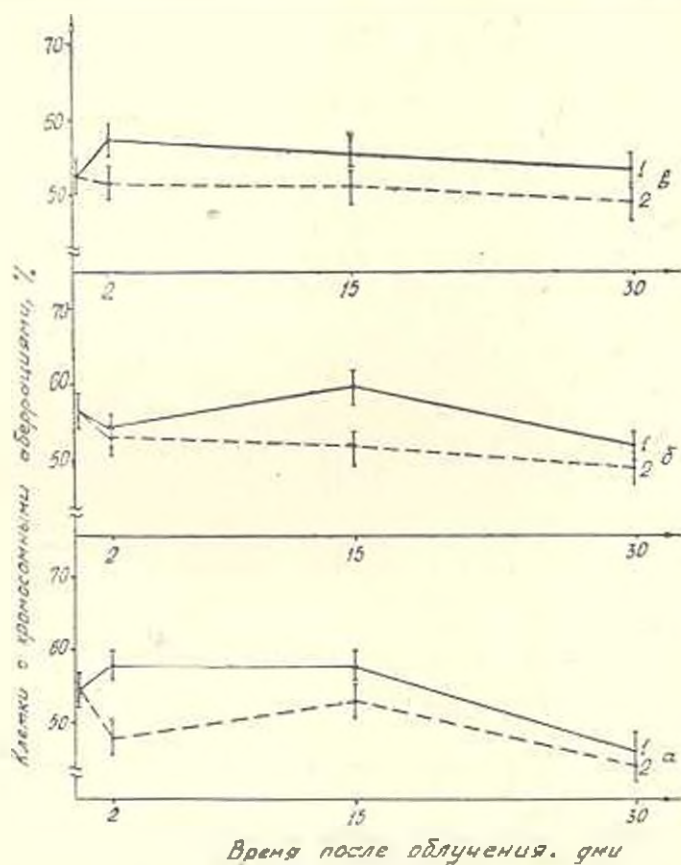


Рис. 3. Уровни поражения клеток в семенах с различной исходной влажностью (а—5, б—12, в—23%) в зависимости от влажности окружающей среды (12%) и газовых условий пострадиационного хранения (кислород—1, азот—2). Условные обозначения см. на рис. 2.

(рис. 4). По мере увеличения времени хранения до 30 дней наблюдается тенденция к усилению лучевого поражения хромосом, причем кислород, присутствующий в пострадиационный период, оказывает более сильное воздействие на картину поражения, чем в опытах с влажностью среды 5 и 12%.

Уровень естественного мутационного процесса необлученных семян всех изученных вариантов влажностей составлял в основном 3—4% и не претерпевал изменений в результате пострadiaционного хранения в вышеуказанных условиях, поэтому данные не приводятся.

Опыты показали, что определяющим фактором, влияющим на картину лучевого поражения в пострadiaционный период, является влажность среды.

Таким образом, двухдневное хранение облученных дозой D_{50} семян в бескислородных условиях (атмосфера азота), независимо от исходной влажности семян и среды в период хранения, приводит к снижению поражения хромосом, тогда как присутствие кислорода в пострadiaционный период увеличивает радиобиологический эффект. Дальнейшее

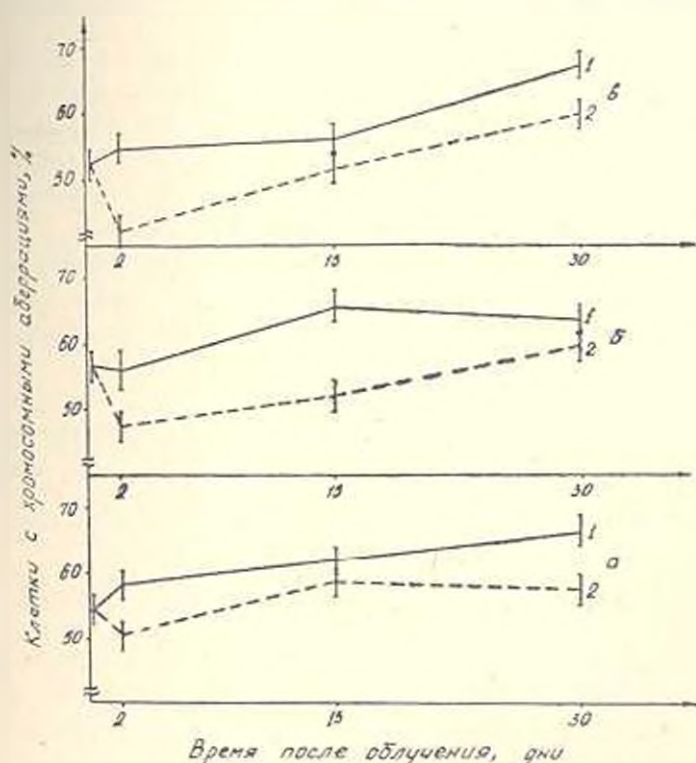


Рис. 4. Уровень поражения клеток в семенах с различной исходной влажностью (а—5%, б—12%, в—23%) в зависимости от влажности окружающей среды (23%) и газовых условий пострadiaционного хранения (кислород—1, азот—2). Условные обозначения см. на рис. 2.

увеличение времени хранения (15 и 30 дней) либо почти не сказывается на картине поражения (влажность среды 5 и 12%), либо усиливает его (влажность среды 23%).

**ՑՈՐԵՆԻ ՍԵՐՄԵՐԻ ՌԱԴԻՈԶԻԱՅՆՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԿԱԽԻԱՄ ՃԱՌԱԿԱՅԹՄԱՆ ՊԱՀԻՆ ՆՐԱՆՑ ՈՒՆԵՑԱԾ ԽՈՆԱՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՀԵՏՃԱՌԱԿԱՅԹՄԱՆ ՇՐՋԱՆՈՒՄ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԽՈՆԱՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒ
ԳԱՋԱՅԻ, ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Բ. Հ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ն. Գ. ՆՈՐ-ԱՐԵՎՅԱՆ, Ս. Պ. ՍԵՐՄԵՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է հետազոտության շրջանում միջավայրի պայմանների, ինչպես նաև մթնոլորտում դազերի (թթվածին, ազոտ) փոփոխության ազդեցությունը ցորենի 5, 12 և 23 % խոնավության սերմերի ռադիոկենսաբանական էֆեկտի վրա:

Ցույց է տրված, որ առավել զգայուն են չոր՝ 5 % խոնավության սերմերը, ռադիոզգայնության բարձրացում է նկատվում նաև 23 % խոնավության սերմերի մոտ:

Ս₅₀ դուլայով (որը հառադայիման պահին բջիջների 50 %-ի մոտ առաջ է բերում քրոմոսոմային խաթարումներ) հառադայիման արված սերմերը 2 օր պահելով ազոտի մթնոլորտում, նկատվել է ռադիոկենսաբանական էֆեկտի բուլացում՝ անկախ սերմերի նախնական և միջավայրի պայմանների խոնավությունից, Թթվածնի ասկայությունը հետազոտության շրջանում, ընդհանրապես, ուժեղացնում է ռադիոկենսաբանական էֆեկտը:

Պահման ժամանակաշրջանի հետագա ավելացումը (15, 30 օր) կամ փոքրում ռադիոկենսաբանական էֆեկտի վրա (5 և 12 % խոնավության պայմաններում), կամ էլ բարձրացնում է այն 23 % խոնավության պայմաններում):

RADIOSENSITIVITY OF WHEAT SEEDS AS AFFECTED BY THE MOISTURE AT IRRADIATION, GAS CONDITIONS AND ENVIRONMENT MOISTURE DURING THE POSTIRRADIATION PERIOD

K. A. VARDANIAN, N. G. NOR-AREVIAN, S. P. SEMERDJIAN

One of the essential methods of radiosensitivity research of biological systems is modification of irradiation effect by means of various physical, chemical and biological factors, such as moisture, environment gas conditions, temperature, age, storage and so on.

It is advisable that we conduct such researches on metabolically passive systems.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Беличенко Н. И. и др. Генетика, 4, 3, 175, 1968.
2. Нурджиян Н. И., Дозорцева Р. А. Известия АН СССР, сер. биол., 4, 577, 1964.
3. Невзгодина Л. В., Папоян Н. М. Радиобиология, 9, 6, 888, 1969.
4. Филев К. А. ДАН СССР, 196, 3, 180, 1964.
5. Хвостова В. В., Невзгодина Л. В., Дубинин Н. П. ДАН СССР, 161, 5, 1219, 1965.
6. Хвостова В. В., Невзгодина Л. В. Радиобиология, 1, 4, 1961.
7. Сахаров В. В., Мансурова В. В., Платонова Р. Н., Шербакова В. К. В сб.: Радиационная генетика, М., 1962.

8. Семерджян С. П., Оганесян Дж. О., Петросян Л. А. Труды Арм. НИИЗ, Эчмина-
дзини, 1968.
9. Немцева Л. С. Генетика, 7, 8, 2, 1972.
10. Фесенко Э. В. Автореф. канд. дисс., Л., 1967.
11. Фесенко Э. В., Царапкин Л. С. Радиобиология, 13, 3, 407, 1973.
12. Царапкин Л. С., Царапкина К. А. Радиобиология, 12, 2, 253, 1972.
13. Conger B. V., Nilan R. A., Konzak C. F., Metter S. Radiat. Biol., 6, 129, 1966.
14. Adams J., Nilan R. A. Radiat. Res., 8, 2, 111, 1958.
15. Гудков И. Н. Радиобиология, 13, 1, 140, 1972.
16. Лаура М. П. Цитология, 8, 4, 558, 1966.
17. Папьян Н. М., Невзгедина Л. В., Орлова Н. Н. Радиобиология, 12, 3, 125, 1972.
18. Семерджян С. П., Нор-Ареян Н. Г., Казарян Г. Т. Тр. Арм. НИИЗ, 2, 52, 1973.

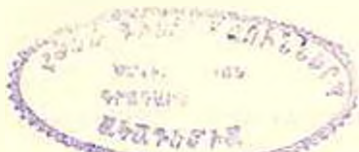


Handwritten signature

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ ՈՒՆ

Էմսպետիմենտայ

Հովհաննիսյան Ս. Ս. Ձգողական դաշտի կենսաբանական ազդեցությունը	661
Ավսպյան Ս. Ի., Վաթինյուկ Ի. Խ., Խոմոտով Յու. Պ., Նանասյան Ա. Ս., Օհանիսյան Ջ. Ս. Տրեկային խցիկի նկարները, մշակման սարքի օգտագործումը բջջաքիմիական հե- տազոտության մեջ	672
Աղստիլյան Վ. Մ., Բաբայան Յու. Ս., Սաղաթյան Վ. Վ., Պողոսյան Խի՛, Կ. Ն. Գնթ-ի նուկլեոտիդային կապի որոշումը ԳՄ սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով	676
Ասլանյան Վ. Ի., Դեոդան Ն. Ի., Խաբաթյան Բ. Ա. Տրոպոնին-արոպոմիոգին կոմպլեքսի կազմակերպման առանձնահատկությունների մասին	683
Գալստյան Գ. Հ., Վարդապետյան Հ. Խ., Վարդանյան Պ. Հ. Հոմոլոգ և հետերոլոգ Գնթ-ի հիստոնային կոմպլեքսների հարման հետազոտություններ	689
Գուրգուրյան Ս. Ս., Մարտիրոսով Ս. Ի., Պետրոսյան Լ. Ս. Վակուոլի իոնների կլանումը Streptococcus faecalis և Escherichia coli բջիջների կողմից	697
Համբարձումյան Տ. Գ., Աղամյան Ս. Յու. Նասրիումի օուարանի-ոնգիստենտային հոս- քերը	707
Հազարյան Խ. Խ., Դյումին Ջու. Մ., Տիբազյան Ս. Գ., Մանվելյան Ա. Գ. Առնետների լյարդի քրոմատինի հետազոտությունը ֆլուորեսցենտային անալիզի միջոցով	714
Առատուրյան Խ. Ա. ժողովային լ-լիզին-Ն-ի պարամագնիտային կենտրոններ նախկին Ա. Ա., Առատուրյան Խ. Վ. Տարածականորեն կոզմետոլ-ված ֆոսֆոլիպիդա- յին թաղանթում իդրատացման ազդեցությամբ էլեկտրաշարժ ուժի առաջացումը	722
Աբադյան Հ. Ո. Կենսաազդված պրոբիոդիկային հիմքերի լուծույթներում միացման ու- ղիկալների առաջացման մեխանիզմի մասին	732
Արծուրի Կ. Գ., ՏԼԵ-Մալկոսյան Ա. Ս. Օբսիդակերականուման սլոտենցիալների կախ- ման հետազոտումը ներգործող էլեկտրաստատիկ դաշտի պարամետրերից	739
Չլյան Կ. Կ. Կրեյստիկի գլխուղեղի էլեկտրական ակտիվության տարածական հարա- բերությունները մոնոլի առարկաների ընկալման ընթացքում բառային հրամանագից հետո	744
Սկրույան Ս. Լ., Արծուրի Կ. Գ. էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը առնետների լյարդի միտոքոնդրիաների շնչառության վրա	750
Մխչյան Է. Խ. Սիկույան Է. Ս., Բալինյան Ս. Ս., Խոյկի Ս. Պ., Հակոբյով Ս. Լ. Դանդի- դիդների ազդեցության ուսումնասիրությունը բիոմեմբրանների կոմպլեքսների կառուցվածքային բաղադրության վրա՝ ֆլուորեսցենտ անալիզի միջոցով	758
Վաղարշ Հ. Տ., Փանոսյան Գ. Հ., Խաչատրյան Կ. Ն. Բարձրախորդ բույսերի բջիջների մեմբրանային պոտենցիալի բնույթի վերաբերյալ	766
Վարդանյան Բ. Հ., Խո-Արևյան Ն. Գ., Սևմերջյան Ս. Պ. Գործնի սերմերի խաղիողա- նության ուսումնասիրությունը կախված ճառագայթման պայմաններից ունեցած խոնավությունից և հետազոտված շրջանում միջուկային խոնավության ու դազային պայմանների փոփոխությունից	771
«Հայաստանի կենսաբանական հանդես», 1978	657



СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные

Оганесян С. С. Биологическое действие гравитационного поля	661
Авакян Ц. М., Васинюк Н. Е., Можаров Ю. П., Никасян А. С., Оганесян Дж. О. Использование ИРД в цитохимических исследованиях биологических объектов	672
Асоян В. М., Бабаян Ю. С., Сагателян В. В., Погосян Мик. К. Определение нуклеотидного состава ДНК УФ-спектрофотометрическим методом	676
Аслиян В. М., Геворкян Н. М., Саркисян М. А. Об особенностях организации тропомиин-тропомиозинового комплекса	683
Паносян Г. А., Вирдапетян Р. Р., Вардеванян П. О. Плавление комплексов ДНК с гомологичными и гетерологичными гистонами	689
Дурегорян С. С., Мартиросян С. М., Петросян Л. С. Поглощение ионов калия клетками <i>Streptococcus faecalis</i> и <i>Escherichia coli</i>	697
Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я. Оуданни-нечувствительные потоки натрия	707
Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тирацунян С. Г., Манвелян А. Г. Исследование хроматина печени крыс с помощью флуоресцентного анализа	714
Асатурян Р. А. Парамагнитные центры в облученном Л-лейцине- N^{15}	720
Шагинян А. А., Стахболцян А. В. Генерация электродвижущей силы в ориентированной фосфолипидной пленке под воздействием гидратации	727
Абян Г. В. О механизме образования радикалов присоединения в γ -облученных растнорах пиримидиновых оснований	732
Арцруни Г. Г., Тер-Маркосян А. С. Исследование зависимости окислительно-восстановительных потенциалов от параметров воздействующего электростатического поля	739
Чян Г. Г. Пространственные отношения электрической активности коры головного мозга у детей при восприятии знакомых предметов после словесной инструкции	744
Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Влияние электростатического поля на дыхание митохондрий печени крыс	750
Мхехян Э. Е., Секоян Э. С., Баджиян С. А., Соцкий О. П., Акопов С. Э. Изучение влияния ганглиозидов на структурную лабильность компонентов биомембран методом флуоресцентного анализа	758
Казарян Г. Т., Паносян Г. А., Хачатрян Г. Н. К природе мембранного потенциала клеток высших растений	763
Вирдапетян К. А., Нор-Аревян Н. Г., Семерджян С. П. Изучение радиочувствительности семян пшеницы в зависимости от их влажности в момент облучения, газовых условий и влажности среды в пострадиационный период	771

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Vol. XXXI, № 7

YEREVAN

July, 1979

CONTENTS

Experimental

<i>Oganesian S. S.</i> The biological effect of gravitational field	661
<i>Avakian Ts. M., Vassinyuk I. E., Mozharov Y. B., Nanassian A. S., Ohanessian J. O.</i> The use of NRD in cytochemical researches of biological objects	672
<i>Aslanian W. M., Babain Y. S., Sagatellan W. W., Pogossian M. K.</i> Determination of nucleotide content in DNA by UV spectrophotometric method	676
<i>Aslanian W. M., Gevorgian N. M., Sarkisian M. A.</i> On the features of tropotin-tropomyosin complex organization	683
<i>Panosyan G. H., Vardapetyan H. R., Vardevanyan P. H.</i> Investigation of DNA melting with homologous and heterologous histones	689
<i>Durgarian S. S., Martirosyan S. M., Petrosyan L. S.</i> Potassium ion accumulation by the cells of <i>Streptococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . . .	697
<i>Hambartsumian T. G., Adamian S. Ya.</i> Ouabain-insensitive sodium fluxes	707
<i>Kazarian R. R., Dyomin Yu. M., Tiratsuyan S. G., Manvelian A. G.</i> Studies of the rat liver chromatin by fluorescent analysis	711
<i>Asaturian R. A.</i> Paramagnetic centres in irradiated L-leucin- N^{15}	720
<i>Shahintan A. A., Stamboltzian Kh. V.</i> The generation of electromoving force in the oriented phospholipid films under the influence of hydration . .	727
<i>Abaghiyan G. V.</i> The mechanism of the formation of addition radicals in γ -irradiated solutions of pyrimidine bases	732
<i>Artsruny G. G., Ter-Markosian A. S.</i> The investigation of dependence of oxidative-reductive potentials upon the parameters of electrostatic field treatment	739
<i>Chitlan G. G.</i> Expansible relations of children's brain electric activity during the perception of familiar subjects after the word instruction . .	744
<i>Mkrtichian S. L., Artsruny G. G., Mkhitarian V. G.</i> The effect of electrostatic field on the respiration in rat liver mitochondrions	750
<i>Mkhejian E. E., Sekotan E. S., Badginian S. A., Sotskii O. P., Akopov S. E.</i> The influence of gangliosides on the structural instability of biomembrane components by the method of fluorescent analysis	758
<i>Kazarian G. T., Panossian G. A., Khachatryan G. N.</i> On the nature of the membrane potential of higher plant cells	763
<i>Vardanian K. A., Nor-Arevian N. G., Semerdjian S. P.</i> Radiosensitivity of wheat seeds as affected by the moisture at irradiation, gas conditions and environment moisture during the postirradiation period	771

"Biological Journal of Armenia", 1978

659