

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года
Այստանի քեսաբանական անդես

Խմբագրական կոլեգիա՝ Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Ե. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադջյան, Հ. Գ. Բատիկյան, Ա. Շ. Գալստյան (գլխ. խմբագրի տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Կ. Ս. Մարջանյան (սկստ. քարտուղար), **Ս. Գ. Մովսիսյան**, Ս. Հ. Մովսիսյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Դ. Ն. Բաբայան, Ս. Ա. Բակունց, Գ. Ս. Դավթյան, Ա. Լ. Թախտաճյան, Պ. Ա. Խորշոդյան, Ս. Կ. Կարասյան, Ե. Հ. Հասրաբյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չալախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Ե. Տեր-Մինասյան:

ԽՄԲԱԳՐԱՆԻԹՅԱՆ ՀԱՍՑԵՆ՝

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

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

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

© Издательство АН Армянской ССР, 1979 г.

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

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е НА СОДЕРЖАНИЕ ТИОЛОВЫХ ГРУПП У КРЫС ПОСЛЕ ОЖОГА

М. И. АГАДЖАНОВ, Л. В. СЕМЕРДЖЯН, В. Г. МХИТАРЯН

В различные сроки после ожогов III^б степени 12—15% поверхности тела крыс в мозге, печени и крови изучалось содержание общих, небелковых и белковосвязанных SH-групп. Установлено, что ожоговая травма приводит к уменьшению содержания всех изученных показателей, особенно в течение первых суток после травмы.

Введение α -токоферола способствует нормализации содержания тиоловых групп.

Среди функциональных групп белковых молекул выделяются высокой реакционной способностью и разнообразием химических реакций тиоловые группы, необходимые для проявления биологической активности многих белков и поддержания их макромолекулярной структуры.

Большинство внутриклеточных ферментов, в том числе почти все известные дегидрогеназы, ингибируются реагентами на SH-группы [14]. Показано исключительно важное значение SH-групп в развитии процессов лучевого поражения [15], при интоксикации четыреххлористым углеродом [16], хлоропреном [8, 9] и т. п. Данные последних лет указывают на значительную роль их в регуляции перекисного окисления липидов [6].

Исследования Вайтцеля и сотр. [19, 20] показали, что органические перекиси и гидроперекиси угнетают дыхание и анаэробный гликолиз интактных дрожжевых клеток, активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, альдолазы, гексокиназы, лактатдегидрогеназы, а также ацетилтрансферазы. Согласно данным этих авторов, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа в 10 раз чувствительнее к действию перекисей, чем альдолаза и лактатдегидрогеназа.

В одной из наших работ было показано, что органические перекиси и гидроперекиси инициируют в организме процесс липидной пероксидации [1]. Высокая чувствительность SH-групп и значительное изменение их содержания в мозге, печени и крови были выявлены нами при внутрибрюшинном введении пероксидированных ненасыщенных жирных кислот [12]. Было установлено значение липидных перекисей в патогенезе ожоговой болезни [10]; обнаружена определенная корреляция между тяжестью ожоговой травмы и интенсивностью процесса липидной пероксидации, а также уменьшением содержания тканевых антиоксидантов, главным образом α -токоферола [4] и фосфолипидов [3].

Учитывая роль тиоловых групп в обеспечении антиоксидательной активности тканей, в частности в поддержании активности глутатионпероксидазы [17], а также наличие избыточной липидной пероксидации после ожога, была поставлена задача исследовать сдвиги в содержании общих, белковосвязанных и небелковых сульфгидрильных групп в мозге, печени и крови в различные сроки после ожоговой травмы, а также влияние α -токоферола на этот процесс.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самках массой 130—160 г. Ожог III^b степени 12—15% поверхности тела вызывали по описанной ранее методике [2]. Части животных вводили внутрибрюшинно витамин Е в виде α -токоферилацетата по 1 мг/кг веса сразу после ожога, а затем через 3, 7 и 12 дней.

Тиоловые группы в печени, мозге и крови определяли через 1 час, 1, 3, 7 и 15 дней после ожога по методу Седлака и Линдсея [18], об их количестве судили по окрашиванию 5,5 дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) Sigma (США), интенсивность которого измеряли на спектрофотометре МОМ-203 при 412 нм. Животных обезглавливали, извлекали мозг и печень и в холодных условиях готовили 2,5%-ный гомогенат на 0,02 М ЭДТА- Na_2 . Содержание общих SH-групп (O-SH) определяли в реакционной смеси, содержащей 1,5 мл 0,2 М трис-HCl буфера, pH 8,2, 0,1 мл 0,01 М ДТНБ, 7,9 мл абсолютного метанола и 0,5 мл супернатанта. Небелковые SH-группы (НБ-SH) определяли в смеси, содержащей 4 мл 0,2 М трис-HCl буфера, pH 8,9, 0,1 мл 0,01 М ДТНБ, 2 мл супернатанта, полученного после депротенизации. По разнице между количеством O-SH и НБ-SH судили о количестве связанных с белками SH-групп (BC-SH).

Количество SH-групп в печени и мозге выражали в ммоль/100 г свежей ткани, а в крови—мкмоль/100 мл.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные о количестве тиоловых групп в мозге, печени и крови у интактных крыс в целом соответствуют результатам, приводимым Герасимовым и соавт. [7], Титовым и Голубенцевым [13], Седлаком и Линдсеем [18], Мхитаряном [4], Пановой и Заец [11] и др.

Как видно из табл. 1, содержание общих тиоловых групп в печени сразу после ожога снижается на 34, через 1 час—на 38%. В последующие сроки (через 1 и 3 дня) оно, хотя и несколько повышается, однако все еще продолжает отставать от исходного уровня на 21 и 19% соответственно. Через 7 и 15 дней этот показатель заметно повышается, превышая исходный уровень на 10 и 12% соответственно. Содержание свободных SH-групп, как это видно из табл. 2, сразу после ожога, а также через один час резко снижается, оказываясь ниже исходного уровня на 52 и 36% соответственно. В последующие сроки (через 7 и 15 дней) оно заметно повышается и достигает исходного уровня.

Подобные сдвиги наблюдаются и в содержании связанных с белками тиоловых групп. Как свидетельствуют данные табл. 3, сразу же после ожога их содержание снижается на 30, а через час—на 38%. Спустя одни сутки и в последующие сроки их количество начинает возрастать и через 7—15 дней после ожога превышает исходный уровень на 14%.

Сопоставление данных, касающихся печени, мозга и крови, показало, что изменения в содержании сульфгидрильных групп после ожо-

Таблица 3

Влияние α -токоферилацетата на содержание связанных с белками SH-групп в печени, мозге и крови крыс после ожога (количество SH-групп выражено в ммоль/100 г свежей ткани)

Ткань	Контрольные крысы	О ж о г						Ожог + α -токоферилацетат					
		сразу	через					сразу	через				
			1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней		1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней
Печень	1,28	0,90	0,80	0,99	1,03	1,46	1,46	1,23	1,11	1,07	1,22	1,28	1,26
Мозг	0,81	0,73	0,70	0,74	0,85	0,90	1,05	0,79	0,76	0,78	0,82	0,79	0,82
Кровь, ммоль/100 мл	18,8	15,5	15,0	12,9	17,3	18,9	19,5	19,5	18,0	15,9	17,2	18,5	18,9

говой травмы во всех исследуемых тканях протекают с одинаковой закономерностью. Наибольшее снижение SH-групп наблюдается в первые сутки после ожога (особенно в печени), затем к 3—7 дню их количество достигает исходного уровня, а к 15 дню даже несколько превышает его.

Аналогичные данные получены при изучении содержания SH-групп в сыворотке крови у больных с различной по тяжести ожоговой травмой [11].

Приведенные данные в определенной степени согласуются с результатами наших предыдущих исследований и коррелируют с процессом липидной пероксидации и со сдвигами в содержании α -токоферола и фосфолипидов. Было показано [10], что сразу после ожога избыточная липидная пероксидация сопровождается высокой активностью глутатионпероксидазы [5], причем эти показатели к концу исследования восстанавливаются до контрольного уровня. В начальные сроки после ожога отмечено также наибольшее снижение содержания α -токоферола [4] и фосфолипидов [3].

Как видно из данных табл. 1, 2, 3, при внутрибрюшинном введении α -токоферилацетата у обожженных крыс происходит нормализация содержания эндогенных SH-групп во всех исследуемых тканях. Это сопровождается соответствующей нормализацией как в содержании эндогенного α -токоферола [4], так и фосфолипидов [3].

Результаты проведенных исследований в определенной степени объясняют изменения, наблюдаемые в активности целого ряда ферментов, в частности глутатионпероксидазной системы, после ожоговой травмы.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՄՈՏ ԱՅՐՎԱԾՔԻՑ ՀԵՏՈ ԹԻՈՒԱՅԻՆ ԽՄԲԵՐԻ
ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՎԻՏԱՄԻՆ Ե-Ի ԱԶԳԵՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Մ. Ի. ԱՂԱԶԱՆՈՎ, Լ. Վ. ՍԵՄԵՐԴՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են առնետների վրա այրվածքից առաջացած, ընդհանուր, սպիտակուցների հետ կապված և ոչ սպիտակուցային SH-խմբերի քանակական տեղաշարժերը: Ցույց է տրվում, որ մարմնի 1/6 մասի վրա III-րդ աստիճանի այրվածքից իջնում է նշված SH-խմբերի քանակը առավելագույն առաջին 24 ժամվա ընթացքում:

α -տոկոֆերիլացետատի ներարկումը կարգավորում է նշված տեղաշարժերը:

THE INFLUENCE OF VITAMIN E ON THE CONTENT OF THIOL GROUPS IN RAT BRAIN, LIVER AND BLOOD AFTER BURN

M. I. AGHADJANIAN, L. V. SEMERDJIAN, V. G. MKHITARIAN

The content of general non-protein and protein-bound SH groupies in rat liver, brain and blood after IIIb degree 12--15% body surface burn has been studied.

It has been established, that burning lesion leads to the content reduction of studied indicators.

The injection of α -tocopherol promotes the thiol group content normalization.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А., Мхитарян В. Г. Биолог. ж. Армении, 26, 4, 1973.
2. Агаджанов М. И. Журн. exper. и клинич. медицины, 17, 5, 68, 1977.
3. Агаджанов М. И., Овакимян С. С., Мхитарян В. Г., Карагезян К. Г. Укр. биох. журн., 5, 1, 1979.
4. Агаджанов М. И. Биолог. ж. Армении, 31, 2, 128, 1978.
5. Агаджанов М. И. Журн. exper. и клинич. медицины, 18, 3, 26, 1979.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., 1972.
7. Герасимов А. М., Королева Л. А., Брусков О. С., Олферьев А. М., Антоненков В. Д., Панченко Л. Ф. Вопр. мед. химии, 22, 1, 89, 1976.
8. Мхитарян В. Г. Тр. Ереванск. мед. ин-та, 12, 59, 1962.
9. Мхитарян В. Г. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 15, 5, 39, 1962.
10. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаева Е. А. Журн. exper. и клинич. медицины, 15, 1, 3, 1975.
11. Панова Ю. М., Заец Т. Л. Сов. медицина, 4, 109, 1968.
12. Семерджян Л. В., Мхитарян В. Г. Журн. exper. и клинич. медицины, в печати.
13. Титов А. В., Голубенцев Д. А. Вопр. мед. химии, 17, 1, 61, 1971.
14. Торчинский Ю. М. Сера в биологии, М., 1977.
15. Barron E. S. G., Dickman S. J. Gen. Physiol., 32, 595, 1949.
16. Butler T. C. J. Pharmacol. and Exper. Therap., 134, 311, 1961.
17. Pinto R. E., Bartley W. Biochem., 112, 109, 1969.
18. Sedlak J., Lindsay K. N. Anal. Biochem., 25, 192, 1968.
19. Weltzel G., Buddecke E., Schneider F. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 323, 211, 1961.
20. Weltzel G., Buddecke E., Schneider F., Pfeil H. Ibid, 325, 61, 1961.

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ КАРДИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

С. С. МИСИРЯН, Р. М. СРАПИОНЯН, М. Б. БХЕЯН
 Г. А. САРИБЕКЯН, А. А. ГАЛОЯН

При изучении некоторых физико-химических свойств 3-х кардиоактивных соединений, выделенных из сердечной мышцы крупного рогатого скота, выяснилось, что они не поглощают ультрафиолетовых лучей, ингибированы и не дают окраски при хлорировании. Эти соединения сохраняют биологическую активность при всех видах гидролиза и проявляют способность ингибировать фосфодиэстеразу цАМФ головного мозга. Полученные данные дают возможность предположить о сходстве коронароактивных соединений, выделенных из сердца с нейрогормоном «С».

Нами было установлено наличие ряда кардиоактивных соединений в гипоталамусе различных животных [3, 5]. Оказалось, что некоторые вещества М-холиномиметического ряда при их центральном введении высвобождают эти соединения, в частности нейрогормоны К и С, из мозга в кровь, где они связываются с белковыми фракциями сыворотки—альбуминами и γ -глобулинами [7]. Не исключалась также возможность транспорта этих соединений к органу мишени—сердцу. Основанием для такого рода предположения послужило выявление некоторых коронароактивных соединений в сердечной мышце [9].

В этом аспекте представляло интерес получение доказательства идентичности этих низкомолекулярных коронарорасширяющих веществ сердца с нейрогормонами К и С, что явилось бы подтверждением их кардиотропности.

В настоящей работе приведены данные о выделении и характеристике 3-х коронарорасширяющих соединений из сердечной мышцы крупного рогатого скота.

Материал и методика. Из сердечной мышцы крупного рогатого скота выделяли низкомолекулярные вещества по методу, описанному Галояном [4]. Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-10 (2×39), предварительно уравновешенной аммоний-ацетатным буфером, рН 4. Элюцию проводили вышеуказанным буфером со скоростью 20 мл/час. Активные в отношении коронарного кровообращения фракции подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии на колонке ДЭАЭ-целлюлозы (2×39), используя градиентную элюцию по следующей схеме: фосфатный буфер 0,005 М, рН 6,5, фосфатный буфер 0,02 М, рН 5,9, фосфатный буфер 0,1 М, рН 5,

0,02 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

0,1 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

0,5 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

Скорость элюции 40 мл/час. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) и пиридин—ацетат—вода (1:10:100). Хроматограммы окрашивали 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Для обнаружения циклических пептидов хроматограммы выдерживали в атмосфере газообразного хлора, опрыскивая 1%-ным раствором растворимого крахмала, содержащим 1%-ный йодистый калий, по методу Райдона и Смита [2]. Кардиотропную активность фракций определяли по изменению коронарного кровотока—объемную емкость крови—по известному методу [10]. Оптическую плотность полученных фракций при 230, 250, 260, 280 нм регистрировали на спектрофотометре СФ-4А и Unicam SP-800. Ферментативный гидролиз проводили трипсином и химотрипсином из расчета 250 и 125 мкг/мл соответственно в растворе Тироде, pH 8,4, в течение 6 час, щелочной—1 Н раствором NaOH (pH 8,1) в течение 6 час., кислотный—в 6 Н HCl в течение 24 час. при 105°. Под воздействием коронароактивных фракций, выделенных из сердца, определяли активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) по количеству гидролизованного субстрата 3',5'-аденозинмонофосфата—(цАМФ) в процессе его инкубации с ферментом. О гидролизе цАМФ судили по падению радиоактивности ^3H цАМФ, использованного в качестве маркера [8]. В работе применяли метод Пеха [11], модифицированный применением микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «СИЛУФОЛ UV-254» [1]. В качестве основных материалов использовали цАМФ фирмы Buchs SC (Швейцария); ^3H цАМФ с удельной активностью 22,1 кюри/мМ—New England Nuclear (США); 5-АМФ—Reanal (Венгрия) и пластины «СИЛУФОЛ UV-254»—Kavalier (Чехословакия).

Результаты и обсуждение. Выделение и очистка коронароактивных низкомолекулярных соединений. Ранее было показано наличие двух коронароактивных начал в сердечной мышце [9]. Нам удалось обнаружить третье активное начало, обладающее отличной от первых двух величиной R_f -распределительной хроматографии на бумаге. О наличии ряда кардиоактивных соединений в сердечной мышце свидетельствует профиль их элюции при гелевой фильтрации через сефадекс G-10 (рис. 1, 2). Коронарорасширяющие начала были сосредоточены в элюатах I, II и III пиков. Результаты исследований показали, что I коро-

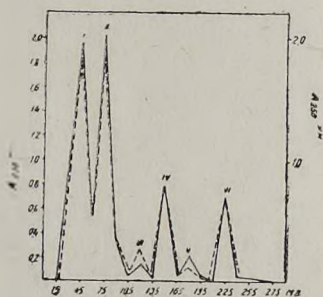


Рис. 1.

Рис. 1. Профиль элюции коронароактивных соединений сердца после гелевой фильтрации на сефадексе G-10. — на волне 230 нм. — — — на волне 250 нм.

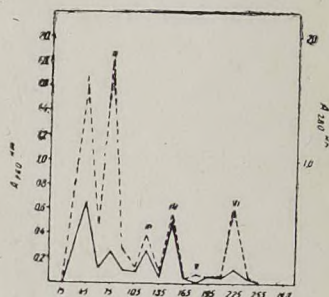


Рис. 2.

Рис. 2. Профиль элюции коронароактивных соединений сердца после гелевой фильтрации на сефадексе G-10. — на волне 280 нм. — — — на волне 260 нм.

нароактивная фракция, вышедшая в I пике (условно обозначенная как I активность), при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе элюируется единым пиком (рис. 3). Дальнейшая очистка этой фракции была осуществлена методом распределительной хроматографии на бумаге. Что касается остальных двух фракций, вышедших во II и III пиках (условно обозначенные нами как II и III активности), то они

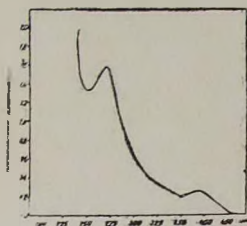


Рис. 3. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе I коронароактивной фракции.

ввиду малых количеств очищались только путем хроматографии на бумаге.

Биологическое испытание элюатов коронароактивных фракций показало, что указанные соединения несколько различаются. Через 20 мин после внутривенного введения I активной фракции отмечается увеличение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 200%, которое достигает максимума на 180-й мин. При этом наблюдается картина постепенного нарастания коронарорасширяющего эффекта, что характерно для нейрогормона С. При введении II и III активных фракций наблюдается более длительный латентный период—40 мин, и объемная емкость крови увеличивается лишь на 100—120% по сравнению с нормой.

После распределительной хроматографии на бумаге этих активных начал в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода 4:1:5 оказалось, что I активная фракция имеет величину R_f —, равную 0,35, II и III—0,52 и 0,05 соответственно. Интересно то, что все 3 коронарорасширяющие фракции, подобно нейрогормону С, сохраняли биологическую активность при всех видах гидролиза (ферментативного, щелочного, кислотного) [6]. Однако после кислотного гидролиза этих фракций оказалось, что они перемещаются, приобретая одну и ту же величину R_f —распределительной хроматографии, а именно 0,35, одновременно меняя параметры фармакологического воздействия. В частности, отмечается увеличение амплитуды, продолжительности действия и нарастание коронарорасширяющего эффекта, характерные для нейрогормона С. Это явление нельзя объяснить однозначно до выяснения первичной структуры этих веществ. Однако очевидно, что при кислотном гидролизе от кардиоактивных соединений отщепляется часть молекулы, обуславливая тем самым изменение коэффициента распределения на хроматограмме. Одинаковая величина R_f —всех 3-х фракций после кислотного гидролиза свидетельствует о наличии общего активного фрагмента, который не теряет своей биологической активности. С ним, по-видимому, связана специфика коронарорасширяющего эффекта.

При исследовании хроматограмм оказалось, что они не поглощали ультрафиолетовых лучей и одновременно были нингидринотрицательны. Известно, что циклические пептиды, сильно кислые или ацетилированные, вовсе не окрашиваются нингидрином или окрашиваются очень слабо. Поэтому мы дополнительно провели хлорирование хроматограмм по методу Райдона и Смита. Однако и этот метод не дал положительных результатов. Аналогичные данные были получены при исследовании химических свойств нейрогормона С. Сходство отмечено и в действии этих соединений на фосфодиэстеразу (ФДЭ) циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (ц 3',5'-АМФ). Ранее было обнаружено, что

Таблица

Изменение активности ФДЭ гомогената мозга крысы под действием коронарорасширяющих фракций, выделенных из сердца крупного рогатого скота

Фракции	Количество гидролизованного субстрата		Степень ингибции	Активность, ед/1 мл
	контроль	опыт		
I	74,4	3	70,4	4,6
II	80,8	26,8	54,0	3,5
III	79,8	29,8	50,0	3,25

За единицу активности принимали такое количество препарата которое ингибировало 1 миллиединицу цАМФ фосфодиэстеразы мозга за 1 мин.

под влиянием нейрогормона С ФДЭ гомогената сердца ингибируется на 24, в то время как ФДЭ гомогената мозга—на 81% по отношению к контролю [8]. Мы изучали влияние всех трех кардиоактивных соединений, полученных из сердца, на ФДЭ ц 3',5'-аденозинмонофосфата гомогената мозга. Как видно из таблицы, коронароактивная фракция ингибировала ФДЭ гомогената мозга на 70,4% по сравнению с нормой, что соответствует 4,6 единицам активности/мл данного элюата, II—на 54% (3,5 ед/мл) активности, III—на 50% (3,25 ед/мл). При тех же стандартных условиях опыта нейрогормон С проявлял активность, равную единице. Аналогичное действие нейрогормона С и коронароактивных соединений, выделенных из сердца, на уровень цАМФ в мозге, свидетельствует об их сходстве в механизме действия.

Расшифровка химической природы и структуры указанных соединений позволит выяснить идентичность их нейрогормону С.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.I 1979 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ՍՐՏԱՄԿԱՆՑ ԱՆՁԱՏՎԱԾ
ՊՍԱԿԱԶԵՎ ԱՆՈԹՆԵՐԸ ԴԱՅՆԱՑՆՈՂ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ՈՐՈՇ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ս. Ս. ՄԻՍԻՐԻԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆԻԱՆ, Մ. Ս. ԲԵՅԻԱՆ,
Գ. Ա. ՍԱՐԻԲԵԿԻԱՆ, Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Խոշոր հղջերավոր անասունների սրտամկանից անջատվել են պսակաձև անոթները լայնացնող երեք նյութեր, որոնք չունեն բնորոշ սպեկտր ուլտրա-մանուշակագույն ճառագայթների զոնայում և նինհիդրին դրական են:

Կարդիոակտիվ նյութերը թթվային, հիմնային և ֆերմենտատիվ հիդրո-լիզից հետո չեն կորցնում իրենց կենսաբանական ակտիվությունը: Նրանք ճնշում են ուղեղի ցիկլո-ԱՄՖ-ի ֆոսֆոդիէսթերազայի ակտիվությունը:

Վերոհիշյալ ավյալները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ սրտից անջատ-ված նյութերն իրենց ֆիզիկա-քիմիական և կենսաբանական հատկություննե-րով նման են նեյրոհորմոն C-ին:

ON SOME PROPERTIES OF CARDIOACTIVE COMPOUNDS
OF THE CATTLE HEART MUSCLE

S. S. MISIRIAN, R. M. SRAPIONIAN, M. B. BICHEIAN,
G. A. SARIBEKIAN, A. A. GALOYAN

Three cardioactive compounds have been isolated from the cattle heart muscle. It has been found that these compounds do not absorb ultraviolet rays, that they are ninhydrine negative and are not painted at chlorination. The compounds maintain their biological activity at all kinds of hydrolize and inhibit PDE cAMP of brain homogenate.

The conclusion is made that the compounds are alike the neurohor-mone "C".

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. А. Вопросы медицинской химии, 28, 2, 9, 1975.
2. Бэйли Дж. Методы химии белков, под ред. Браунштейна А. А., 1965.
3. Галоян А. А. В кн.: Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965.
4. Галоян А. А. Авторское свидетельство № 403214 (по заявке № 1208585, 1968).
5. Галоян А. А. Тез. докл. Всесоюзной конференции, посвященной 70-летию со дня рождения Х. С. Коштоянца, Ереван, 1971.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексанян Г. Г. ДАН АрмССР, 51, 2, 1970.
7. Галоян А. А., Оганян М. В., Геворкян Г. Г. ДАН АрмССР, 53, 4, 1971.
8. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вопросы биохимии мозга. 11, 1976.
9. Срапионян Р. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 56, 3, 1973.
10. Morawitz P. Z. and Zhan A. Dt. Arch. Klin. med. 116, 364, 1914.
11. Pösch G. Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharm. 268, 272, 1971.

КРЕАТИНКИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ БЕТА-ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕПЛОВОЙ НАГРУЗКИ

В. Б. МАТЮШИЧЕВ, В. Р. ТАРАТУХИН, В. Г. ШАМРАТОВА, Г. А. ЮЖАКОВА

Изучено действие внешнего бета-облучения (^{85}Kr) крыс и тепловой нагрузки раздельно и в комбинациях на креатинкиназную активность головного мозга и печени—через 5, 12, 19 и 26 суток после воздействий. Показано, что для обеих тканей гипертермия в целом отягощает последствия использования дозы 2,50 крад и резко снижает эффективность дозы 7,40 крад. Обнаружена тканевая специфичность пострадиационных изменений.

Внешнее бета-облучение при повышенной температуре окружающей среды является одним из типов радиационных воздействий, которым люди могут подвергаться в профессиональных условиях. Изучение последствий таких нагрузок представляется поэтому актуальным, тем более что реакция организма на бета-облучение необычна [4], состояние температурного стресса способно модифицировать течение лучевой болезни [1], а сама эта область не исследована. В настоящем сообщении приводятся данные о влиянии внешнего бета-облучения крыс, испытывающих тепловое напряжение, на креатинкиназную активность (ККА) тканей мозга и печени. Креатинкиназа—один из ключевых ферментов энергетического обмена—играет важную роль в процессах репарации радиационных повреждений клетки.

Материал и методика. Эксперименты проводились на 204 беспородных белых крысах-самцах массой 160—180 г: 60 интактных животных служили контролем, остальные 144 составили 9 подопытных групп (по 16 крыс в каждой). Животные 4 групп испытывали на себе комбинированное действие гипертермии и радиации. Крыс с эпилированным на площади около 35 см² участком спины выдерживали 4 час. в герметичной тепловой камере при температуре воздуха 36° и относительной влажности 80—90%. Одновременно с тепловой нагрузкой животных подвергали воздействию внешнего бета-излучения от ^{85}Kr в дозах 2,50; 3,05; 4,45 или 7,40 крад. Контроль эффектов комбинированных влияний осуществляли с помощью собственно тепловой нагрузки (1 группа) и раздельного бета-облучения в дозах 2,50; 3,05; 4,45 и 7,40 крад (4 группы).

Через 5, 12, 19 и 26 суток после воздействий по 3 крысы из каждой подопытной группы, а также 15 интактных животных декапитировали и определяли ККА [2] водных экстрактов больших полушарий головного мозга и печени. Ферментативную активность, выраженную в мкмоль прироста креатина в инкубационной пробе за 1 мин, пересчитывали на 1 мг экстрагированного белка. Для статистической обработки данных использовали дисперсионный анализ.

Результаты и обсуждение. Об общей эффективности конкретных доз радиации судили по величине средних за 4 срока наблюдения относительных отклонений от принятого за 100% уровня активности у интактных животных, а также по числу соответствующих им достоверных сдвигов. Согласно этим критериям (таблица) раздельное облучение в дозах 2,50; 3,05 и 4,45 крад малоэффективно и почти равноценно: пост-радиационные изменения для них составляют 16, 17, 15% и насчитывают соответственно 1,2 и 2 значимых отклонения. Наиболее эффективно бета-облучение в дозе 7,40 крад, вследствие чего ККА изменяется в среднем на 34% и обнаруживает 3 достоверных эффекта.

Т а б л и ц а

Креатинкиназная активность тканей крыс при бета-облучении организма в различных температурных условиях, % к контролю, принятому за 100

Ткань	Время после воздействия, сутки	Нормотермия, 20°					Гипертермия, 36°				
		доза облучения, крад									
		0	2,50	3,05	4,45	7,40	0	2,50	3,05	4,45	7,40
Мозг	5	100	89	76*	98	118	86	122	101	98	100
	12	100	73*	111	108	134*	121*	64*	124*	107	116
	19	100	112	81*	130*	158*	91	107	84	116	156*
	26	100	99	98	121*	79*	83	149*	113	117*	99
	СОО	0	16	17	15	34	17	34	14	11	18
Печень	5	100	80	44*	77	163*	46*	55*	68*	138*	114
	12	100	90	110	74*	60*	60*	95	148*	94	77*
	19	100	110	95	155*	121	73	110	103	125	95
	26	100	158*	129	167*	97	101	127	170*	147*	141*
	СОО	0	26	43	47	39	56	31	42	29	23

Примечание: Звездочкой отмечены случаи, когда $p < 0,05$; СОО—средние относительные отклонения от уровня нормы, принятого за 100%; абсолютные значения ККА (в мкмоль за 1 мин на 1 мг белка) в контроле составляют $2,18 \pm 0,04$ при $p = 56$ для мозга и $(22,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$ при $p = 45$ для печени.

Сопоставляя частные средние в градациях раздельного облучения, можно отметить тенденцию к угнетению ККА мозга при воздействии радиации в дозах 2,50 и 3,05 крад и ее стимулированию под влиянием доз в 4,45 и 7,40 крад. Причем различия в реакции ККА на низкие и высокие дозы касаются не только общей направленности изменений, но и их динамики. Так, при облучении в дозе 2,50 крад максимальные сдвиги активности выявляются на 2-й неделе, при дозе 3,05 крад—на 1-й и 3-й неделях наблюдения, к 4-му сроку определения ККА в обоих случаях нормализуется. При высоких радиационных нагрузках, напротив, частные средние значительно превышают физиологический уровень именно к концу периода регистрации. Для дозы в 4,45 крад достоверные сдвиги обнаружены на 3-й, 4-й неделях, облучение же в дозе 7,40 крад сопровождается повышением ККА на 2-й, 3-й неделях, а к 26-м суткам—спадом на 21% ниже значения активности у необлученных жи-

вотных. Как можно видеть, самые глубокие и резкие изменения ККА мозга вызывает бета-облучение в дозе 7,40 крад.

На результатах облучения крыс существенным образом отражается тепловое состояние организма. По критерию средних относительных отклонений наиболее эффективной дозой комбинированного облучения является доза в 2,50 крад (34%), остальные (3,05; 4,45; 7,40 крад) характеризуются незначительными и близкими между собой величинами этих показателей. В динамике изменений ККА мозга, фиксируемых после комбинированного облучения в дозе 2,50 крад, на протяжении всего пострadiaционного периода отмечаются волнообразные колебания активности. К 5-м суткам она повышена на 22, а уже на 12-е сутки ее величина оказывается на 56% ниже контрольной, затем ККА нормализуется, но к 26-м суткам вновь возрастает. Облучение в дозах 3,05; 4,45 и 7,40 крад не влечет за собой ни резких перепадов активности, ни значительных отклонений от физиологических значений: сдвиги направлены преимущественно в сторону повышения, а число их не превышает одного на каждую из доз. При этих воздействиях к концу первой недели экспозиции частные средние ККА практически не отличаются от показателей нормы. В последующем активность креатинкиназы увеличивается. Максимальные сдвиги отмечаются на 12-е сутки при воздействии в дозе 3,05 крад и на 19-е—в дозе 7,40 крад (отклонения средних от контроля составляют 24 и 56%), после облучения в дозе 4,45 крад увеличение активности достигает достоверных значений только к 26-м суткам (на 17%).

Как видно из таблицы, сама гипертермия вызывает незначительные изменения ККА мозга: достоверный эффект обнаружен лишь на 12-е сутки, в другие периоды отклонения от нормы несут существенны. Однако, несмотря на низкую термореактивность ККА, облучение в условиях высокой температуры окружающей среды оказывается на эффективности радиации заметным образом. Для дозы в 2,50 крад это находит выражение как в более широком по сравнению с отдельным облучением размахе варьирования частных средних, так и в большей длительности проявления эффекта. Что касается остальных доз, то здесь искажающее действие гипертермии характеризуется меньшей по сравнению с эффектом отдельного облучения выраженностью сдвигов и более поздним их обнаружением.

Иные отношения существуют в дисперсионном комплексе ККА печени. По величине среднего относительного отклонения (47%) и количеству достоверных сдвигов [3] наибольший эффект при отдельном облучении наблюдается при дозе 4,45 крад. Воздействие в дозах 3,05 и 7,40 крад дает менее ощутимые результаты, а самая низкая доза является одновременно и наименее эффективной. Во всех градациях раздельного облучения в течение пострadiaционного периода отмечается фазность изменений ферментативной активности, причем при облучении в дозах 2,50; 3,05 и 4,45 крад изменения в общем носят однотипный характер. К 5-м суткам ККА уменьшается соответственно на 20, 56, 23%,

и для доз 2,50; 4,45 крэд остается сниженной к 12-м суткам опыта. В дальнейшем ККА увеличивается, достигая к концу срока исследования максимальных значений: частные средние превосходят уровень нормы. При облучении в дозе 7,40 крэд резкие колебания активности наблюдаются только в первые две недели: достоверное повышение ККА на 63% к 5-м суткам и снижение на 40% ниже значения активности в контроле к 12-м. В дальнейшем ККА постепенно нормализуется.

Иная картина биохимических изменений в печени получается при облучении крыс в условиях гипертермии. Среди средних относительных отклонений наибольшая величина при 3-х достоверных сдвигах отмечена для дозы 3,05 крэд. Дозы в 4,45 (2 достоверных эффекта), 7,40 и 2,50 крэд оказались по этим показателям менее эффективными. Как и при раздельном облучении, изменения ферментативной активности после совместного воздействия радиационного и термического факторов имеют фазный характер. В сочетании с гипертермией бета-облучение в дозах 2,50 и 3,05 крэд вызывает к 5-м суткам достоверное понижение активности. Затем ККА в обоих случаях увеличивается, но с разной интенсивностью: постепенно и незначительно—при нагрузке в 2,50 крэд и резко, с перепадом до нормы—к 19-м суткам под воздействием дозы в 3,05 крэд. К концу периода наблюдения ферментативная активность достигает максимального для этих доз подъема. Для доз 4,45 и 7,40 крэд увеличение активности наблюдается уже с первой недели пострадиационного периода (отклонения частных средних равны 38 и 14%), но вслед за ним наступает спад уровня ККА к 12-м суткам, сменяющийся далее новым повышением с максимумом на 26-е сутки.

Влияние на ККА печени собственно гипертермии поначалу выражается в значительном угнетении ферментативной активности—на 5-е сутки она понижена по сравнению с контрольным уровнем более чем в 2 раза, в последующем эффект уменьшается: на 12-е сутки активность ниже нормы на 40, а на 19-е—на 27%, к концу посттермального периода ККА стабилизируется окончательно. Однако, как можно убедиться, повышенная температура среды не влечет за собой заметного снижения эффективности бета-облучения животных. В то же время необходимо подчеркнуть особенности действия отдельных доз комбинированного облучения. Так, гипертермия в сочетании с облучением в дозе 2,50 крэд снижает ККА сравнительно с ее уровнем при раздельном облучении, а в комбинации с дозой 3,05 крэд, наоборот, увеличивает. При более высоких дозовых нагрузках происходит то относительное увеличение, то снижение ККА.

Сопоставляя результаты исследования пострадиационной ККА мозга и печени, нельзя не отметить некоторые общие черты изменений активности в обеих тканях—как в мозге, так и в печени при комбинированном облучении повышается эффективность самой низкой дозы радиации и, напротив, резко падает в сравнении с раздельным облучением эффективность максимальной из используемых доз. Но если проследить за динамикой сдвигов ККА, выявляется специфичность пострадиа-

ионных реакций: в мозге сопряженное действие термического фактора для 3-х из 4-х применявшихся доз на протяжении всего периода наблюдения приводит к ослаблению радиационного эффекта, тогда как в изменениях активности печени нет единообразия. Это обстоятельство проще всего было бы объяснить значительным угнетением ККА печени в условиях гипертермии, создающим фон, который и вносит диссонанс в протекание биохимических процессов при облучении. Однако возникает вопрос, почему присутствие одного и того же фона проявляется по-разному. Очевидно, взаимодействие термо- и радиосоставляющих отдельных комбинаций протекает избирательно и к тому же опосредованным путем [3]. Характер пострadiационного поведения ККА печени определяется, по всей вероятности, структурным и метаболическими особенностями гепатоцитов.

ЛГУ, кафедра биохимии биолого-почв. ф-та

Поступило 25.IX 1978 г.

**ԱՌՆՅՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՄԱՆԻՏԵՐԻ ԿՐԵԱՏԻՆԿԻՆԱԶՍԻՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՅՐԳԱՆԻՉՄԻ Բ-ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ
ԵՎ ԳԵՐՋԵՐՄԱՅՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Վ. Բ. ՄԱՏՅՈՒՇԻՉԵՎ, Վ. Ռ. ՏԱՐԱՏՈՒԽԻՆ, Վ. Գ. ՇԱՄՐԱՏՈՎԱ, Գ. Ա. ՅՈՒԺԱԿՈՎԱ

Ուսումնասիրվել է առանձին, ինչպես նաև կոմբինացված արտաքին β -ճառագայթման (85 K Γ ՝ 2,50; 3,05; 4,45; 7,40 կրադ) և գերջերմացման (36°, օդի հարաբերական խոնավության 80, 90%, 4 ժամվա ընթացքում) ազդեցությունը զլխուղեղի և լյարդի կրեատինկինազային ակտիվության վրա (5, 12, 19, 26 օր ազդեցությունից հետո): Ուսումնասիրված հյուսվածքների համար ցույց է տրված, որ գերջերմացումը ուժեղացնում է ճառագայթահարության ազդեցությունը 2,50 կրադ դոզայի դեպքում և խիստ իջեցնում է այն 7,40 կրադ դոզայի դեպքում: Հաշտնաբերված է ետճառագայթահարության փոփոխությունների հյուսվածքային յուրահատկությունը:

**CREATINE KINASE ACTIVITY OF RAT TISSUES UNDER
COMBINED EFFECT ORGANISM OF BETA-IRRADIATION
AND HEATING**

V. B. MATYUSHICHEV, V. R. TARATUKHIN, V. G. SHAMRATOVA,
G. A. YUZHAKOVA

The effect of beta-irradiation and heating on creatine kinase activity of rat brain and liver has been studied. It has been shown that for both tissues hyperthermia reduces the effectiveness of some irradiation doses.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Антипов В. В., Давыдов Б. И., Вериго В. В., Свирижев Ю. М. В сб.: Основы космической биологии и медицины, 2, 2, 243, 1975.
2. Лызлова С. Н., Тхоржевская З. С., Ашмарин И. П. В сб.: Ферменты в эволюции животных, 3, М., 1969.
3. Свердлов А. Г. В сб.: Радиационное поражение организма, 60, М., 1976.
4. Себрант Ю. В. Биологическое действие внешнего бета-облучения, М., 1970.

Таблица 1

Влияние α -токоферилацетата на содержание общих SH-групп в печени, мозге и крови крыс после ожога (количество SH-групп выражено в ммоль/100 г свежей ткани)

Ткань	Контроль- ные крысы	О ж о г						О ж о г + α -токоферилацетат					
		сразу после ожога	ч е р е з					сразу после ожога	ч е р е з				
			1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней		1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней
Печень	$1,53 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$0,95 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$1,21 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$1,25 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$1,69 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$1,72 \pm 0,05$ $P < 0,001$	$1,47 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$1,34 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$1,31 \pm 0,07$ $P > 0,05$	$1,45 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$1,52 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$1,50 \pm 0,06$ $P < 0,01$
Мозг	$1,02 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,07$ $P < 0,001$	$0,88 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$0,93 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$1,06 \pm 0,03$ $P > 0,05$	$1,14 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$1,30 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$0,99 \pm 0,06$ $P > 0,05$	$0,97 \pm 0,02$ $P < 0,05$	$0,99 \pm 0,02$ $P > 0,01$	$1,03 \pm 0,02$ $P > 0,05$	$1,01 \pm 0,01$ $P < 0,01$	$1,03 \pm 0,01$ $P < 0,001$
* Кровь	$20,5 \pm 0,3$	$16,9 \pm 0,8$ $P < 0,001$	$16,3 \pm 0,4$ $P < 0,001$	$14,0 \pm 0,28$ $P < 0,001$	$18,8 \pm 0,3$ $P < 0,001$	$20,8 \pm 0,1$ $P > 0,05$	$21,2 \pm 0,8$ $P > 0,05$	$21,3 \pm 0,2$ $P < 0,001$	$19,7 \pm 0,4$ $P < 0,005$	$17,4 \pm 0,2$ $P < 0,001$	$19,9 \pm 0,3$ $P < 0,05$	$20,2 \pm 0,2$ $P < 0,01$	$20,6 \pm 0,2$ $P < 0,01$

* Здесь и в других таблицах количество SH-групп выражено в ммоль/100 мл крови.

Таблица 2

Влияние α -токоферилацетата на содержание небелковых SH-групп в печени, мозге и крови крыс после ожога (количество SH-групп выражено в ммоль/100 г свежей ткани)

Ткань	Контроль- ные крысы	О ж о г						О ж о г + α -токоферилацетат					
		сразу после ожога	ч е р е з					сразу после ожога	ч е р е з				
			1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней		1 час	1 день	3 дня	7 дней	15 дней
Печень	$0,25 \pm 0,007$	$0,12 \pm 0,007$ $P < 0,001$	$0,16 \pm 0,005$ $P < 0,001$	$0,22 \pm 0,005$ $P > 0,05$	$0,22 \pm 0,005$ $P > 0,05$	$0,23 \pm 0,005$ $P > 0,05$	$0,26 \pm 0,009$ $P > 0,05$	$0,24 \pm 0,003$ $P < 0,001$	$0,23 \pm 0,003$ $P < 0,001$	$0,24 \pm 0,005$ $P > 0,05$	$0,23 \pm 0,005$ $P > 0,05$	$0,24 \pm 0,003$ $P > 0,05$	$0,24 \pm 0,004$ $P > 0,05$
Мозг	$0,21 \pm 0,004$	$0,17 \pm 0,002$ $P < 0,001$	$0,18 \pm 0,008$ $P < 0,01$	$0,19 \pm 0,009$ $P > 0,05$	$0,21 \pm 0,002$ $P > 0,05$	$0,24 \pm 0,002$ $P < 0,001$	$0,25 \pm 0,007$ $P < 0,001$	$0,20 \pm 0,004$ $P < 0,02$	$0,21 \pm 0,005$ $P < 0,01$	$0,21 \pm 0,007$ $P < 0,05$	$0,21 \pm 0,006$ $P > 0,05$	$0,22 \pm 0,007$ $P > 0,05$	$0,21 \pm 0,005$ $P < 0,001$
* Кровь	$1,7 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$1,3 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$1,0 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$1,5 \pm 0,03$ $P < 0,005$	$1,9 \pm 0,04$ $P < 0,02$	$1,7 \pm 0,02$ $P > 0,05$	$1,8 \pm 0,04$ $P < 0,001$	$1,7 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$1,5 \pm 0,01$ $P < 0,001$	$1,7 \pm 0,03$ $P < 0,001$	$1,7 \pm 0,02$ $P < 0,001$	$1,7 \pm 0,08$ $P > 0,05$

УДК 577.154.246: (547.392.4+547.395/396)

ВЛИЯНИЕ НЖК И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕОКИСЛЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ

Л. А. ЧИЛИНГАРЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Исследовали влияние олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, а также продуктов их переокисления на активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс в различные сроки введения (7 и 14 дней). Установлено, что под влиянием названных агентов активность β -глюкуронидазы возрастает в прямой зависимости от ненасыщенности кислоты и степени ее пероксидации. Через 7 дней от начала введения активность достигает максимума, понижается к 15-му дню, не доходя, однако, до нормальных показателей.

Известно, что фермент β -глюкуронидаза (КФ 3.2.1.31) представлен почти во всех тканях животных, преимущественно в лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме.

Как известно, нормально функционирующая клетка имеет твердо закрепленный ферментный остов, определенные ферментные системы, деятельность которых регулируется законами их компартментализации в клетке и закрепленностью в мембранных образованиях цитологических структур. В лизосомах клеток известно более 60 гидролитических ферментов, расщепляющих большинство сложных веществ и биополимеров в организме. Наиболее чувствительным аппаратом в аварийных для организма ситуациях, связанных с высокой степенью напряжения метаболических процессов при репарации, регенерации [10], экстремальных физических нагрузках и стрессе [4] являются лизосомы. β -глюкуронидазу—фермент с широким функциональным назначением, в последнее время нередко используют в качестве маркерного фермента лизосом [21, 23].

Мы поставили перед собой цель изучить активность β -глюкуронидазы в мозге и печени белых крыс под влиянием ненасыщенных жирных кислот и продуктов их переокисления, инициирующих в организме цепную реакцию свободнорадикального окисления.

Материал и методика. Опыты были поставлены на белых крысах-самцах, массой 120—130 г. Контролем служили интактные крысы. Подопытные были разделены на 2 группы: первой—вводили внутривенно ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) (олеиновую, линолевую, линоленовую) в дозе 0,1 г на 100 г массы животного; второй—в той же дозе, пероксидированные НЖК. Пероксидация достигалась продуванием воздуха через НЖК при температуре 60°. Перекисное число составляло для олеиновой кислоты—300, для линолевой и линоленовой—400.

Животных замораживали в жидком воздухе и через 7 и 14 дней после введения соответствующей жирной кислоты извлекали исследуемые ткани (мозг и печень). Активность фермента определяли по методу Колдовски и др. [17] в некоторой нашей модификации.

Готовили 1%-ные гомогенаты тканей на бидистиллате при 0° с помощью тefлонового гомогенизатора, с последующим разведением печеночного гомогената до 0,1%. Инкубационная смесь состояла из 2 мл ацетатного буфера с pH 4,0, содержащего три-Ион-X-100 р-нитрофенил-β-d-глюкуронида (фирмы Calbiochem, Calif.) в конечной концентрации 0,5 ммоль и 1 мл гомогената. Общий объем смеси составлял 4,0 мл. Смесь помещали на 60 мин в термостат при 37°. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 М K₂CO₃ с образованием желтой окраски высвободившегося р-нитрофенила. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при 420 нм на Spectrophot-203. Активность фермента выражали в мкмоль/мг белка/60 мин. Содержание белка в гомогенатах определяли по Лоури [18] с использованием в качестве рабочих стандартов кристаллического бычьего сывороточного альбумина («Koch-light», Англия).

Результаты и обсуждение. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, перексидированная олеиновая кислота через 7 суток после начала введения повышает активность

Таблица 1

Активность β-глюкуронидазы в мозге белых крыс при различных сроках введения НЖК и продуктов их перексидации, мкМ/мг белка

Контроль- ные крысы	Вводимые кислоты	Подопытные крысы			
		через 7 дней	% изме- нения	через 14 дней	% изме- нения
0,083±0,005 (16)	Олеиновая	0,121±0,009 (8) p<0,001	45,7	0,101±0,004 (8) p<0,001	21,6
	Перексидированная олеиновая	0,192±0,007 (5) p<0,001	131,4	0,122±0,005 (12) p<0,001	47,0
	Линолевая	0,146±0,009 (10) p<0,001	75,9	0,132±0,007 (16) p<0,001	59,0
	Перексидированная линолевая	0,211±0,01 (9) p<0,001	154,2	0,136±0,006 (7) p<0,001	60,2
	Линоленовая	0,169±0,007 (14) p<0,001	103,6	0,14 ±0,006 (21) p<0,001	68,6
	Перексидированная линоленовая	0,237±0,01 (12) p<0,001	185,5	0,182±0,007 (7) p<0,001	119,2

Примечание: в обеих таблицах в скобках указано количество животных.

β-глюкуронидазы на 45,7%, спустя 14 суток активность фермента хотя и понижается, однако остается выше контроля на 21,6%. Линолевая кислота повышает активность β-глюкуронидазы в мозге через 7 суток на 75,9%, падая через 14 суток до 59% по сравнению с контролем, а линоленовая кислота—до 103,6 и 68,6% соответственно. Можно заметить

Таблица 2

Активность β -глюкуронидазы в печени белых крыс в различные сроки введения НЖК и продуктов их перекисаации, мкМ/мг белка

Контроль- ные крысы	Вводимые кислоты	Подопытные крысы			
		через 7 дней	% изме- нения	через 14 дней	% изме- нения
1,14 $\pm$ 0,05 (17)	Олеиновая	1,385 $\pm$ 0,05 (14) $p < 0,02$	21,5	1,29 $\pm$ 0,08 (7) $p < 0,05$	13,2
	Пероксидированная олеиновая	2,08 $\pm$ 0,04 (5) $p < 0,001$	82,5	1,55 $\pm$ 0,12 (9) $p < 0,01$	35,9
	Линолевая	1,559 $\pm$ 0,06 (10) $p < 0,001$	36,2	1,37 $\pm$ 0,03 (19) $p < 0,01$	20,1
	Пероксидированная линолевая	2,843 $\pm$ 0,06 (7) $p < 0,001$	149,3	1,37 $\pm$ 0,03 (7) $p < 0,001$	58,8
	Линоленовая	1,72 $\pm$ 0,08 (18) $p < 0,001$	50,8	1,36 $\pm$ 0,05 (14) $p < 0,05$	19,2
	Пероксидированная линоленовая	3,25 $\pm$ 0,14 (7) $p < 0,001$	185,0	2,185 $\pm$ 0,1 (7) $p < 0,001$	91,6

Большую чувствительность β -глюкуронидазной активности к НЖК по мере возрастания двойных связей в молекуле жирной кислоты.

При введении пероксидированных НЖК заметны более глубокие сдвиги. Так, пероксидированная олеиновая кислота через 7 суток повышает активность β -глюкуронидазы в мозге более, чем в 2 раза, линолевая—на 154,2%, а линоленовая—почти в 3 раза. Через 14 суток уровень активности β -глюкуронидазы при всех затравках пероксидированными жирными кислотами соответственно понижается до 47,0, 60,2 и 119,2%, однако остается выше уровня активности интактных животных. Таким образом, наивысшая активность β -глюкуронидазы в мозге наблюдается под влиянием пероксидированной линоленовой кислоты через 7 суток после начала введения.

При анализе данных об активности фермента в печеночной ткани выявлены аналогичные сдвиги в активности фермента под влиянием НЖК и продуктов их переокисления (табл. 2). Через 7 суток после введения непероксидированной олеиновой кислоты наблюдается повышение активности β -глюкуронидазы на 21,5%, через 14—активность понижается, доходя до 13,2%, под влиянием линолевой и линоленовой кислот через 7 суток активность соответственно повышается до 36,2 и 50,8 и понижается через 14—до 20,1 и 19,2%.

Под влиянием пероксидированных НЖК наблюдаются более глубокие сдвиги: так, на 7-е сутки активность фермента повышается под влиянием олеиновой, линолевой и линоленовой соответственно на

82,5; 149,3 и 185%, а через 14 суток она, хотя и несколько понижается, однако все еще превышает контрольный уровень соответственно на 35,9; 58,8 и 91,6%.

Согласно нашим данным, мозговая ткань в целом несколько более чувствительна к введению НЖК и продуктов их перекисления, чем печеночная. Следует отметить особенности распределения β -глюкуронидазной активности в мозге. Работами Аллена и др. [14] показано, что в мозговой ткани β -глюкуронидазная активность в различных отделах мозга представлена неодинаково. Белое вещество обладает значительно большей активностью, чем серое; причем если в сером веществе фермент имеет исключительно лизосомальную локализацию, то в белом он представлен и в лизосомах (глиальных клетках) и преимущественно вне лизосом (в неидентифицированной фракции и во фракции микросом).

Установлено, что жирнокислотный состав фосфолипидов биомембран лизосом меняется в зависимости от жирнокислотного состава питания [11, 16]. Акоста и др. показали [13], что даже в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ свободные жирные кислоты заметно лабилизируют мембраны лизосом миоцитов сердца. Введение НЖК и продуктов их перекисления вызывает значительное повышение активности β -глюкуронидазы, что, возможно, тоже обусловлено лабильностью лизосомных мембран особенно через 7 суток после введения этих кислот и находится в четкой зависимости от степени их ненасыщенности и перекисленности. В этом аспекте представляют интерес данные Мелик-Агаян [7] о максимальном уровне липидных перекисей в печени через 7 суток после введения хлоропрена, перекисный механизм действия которого хорошо известен из работ Мхитаряна [8]. В тот же срок показано резкое снижение содержания витамина Е с жировой дистрофией при гистохимическом исследовании [2]. По данным Буниана и соавт. [15], Мура и соавт. [19], недостаток витамина Е вызывает в свою очередь резкое нарушение стабильности мембран лизосом.

В литературе имеются также многочисленные данные о высокой активности β -глюкуронидазы при радиобиологическом воздействии [3]. Одни авторы объясняют это механизмом разрыва лизосомальных мембран и солиubilизацией их ферментов, другие же—первичным разрушением антиоксидантов в клетке [24, 25].

Козловым и соавт. [6] показано накопление продуктов свободно-радикального окисления—липоперекисей при злокачественном росте в липидах мембран органелл печени (ядер, митохондрий, микросом, лизосом).

При злокачественных новообразованиях активность β -глюкуронидазы также возрастает [20, 22], так что при некоторых видах опухолей определение β -глюкуронидазной активности служит даже вспомогательным тестом в диагностике.

Зайцев [5] выявил достоверное повышение активности β -глюкуронидазы в сыворотке крови при различных гепатитах, одновременно по-

казав связь между глубиной паренхиматозных изменений в печени и степенью солиubilизации лизосомальных ферментов, что объясняется степенью повреждения лизосомальных мембран

По данным Абегаи и др. [1], при вирусном гепатите наблюдается резкое повышение содержания липидных перекисей в крови с активацией ряда других ферментов, что объясняется повышением мембранной проницаемости гепатоцитов под влиянием липидных перекисей.

Повышение активности β -глюкуронидазы под влиянием ненасыщенных жирных кислот и продуктов их перекисления, по-видимому, связано также с накоплением продуктов свободнорадикального окисления, имеющих кислую реакцию, вследствие чего увеличивается атакуемость ферментов лизосом, и встроенные в мембраны гидролазы реагируют резким возрастанием специфической активности [11].

Резкое повышение активности β -глюкуронидазы под влиянием ИЖК и продуктов их перекисидации обосновывается данными Несмеянова и др. [9] о необходимости свободной карбоксильной группы для непосредственной инициации активности β -глюкуронидазы.

Возможно, одним из индукторов распада глюкуронидов может быть переключение углеводного обмена в условиях высокой липидной перекисидации на альтернативные пути: на пентозный цикл [12] и частично на глюкуронатный путь с целью синтеза пентоз и НАДФН₂, столь необходимого в ряде биосинтетических реакций организма, и в том числе для стероидных гормонов, выполняющих регуляторную функцию как в отношении липидной перекисидации в целом, так и в регуляции активности β -глюкуронидазы в частности.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 15.III 1979 г.

**ՋԱԳԵՑԱԾ ՃԱՐՊԱԹՐՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՅՄԱՆ
ԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒՅՈՒՆԸ ԱՌԵՏՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ
ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ β -ԴԼՅՈՒԿՈՒՐՈՆԻԴԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ**

Լ. Ա. ԶԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԻՆԻՍԻՍԻԱՆ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է շագանակա ճարպաթթուների (օլենինաթթվի, լինոլաթթվի և լինոլենաթթվի) և նրանց գերօքսիդացման արգասիքների ազդեցությունն ուղեղի և լյարդի β -գլյուկուրոնիդազայի ակտիվության վրա: Ճարպաթթուները ներարկվել են ներորոգայնային 7 և 14 օրվա ընթացքում:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ β -գլյուկուրոնիդազայի ակտիվության բարձրացումը կախված է ճարպաթթվի շագանակաթթուներից և պերօքսիդացման աստիճանից: Ընդ որում, առավելագույն ակտիվացում նկատվում է ներարկումից 7 օր հետո, այնուհետև ֆերմենտի ակտիվությունը իջնում է, սակայն 15-րդ օրը դեռ մնում է նորմայից բարձր:

CHANGES OF β -GLUCURONIDASE ACTIVITY IN RAT BRAIN AND LIVER

L. A. CHILINGARIAN, V. G. MKHITARIAN

Unsaturated fatty acids and their hydroperoxydes have been administered to rats causing the increase of β -glucuronidase activity by the 7-th day and its decrease by the 14-th day. The activity was proportional to the degree of acid unsaturation and peroxidation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абагян И. А., Казазян А. В., Мхитарян В. Г. Журн. эксп. и клин. медицины, 15, 173, 1976.
2. Аллавердян А. Г. Тр. Инст. гигиены и проф. заболеваний, 1, 139, 1970.
3. Бак З., Александр П. Основы радиобиологии (пер. с англ.), 232, М., 1963.
4. Валякина Т. И., Васильева Н. Б., Малькова В. П., Габриелян Н. Д., Хорлин А. Я. Биохимия, 40, 733, 1975.
5. Зайцев В. В. Автореф. канд. дисс. М., 1974.
6. Козлов Ю. П. Тр. Московского общества испытателей природы. Биоантиокислители. 52, 5, 1975.
7. Мелик-Агаян Е. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1975.
8. Мхитарян В. Г. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1964.
9. Несмеянов Б. А., Зурабян С. О., Сосинская И. Е., Хорлин А. Я. Биохимия, 39, вып. 1, 141, 1974.
10. Покровский А. А., Арчаков А. Н., Мухамбетова Л. Х., Бурмантова Н. П., Аленичева Т. В., Жеребкова Н. С. Цитология, 11, 79, 1969.
11. Покровский А. А., Тутельян В. А., Лизосомы, М., 128, 1976.
12. Семерджян Л. В., Мхитарян В. Г. Журн. эксп. и клин. медицины, 17, 4, 11, 1977.
13. Acosta D. & Wenzel D. G. Atherosclerosis, 20, 417, 1974.
14. Allen N. & Kirmenjian H. K. J. Neurochemistry, 16, 1113, 1969.
15. Bunyan J., Green J., Diplock A. T., Robinson D. Brit. J. Nutr., 21, 127, 137, 147, 1967.
16. Henning R., Kaulen H. D., Stoffel W. Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem., 351, 1191, 1970.
17. Koldovsky O., Palmiery M., Jumavan J. Comp. Biochem. Physiol., 43B, 1, 1972.
18. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
19. Moore T., Sharman I. M., Stanton M. G., Dingle J. T. Biochem. J., 103, 923, 1967.
20. Shuttleworth E. C. & Allen N. Neurol., 18, 534, 1968.
21. Stahn B., Maier K., Hanning K. J. Cell. Biol., 66, 576, 1970.
22. Watts G., Mac Vigar J. & Goldbarg D. M. Brit. J. Cancer, 20, 282, 1966.
23. Werb Z., Cohn L. J. Exptl. Med., 135, 21, 1972.
24. Wills E. D., Wilkinson A. E. Biochem. J., 99, 657, 1966.
25. Wills E. D., Wilkinson A. E. Radiat. Res, 31, 372, 1937.

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННЫХ I- И D-ФОРМ ГЛИКОГЕНСИНТЕТАЗЫ МОЗГА КРЫС

Ц. М. СУДЖЯН

Из мозга крыс выделены и частично очищены I- и D-формы гликогенсинтетазы. Изучение их кинетических свойств показало, что K_m для УДФ глюкозы I-формы гликогенсинтетазы мозга снижается в присутствии глюкозо-6-фосфата. D-форма фермента активна только в присутствии относительно высокой его концентрации.

Лелуар и соавт. [6—8] показали, что основным ферментом, регулирующим биосинтез гликогена, является гликогенсинтетаза (ГС). В мозговой и других тканях этот фермент присутствует в зависимой (D) и не зависимой (I) от глюкозо-6-фосфата молекулярных формах. В наших предыдущих исследованиях [1] было показано, что изменение функциональной активности высших отделов ЦНС как под воздействием естественных физиологических раздражителей, так и психотропных веществ оказывает влияние на активность I- и D-форм ГС в мозговой ткани.

Кинетические свойства ГС мозга были изучены при выделении фермента на уровне гомогената [3, 10]. Однако I- и D-формы фермента не были выделены отдельно. В настоящем исследовании нами выделены, частично очищены I- и D-формы ГС мозга крыс и изучены их кинетические свойства.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Выделение и очистку I- и D-форм ГС (УДФГ: гликоген- α -4-глюкозил трансфераза, КФ 2. 4.1.11) проводили по методу Пассонье и Шварца [11] в нашей модификации, заключающейся в том, что при выделении I- и D-форм фермента крыс замораживали в жидком азоте; гомогенизацию ткани проводили в четырехкратном объеме 25 мМ триса, pH 7.5, содержащего 1 мМ ЭДТА, вместо 5 мМ дитиотрентола добавляли 5 мМ 2-меркаптоэтанола (трис-МЭ-ЭДТА). Все процедуры проводили при 0—4°.

При выделении I-формы гомогенат центрифугировали при 8000 g. К надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до концентрации 2 М, поддерживая pH 7,5 гидроокисью аммония. Через 30 мин центрифугировали. Осадок диализовали в течение 24 час. против трис-МЭ-ЭДТА буфера, затем диализат центрифугировали для удаления денатурированного белка. В дальнейшем добавляли кальций фосфатный гель, приготовленный по Кайлину и Хартри [4], в котором отношение концентрации белка в растворе к твердому гелю составляло 1:0.25. Гель осаждали центрифугированием и промывали тем же буфером в объеме, равном объему диализуемой жидкости. Фермент с геля элюировали 0.2 М фосфатным буфером, pH 7.5, дважды, объемом, эквивалентным объему диализата до обработки гелем. Затем солиubilизированный

фермент концентрировали осаждением 1 М сульфатом аммония и нейтрализовали описанным выше методом. Осадок диализовали против 100 объемов трис-МЭ-ЭДТА в течение ночи. Диализованный раствор наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (ДЕ-32 фирмы Whatman, Англия), размерами 1,3×6,0 см, предварительно уравновешенную трис-МЭ-ЭДТА буфером. Эфлюент собирали по 3,3 мл с помощью коллектора с охлаждающей системой марки Műtem (Венгрия), измеряли во фракциях оптическую плотность при 280 нм и определяли активность ГС. Наибольшая активность фермента отмечалась во фракциях 36—40. Эти фракции собирали и концентрировали вакуумным диализом.

Выделение и очистку D-формы ГС проводили вышеописанным способом с некоторыми добавлениями. Мозг крыс гомогенизировали в 4-х объемах трис-МЭ-ЭДТА, содержащего 20 мМ KF, и центрифугировали при 8000 g. К надосадочной жидкости добавляли равное ей количество 50 мМ N-трис (гидроксиметил) метил-2-аминоэтан сульфоновой кислоты (ТЭС) буфера, pH 7,0, содержащего 50 мМ KF, 20 мМ MgCl₂, 0,6 мМ этилен гликол-бис (β-аминоэтиловый эфир) N,N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТК), 20 мМ теофиллина, 20 мМ АТФ и 20 мкмоль циклического 3',5'-АМФ. На этом этапе I-форма ГС в присутствии протепинкиназы в гомогенате [12] переходит в D-форму. Температуру полученной смеси доводили до 30° и инкубировали в течение 20 мин. Добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 2 М, приводили к pH 7,5 с помощью гидроксида аммония и осадок собирали. Солюбилизацию кальций фосфатным гелем и второе сульфат аммонийное осаждение проводили так же, как и для I-формы, но в присутствии 20 мМ KF. После диализа, когда некоторая часть активности ГС была вновь обращена в I-форму, диализованную фракцию снова инкубировали с описанным выше ТЭС реагентом. ДЕ-32 колоночную хроматографию проводили так же, как и для I-формы фермента.

Активность ГС определяли измерением количества УДФ, образующегося из УДФ-глюкозы (УДФ) в присутствии гликогена; содержащее УДФ —примененнем пируваткиназы (ПК), катализирующей перенос фосфата из фосфоэнолпирувата (ФЭП) на УДФ с образованием УТФ и пирувата. Количество освободившегося пирувата эквивалентно содержанию УДФ [9]. Для определения активности ГС в присутствии глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) брали 0,03 мл смеси, содержащей равные количества 0,75 М глицинового буфера с 0,025 М ЭДТА (pH 8,5), 0,05 М Г-6-Ф и 40 мг/мл гликогена, добавляли 0,005 мл 0,03 М цистина, 0,005 мл фермента, 0,01 мл УДФГ (в 1 мл 25×10⁻⁷ М). Различные концентрации УДФГ и Г-6-Ф, используемые при изучении кинетических свойств I- и D-форм ГС, приведены в соответствующих опытах. При определении активности ГС в отсутствие Г-6-Ф вместо него добавляли глициновый буфер. Смесь инкубировали 10 мин при 37°, кипятили 2 мин при 100°. Затем добавляли по 0,025 мл 0,01 М ФЭК и ПК (0,1 г в 20 мл). Содержимое пробирок инкубировали 15 мин при 37°, добавляли 0,15 мл 0,1%-ного динитрофенилгидразина, через 5 мин прибавляли 0,2 мл 10 н NaOH и 2,2 мл этанола. Оптическую плотность измеряли при 520 нм в кювете 1 см. Г-6-Ф, УДФ и ФЭП—фирмы Sigma, ПК—фирмы Reanal.

Результаты и обсуждение. Процедура очистки I-формы ГС позволила повысить ее удельную активность примерно в 100 раз. Выход составлял 23%. В течение очистки доля I-формы ГС повышается от 72 до 94%. Удельная активность ее достигает 170,8 мкмоль УДФ/мг белка/мин. Типичная схема очистки D-формы ГС мозга представлена в табл. 1.

Доля D-формы фермента с 8% на первом этапе повышается и достигает 96% на этапе первого перехода I в D (активность фермента при этом измеряли в присутствии и в отсутствие Г-6-Ф). На последующих этапах процент D-формы был понижен несмотря на присутствие KF, подавляющего фосфатазную активность. Доля D-формы ГС достигает

Таблица 1

Очистка D-формы ГС мозга крыс

Фракции	Объем фракции, мл	Белок, мг/мл	Общая актив- ность, ммоль УДФ/мин	Удельная актив- ность, ммоль УДФ/мг/мин	Выход %	% D	Степень очистки
Гомогенат	84,0	20,16	2743,40	1,62	100	8	1
Первый I D переход	98,0	1,83	1226,96	6,84	44	96	4,1
2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ осадение	6,0	17,40	745,20	7,14	27	81	4,4
Элюат с кальций фосфатного геля	25,5	2,88	671,99	9,12	24	79	5,6
1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ осадение	1,4	11,94	482,0	28,80	17	72	17,8
Второй I D переход	2,8	5,70	480,0	30,0	17	97	18,5
DE-32 колонка концентрированная	0,9	3,20	445,60	154,70	16	97	95,5

97% при повторной инкубации со смесью, необходимой для перехода I- в D-форму. Этот процент сохраняется и на этапе колоночной хроматографии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемый метод выделения и очистки I- и D-форм ГС приемлем для тканей с низкой ферментативной активностью, в частности для мозга.

Согласно данным литературы, инкубация очищенной ГС с гликогеном приводит к активации фермента [11, 13]. Результаты опытов, полученные нами при изучении влияния инкубации с гликогеном на активность I-формы ГС, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Активность I-формы ГС мозга при преинкубации с гликогеном и без него

Фракции	Активность I-формы ГС, ммоль УДФ мл/мин		Отношение с гликогеном/без
	без гликогена	с гликогеном	
Гомогенат	38,80	43,30	1,18
2 M (NH ₄) SO ₄ осадок	231,61	357,41	1,50
Элюат с кальций фосфатного геля	134,56	457,50	3,40
1 M (NH ₄) SO ₄ осадок	1624,70	3736,80	2,80

Время преинкубации фермента с гликогеном—15 мин при 37°.

Из приведенных данных видно, что преинкубация фермента с гликогеном повышает его активность во всех исследуемых фракциях. Она повышается в 3,5 раза на этапе элюата с кальций фосфатного геля. Исходя из полученных данных в последующем мы изучали влияние различных сроков инкубации фермента с гликогеном на активность очищенных I- и D-форм ГС.

Из табл. 3 следует, что активность как D-, так и, особенно, I-формы ГС возрастает при инкубации фермента с гликогенной «затравкой».

Таблица 3

Влияние инкубации с гликогеном на активность очищенных D- и I-форм ГС мозга

Время преникубации, мин	D-форма ГС	I-форма ГС
	ммоль УДФ/мл/мин	
0	152,42	163,81
15	223,55	457,52
30	294,22	564,91
60	364,35	645,88
90	386,24	724,92
90 б/гликогена	183,42	151,28

Наряду с этим, было также показано [11], что присутствие гликогенной «затравки» существенно не влияет ни на максимальную скорость активности I- и D-форм ГС, выделенной из мозга свиньи, ни на сродство к УДФГ. По-видимому, концентрация гликогена в этих опытах была не очень существенной, так как I-форма мозговой ГС, очевидно, связана с гликогеном в нативном состоянии [10], и ее активность не зависит от гликогенной «затравки».

В дальнейшем мы изучали кинетические свойства I-формы ГС K_m для УДФГ определяли по Лайнуверу-Берку в отсутствие и в присутствии Г-6-Ф (рис. 1). Очевидно, в отсутствие Г-6-Ф K_m равна 0,166 мМ,

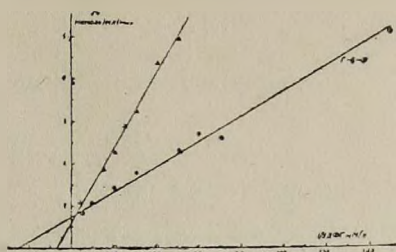


Рис. 1.

Рис. 1. Активность I-формы ГС из мозга крыс как функция концентрации УДФГ. Концентрация Г-6-Ф—5 мМ.

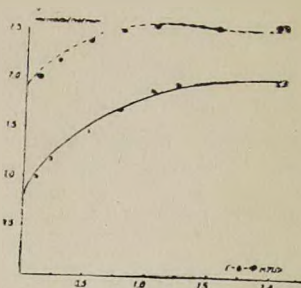


Рис. 2.

Рис. 2. Активность I-формы ГС мозга при двух концентрациях УДФГ [1) 0,5 мМ; 2) 5 мМ] и различных концентрациях Г-6-Ф.

а $V_{\max}$ —2,0 мкмоль/мл/мин. В присутствии 5 мМ Г-6-Ф достигает 0,04 мМ, а $V_{\max}$ —1,33 мкмоль/мл/мин. Таким образом, в присутствии Г-6-Ф K_m для УДФГ I-формы ГС понижается в 4 раза. Полученные нами данные позволяют сделать следующее сравнение: концентрация УДФГ в мозге, составляя 60—70 мкмоль/кг [3], приблизительно в 5 раз ниже, чем в печени (350 мкмоль/кг) [5]. Наряду с этим, K_m для УДФГ I-формы ГС в отсутствие Г-6-Ф, по нашим данным, составляя 0,17 мМ, также около 5 раз в мозге ниже, чем в печени [2]. Как видно из рис. 2, активность I-формы ГС при концентрации УДФГ 0,5 мМ при увеличе-

нии Г-6-Ф до 2 мМ/л повышается от 0,8 до 2 мкмоль/мл/мин, а при концентрации 5 мМ и том же содержании Г-6-Ф с 1,9 до 2,6 мкмоль/мл/мин. Из полученных нами данных следует, что при меньшей концентрации УДФГ с увеличением содержания Г-6-Ф активность фермента возрастает в большей степени (в 2,5 раза), чем при концентрации, близкой к насыщающей, когда она возрастает лишь в 1,3 раза.

В опытах по изучению кинетики D-формы ГС мозга (рис. 3) нами выявлено, что при концентрации Г-6-Ф 0,75 мМ K_M для УДФГ состав-

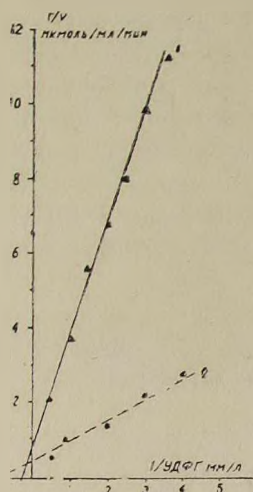


Рис. 3.

Рис. 3. Активность D-формы ГС из мозга крыс как функция концентрации УДФГ при двух концентрациях Г-6-Ф [1) 0,75 мМ; 2) 3 мМ].

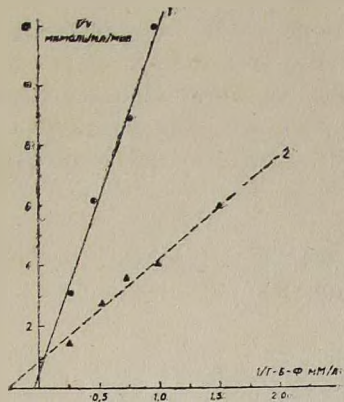


Рис. 4.

Рис. 4. Активность D-формы ГС мозга при двух концентрациях УДФГ [1) 0,5 мМ; 2) 5 мМ] как функция концентрации Г-6-Ф.

ляет 5,0 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,2 мкмоль/мл/мин. Когда она повышается до 3 мМ, K_M для УДФГ понижается в 5 раз, составляя 1,0 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 2,25 мкмоль/мл/мин. В отличие от I-формы ГС D-форма в отсутствие Г-6-Ф полностью неактивна, поэтому можно использовать метод Лайпунивера-Берка ($1/V$ график против $1/\text{Г-6-Ф}$) при определении активности D-формы ГС как функции концентрации Г-6-Ф при 2-х концентрациях УДФГ (рис. 4), K_M для Г-6-Ф при 0,5 мМ УДФГ составляет 25 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,4 мкмоль/мл/мин. При более высоком уровне УДФГ (5 мМ) она понижается и составляет 5,5 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,25 мкмоль/мл/мин. Исходя из этих данных можно заключить, что D-форма ГС активна только в присутствии относительно высокой концентрации Г-6-Ф.

Ереванский медицинский институт
лаборатория биосинтетических реакций мозга

Поступило 16.II 1979 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՌԻԶԵՂԻ ԳԼԻԿՈԴԵՆ ՍԻՆԹԵՏԱԶԱՅԻՆ ՄԱՍՆԱԿԻ
ՄԱՔՐՎԱԾ I- ԵՎ D-ՉԵՎԵՐԻ ՈՐՈՇ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Յ. Մ. ՍՈՒՋՅԱՆ

Առնետներ ռիզեղից առանձնացվել և մաքրման են ենթարկվել գլիկոգեն սինթետազայի I և D-ձևերը: Մաքրման հետևանքով գլիկոգեն սինթետազայի I և D-ձևերի տեսակարար ակտիվությունները համապատասխանաբար հասնում են 170,8 և 154,7 մմկմոլ/մգ սպիտակուցի/րոպեի: Կինետիկական հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ գլիկոգենսինթետազայի I-ձևը K_M ՈՒԴՖԳ համար գլուկոզո-6-ֆոսֆատի առկայությամբ իջնում է: Ընդ որում, ՈՒԴՖԳ ավելի փոքր կոնցենտրացիայի ժամանակ գլիկոգեն սինթետազայի I-ձևի ակտիվությունը գլուկոզո-6-ֆոսֆատի կոնցենտրացիայի մեծանալու հետ միասին աճում է ավելի մեծ աստիճանով, քան երբ ՈՒԴՖԳ կոնցենտրացիան մոտենում է հագեցման:

Գլիկոգենի գլիկոգեն սինթետազայի D-ձևը ակտիվ է գլուկոզո-6-ֆոսֆատի համեմատաբար բարձր կոնցենտրացիայի ժամանակ:

SOME CHARACTERISTICS OF PARTIALLY PURIFICATED
I-AND D-FORMS OF RAT BRAIN GLYCOGEN SYNTHETASE

Ts. M. SUDJAN

Glycogen synthetase I and D-forms of rat brain have been isolated and purified. The study of their kinetic properties has shown that K_M of the I-form of glycogen synthetase for UDPG decreases in the presence of glucose-6-phosphate. D-form is active only at a relatively high concentrations of glucose-6-phosphate.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хачатрян Г. С., Судо́жан И. М. *Вопр. мед. химии*, 19, 5, 539, 1973.
2. Bishop J. S., Larner J. J. *Biol. Chem.*, 242, 1354, 1967.
3. Goldberg N. D., O'Tbole A. G. *J. Biol. Chem.*, 244, 11, 3053, 1969.
4. Kellin D., Hartree E. F. *Proc. Roy. Soc.*, 124, 397, 1938.
5. Kreutner W., Goldberg N. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58, 1515, 1967.
6. Leloir L. F., Cardini C. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6340, 1957.
7. Leloir L. F., Olavarria J. M., Goldemberg S. H. *et al. Arch. Biochem.*, 81, 508, 1958.
8. Leloir L. F. *J. Biol. Chem.*, 235, 919, 1960.
9. Leloir L. F., Goldemberg S. *Meth. in enzymol.*, 5, 145, 1962.
10. Passonneau J. V., Brunner E. A. *et al. J. Neurochem.*, 18, 2317, 1971.
11. Passonneau J., Scawartz J. *The J. of Biol. Chem.*, 250, 6, 2287, 1975.
12. Rottenberg D. A., Passonneau J. V., Lust W. D. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1192, 1972.
13. Thomas J. A., Larner J. *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 62, 1973.

УДК 547.392.4+577.161.3+577.15.062

ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРОКСИДИРОВАННОЙ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И α -ТОКОФЕРИЛАЦЕТАТА НА ЦИКЛ КРЕБСА

Л. В. МХИТАРЯН

Изучены сдвиги в активности некоторых ферментов цикла Кребса в митохондриях мозга белых крыс при внутрибрюшинном введении пероксидированной олеиновой кислоты и при его параллельном введении с α -токоферилацетатом. Установлено, что активность цитратсинтазы под влиянием пероксидированной олеиновой кислоты подвергается фазовым изменениям. Пируват-, α -кетоглутарат- и малатдегидрогеназа угнетаются во все сроки эксперимента, особенно на седьмой день. При совместном введении олеиновой кислоты с α -токоферилацетатом наблюдается тенденция к нормализации активности изученных ферментов.

Изучение активности ферментов и интермедиатов цикла Кребса при различных состояниях и воздействиях организма представляет определенный интерес.

Установлено, что длительное рентгеноблучение вызывает в митохондриях головного мозга фазные изменения в активности пируватдегидрогеназы и некоторых других ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) [13]. Определенные изменения были обнаружены при воздействии небольшими дозами ионизирующей радиации в митохондриальной фракции головного мозга и миокарда [12].

В ряде работ было показано угнетение активности некоторых ферментов цикла Кребса при гипоксии [5], остром отравлении этионином [14, 15], при сахарном диабете [3, 4], стрессе. Усиление процесса окисления промежуточных продуктов цикла Кребса и повышение активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях обнаружено у крыс при дефиците ненасыщенных жирных кислот (НЖК) в диете [16, 25]. Показано, что активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс угнетается под действием олеиновой кислоты [24]. Ингибирование цитратсинтазы в митохондриях сердца наблюдается при введении линолевой и олеиновой кислот [23].

В предыдущих работах [6, 7] было установлено, что в гомогенатах коры головного мозга происходят фазные изменения при хлоропреновом отравлении, а также под влиянием пероксидированных олеиновой и линоленовой кислот.

Так как хлоропрен и пероксидированные НЖК вызывают определенные изменения биомембран и нарушают их нормальную проницаемость, возникла необходимость изучить состояние цикла Кребса в митохондриях коры головного мозга крыс под влиянием пероксидированной олеиновой кислоты, а также при совместном действии его с α -токоферилацетатом.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах самцах массой 150—200 г, содержащихся на обычном рационе вивариума. Исследования проводили на 3 группах крыс: первая—интактные крысы—служила контролем; второй—вводили ежедневно внутривенно пероксидированную олеиновую кислоту (220 мкмоль перекисного кислорода на 1 г кислоты) в количестве 0,1 мл на 150 г массы животного; третьей группе параллельно с кислотой вводили α -токоферилацетат в количестве 2 мг на 150 г массы животного в виде тонкой эмульсии, приготовленной на 10%-ном водном растворе твин-80 (0,5 мл). Затравку производили в течение 24 час, 7 и 15 дней, после чего крыс декапитировали и из коры больших полушарий головного мозга их выделяли митохондрии по методу Хогбум [14].

Об активности цитратсинтазы судили по приросту лимонной кислоты в присутствии оксалоацетата «Sigma» (США), ацетата натрия; АТФ «Reanal» (ВНР) и КоА «Fluka» (Швейцария), количество которой определяли по методу Нательсона и др. [20] и выражали в мкмоль лимонной кислоты на 1 мг митохондриального белка в течение 1 часа инкубации при 37°. Измерения производили на спектрофотометре—МММ-203 при длине волны 430 нм. Активность пируват-, α -кетоглутарат- и малатдегидрогеназ определяли по методу Нордмана и др. [22], с некоторой модификацией, внесенной Путилиной и Ещенко [11] и выражали в мкг формазана, образовавшегося в пробе за 20 мин инкубации в расчете на 1 мг митохондриального белка. Измерения производили на спектроколориметре «Spekol» (ГДР) при длине волны 570 нм.

Белок в пробах определяли по Лоури [18]. Результаты опытов обработаны методом вариационной статистики Фишера-Стюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из данных табл. 1, активность цитратсинтазы уже через день после затравки снижается на 67%, через 7 дней она резко повышается, превышая контрольный уровень на 64,8%, и с удлинением сроков затравки до 15 дней снова снижается на 32,8%.

При введении кислоты с α -токоферилацетатом через 24 часа активность фермента снижается несколько меньше, чем при введении только олеиновой кислоты. В последующие сроки затравки (7 и 15 дней) активность цитратсинтазы хотя и повышается, однако остается ниже контрольного уровня на 28 и 20% соответственно.

Как видно из данных табл. 2, активность пируват-, α -кетоглутарат- и малатдегидрогеназ во все сроки затравки пероксидированной олеиновой кислотой значительно подавлена. Так, через 24 часа после затравки наибольшему угнетению подвергаются пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназы, активность которых снижается на 32,5 и 30,5% соответственно, в то время как активность малатдегидрогеназы—всего лишь на 19,8%.

Через 7 дней активность α -кетоглутаратдегидрогеназы почти не изменяется и продолжает оставаться ниже контрольного уровня на 35%, между тем как активность пируватдегидрогеназы и, особенно малатдегидрогеназы, резко снижается.

Таблица 1

Сдвиги в активности цитратсинтазы митохондрий головного мозга крыс,
мкмоль лимонной кислоты/час/мг белка митохондрий

Введенные вещества	К р ы с ы						
	контроль- ные	п о д о п ы т н ы е					
		через 24 часа	% из- мене- ния	через 7 дней	% из- мене- ния	через 15 дней	% из- мене- ния
Пероксидиро- ванная олеи- новая кисло- та	0,125±0,003 (9)	0,041±0,0008 (7) P<0,001	-67,2	0,206±0,005 (11) P<0,001	+64,8	0,084±0,004 (7) P<0,001	-32,8
Пероксидиро- ванная олеи- новая кисло- та + α-токо- ферилацетат	0,125±0,003 (9)	0,058±0,001 (12) P<0,001	-53,6	0,09±0,04 (12) P<0,001	-28,0	0,1±0,003 (7) P<0,01	-20,0

Примечание: Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках—количество животных.

Таблица 2

Влияние пероксидированной олеиновой кислоты на активность дегидрогеназ
митохондрий головного мозга крыс, мкг формаза/мг белка митохондрий

Фермент	К р ы с ы						
	контроль- ные	п о д о п ы т н ы е					
		через 24 часа	% из- мене- ния	через 7 дней	% из- мене- ния	через 15 дней	% из- мене- ния
Пируватде- гидрогеназа	7,68±0,32 (12)	5,18±0,36 (9) P<0,001	-32,5	3,37±0,23 (11) P<0,001	-56,0	3,48±0,51 (8) P<0,001	-54,6
α-кетоглутар- атдегидро- геназа	5,92±0,3 (11)	4,11±0,15 (10) P<0,001	-30,5	3,38±0,17 (11) P<0,001	-35,3	4,81±0,06 (7) P<0,01	-18,7
Малатдегидро- геназа	6,0±0,11 (14)	4,81±0,2 (9) P<0,001	-19,8	1,35±0,04 (9) P<0,001	-77,5	2,29±0,13 (8) P<0,001	-61,8

При удлинении сроков затравки до 15 дней хотя активность всех исследуемых дегидрогеназ несколько повышается, однако продолжает оставаться резко подавленной, особенно малат- и пируватдегидрогеназы. Активность α-кетоглутаратдегидрогеназы возрастает и отстает от контрольного уровня лишь на 18,7%.

Следовательно, наибольшее угнетение активности изученных дегидрогеназ наблюдается после 7 дней затравок. Интересно, что под влиянием пероксидированной олеиновой кислоты в мозге содержание липидных перекисей повышается во все сроки эксперимента, особенно после 7-го дня [8].

На основании полученного фактического материала можно допустить, что низкая активность цикла в митохондриях головного мозга обусловлена действием липидных перекисей. Известно, что избыточная липидная пероксидация сопровождается значительным снижением содержания биоантиоксидантов и особенно витамина Е [2].

Таблица 3

Влияние олеиновой кислоты и α -токоферилацетата на активность дегидрогеназ митохондрий головного мозга крыс, мкг формазана/мг белка митохондрий

Ферменты	К р ы с ы						
	контроль- ные	п о д о п ы т ы е					
		через 24 часа	% из- мене- ния	через 7 дней	% из- мене- ния	через 15 дней	% из- мене- ния
Пируватде- гидрогеназа	7,68±0,32 (12)	7,28±0,02 (7) P>0,05	-5,2	6,69±0,13 (7) P<0,05	-12,3	6,28±0,13 (7) P<0,02	-18,2
α -кетоглутаратдегидро- геназа	5,92±0,3 (11)	4,36±0,19 (7) P>0,01	-26,3	4,83±0,027 (11) P<0,02	-18,4	5,53±0,31 (7) P>0,05	-5,9
Малатдегидро- геназа	6,0±0,18 (14)	5,97±0,13 (7) P>0,05	-3,9	3,55±0,1 (7) P<0,001	-40,7	4,45±0,08 (7) P<0,001	-25,7

Как видно из данных табл. 3, при введении олеиновой кислоты совместно с α -токоферилацетатом наблюдается некоторая тенденция к повышению активности ферментов во все сроки эксперимента, что, видимо, обусловлено некоторыми его свойствами, в том числе подавлением инициации процесса липидной пероксидации, в результате чего сохраняется целостность мембран митохондрий и нормальное их функционирование.

Экспериментально установлено, что витамин Е, как и некоторые дегидрогеназы цикла Кребса, в том числе α -кетокислот, локализован преимущественно во внутренней мембране митохондрий, вследствие чего при введении его интактным крысам повышается активность пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназ [14]. Не исключается также, что витамин Е будучи необходимым компонентом липоилдегидрогеназы, одного из ферментов мультиэнзимного комплекса α -кетокислот [21], может при введении в организм активировать эти ферменты.

Учитывая, что цитратсинтаза и дегидрогеназы α -кетокислот являются тиоловыми ферментами и весьма чувствительны к тиоловым ядам, в том числе и перекисям, можно допустить, что некоторая активация ферментов витамином Е обусловлена его антиоксидантными свойствами—способом предохранять SH-группы фермента от окисления и тем самым ферменты от инактивации. Такая интерпретация подтверждается многочисленными литературными данными, а также исследованиями Семерджян Л. В., которая показала значительное снижение

количества SH-групп в тканях и крови крыс при затравке их пероксидированной НЖК и некоторое повышение—при введении α -токоферил-ацетата (неопубликованные данные). Следует привести также данные Наира [19], который показал, что дефицит витамина Е может привести к нарушению биосинтеза гема и, следовательно, к уменьшению активности гемсодержащего фермента—каталазы.

Сравнительно недавно Мхитаряном и Межлумян [9] были получены аналогичные данные в отношении другого гемсодержащего фермента—триптофанпирролазы, активность которой угнетается под влиянием НЖК и частично активируется при введении витамина Е.

Результаты этих исследований позволяют утверждать, что одной из существенных причин малой активности НАД-зависимых ферментов является нарушение биосинтеза НАД вследствие низкой активности триптофанпирролазы—фермента, ответственного за биосинтез никотиновой кислоты.

Подобные данные получены и при ожоге (стадия токсемии) [1], в патогенезе которого липидным перекисям придается важное значение [10]. При этом было установлено низкое содержание никотинамидных нуклеотидов и угнетение активности НАД-зависимой малат- и глутамат-дегидрогеназ [1].

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемые изменения в активности ферментов цикла Кребса на фоне избыточной липидной перекисидации обусловлены сдвигами в содержании SH-групп, нарушением биосинтеза НАД и дефицитом витамина Е. Возможно, этим и обусловлен корригирующий эффект экзогенного витамина Е на активность ферментов цикла Кребса при избыточной липидной перекисидации.

Ереванский медицинский институт

Поступило 12.VII 1978 г.

ՕԼԵԻՆԱԹԹՎԻ ԵՎ α -ՏՈԿՈՖԵՐԻԼԱՅԵՏԱՏԻ ՀԱՄԱՏԵՂ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿՐԵՖՍԻ ՑԻԿԼԻ ՎՐԱ

Լ. Վ. ՄԽԻՐԱՐՅԱՆ

Սպիտակ առնետների վրա ուսումնասիրվել է սերոօքսիդացված օլեինաթթվի ազդեցությունը ուղեղի միտոքոնդրիանների ցիտրատսինթազայի պիրուվատ, α -կետոգլուտարատ- և մալատդեհիդրոգենազների ակտիվության վրա:

Ցույց է տրվում, որ ցիտրատսինթազայի ակտիվությունը ենթարկվում է ֆազային փոփոխության, իսկ պիրուվատ, α -կետոգլուտարատ- և մալատդեհիդրոգենազների ակտիվությունը ճնշվում է փորձի բոլոր ժամկետներում, հատկապես 7-րդ օրը:

Օլեինաթթվի և α -տոկոֆերիլացիտատի համատեղ ազդեցության դեպքում նշված ֆերմենտների ակտիվությունը հակում ունի նորմալացման:

THE JOINT EFFECT OF OLEIC ACID AND α -TOCOPHERYLACETATE ON THE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE OF KREBS

L. V. MKHITARIAN

The effect of peroxidated oleic acid on the activity of citrate synthetase, pyruvate, α -ketoglutarate and malatdehydrogenase has been studied on rat brain mitochondria.

It has been established that citrate synthetase activity undergoes phasic changes under the influence of peroxidated oleic acid. Pyruvate, α -ketoglutarate and malatdehydrogenase activities have been inhibited during the whole studied period, α -tocopherylacetate has tended to normalize the activity of these enzymes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вальдман Б. М., Рябинин В. Е. В кн.: Метаболические основы острой ожоговой токсемии. 6, Омск, 1977.
2. Владимиров Ю. А., Оленов В. И., Суслова Т. Б., Потапенко А. Я. ВИНТИ. Итоги науки и техники, Биофизика. 5, 56, 1975.
3. Гулый М. Ф. Укр. биохим. ж. 42, 189, 1970.
4. Егян В. Б., Бунятян Г. Х., Туриян Г. А., Акопян Г. Е. Вopr. биохимии мозга, 4, 147, Ереван, 1970.
5. Ещенко Н. Д., Голубев А. Г., Осадчая Л. М., Путилина Ф. Е. Тр. Горьков. мед. ин-та, 63, 55, 1975.
6. Мхитарян Л. В., Геворкян Д. Н., Мхитарян В. Г. Журн. exper. и клинич. медицины, 16, 1, 66, 1976.
7. Мхитарян Л. В., Мхитарян В. Г. Журн. exper. и клинич. мед., 17, 1, 3, 1978.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Биол. ж. Армении, 27, 6, 3, 1974.
9. Мхитарян В. Г., Межлумян Л. М. Журн. exper. и клинич. мед., 18, 3, 13, 1978.
10. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Мат-лы IV Закавказской конф. патофизиологов. 228, Баку, 1975.
11. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Вестник ЛГУ, 21, 4, 42, 1969.
12. Цыхун Г. Ф., Тайц М. Ю., Насиров Р. А. Реф. докл. Всесоюзного симпозиума по действию малых доз ионизирующей радиации на ЦНС. 29, Минск, 1968.
13. Черкасова Л. С., Новик В. А., Цыхун Г. Ф. Тез. докл. симпозиума «Биоэнергетика при лучевом поражении живых организмов», 62, Л., 1973.
14. Штутман Ц. М., Кузнецова Л. Н., Пархоменко Ю. М., Бибер А. А. Сб.: Витамины, вып. 8, 96, Киев, 1975.
15. Gazzaniga P. P. Enzyme, 20, 4, 193, 1975.
16. Hayachida T., Portman O. W. J. Nutr., 81, 103, 1965.
17. Hogeboom G. H. In: Methods in Enzymology, 1, 17, 1955.
18. Lowry O. H. et al. J. Biol. Chem., 193, 256, 1951.
19. Nair P. P. Ann. N. Y. Acad. Sci., 203 53, 1972.
20. Natelson S., Pincus J., Lugovoy J. J. Biol. Chem., 175, 745, 1948.
21. Neubert D., Lehninger A. J. Biol. Chem., 237, 952, 1962.
22. Nordman J., Nordman N., Gauchery O. Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 1826, 1951.
23. Pande S. V., Mead J. F. J. Biol. Chem., 243, 6180, 1968.
24. Sato Masao, Uchijama Mitsuru. Chem. and Pharm. Bull., 20, 2, 815, 1972.
25. Smith J., De Luca H. F. J. Nutr., 79, 416, 1964.

О СВОЙСТВАХ ТРИМЕТАФОСФАТАЗЫ ТКАНЕЙ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

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

Определялась активность триметафосфатазы в печени, почках, мозге, сердечной и скелетной мышцах, а также в желтке и желточном мешке развивающегося куриного эмбриона и чувствительность этого фермента к $MgCl_2$ и NaF . Изучалась активность фермента под действием гидрокортизона и субстрата (триметафосфат Na). Установлено, что наивысшей триметафосфатазной активностью обладает желточный мешок. Результаты исследований свидетельствуют об изменениях в свойствах фермента в эмбриональном развитии.

В жизнедеятельности организмов неорганические полифосфаты играют важную роль, являясь не только регуляторами внутриклеточной концентрации важнейших метаболитов, но и резервом активированного фосфата, способного утилизироваться в различных метаболических процессах. До последнего времени было мало известно о биохимических превращениях этих простейших накопителей энергии в живых клетках, какими являются неорганические полифосфаты. Возросший к ним интерес вызвал интенсивное изучение их структуры и метаболизма. В то же время в литературе пока не встречаются сведения о ферментах, участвующих в обмене этих соединений в тканях эмбрионов высших животных. Онтогенетические исследования на куриных эмбрионах представляют особый интерес с точки зрения их изоляции от материнского организма и особенностей энергетического обмена. В связи с этим представляло несомненный интерес изучение динамики активности одного из ферментов, участвующих в обмене неорганических полифосфатов— триметафосфатазы в течение развития куриного эмбриона, а также влияние некоторых общепринятых активаторов и ингибиторов, и изучение возможной индукции синтеза фермента при введении гормона и субстрата в ходе эмбрионального развития.

Материал и методика. Объектом исследований служили ткани куриного эмбриона (печень, почки, мозг, сердечная и скелетная мышцы), а также желток и желточный мешок. Триметафосфатазу в пробах определяли по Бергу [1], неорганический фосфат— Лоури и Лопесу [2]. В каждом опыте использовали 8—10 эмбрионов в зависимости от их возраста. Гомогенаты готовили на воде в соотношении 1:10 (в/об). В качестве субстрата использовали триметафосфат Na , приготовленный на мединаловом буфере, pH 5. Инкубацию проводили в течение часа при температуре 37° . Инкубационная смесь составляла (в мл): 1—гомогената, 2,5—субстрата, 0,5—испытуемого реагента (NaF и $MgCl_2$ 10^{-2} , 10^{-3} , $10^{-4}M$). Проводили предварительную прединкубацию с

этими реагентами в течение 15 мин. результаты выражали в мкМР/г ткани. В опытах использовали гидрокортизон фирмы «Рихтер» (Венгрия) и триметафосфат Na, которые вводили в пугу яйца в количестве 2, 5 и 10 мг на 100 г веса. Пробы брали через 3 часа после введения препарата.

Результаты и обсуждение. Как известно, ткани растущего и развивающегося организма значительно отличаются от тканей взрослого как по химизму, так и по структуре и функциональным свойствам.

Самой высокой триметафосфатазной активностью, начиная с 8-го дня инкубации до вылупления цыпленка, обладает желточный мешок. В то же время в желтке активность фермента не обнаружена. Сдвиги в активности триметафосфатазы в различных тканях зародыша носят индивидуальный характер. Наивысшей активностью фермента, которая заметно нарастала начиная с 14 дня, отличалась печеночная ткань, затем почки. Мозг и мышцы обладали более низкой активностью триметафосфатазы. Кривые на рис. свидетельствуют о существенных тка-

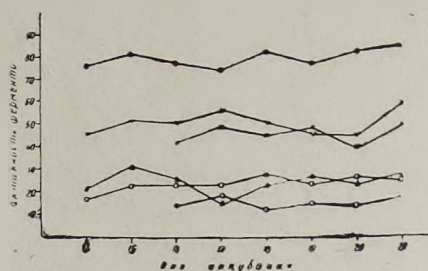


Рис. Активность триметафосфатазы в различных тканях куриного эмбриона в динамике, мкМ Р/г ткани. Печень — V. Почки — X. Мозг — ▲. Сердце — ○. Мышцы — □. Желточный мешок — ●.

невых различиях в активности фермента на разных этапах индивидуального развития.

Изучалось также воздействие NaF и $MgCl_2$ на активность триметафосфатазы в ходе эмбриогенеза (табл. 1 и 2). Выяснилось, что NaF в концентрациях 10^{-2} и 10^{-3} М резко понижает активность фермента желточного мешка, и, в той или иной степени, в печени, почках, мозге и мышцах. В сердечной мышце наблюдается обратная картина: некоторое повышение активности триметафосфатазы на 16, 17, 18-й дни инкубации и понижение—в остальные дни (19, 20, 21-й). Под влиянием $MgCl_2$ триметафосфатаза желточного мешка и мозговой ткани не претерпевает существенных изменений. В печени зародыша $MgCl_2$ в концентрации 10^{-3} М более выражено повышает активность фермента во все дни инкубации, а в сердечной мышце—на 18-й день. В почках на 16, 17, 18, 19-й дни инкубации наблюдается тенденция к понижению активности триметафосфатазы, и некоторая активация—на 20-й и 21-й дни. Такое различное действие использованных реагентов на триметафосфатазу органов куриного эмбриона, по-видимому, свидетельствует о тканевой гетерогенности фермента, о модификации ее функций, связанных с процессами развития и дифференцировки тканей зародыша в ходе эмбрионального развития.

Большой интерес представляет выяснение роли гормонов в регуляции активности ферментов. В литературе отсутствуют сведения о ха-

Таблица I

Влияние NaF на активность триметафосфатазы тканей куриного эмбриона,
мкм Р/г ткани

NaF, М		Печень	Почки	Мозг	Сердце	Мышцы	Желточный мешок
14-й	Контроль	39				25,3	83
	10 ⁻²	14				4,6	11
	10 ⁻³	18				8,7	28,2
	10 ⁻⁴	36				24	76
15-й	Контроль	48		30		26,4	86
	10 ⁻²	28		24		12	19
	10 ⁻³	56		33		17	40
	10 ⁻⁴	44,4		30		25,4	84
16-й	Контроль	49	50,5	35	11	26,4	86,2
	10 ⁻²	24	16	4,2	14,6	9,6	17
	10 ⁻³	54	51	34	18	18	35
	10 ⁻⁴	46	51	35	11	28	86,2
17-й	Контроль	48,2	46	12	17	25,1	88,3
	10 ⁻²	23,2	11	6,4	20,2	4,9	18
	10 ⁻³	53	15	5,2	23,6	13,4	35,1
	10 ⁻⁴	47	15	11	16	26,1	88,3
18-й	Контроль	48,2	44,1	24	12	25	86,2
	10 ⁻²	16	6,4	15	6,2	17	38
	10 ⁻³	23,2	28,2	18	10,5	16	20
	10 ⁻⁴	37	51,4	24	18	20,2	86,2
19-й	Контроль	42,1	54	26,1	13	27	82
	10 ⁻²	7,4	5,4	12,3	5,2	20,3	36,3
	10 ⁻³	51,1	32	15,4	0	15,2	15
	10 ⁻⁴	42	54	22	11	1,9	82
20-й	Контроль	29,3	51	21	11	35	88,3
	10 ⁻²	29,3	21,2	15,4	0	26,4	44,1
	10 ⁻³	36	51	10	0	17,1	25,5
	10 ⁻⁴	29,3	51	8	8	0	88,3
21-й	Контроль	67	59	30	25	31	98
	10 ⁻²	33,4	5	24	4	31,4	25,4
	10 ⁻³	10	71,3	24	14	15	20
	10 ⁻³	40	37	38	25	31,4	98

рактуре воздействия того или иного гормона на активность триметафосфатазы в ходе эмбриогенеза. Предметом наших исследований явилось изучение действия гидрокортизона, а также влияние субстрата триметафосфата Na на активность триметафосфатазы различных тканей куриного эмбриона. Пробы брали на 11, 12, 14, 17 и 20-й дни инкубации. Учитывалось, что на 11-й, 12-й дни инкубации в зародыше развивается гормональная система. На 17-й день инкубации начинается интенсив-

Таблица 2

Влияние $MgCl_2$ на активность триметафосфатазы тканей куриного эмбриона.
мкМ Р/г ткани

$MgCl_2$, М	Печень	Почки	Мозг	Сердце	Мышцы	Желточный мешок
Контроль	59		21,2		13	64,3
10-2	55,3		14,8		14	59
10-3	73		19		17	72
10-4	59,1		21,2		20,1	55,3
Контроль	59		33,1		21,2	75
10-2	55		37		17	75
10-3	68,4		31,5		23	75
10-4	48		19		18	81,2
Контроль	53	33,4	23,2	18,1	22	66,3
10-2	61	28,6	23,2	13,1	16	59
10-3	66,2	33,4	23,2	17,1	23,2	70
10-4	44	26	40,2	29	17,1	59
Контроль	61	55,2	19	19	32	77
10-2	70,3	45	33,3	21	36,3	66,2
10-3	93,2	40	51,8	26,1	41,1	82,6
10-4	61,2	33,4	25	19	33,4	63,3
Контроль	53	45	23,2	11	31,4	77
10-2	63	45	23,2	25,5	33	72,3
10-3	82	43,1	29	35	28,2	75
10-4	53,4	20	41	6,4	10,1	77
Контроль	53	40,2	26,1	17	22	69
10-2	59	31	22	12	16	60
10-3	59	35,4	23,2	16	26,1	69,1
10-4	49,1	32,2	29	29	22	69,1
Контроль	57,4	36	27	18	22,1	77
10-2	57,4	29,3	22,2	13	14,8	60
10-3	66,2	45,3	22	18	28,2	84,4
10-4	57,4	37,3	27	13	15	79
Контроль	51	39	25	7,8	17,4	69,1
10-2	51	52	23,2	11	15	61,3
10-3	77	70,1	32,2	24,7	24	77
10-4	51	44	25	8	17,4	69,1

ное использование минеральных солей скорлупы для костеобразования, на 20-й, 21-й дни цыпленок завершает свое развитие.

Результаты наших исследований показывают (табл. 3), что на 11, 12, 14-й дни инкубации и субстрат, и гидрокортизон понижают активность триметафосфатазы печени, а на 17-й и 20-й дни фермент существенных изменений не претерпевает. В почках на 20-й день наблюдается понижение активности фермента после введения триметафосфата Na и

гидрокортизона. В сердечной мышце на 14-й день наблюдается повышение активности фермента—резко под влиянием гормона и слабее—при введении субстрата, а на 17-й и 20-й дни заметных сдвигов не наблюдается. В мышцах на 11, 14, 17-й дни инкубации субстрат несколько повышает активность фермента, а гидрокортизон понижает, на 12-й день под влиянием и субстрата, и гормона она понижается. В мозге наблюдается субстратная и гормональная индукция на 11-й и 12-й дни. На 14-й день гидрокортизон несколько понижает активность фермента. В остальных дни изменений не наблюдается. В желточном мешке определенных изменений не отмечалось.

Таблица 3

Изменение активности триметафосфатазы в различных органах куриного эмбриона после введения триметафосфата Na и гидрокортизона, мкМ Р/г ткани

Органы	Дни инкубации														
	11-й			12-й			14-й			17-й			20-й		
	контроль	субстрат	гидрокортизон	контроль	субстрат	гидрокортизон	контроль	субстрат	гидрокортизон	контроль	субстрат	гидрокортизон	контроль	субстрат	гидрокортизон
Желток	0	3,1	6,5	0	4,9	0,3	0	9,3	0	0	9,9	0	0	0	0
Печень	31	25	9,3	28	20	18	39	16	30	58,8	63	63	41,5	45,9	41,5
Почки										47,2	56	56	33	15	21
Сердце							5,3	12	53	18	16	16	15	14	14
Мышцы	8,4	17,4	5,7	12	3	4	10,6	11	0,3	15	19,4	13	24	19	28
Мозг	0,3	7	12	0,3	11	8,4	10	9,3	4,4	15,2	10	18	17	21,4	20
Желточный мешок	68,4	29	38	43,4	57	47	79	70	66	58	66	56	79	66	69

Приведенные в настоящей работе данные свидетельствуют как о тканевой специфичности триметафосфатазы, так и об определенных изменениях ее свойств в ходе эмбрионального развития. Вероятно, под влиянием внутриклеточных и интегрированных эффектов в условиях постоянного изменения функционального состояния развивающегося эмбриона происходит адекватная регуляция активности отдельных молекулярных форм фермента.

Институт биохимии АН АрмССР Поступило 31.V 1978 г.

ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ՏՐԻՄԵՏԱՖՈՍՖԱՏԱԶՄՅԻ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ի. Հ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԳՈՒՆՅ. Ա. Հ. ԴԱՍՊԱՐՅԱՆ

Որոշվել է տրիմետաֆոսֆատազայի ակտիվությունը լյարդում, երիկամներում, ուղեղում, սրտամկանում և կմախքամկաններում, ինչպես նաև հավի վարկացող սաղմի ղեղնուցում և ղեղնուցապարկում:

Որոշվել է նաև նշված ֆերմենտի զգայունությունը $MgCl_2$ և NaF նկատմամբ: Ուսումնասիրվել է այդ ֆերմենտի ակտիվությունը հիդրոկորտիզոնի և սուբստրատի (Na -ի սրիմետաֆոսֆատ) ազդեցության ներքո:

Նշվել է, որ տրիմետաֆոսֆատազային ամենաբարձր ակտիվությամբ աչքի է ընկնում սաղմի դեղնուցապարկը:

Հետազոտությունների արդյունքները վկայում են սաղմնային զարգացման շրջանում ֆերմենտի հատկությունների փոփոխման մասին:

ON PROPERTIES OF TRIMETAPHOSPHATASE CHICK EMBRIO TISSUES

I. G. ASLANYAN, G. T. ADUNTZ, A. A. GASPARYAN

The activity of trimetaphosphatase in the liver, kidney, brain, heart and skeletal muscles, yolk, yolk sack of developing chick embryo have been determined; the sensitivity of this enzyme to $MgCl_2$ and NaF has been investigated. Yolk sack has turned to possess the maximal trimetaphosphatase activity. The investigation results indicate that in embryonal development changes of enzyme properties take place.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., 1953.
2. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 3421, 1946.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕКСОКИНАЗЫ И ЕЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА В СЕРДЕЧНОЙ И ДРУГИХ МЫШЦАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕЙРОГОРМОНА С

С. С. АЛЕКСАНЯН, Л. А. ҚАРАПЕТЯН

Изучались общая активность и изоферментный спектр гексокиназы (ГК) под влиянием нейрогормона С у кроликов в сердечной, гладкой, медленно сокращающейся красной и быстро сокращающейся белой скелетной мышцах. Показано, что введение нейрогормона С приводит к увеличению активности ГК в сердечной мышце. При электрофоретическом анализе ГК растворимой фракции сердечной мышцы было обнаружено увеличение содержания GK_3 .

При изучении механизмов действия нейрогормона С на сердце и другие органы нами ранее было показано увеличение содержания лактата и изменение активности фосфорилазы, свидетельствовавшие о том, что нейрогормон С интенсивно усиливает гликолитический путь расщепления гликогена и глюкозы [1—3].

Мы задались целью изучить активность, а также изоэнзимный спектр гексокиназы под влиянием нейрогормона С у кроликов в сердечной, гладкой, медленно сокращающейся красной и быстро сокращающейся белой скелетных мышцах.

Материал и методика. Опыты ставили на кроликах обоего пола массой 2,5—3 кг. Нейрогормон С вводили наркотизированным гексеналом животным внутривенно (V. Femoralis) в дозе 3—4 единиц на животное. За единицу активности нейрогормона С принимали активность препарата, ингибирующего 1 миллиединицу 3,5 цикло-АМФ фосфодиэстеразы гомогената мозга крыс в минуту. Контрольные животные получали физиологический раствор. Животных декалцитировали через 30 мин после введения нейрогормона, затем брали исследуемые органы. Активность ГК измеряли в сердечных мышцах, мышцах пилорической части желудка, а также в медленно сокращающейся красной и быстро сокращающейся белой скелетных мышцах кроликов. Гомогенат из мышц готовили на 0,15 М КСI в разведении 1:5. Для этого скелетные мышцы очищали от сухожилий и фасций, ткань измельчали ножницами и растирали в ступке с кварцевым песком. Желудок освобождали от содержимого, тщательно промывали охлажденной дистиллированной водой, удаляли слизистую оболочку, и ткань растирали в ступке с кварцевым песком. Гомогенат центрифугировали в течение 45 мин при 12000 g. полученный супернатант использовали непосредственно в опытах. Все процедуры по получению растворимой фракции выполняли на холоду при 4°. Активность ГК измеряли на спектрофотометре при $\lambda=340$ нм по восстановлению НАДФ, и выражали в микромолях НАДФ на 1 мг белка/час [14]. Инкубационная среда для измерения активности ГК содержала (в М): трис-НСI буфер (рН 8,0)—0,01; $MgCl_2$ —0,005; АТФ—0,005; НАДФ—0,0005; глюкозу—0,055; дегидрогеназу Г-6-Ф—0,2 ме. В измеряемых пробах определяли количество белка [15].

Для определения изоферментного состава ГК в сердечной мышце использовали диск-электрофорез в 7,5%-ном полиакриламидном геле в течение 2,5 час. [9]. Локализацию изоферментов ГК выявляли инкубированием в термостате при 37° в течение 1 часа в смеси, содержащей: трис-НСl—буфер (рН 8,0)—0,01 М—10, MgCl₂—0,06 М—4,5 мл; АТФ—60; ТПН—9, феназинметасульфат—4; нитросиний тетразол—9, глюкоза—300, Na₂S—1 мг; вода бидистиллированная—3,5 мл. ТПН и АТФ добавляли непосредственно перед окраской. После просветления фореграмм смесью метанол—уксусная кислота—вода (5:1:5) проводили денситометрию на регистрирующем спектрофотометре «Specord» с дополнительной приставкой для измерения гелей «ГЕ.Л» [7].

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что однократная инъекция животным нейрогормона С приводит к заметным изменениям в активности ГК (табл. 1).

Таблица 1

Активность гексокиназы в сердечной, гладкой, белой и красной мышцах кролика в норме и после введения нейрогормона С, мкмоль НАДФ/мг белка/час (средние данные 7 опытов)

Исследуемые ткани	Мышцы			
	сердечная	гладкая	белая	красная
Контроль	0,386±0,006	0,367±0,012	0,069±0,011	0,369±0,008
Опыт	0,498±0,005 p < 0,001	0,311±0,008 p < 0,001	0,056±0,018 p > 0,5	0,309±0,050 p < 0,001

Как видно из полученных данных, после внутривенного введения нейрогормона С, активность гексокиназы в гладких, белых и красных мышцах несколько снижается. Своеобразные сдвиги наблюдаются в сердечной мышце: активность гексокиназы через 30 мин резко повышается, составляя 0,498±0,005 мкмоль НАДФ на мг белка/час.

При электрофоретическом анализе ГК растворимой фракции сердечной мышцы были получены следующие результаты: в гомогенатах сердечной мышцы кролика выявляются три изофермента ГК—ГК₁, ГК₂, ГК₃, причем содержание ГК₃ по сравнению с ГК₁ и ГК₂ выше (табл. 2).

Таблица 2

Процентное соотношение изоферментов гексокиназы в сердечной мышце кролика после внутривенного введения нейрогормона С

	Контроль	Опыт	Р
ГК ₁	26,87±1,66	—	0,001
ГК ₂	26,50±1,41	35,83±5,22	0,1
ГК ₃	46,63±1,37	64,17±5,22	0,001

Многочисленные опыты показали, что через 30 мин после внутривенного введения нейрогормона С содержание ГК₁ резко снижается (следовые количества), ГК₃ возрастает в 1,4, а ГК₂—в 1,3 раза.

По-видимому, содержание $ГК_3$ и $ГК_2$ в сердечной мышце кролика после введения нейрогормона увеличивается за счет изменения $ГК_1$.

Нам кажется, что энергетический обмен сердца регулируется не только местными факторами, но и нейрогормональным путем. Все больше появляется работ, указывающих на взаимообусловленность изоферментного спектра и специфики энергетического обмена клетки [8]. Центральную нейрогуморальную регуляцию гликолиза можно считать вероятной, если учесть наличие ряда работ о значении гормонов в регуляции изоферментного спектра гликолитических ферментов [6].

Таким образом, в наших экспериментах наблюдаются весьма существенные изменения в содержании изоферментов $ГК_1$, $ГК_2$ и $ГК_3$ в сердечной мышце. Имеется ряд данных о постоянстве содержания изоферментов гексокиназы в некоторых тканях [11, 12], тогда как в печени и жировой ткани изоферментный спектр меняется. В печени число изоферментов в зависимости от вида животных колеблется в пределах 3—5 [10].

Существование изоферментов можно рассматривать как эволюционное приспособление к тончайшему регулированию процессов обмена веществ. В качестве примера можно указать на почти полное исчезновение $ГК_2$ при инсулярной недостаточности и восстановление ее активности под воздействием инсулина [4, 5, 13].

Результаты наших исследований свидетельствует о том, что под влиянием нейрогормона C происходят увеличение общей активности гексокиназы сердца и характерные сдвиги в изоферментном составе в сторону увеличения содержания изоферментов $ГК_3$, что, по-видимому, способствует усилению гликолиза в сердечной мышце.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 6.VII 1978 г.

**ՀԵՔՍՈՎԻՆԱԶԱ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ԿԱԶՄՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՐՏՈՒՄ ԵՎ ԱՅԼ ՄԿԱՆՆԵՐՈՒՄ
ՆՅՅՐՈՀՈՐՄՈՆ C-Ի ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈ**

Ս. Ս. ԱԼԵՍԱՆՅԱՆ, Լ. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է հեքսոկինազա ֆերմենտի և վերջինիս իզոֆերմենտների կազմության որոշումը սրտամկանում, ինչպես նաև հարթ, կարմիր և սպիտակ (կմախքային) մկաններում՝ ճազարների մոտ:

Հետազոտություններից պարզվել է, որ նեյրոհորմոն C -ի ազդեցության ներքո հեքսոկինազա ֆերմենտի ակտիվությունը կտրուկ կերպով ավելանում է սրտամկանում, իսկ հարթ, սպիտակ և կարմիր մկաններում զգալի չափով իջնում է: Հեքսոկինազա ֆերմենտի իզոֆերմենտային կազմության որոշման ժամանակ պարզվեց, որ նեյրոհորմոն C -ի ազդեցությամբ հեքսոկինազա $ՀԿ_3$ -ի քանակը զգալի չափով ավելանում է:

Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ նեյրոհորմոն C -ի ազդեցության ներքո տեղի է ունենում հեքսոկինազա ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվության զգալի բարձրացում սրտամկանում, իսկ իզոֆերմենտային կազ-

մում տեղի է ունենում բնորոշ փոփոխություն դեպի ZH_3 -ի քանակը, որը, ըստ երևույթին, նպաստում է գլիկոլիզի արագացմանը սրտամկանում:

EFFECT OF NEUROHORMONE "C" ON THE ACTIVITY OF HEXOKYNASE AND ITS ISOENZYME COMPOSITION IN RABBIT HEART AND OTHER MUSCLES

S. S. ALEXANIAN, L. A. KARAPETIAN

The effect of neurohormone "C" on hexokynase (HK) total activity and isoenzyme spectrum in rabbit heart, smooth, slowly contracting red and rapidly contracting white skeletal muscles has been studied. Data obtained indicate that neurohormone "C" injection results in the increase of HK activity. The electrophoretic analyses of heart muscle soluble fraction has revealed increase of HK_3 content.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алексанян С. С., Галоян А. А. Биолог. ж. Армении, 30, 2, 1977.
2. Галоян А. А., Алексанян С. С. ДАН АрмССР, 58, 3, 1974.
3. Галоян А. А., Алексанян С. С., Абеян Ж. Г., Бархударян Н. А. ДАН АрмССР, 60, 2, 1975.
4. Ильин В. С., Титова Г. В. Биохимия, 28, 6, 987, 1963.
5. Ильин В. С., Титова Г. В. ДАН СССР, 141, 1, 227, 1961.
6. Ильин В. С., Усстенко Н. С. Биохимия, 37, 1, 127, 1972.
7. Мовсесян Н. О., Хумарян Н. Г., Мовсесян С. Г. Лабораторное дело, 7, 445, 1976.
8. Cahn R. D., Kaplan N. O. Science, 136, 962, 1962.
9. Harrison A. P. Anal. Biochem, 61, 2, 500, 1974.
10. Howard M. Katzen Biochem. Bioph. res. comm., 19, 3, 337, 1965.
11. Katzen H. M. Advance in enzyme regulation, 5, 335, 1967.
12. Katzen H. M., Schimke R. T. Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 54, 1218, 1965.
13. Katzen H. M. et al. Ann. N. J. Acad. Sci., 151, 351, 1968.
14. Long G. Biochem. J., 50, 5, 407, 1951.
15. Ruth P. Anal. Biochem., 9, 401, 4, 1964.

МОДИФИКАЦИЯ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ

М. Л. ГЕВОРКЯН, М. А. ДАВТЯН

Исследовали инактивацию и разрушение триптофанилов аргиназы печени крупного рогатого скота при взаимодействии с N-бромсукцинимидом. Показано, что субстрат и конкурентные ингибиторы частично предохраняют фермент от инактивации. Изучалась также роль свободных сульфгидрильных групп в проявлении активности аргиназы. Сделано заключение, что инактивация ее является результатом взаимодействия N-бромсукцинимида с несколькими типами функциональных групп фермента, часть которых входит, по-видимому, в состав активного центра аргиназы.

Изучению роли отдельных функциональных групп в проявлении активности ферментов в настоящее время уделяется большое внимание. Результаты подобных исследований позволяют ближе подойти к выяснению механизма действия ферментов, понять сложную взаимосвязь между их структурой и функцией. Аргиназа относится к сравнительно мало изученным с этой точки зрения ферментам.

Проведенные нами ранее исследования по воздействию УФ облучения на аргиназу печени крупного рогатого скота [1] позволили предположить, что в проявлении активности этого фермента определенную роль могут играть остатки триптофана. В опытах по сенсibilизированному фотоокислению аргиназы в присутствии эозина [2] было показано, однако, что разрушение триптофанилов в этих условиях не отражается на активности фермента. Представляло интерес изучение влияния на аргиназу специфического реагента N-бромсукцинимида (НБС). Хотя наряду с остатками триптофана этот реагент может взаимодействовать и с некоторыми другими функциональными группами в белках (остатками тирозина, гистидина, цистеина и др.) [3, 4], его применение позволило получить ценные сведения о роли отдельных аминокислотных остатков в активности целого ряда ферментов [5—11], в том числе и аргиназы, полученной из стафилококковых бактерий [12]. В опытах этих авторов наблюдалось значительное торможение ферментативной активности и частичная защита субстратом от инактивации; по их мнению, ингибирование активности фермента не связано с остатками триптофана и является результатом действия более сложного механизма.

Нами исследовалось влияние НБС на аргиназу печени крупного рогатого скота.

Материал и методика. В работе использовались препараты из печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия), N-бромсукцинимид, L-аргинин, L-лизин, L-орнитин, мочевина, додецилсульфат натрия (ДС)—отечественного производства, параклормеркурибензоат (ПХМБ)—натриевая соль—фирмы Chemapol (Чехословакия).

Аргиназная активность определялась по методу Ратнер, как описано ранее [1]. Растворы белка готовились на 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). Опыты проводились при комнатной температуре (22°). Реакцию аргиназы с НБС проводили следующим образом: к раствору белка добавляли свежеприготовленный водный раствор НБС и эту смесь инкубировали до двух часов. Затем брались пробы для определения активности и измерения флуоресценции (ФЛ). Интенсивность триптофановой ФЛ измерялась на спектрофлуориметре MPS-2A (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 297 нм.

Число модифицирующихся триптофанилов определялось по методу Виткопа [13, 14]. К раствору аргиназы ($8,3 \cdot 10^{-6}$ М) в кварцевой кювете добавляли раствор НБС ($4 \cdot 10^{-4}$ М) по 0,1 мл, перемешивали переворачиванием и через 10—15 мин измеряли поглощение при 280 нм. Затем брали пробу для определения аргиназной активности.

Растворы аргиназы денатурировали в 5,8 и 8 М мочевины, а также в растворе с рН 2,75 в течение 2—3 час. при комнатной температуре.

Число сульфгидрильных групп определялось по методу Бойера [15]. К раствору белка в кварцевой кювете добавляли раствор ПХМБ, стандартизированный при 232 нм, по 0,02 мл, и после перемешивания измеряли изменение поглощения при 250 нм. Молекулярный вес аргиназы принимался равным 120000 дальтон.

Результаты и обсуждение. Как показали наши эксперименты, N-бромсукцинимид значительно тормозит аргиназную активность (рис. 1) Из рисунка видно, что в первые 5 мин активность аргиназы резко

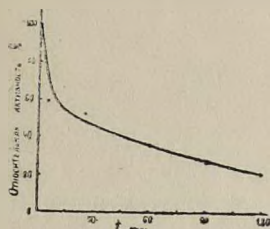


Рис. 1.

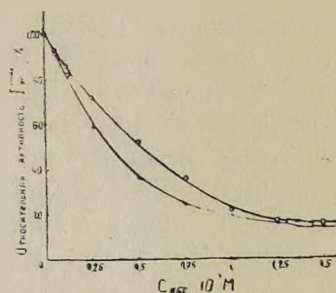


Рис. 2.

Рис. 1. Зависимость относительной аргиназной активности от времени в ходе реакции аргиназы ($1,8 \cdot 10^{-6}$ М) с НБС ($1,25 \cdot 10^{-4}$ М).

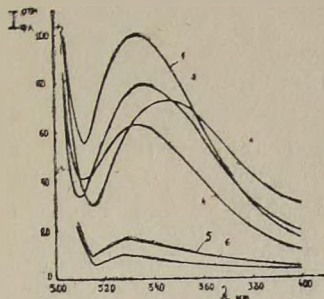
Рис. 2. Влияние различных концентраций НБС на активность (o) и интенсивность ФЛ (⊗) растворов аргиназы ($1,8 \cdot 10^{-6}$ М).

уменьшается, затем продолжает медленно снижаться и через два часа инактивация достигает 80%. Вначале, по-видимому, происходит быстрая модификация легко взаимодействующих с реагентом аминокислотных остатков, связанных с активностью фермента. Дальнейшее снижение ее, вероятно, является результатом дополнительной модификации менее реакционноспособных групп, или функциональных групп, которые стали доступны реагенту после структурных изменений, вызванных первичными реакциями модификации.

Исследовалась также зависимость аргиназной активности от концентрации реагента. Как видно из рис. 2, с увеличением концентрации НБС активность фермента снижается и при $1,25 \cdot 10^{-4}$ М в растворе уменьшается на 85 %. Однако и при использовании большей концентрации, $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, после двухчасовой инкубации полной инактивации не происходит, активность снижается на 85 %.

Параллельно с определением активности фермента были измерены спектры триптофановой флуоресценции в исследуемых растворах. Максимум ФЛ остатков триптофана аргиназы находится, как известно, в области 335—337 нм. При добавлении НБС интенсивность ФЛ значительно уменьшается и максимум несколько смещается в коротковолновую область (рис. 3). На рис. 2 приведены значения относительной интенсив-

Рис. 3. Кривые интенсивности флуоресценции остатков триптофана в аргиназе. 1— аргиназа в 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). 2—в 5,8 М мочеvine, 3—в 8 М мочеvine, 4—в глицин-НСI буфере (рН 2,75), 5, 6—после двухчасовой инкубации с НБС при концентрациях реагента $1,25 \cdot 10^{-4}$ М и $2,5 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.



ности ФЛ триптофанилов в максимуме в зависимости от концентрации НБС. Существует различие в характере уменьшения интенсивности ФЛ и снижения активности аргиназы. Кроме разрушения остатков триптофана на ход снижения интенсивности ФЛ, очевидно, влияет и изменение микроокружения этих остатков, происходящее в результате конформационных изменений молекулы аргиназы в процессе реакции. Почти полное тушение интенсивности ФЛ может свидетельствовать о том, что модифицирующиеся остатки триптофана являются основными центрами ФЛ белка и, по-видимому, расположены в доступных для реагента участках макромолекулы.

Определение числа модифицированных триптофанилов в аргиназе при взаимодействии с НБС (рис. 4) показало, что в данных условиях разрушается около 2,5—3 остатков триптофана на молекулу фермента. На рис. 4 б приведена зависимость между числом модифицированных триптофанилов и аргиназной активностью. Экстраполяция кривой снижения активности к нулевой точке показывает, что остатки триптофана, модифицирующиеся в ходе реакции с НБС, могут быть в одинаковой степени связаны с активностью аргиназы. Из рис. 4 а видно, что при добавлении около 30 моль НБС на моль белка, когда активность подавляется на 50 %, триптофаны уже модифицированы. Дальнейшее добавление реагента не влияет на число модифицирующихся остатков, хотя активность продолжает снижаться. Это свидетельствует о том, что в процесс инактивации вносят вклад функциональные группы аргиназы, взаимодействующие с НБС, параллельно с модификацией триптофанилов.

Было определено также число модифицирующихся остатков триптофана в растворах денатурированного белка. В растворе 5,8 и 8 М мочевины выявлялось около 6 остатков триптофана на молекулу фермента. Измерение спектров триптофановой ФЛ аргиназы в этих растворах показало, что в растворе 5,8 М мочевины происходит только некоторое снижение интенсивности ФЛ аргиназы, тогда как в 8 М мочевины оно сопровождается характерным для большинства белков смещением максимума ФЛ в длинноволновую область (рис. 3). Таким образом, увеличение числа доступных для НБС остатков триптофана происходит уже в растворе 5,8 М мочевины, а дальнейшее разворачивание молекулы белка в 8 М мочевины изменяет, по-видимому, только характер микроокружения триптофанилов, приводя к смещению положения максимума ФЛ. В растворе с pH 2,75, в котором, как показано некоторыми авторами [16, 17], аргиназа распадается на субъединицы и теряет активность, модифицируется около 7—8 остатков триптофана на молекулу белка. В этом случае, как и в растворе 5,8 М мочевины, не наблюдается смещения положения максимума ФЛ, происходит только снижение интенсивности (рис. 3). Таким образом, наибольшее число триптофанилов взаимодействует с НБС в растворе с кислым pH.

Далее были проведены опыты в присутствии природного субстрата L-аргинина и двух конкурентных ингибиторов— L-лизина и L-орнитина (рис. 4 а). Присутствие этих соединений в концентрации $2,5 \cdot 10^{-2}$ М в

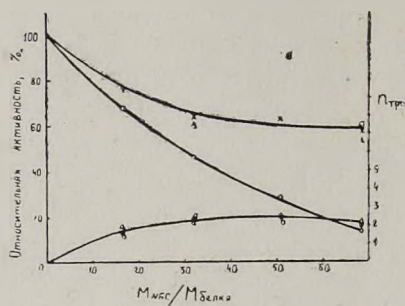


Рис. 4а.

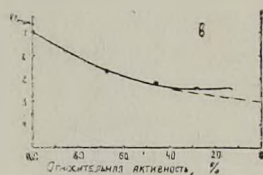


Рис. 4б.

Рис. 4. Зависимость инактивации аргиназы (о), разрушения триптофанилов (●) от концентрации НБС и влияние L-аргинина (×), L-лизина (Δ) и L-орнитина (■) на эти процессы.

реакционной смеси не отражается на числе модифицирующихся остатков, в то же время аргиназная активность заметно сохраняется. После добавления 30 моль НБС, когда исчерпано разрушение триптофанилов и активность снизилась на 35%, дальнейшее увеличение концентрации реагента не вызывает снижения активности фермента, т. е. субстрат и ингибиторы частично защищают фермент от инактивации. Функциональные группы аргиназы, предохраняемые от взаимодействия с НБС, очевидно, входят в состав ее активного центра. Тот факт, что в присутствии аргинина реагент все же вызывает снижение активности фермента на 35%, свидетельствует о модификации аминокислотных остатков,

либо входящих в состав активного центра, но не прикрываемых субстратом, либо локализованных вне его и косвенно влияющих на активность аргиназы (нарушение конформации). Таким образом, кривая активность—концентрация реагента отражает взаимодействие НБС с несколькими типами функциональных групп, влияющих на активность аргиназы. Что касается остатков триптофана, то исходя из полученных данных можно предположить, что триптофанилы, по-видимому, не входят в состав активного центра, но, возможно, их разрушение оказывает косвенное влияние на процессы инактивации.

Как уже указывалось выше, НБС взаимодействует, кроме остатков триптофана, также и с некоторыми другими функциональными группами в белках. Принимая во внимание полученные данные, представляло интерес выяснить участие также других, чувствительных к реагенту аминокислотных остатков. С этой целью было проведено определение свободных быстро реагирующих SH-групп с помощью ПХМБ. В наших опытах в аргиназе определялось около 3 SH-групп на молекулу, а ферментативная активность снижалась на 5—7%. L-аргинин, добавленный перед титрованием, не влиял на число титруемых групп и на степень инактивации фермента. Судя по всему, легкомодифицируемые ПХМБ SH-группы в аргиназе не играют существенной роли в проявлении активности фермента. В аргиназе, обработанной НБС, свободных SH-групп не было обнаружено, т. е. реагент взаимодействовал и с тиоловыми группами. В растворе 8 М мочевины с помощью ПХМБ было определено 4 SH-группы, а в 1%-ном растворе ДС—5 SH-групп. Наибольшее число их в аргиназе было обнаружено при pH 3,65—6 SH-групп на молекулу фермента. Эти, определяемые после денатурации, SH-группы находятся внутри молекулы и, возможно, участвуют в поддержании нативной конформации молекулы аргиназы. Мы наблюдали значительное ингибирование аргиназной активности в присутствии высоких концентраций ПХМБ. При добавлении 180 моль ПХМБ на моль аргиназы активность последней снижалась на 80%, а добавление 400 моль ПХМБ приводило к 100%-ной инактивации. В литературе имеются данные об инактивации аргиназы высокими концентрациями ПХМБ [12]. Однако в последнее время в ряде работ указывается, что ПХМБ может вызывать инактивацию ферментов не в результате взаимодействия с тиоловыми группами, а вследствие нарушения нативной конформации при взаимодействии с другими аминокислотными остатками белка [19]. Показано даже, что ПХМБ подавляет активность ферментов, вообще не содержащих сульфгидрильных групп, что также объясняется конформационными изменениями, вызванными его молекулой [20]. На основании этих данных, а также наших результатов можно предположить, что наблюдаемый эффект при использовании высоких концентраций ПХМБ также является результатом неспецифических структурных изменений молекулы фермента, и аргиназа печени крупного рогатого скота, так же как и аргиназа печени лошади [18] и печени крысы [21], не является тиоловым ферментом. Таким образом, хотя НБС и модифицирует SH-

группы в аргиназе, это взаимодействие не является основной причиной потери активности в данных условиях. Здесь, очевидно, имеет место модификация других, чувствительных к реагенту функциональных групп, играющих существенную роль в процессах инактивации.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно заключить, что инактивация аргиназы из печени крупного рогатого скота происходит в результате модификации НБС как аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра фермента, так и, по-видимому, функциональных групп, косвенно влияющих на проявление активности фермента.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 31.VII 1978 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԱՐԳԻՆԱՋԱՅԻ ՄՈԴԻՖԻԿԱՅԻԱՆ N-ԲՐՈՄՍՍՈՒԿՆԻՆԻՄԻԴՈՎ

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻԹՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է խոշոր եղջերավոր անասունների լյարդի արգինազայի ինակտիվացումը և տրիպտոֆանի մնացորդների քայքայումը N-բրոմսուկցինիմիդի ազդեցության հետևանքով: Ցույց է տրվում, որ սուբստրատը և մրրակացային ինհիբիտորները մասամբ պաշտպանում են ֆերմենտը ինակտիվացումից:

Հետազոտվել է նաև ազատ SH-խմբերի դերը ֆերմենտի ակտիվության մեջ: Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ արգինազայի ինակտիվացումը տեղի է ունենում N-բրոմսուկցինիմիդի և արգինազայի մի քանի տիպի ֆունկցիոնալ խմբերի փոխազդեցության հետևանքով, որոնց մի մասը, հավանաբար, մտնում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի կազմության մեջ:

CATTLE LIVER ARGINASE MODIFICATION BY N-BROMOSUCCINIMIDE

M. L. GEVORGIAN, M. A. DAVTIAN

The inactivation and destruction of tryptophan residues of cattle liver arginase have been investigated. The arginase activity is partly protected by substratum and competitive inhibitors. The data lead to the conclusion that inactivation of arginase is the result of interaction of NBS with several functional groups of enzyme, some of which are probably involved in the active site of arginase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44, 1974.
2. Геворкян М. Л., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 3, 32, 1976.
3. Shaltiel S., Patchornik A. J. Am. Chem. Soc., 85, 2799, 1963.
4. Brand L., Shaltiel S. Biochim. et biophys. acta, 88, 2, 338, 1964.

5. Блума Р. К., Вина И. А., Жагат Р. А. Химия природн. соед., 2, 228, 1975.
6. Yelding K. L., Summers M. R., Gregg R. S. Ala. J. Med. Sci., 10, 4, 393, 1973.
7. Irie M., Harada M., Sawada F. J. Biochem., 72, 6, 1351, 1972.
8. Nagami K. Biochem. and biophys. Res. Commun., 51, 2, 364, 1973.
9. Bell J. E., Castellino F. Y., Trayer J. P., Hill R. L. J. Biol. Chem., 250, 19, 7579, 1975.
10. Hirose M., Sugimoto E., Chiba H. Biochim. et biophys. acta, 250, 3, 514, 1971.
11. Fujimori H., Ohnishi M., Himori K. J. Biochem., 75, 4, 767, 1974.
12. Soru E., Zaharia O. Rev. roum. biochim., 13, 1, 49, 1976.
13. Patchornik A., Louson W. B., Gross E., Witcop B. J. Am. Chem. Soc., 82, 5923, 1960.
14. Spande T. F., Witcop W. B. Methods In Enzymology, 11, 500, 1967.
15. Boyer P. D. J. Am. Chem. Soc. 76, 4331, 1954.
16. Hosoyama J. Eur. J. Biochem., 27, 1, 48, 1972.
17. Vielle-Breitburg F., Orth G. J. Biol. Chem., 247, 4, 1227, 1972.
18. Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A. Arch. Biochem. and biophys., 62, 446, 1956.
19. Garland R. C., Cori C. F., Chang H. W. Mol. and Cell. Biochem., 12, 23, 1979.
20. Greenblatt G. A., Sarkissian I. V. Sub-Cellul. Biochem., 3, 249, 1974.
21. Mora J., Tarrab R., Bojalil L. F. Biochim. et biophys. acta, 118, 206, 1966.

СПЕКТР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА У СОБАК ПРИ ВЫКЛЮЧЕНИИ
ВНЕШНЕСЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. Н. ПОМЕЛЬЦОВ, В. Н. ШАТАЛОВ

В хроническом эксперименте на собаках изучался спектр протеолитической активности желудочного и кишечного сока в норме и в различные сроки после нарушения внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы. Показано, что нарушение экзокринной функции поджелудочной железы приводит к проявлению протеолитической активности желудочного сока при значениях рН реакции 4,0, что совершенно не характерно для желудочного сока интактных животных. В кишечном соке в отдаленные сроки протеолитическая активность не только возрастает, но даже значительно снижается при кислом значении рН реакции.

Полученные данные позволяют рассматривать желудок как орган, играющий ведущую роль в компенсации нарушенных в результате перевязки панкреатических протоков процессов гидролиза белка.

До настоящего времени не существует единого мнения об оптимуме действия протеолитических ферментов в желудочном соке. Так, отдельные авторы [4,5] полагают, что активность протеолитических ферментов в желудке выражена при кислом значении рН; при этом выявляются два оптимума — 1,5—2,0 и 3,2—3,5. В то же время имеются данные, указывающие на возможность протеолитического действия желудочного сока при значениях рН реакции, равных 5,4 [6] и даже 7,0—7,6 и 8,2—8,4 [7].

В предыдущих наших исследованиях [1—3] было показано, что внешнесекреторная недостаточность поджелудочной железы приводит к резкому возрастанию протеолитической активности желудочного сока. В этих работах речь шла о суммарной протеолитической активности желудочного сока, когда определение ее велось при кислом значении рН реакции—1,5.

Целью настоящей работы было исследование спектра протеолитической активности ферментов желудочного сока интактных животных, а также животных, перенесших оперативное выключение внешней секреции поджелудочной железы (перевязка протоков).

Материал и методика. Протеолитическая активность желудочного сока определялась по разработанной нами методике, суть которой состоит в том, что с ее помощью удается определение этого показателя в широком диапазоне рН. Это как нельзя бо-

лее соответствовало задачам исследования, так как в предварительной серии опытов нами было обнаружено значительное смещение рН желудочного сока собак с перевязкой панкреатических протоков в щелочную сторону (вплоть до 4,6, в среднем $4,21 \pm 0,16$).

В качестве расщепляемого субстрата нами использовался 1%-ный раствор казеина (по 1 мл, т. е. по 10.000 мкг в каждой пробе). Реакции ставились при 3-х значениях рН - 1,5, 4,0 и 7,0. Методика применялась с таким расчетом, что максимально возможная активность не могла превышать 1.000 условных единиц.

Опыты ставились на 24-х собаках с большой фистулой желудка по Басову (14 животных). Для определения протеолитической активности кишечного сока производилась операция изоляции отрезанием тонкой кишки по Тирн-Велла, 8-ми собакам изолированная петля тонкой кишки была сформирована из верхнего отдела, 8-ми из среднего и 8-ми из нижнего.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные показали, что в желудочном соке интактных собак имеется два пика протеолитической активности. Наибольшей величины этот показатель у нормальных животных достигает при рН 1,5 ($695 \pm 54,1$ усл. ед.). При рН 7,0 он несколько ниже ($512,2 \pm 48,7$). И, наконец, при рН 4,0 желудочный сок интактных животных совершенно не обладает протеолитической активностью.

Наибольшей протеолитической активностью кишечный сок всех 3-х отделов тонкой кишки интактных животных обладает при значениях рН реакции 7,0. При рН 1,5 протеолитическая активность кишечного сока всех трех исследовавшихся нами отделов тонкой кишки несколько ниже, а при рН 4,0 она вообще не выявляется.

Выключение внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы приводит к значительному изменению спектра протеолитической активности как желудочного, так и кишечного сока.

На рис. 1 представлены результаты исследования протеолитической активности кишечного и желудочного сока при значении рН 1,5 в различные сроки после перевязки протоков поджелудочной железы. Согласно этим данным, в ранние послеоперационные сроки (до 2—3-х месяцев) не выявляется сколько-нибудь выраженной закономерности в динамике протеолитической активности кишечного сока всех 3-х отделов тонкой кишки. Периоды снижения сменяются подъемами и наоборот. Все же следует отметить, что к концу этого срока отмечается выраженное снижение протеолитической активности кишечного сока во всех отделах тонкой кишки. В дальнейшем она устанавливается на уровне, значительно более низком, чем у интактных животных.

Что касается протеолитической активности желудочного сока подопытных животных, то следует сказать, что выключение внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы практически не вызывает сколько-нибудь значительного изменения ее при рН реакции 1,5 на протяжении всего времени исследования.

Совершенно иная картина выявляется при изучении протеолитической активности желудочного и кишечного сока собак после нарушения экзокринной функции поджелудочной железы при значениях рН реакции 4,00 (рис. 2). На протяжении первых 2-х месяцев после

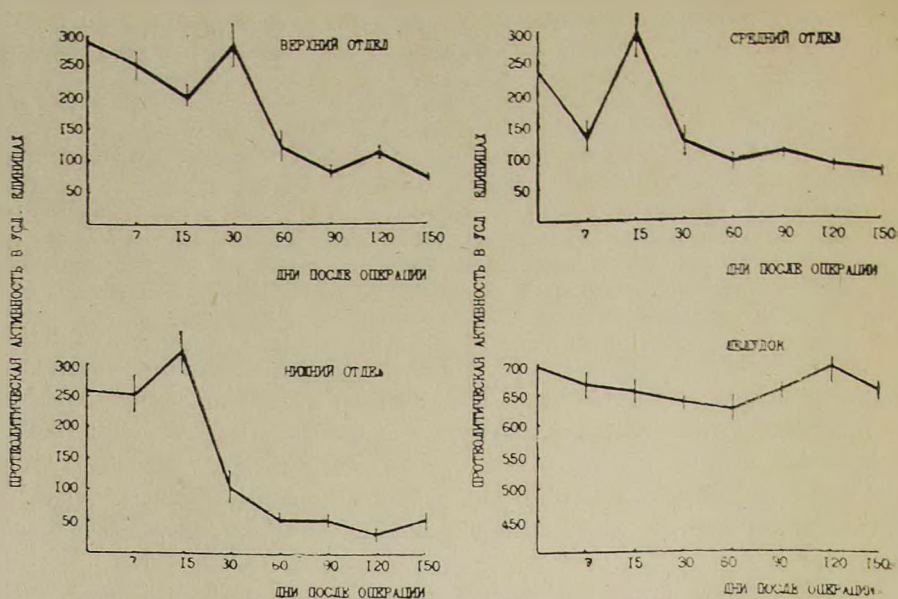


Рис. 1. Динамика протеолитической активности желудочного и кишечного сока в различные сроки после нарушения внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы, pH 1,5.

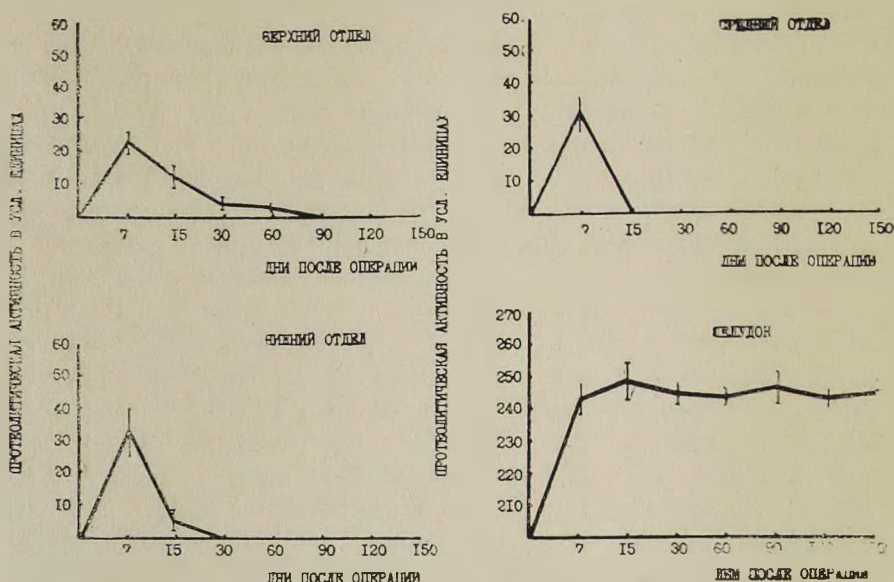


Рис. 2. Динамика протеолитической активности желудочного и кишечного сока в различные сроки после нарушения внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы, pH 4,0.

перевязки протоков поджелудочной железы отмечается слабая (около 20 усл. ед.) протеолитическая активность в верхнем отделе тонкой кишки. Затем, начиная с 3-го послеоперационного месяца, она полностью исчезает и не проявляется на протяжении всего периода исследования.

Аналогичная картина была выявлена и в среднем и нижнем отделах тонкой кишки, с той лишь разницей, что проявление протеолитической активности в кишечном соке этих отделов носит еще менее длительный характер (15—30 дней).

В желудочном соке подопытных животных с первых же дней после операции отмечается появление выраженной протеолитической активности. Начиная с 7-го дня она держится на уровне 240—250 усл. ед.

При pH 7,0 нарушение внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы не приводит к сколько-нибудь заметному колебанию протеолитической активности как в различных отделах тонкой кишки, так и в желудке (рис. 3).

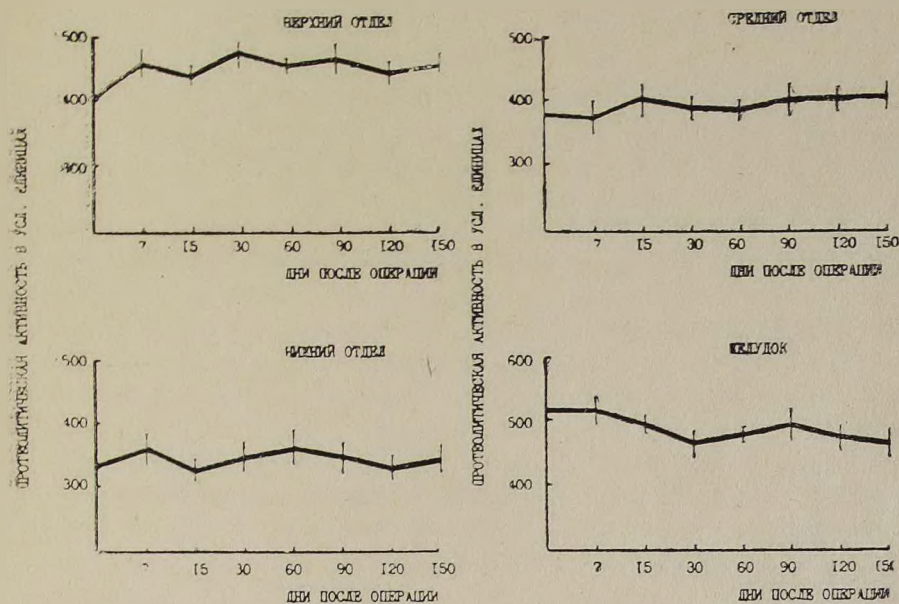


Рис. 3. Динамика протеолитической активности желудочного и кишечного сока в различные сроки после нарушения внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы, pH 7,0.

Таким образом, нарушение внешнесекреторной деятельности поджелудочной железы приводит к выраженному перераспределению спектра протеолитической активности как желудочного, так и кишечного сока подопытных собак. Это особенно выражено в желудочном соке. Если при pH 1,5 и 7,0 протеолитическая активность желудочного сока не претерпевает сколько-нибудь значительных изменений на протяжении всего времени исследования, то при pH 4,0 отмечается не только появление, но и длительное (в наших опытах до 1,5—2 лет) существование выраженной протеолитической активности, что совершенно не характерно для желудочного сока интактных животных.

Практически протеолитическая активность в кишечном соке подопытных животных при всех исследовавшихся нами значениях pH реакции не увеличивается. Лишь в ранние послеоперационные сроки отмеча-

ется появление весьма незначительной по своей величине протеолитической активности при pH 4.0.

Описанные изменения в спектре протеолитической активности желудочного и кишечного сока животных, перенесших оперативное выключение внешней секреции поджелудочной железы, свидетельствует о том, что основную ведущую роль в компенсации нарушения процессов гидролиза белка несет желудок, а не тонкая кишка.

4-е Главное управление при МЗ СССР
(ЦНИЛ), Москва

Поступило 21.III 1979 г.

ՇՆԵՐԻ ՍՏԱՄՈՔՍԱՆՅՈՒԹԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՍՊԵԿՏՐԸ ԵՆԹԱՍՏԱՄՈՔՍԱԳԵՂՁԻ ՆԵՐՍԵԿՐԵՏՈՐ
ԴՈՐԾՈՒՆԵՈՒԹՅԱՆ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԴԵՊԸՄԻՄ

Ա. Ն. ՊՈՄԵԼՏՈՎ, Վ. Ն. ՇԱՏԱԼՈՎ

Շների վրա կատարված երկարատև փորձերի միջոցով ուսումնասիրվել է ստամոքսաճյուղի և աղիների ճյուղի սպիտակուցային ակտիվությունը նորմայում և տարբեր ժամկետներում՝ ենթաստամոքսագեղձի ներսեկրետոր գործունեության խանգարումից հետո:

Տույց է տրվում, որ ենթաստամոքսագեղձի էկզոկրինային ֆունկցիայի խանգարումը հանգեցնում է ստամոքսաճյուղի սպիտակուցային ակտիվության առաջացման pH դեպքում, որը բոլորովին հատկանշական չէ ինտակտ կենդանիների ստամոքսաճյուղի համար: Աղիների ճյուղի մեջ, տարբեր ժամկետներում, սպիտակուցային ակտիվությունը ոչ միայն ավելանում է, այլ նույնիսկ նշանակալից իջնում է pH ռեակցիայի թթու նշանակության դեպքում:

Մտացված տվյալները հնարավորություն են տալիս ստամոքսը դիտելու որպես մի օրգանի, որը առաջատար դեր է կատարում ենթաստամոքսագեղձի ծորանների կապվելու հետևանքով սպիտակուցների հիդրոլիզի պրոցեսում առաջացած խանգարումների կոմպենսացիայում:

THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF DOG GASTRIC JUICE
SPECTRUM AT THE EXTERNAL SECRETION ACTIVITY
OF PANCREAS SHUT OFF

A. I. POMELTSOV, V. I. SHATALOV

An activity of the gastric juice at pH equal to 4,0 as a result of shutting off the pancreas external secretion function has been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Благовидов Д. Ф. Докт. дисс., М., 1972.
2. Благовидов Д. Ф., Помельцов А. Н., Шаталов В. Н. Бюлл. exper. биол. и мед., 11, 19—22, 1972.
3. Благовидов Д. Ф., Саркисов Д. С. Компенсаторные процессы после резекции поджелудочной железы. М., 1976.
4. Коротько Г. Ф. Выделение ферментов железами желудка (очерки). Ташкент, 1971.
5. Янcone И. Л. Сб. Ферментативная адаптация животного организма. М., 165—167, 1974.
6. Ychimori Akira, Kawamura Takechi, Sakurada Hiroyuki, Shirane Akio, Yamagata Susumu, Miura Yoshikuni, Tsuda Katsufuji, Jamagata Shoichi. Tohoki J. Exp. Med., 118, 4, 349—354, 1976.
7. Taylor W. H. Physiol. Rev., 42, 4, 519—528, 1962.

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, В. Г. АМБАРЦУМЯН

Установлено, что 3,3',5-трийод-L-тиронин, 3,5-дйод-L-тиронин, 3,3',5-трийодтиреоуксусная и 3,3',5-трийодтиреопропионовая кислоты являются сильными ингибиторами глутаминазы митохондриальной фракции печени. Ингибирующее действие этих соединений в зависимости от количества атома йода и структуры боковой цепи проявляется в различной степени. В их присутствии стимулирующий эффект фосфата подавляется значительно сильнее, чем цитрата. Повышение концентрации фосфата не снижает тормозящего действия этих соединений, между тем как с увеличением концентрации фермента этот эффект ослабляется.

Глутаминаза в животных тканях, обладая низкой каталитической активностью в отсутствие активаторов, сильно стимулируется различными соединениями как органической, так и неорганической природы. Активаторами этого фермента являются промежуточные продукты обмена, макроэрги, гормоны, коферменты и т. д. [3, 12–14, 20, 21]. Известно, что глутаминаза мозга наиболее эффективно стимулируется гормоном щитовидной железы тироксином (T_4). При одновременном его применении с другими эффекторами фермента происходит значительное усиление их стимулирующего действия [2, 3]. Другой гормон щитовидной железы—3,3',5-трийод-L-тиронин (T_3) и ряд его производных также стимулируют активность глутаминазы мозга, но в различной степени [4].

Следует отметить, что влияние этих соединений на активность глутаминазы печени не изучена. В связи с этим в настоящей работе мы задались целью исследовать роль тиреоидных гормонов и их аналогов в регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции печени.

Материал и методика. В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию печени крыс, полученную по ранее описанной методике [1]. Брали водную взвесь этой фракции, соответствующей 50, 100 и 200 мг ткани на пробу.

Инкубационная смесь содержала: 0,4 мл митохондриальной фракции, 0,5 мл 0,2 М трис-НСl буфера, рН 7,5, или 8,5, 20 мкмоль/мл L-глутамин, 40 мкмоль/мл L-глутаминовой кислоты (ГК) и различные концентрации T_4 , T_3 , 3,5-дйод-L-тиронина, T_2 , 3,3',5-трийодтиреоуксусной кислоты, (T_3 УК) 3,3',5-трийодпропионовой кислоты (T_3 ПК), L-тиронина, 3-йод-L-тирозина, 3,5-дйод-L-тирозина и J_2 . Все перечисленные выше реактивы производства фирмы Sigma, за исключением T_4 (Reanal). Об активности глутаминазы судили по выходу аммиака, который определяли по методу Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. [6].

Результаты и обсуждение. В периферических тканях животных тиреоидные гормоны подвергаются многосторонним метаболическим превращениям, затрагивающим различные части структуры их молекулы. В результате этих превращений образуются как дейодированные формы гормонов, так и их аналоги с различными изменениями аланинового радикала. Не исключено, что некоторые из этих дериватов могут обладать более сильной физиологической активностью и узким диапазоном действия, чем интактные молекулы T_4 и T_3 [6, 15, 18]. Механизм регуляции метаболизма под действием тиреоидных гормонов многообразен. Одним из путей является их непосредственное влияние на каталитическую активность ферментов. В ряде случаев действие тиреоидных гормонов на активность ферментов носит неспецифический характер. Например, ингибирование АТФ-азы, ксантиноксидазы и малатдегидрогеназы наблюдается не только в присутствии тиреоидных гормонов, но и других йодсодержащих соединений—цианистого и молскульного йода [9, 17, 19].

В наших исследованиях испытывалось влияние на активность глутаминазы печени не только T_4 , T_3 , T_2 , T_3 УК, T_3 ПК, но и 3-йод-L-тирозина, 3,5-дийод-L-тирозина и J_2 . Ввиду того, что этот фермент в промытой митохондриальной фракции печени обладает очень низкой каталитической активностью, все опыты проводили в присутствии активаторов—фосфата или цитрата. Как показывают данные, приведенные в табл., испытанные нами соединения по-разному действуют на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени. Так, T_4 , имея в своей молекуле 4 атома йода, и тиронин, который вовсе не содержит йод, практически не влияют на активность фермента, стимулируемого как фосфатом, так и цитратом. В то же время T_3 и различные его аналоги оказывают сильное ингибирующее действие. Наиболее эффективным среди всех использованных соединений является T_2 . Ингибирующее же действие T_3 заметно слабее.

Из приведенных данных следует, что тормозящее действие тиреоидных гормонов находится в прямой зависимости от содержания атома йода в их молекуле. С уменьшением количества йода усиливается ингибирующий эффект этих соединений, а полное отсутствие его приводит к исчезновению тормозящего действия.

Как выяснилось, изменение структуры аланинового радикала T_3 также отражается на ингибировании активности глутаминазы. Так, T_3 УК и T_3 ПК намного сильнее подавляют стимулирующий эффект активаторов глутаминазы, чем сам T_3 (таблица). Однако эти соединения, имея различную структуру боковой цепи, почти в одинаковой степени ингибируют активность фермента.

Из результатов, приведенных в таблице, видно, что такие дериваты T_4 и T_3 , как монойод и дийодтирозин, не влияют на активность глутаминазы. Эти данные показывают, что целостность тирониновой структуры в молекуле гормонов необходима для проявления их тормозящего действия.

Таблица

Влияние тироксина, трийодтиронина и его аналогов на активность глутаминазы
митохондриальной фракции печени крыс (NH_2 мкмоль/г свежей ткани). pH 8,5

Добавки, мкмоль/мл		NaH_2PO_4	Цитрат
		20	20
L-тироксин		94±2,8 (35)	86±2,5 (19)
	0,05	102±5,1 (6)	89±3,8 (6)
	0,1	110±6,0 (6)	94±4,2 (6)
3,3',5-трийод-L-тиронин	0,025	49±2,5 (13)	78±4,8 (6)
	0,05	6±2,3 (10)	65±2,4 (6)
	0,025	21±2,4 (13)	52±2,8 (13)
3,5-дийод-L-тиронин	0,05	0 (3)	21±1,6 (6)
	0,05	89±4,2 (6)	80±4,8 (6)
3,3',5-трийодтиреоуксусная кислота	0,025	29±2,5 (6)	65±3,9 (6)
	0,05	4±0,1 (6)	42±2,0 (6)
3,3',5-трийодтиреопропионовая кислота	0,025	25±2,2 (10)	61±4,4 (8)
	0,05	2±0,2 (6)	46±3,1 (6)
3-йод-L-тирозин	0,05	92±5,7 (6)	80±6,4 (6)
3,5 йод-L-тирозин	0,05	96±3,5 (6)	82±6,8 (6)
молекулярный йод	0,5	90±5,0 (6)	83±6,4 (6)

Существует мнение, что при действии тиреоидных гормонов высвобождаются активные йодные радикалы, которые имитируют гормональный эффект, и что гормоны действуют на различные клеточные структуры либо как интактные молекулы, либо как радикалы йода [5, 11]. Следует отметить, что молекулярный йод также воспроизводит многие эффекты тиреоидных гормонов. Учитывая это обстоятельство и тот факт, что печень обладает высокой дейодазной активностью [16], мы решили изучить влияние йода на активность глутаминазы печени. Известно, что глутаминаза печени является тиоловым ферментом [12, 22], а молекулярный йод обладает способностью блокировать SH-группы ферментов. Однако, как выяснилось из наших исследований, I_2 не ингибирует активность глутаминазы печени. Следовательно, тормозящее действие тиреоидных гормонов нельзя объяснить образованием йода из их молекулы во время инкубации.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что действие T_3 и его аналогов на активность глутаминазы носит специфический характер.

Результаты, представленные в таблице, показывают, что степень ингибирования под действием испытанных соединений зависит также от применяемого активатора глутаминазы. Так, если низкие концентрации T_2 , T_3 УК и T_3 ПК заметно ингибируют активность фермента в присутствии фосфата, то в присутствии цитрата этот эффект незначителен. Сравнительно высокие концентрации указанных веществ (0.05 мкмоль/мл) приводят почти к полному ингибированию стимулирующего действия фосфата, между тем как эффект цитрата тормозится на 50—60%. Сильное угнетение активирующего влияния цитрата наблюдается лишь в присутствии T_2 .

Известно, что кривая зависимости активности ферментов от концентрации активаторов, имея гиперболическую форму, под действием ингибитора может перейти в сигмоидную. Как видно из рис. 1, кривая

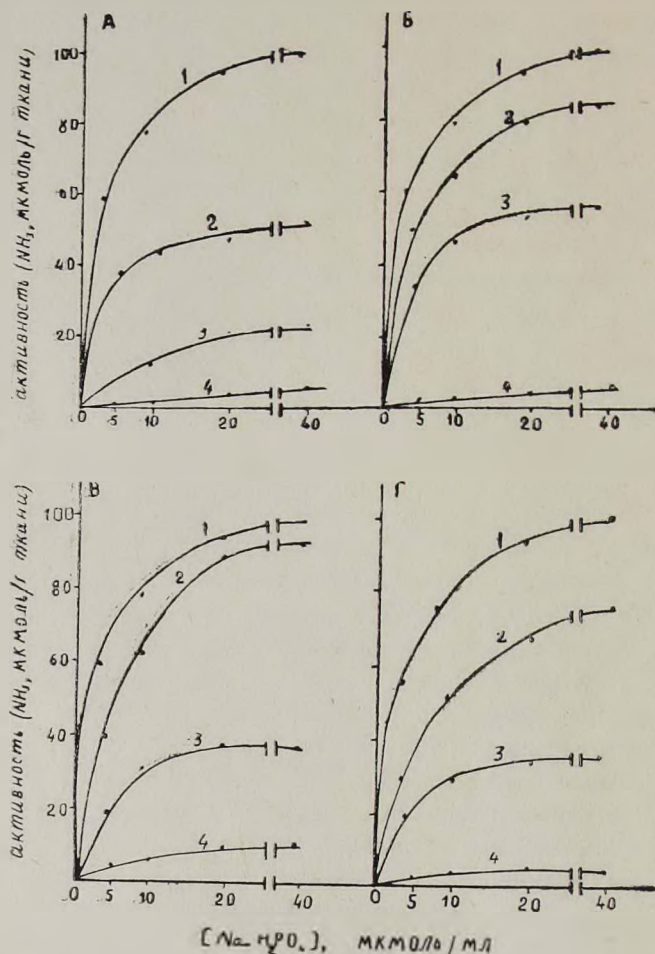


Рис. 1. Влияние T_2 (А), T_3 (Б), T_3 УК (В) и T_3 ПК (Г) на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени, стимулируемой фосфатом. 1—фосфат без ингибитора; 2—фосфат + 0,0125 мкмоль/мл ингибитора; 3—фосфат + 0,025 мкмоль/мл ингибитора; 4—фосфат + 0,05 мкмоль/мл ингибитора.

зависимости активности глутаминазы от концентрации фосфата имеет гиперболическую форму. В присутствии возрастающих концентраций T_3 , T_2 , T_3 УК и T_3 ПК, хотя и происходит значительное снижение каталитической активности фермента, однако форма кривой не меняется. Из этого же рисунка видно, что значительное увеличение концентрации фосфата не ослабляет ингибирующего эффекта указанных соединений. Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что I_{50} для $T_2=0,0165$, для T_3 ПК=0,0198, для T_3 УК=0,021, а для $T_3=0,026$ мкмоль/мл.

Глутаминовая кислота сильно ингибирует активность глутаминазы мозга и почек [12]. При низких значениях pH ее ингибирующее действие на активность фермента значительно усиливается [2]. В связи с этим было изучено влияние T_2 и ГК на активность глутаминазы печени при pH 7,5. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что при этом значении pH наблюдается некоторая тенденция к усилению тормозящего действия T_2 .

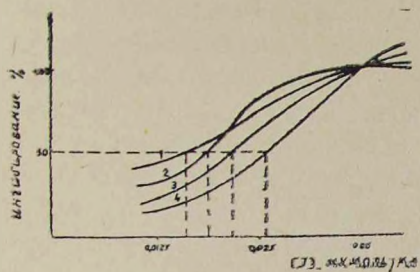


Рис. 2.

Рис. 2. Величины I_{50} . 1—для T_2 ; 2— T_3 ПК; 3— T_3 УК; 4— T_3 .

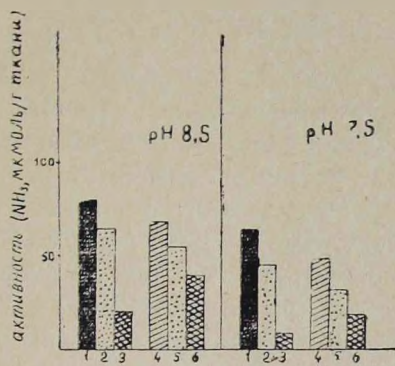


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние T_2 и ГК (40 мкмоль/мл) на активность глутаминазы печени, стимулируемой фосфатом и цитратом при разных значениях pH среды.

1—фосфат—20 мкмоль/мл; 2—фосфат+ГК; 3—фосфат+ T_2 (0,025 мкмоль/мл); 4—цитрат—20 мкмоль/мл; 5—цитрат+ГК; 6—цитрат+ T_2 (0,025 мкмоль/мл).

Примечательно, что ГК (40 мкмоль/мл) в достаточно высоких концентрациях оказывает слабое ингибирующее действие на активность глутаминазы печени. Ее эффект в зависимости от pH среды и применяемого активатора меняется лишь незначительно (рис. 3). Следует отметить, что T_3 и его производные являются единственными природными соединениями, обладающими столь мощным ингибирующим действием на активность глутаминазы печени.

Далее мы исследовали эффект тиреоидных гормонов и их производных на активность глутаминазы в зависимости от концентрации фермента. Как видно из рис. 4, с увеличением количества митохондриальной фракции удельная активность глутаминазы линейно возрастает. Однако под действием T_3 и T_2 кривая этой зависимости из гиперболической формы переходит в сигмовидную. Можно предположить, что под действием тиреоидных гормонов меняется агрегатное состояние или же

происходит конформационная перестройка четвертичной структуры фермента, которая приводит к подавлению его активности. По всей вероятности, T_3 и его аналоги являются аллостерическими ингибиторами глутаминазы митохондриальной фракции печени.

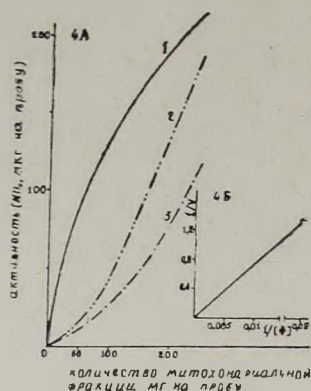


Рис. 4 А. Зависимость активности глутаминазы печени от количества митохондриальной фракции в присутствии T_2 и T_3 . 1—фосфат—20 мкмоль/мл; 2—фосфат+ T_3 (0,05 мкмоль/мл); 3—фосфат+ T_2 (0,025 мкмоль/мл). 4 Б. График двойных обратных величин зависимости активности фермента от количества митохондриальной фракции печени без ингибитора.

Из данных настоящего, а также ранее проведенных исследований выяснилось, что T_3 и его производные оказывают противоположное действие на активность глутаминазы мозга и печени. Они, являясь сильными активаторами для мозговой глутаминазы, столь же сильно подавляют активность этого фермента в печени. Как показали исследования, проведенные в нашей лаборатории, тиреоидные гормоны и их аналоги активируют глутаминазу митохондриальной фракции почек и сильно потенцируют стимулирующий эффект фосфата. Очевидно, такое различие в свойствах глутаминазы мозга, печени и почек обуславливается особенностями метаболизма этих органов.

Интересно, что как тормозящее, так и стимулирующее действие T_3 и его аналогов на активность глутаминазы мозга и печени подчиняется определенным закономерностям, зависящим от структуры их молекулы. Так, при уменьшении содержания йода в молекуле T_3 угнетающее действие его на глутаминазу печени заметно возрастает, а стимулирующий эффект в мозге значительно снижается, между тем как различные модификации аланинового радикала T_3 приводят к усилению как активирующего, так и ингибирующего эффекта их.

T_4 и T_3 как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* оказывают одинаковое влияние на различные метаболические процессы и активность отдельных ферментов. Примечательно, что на глутаминазу печени они действуют по-разному.

Следует отметить, что содержание T_4 в организме животных значительно больше, чем T_3 . В то же время в периферических тканях благодаря наличию дейодаз T_4 может превращаться в T_3 . Печеночная ткань, обладая очень высокой дейодазной активностью, достаточно интенсивно дейодирует T_4 , а еще сильнее T_3 [7, 8, 10]. Весьма вероятно, что эти превращения тиреоидных гормонов могут играть важную роль в регуляции активности глутаминазы печени.

ԹԻՐՈՒԻ ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՅ ԱՇԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆՈՒՐԻԱԿԱՆ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ
ԳԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԶՍՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Վ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՏՈՒՄՅԱՆ

Կատարված հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ 3,3',5-տրիյոդ-Լ-թիրոնինը, 3,5-դիյոդ-Լ-թիրոնինը, 3,3',5-տրիյոդթիրեոբացախաթթուն և 3,3',5-տրիյոդթիրեոպրոպիոնաթթուն համեմատաբար չնչին դոզաներով օգտագործելիս խիստ արգելակում են լյարդի գլյուտամինազայի ակտիվության խթանումը անօրդանական ֆոսֆատի և ցիտրատի կողմից: Նշված միացությունների արդեւակիչ հատկությունը ավելի է ուժեղանում նրանց մոլեկուլում պարունակվող յոդի քանակության պակասեցման, ինչպես նաև ալանինային կողմնային շղթայի բարդացման հետ մեկտեղ:

Նշենք, որ 3,3',5-տրիյոդ-Լ-թիրոնինը և նրա ածանցյալները ֆոսֆատի խթանող հատկությունն ավելի ուժեղ են ճնշում, քան ցիտրատի: Ընդ որում, ֆոսֆատի քանակության ավելացումը ոչ մի ազդեցություն չի թողնում հետազոտված միացությունների արգելակող հատկության վրա, մինչդեռ միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի քանակության ավելացման հետ մեկտեղ ղգալիորեն թուլանում է նրանց կողմից լյարդի գլյուտամինազայի վրա ցուցաբերած ճնշող ազդեցությունը:

THE EFFECT OF THYROID HORMONES AND ITS DERIVATIVES ON THE ACTIVITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIAL FRACTION GLUTAMINASE

W. S. HOVHANNISIAN, W. G. HAMBARTSUMIAN

The obtained results have shown that glutaminase activity of rat liver mitochondrial fractions is inhibited by 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine 3,5-diiodo-L-Thyronine, 3,3',5-Triiodothyreoacetic acid and 3,3',5-Triiodothyropropionic acid. The effect depends on the amount of iodine atoms and the structure of the molecule of the hormon. Inhibition of liver glutaminase activity is enhanced by decreasing the quantity of iodine atoms in the molecule of the thyroid hormone. 3,5-diiodo-L-Thyronine is the strongest inhibitor of this enzyme. A high concentration of phosphate does not protect the enzyme from inhibition by Triiodo-L-Thyronine and its derivatives. The presence of large amount of liver mitochondrial fractions decreases the effect of these compounds on the activity of liver glutaminase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 6, 588, 1978.
2. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
3. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.

4. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
5. Рачев Р. Р., Ещенко Н. Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М., 1975.
6. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вopr. мед. химии, 8, 538, 1962.
7. Туракулов Я. Х. Биохимия и патология щитовидной железы. Ташкент, 1963.
8. Albert A., Klatting F. R. J. Endocrinology, 51, 427, 1952.
9. Bronk J. R. Biochem. Biophys. Acta, 69, 375, 1963.
10. Frieden E. Recent Progr. Hormone Res., 23, 139, 1967.
11. Gruenstein E., Wynn J. J. Theret. Biol., 26, 343, 1970.
12. Katunuma N., Hozino A., Tomino J. Adv. in Enzyme Res., 5, 55, 1967.
13. Kvanme E., Torgner A. Biochem. J., 137, 525, 1974.
14. Kvanme E., Torgner A. Biochem J., 149, 83, 1975.
15. Larson F. C., Albright E. C. Endocrinology, 63, 183, 1958.
16. Lissitzky S., Rogues M., Torresani J., Simon C., Bouchillout S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 249, 1964.
17. Michel R., Truchot R., Tron-Loisel H., Ouignard A. M. Compt. rend Soc. Biol., 161, 1512, 1967.
18. Tata J. R., Rall J. E., Rawson R. W. Endocrinology, 60, 83, 1957.
19. Varrone S., Consiglio E., Covelli J. Europ. J. Biochem., 13, 305, 1970.
20. Weil-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
21. Weil-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
2. Yen-Zen Huang, Knox W. E. Enzyme, 21, 408, 1976.

ДЕЙСТВИЕ ЭТАНОЛАМИНА НА ХЕМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕМБРАНЫ ГИГАНТСКИХ НЕЙРОНОВ УЛИТКИ

Р. Г. КАМАЛЯН, Э. А. АВАГИМЯН, В. Л. АРВАНОВ, С. Н. АИРАПЕТЯН

Добавление этаноламина в омывающую нейрон среду приводит к усилению действия ацетилхолина на мембранный потенциал и проницаемость мембраны как при деполяризационных, так и гиперполяризационных ответах мембраны. По мере инкубации нейрона в бескальциевом растворе эффект этаноламина на хемочувствительность мембраны ослабевает и затем полностью исчезает. После предварительного обогащения нейрона ионами натрия он вызывает уменьшение K^+ -вызванной кратковременной гиперполяризации мембраны.

Предполагается, что этаноламин инактивирует электрогенный натриевый насос, вызывая тем самым усиление хемочувствительности мембран.

Этаноламин (ЭА) является биологически активным соединением, оказывающим многогранное влияние на метаболизм и физиологические функции организма [5]. Имеются данные о влиянии его на процессы нейрогуморальной регуляции метаболизма изолированных органов [3—7]. Результаты фармакологических исследований свидетельствуют о действии ЭА на чувствительность адрено- и холинорецепторов сердечно-сосудистой системы [4—9]. Показано действие этого соединения на процессы проницаемости глюкозы и аминокислот в животных [8] и ионов калия в растительных тканях [13].

В свете сказанного представляло интерес изучение действия ЭА на работу электрогенного Na -насоса и хемочувствительность нейрональных мембран.

Материал и методика. Опыты проводились на идентифицированных нейронах изолированного ганглия улитки *Helix*. Препарат фиксировался в специальной камере с помощью микроиглол. Поверхностная соединительнотканная оболочка иссекалась острием бритвы, закрепленной на специальном держателе. В нейрон внутриклеточно вводилось два стеклянных микроэлектрода, соответственно для регистрации электрической активности и пропускания тока через мембрану нейрона. Микроэлектроды заполнялись 2,5 М KCl . Электрические сигналы с регистрирующего микроэлектрода через агаровый мостик подавались на катодный повторитель, усилитель УПТ-2 и далее на регистрирующие приборы—самопишущий потенциометр ЭПП-09 и осциллограф С1-16 с фоторегистрирующим устройством ФОР-2. Для измерения сопротивления мембраны через второй микроэлектрод подавался прямоугольный толчок тока порядка 10^{-9} — 10^{-8} А, величина которого регистрировалась вторым каналом усилителя. Через камеру перфузировали нормальный раствор Рингера ($NaCl$ —80, KCl —4, $CaCl_2$ —7, $MgCl_2$ —15, $Tris HCl$ —5 ммоль) с постоянной скоростью 0,2 мл/сек. Концентрация ионов калия в растворе уменьшалась за счет соответствующего увеличения содержания

ионов натрия. Используемая концентрация ЭА в растворе Рингера составляла 10^{-3} М, а ацетилхолина (АХ)— $5 \cdot 10^{-5}$ М. Опыты проводились в зимние месяцы при комнатной температуре, 22° .

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что инактивация электрогенного Na-насоса сопровождается увеличением АХ-чувствительности нейрональной мембраны [1, 2, 10]. В первой серии экспериментов нами исследовалось действие ЭА на чувствительность мембраны к АХ в условиях инактивации Na-насоса и при восстановлении его активности (рис. 1). Известно, что инкубация нейронов в бескальевом растворе приводит к инактивации электрогенного Na-насоса, в резуль-

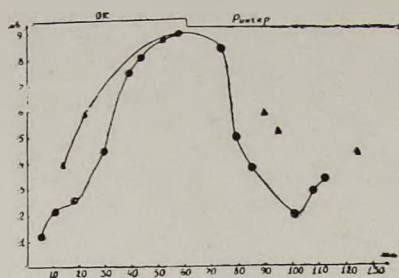


Рис. 1. Зависимость действия ЭА на АХ-ответы мембраны от времени инкубации в бескальевом растворе.

тате чего происходит накопление ионов натрия в клетке [14]. Как видно из рис. 1, перенос нейронов в бескальевый раствор сопровождается увеличением деполяризационных АХ-ответов мембраны. Инкубация нейронов в ЭА-содержащем растворе приводит к усилению действия АХ на мембранный потенциал. Однако по мере инкубации нейрона в бескальевом растворе этот эффект ЭА уменьшается и полностью исчезает через 50—60 мин инкубации, когда, по-видимому, окружающее нейрон пространство полностью освобождается от ионов калия. При добавлении во внешнюю среду 4 ммоль K^{+} , что приводит к активации Na-насоса [12, 14], вновь отмечается усиление АХ-ответов мембраны в присутствии ЭА.

Установлено, что при переносе нейрона в нормальный раствор Рингера, после предварительной инкубации в бескальевом растворе, имеет место активный выброс избыточного натрия из клетки электрогенным Na-насосом, сопровождающийся кратковременной гиперполяризацией мембраны [1, 11, 12]. На рис. 2 показано действие ЭА на гиперполяризацию мембраны, вызванную активацией Na-насоса. Параллельно с этим исследовалось влияние ЭА на АХ-чувствительность мембраны. Как видно из рис. 2 а, перенос нейрона в нормальный раствор Рингера после предварительной инкубации в бескальевом растворе приводит к кратковременной гиперполяризации мембраны на 6 мв. При переносе же его в те же условия, но после предварительной инкубации в бескальевом ЭА-содержащем растворе, эта величина уменьшалась до 1 мв. (рис. 2 б). При последующем вымывании ЭА из среды наблюдалось полное восстановление этого показателя. Измерение сопротивления мембраны в ходе этого эксперимента показало, что добавление ЭА не

вызывает существенных изменений сопротивления мембраны. Эти данные позволяют предположить, что уменьшение насос-вызванной гиперполяризации мембраны в ЭА-содержащем растворе обусловлено его ингибирующим действием на работу электрогенного Na-насоса. На рис. 2 показано также, что АХ-вызванное увеличение проводимости мембраны в нормальном растворе Рингера непосредственно после инкубации в бескальциевом растворе (т. е. в условиях активации Na-насоса) составляло 7% (рис. 2а). В присутствии же ЭА эффект АХ дости-

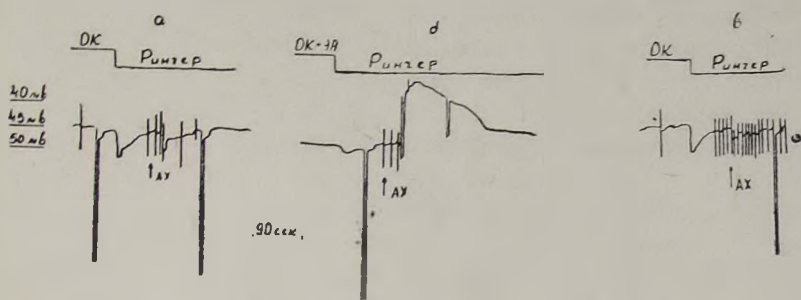


Рис. 2. Действие ЭА на K^+ -вызванную гиперполяризацию и АХ-ответы мембраны. а) после 15-минутной преинкубации в бескальциевом растворе; б) после 15-минутной преинкубации в ЭА-содержащем бескальциевом растворе; в) после вымывания ЭА из среды.

гал 74%, что сопровождалось значительным усилением и деполяризационного действия последнего (рис. 2б). При вымывании ЭА из среды АХ-ответы мембраны восстанавливались (рис. 2в).

Результаты более детального изучения действия ЭА на работу электрогенного Na-насоса представлены на рис. 3. Показано, что ЭА значительно уменьшает величину K^+ -вызванной гиперполяризации (рис. 3а). Когда же нейрон инкубировали в ЭА-содержащем бескальциевом растворе, но перед добавлением нормального Рингера вымывали ЭА из среды, величина кратковременной гиперполяризации полностью восстанавливалась (рис. 3в).

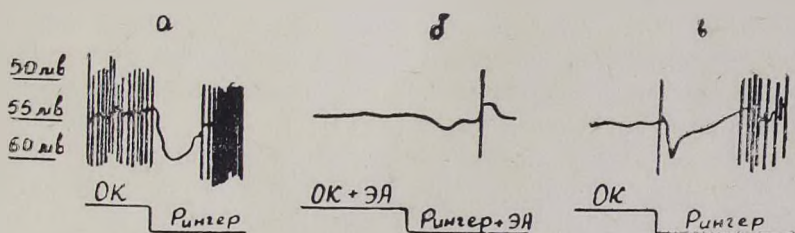


Рис. 3. Действие ЭА на K^+ -вызванную гиперполяризацию мембраны. а) в норм. растворе Рингера после 15-минутной преинкубации в бескальциевом растворе; б) при постоянном присутствии ЭА в среде; в) перед добавлением норм. Рингера ЭА был удален из бескальциевого раствора.

Действие ЭА на АХ-чувствительность мембраны изучалось также на нейронах, гиперполяризующихся под действием АХ. На рис. 4 вид-

но, что присутствие ЭА в среде усиливает и гиперполяризационные ответы мембраны.

Приведенный экспериментальный материал показывает, что ЭА уменьшает величину кратковременной K^+ -вызванной гиперполяризации, обусловленной работой электрогенного Na -насоса. Она восстанавливается при предварительном вымывании ЭА из инкубационной среды (рис. 2, 3). Добавление ЭА не вызывает изменения сопротивления мембраны (рис. 2). По-видимому, эти данные можно объяснить тем, что ЭА, связываясь с рецептором, ингибирует активность Na - K -АТФазы мембраны, препятствуя тем самым активному электрогенному транспорту избыточного натрия из клетки.

Параллельно с этим показано, что ЭА усиливает действие АХ на мембранный потенциал и сопротивление мембраны (рис. 1, 2, 4). Срав-

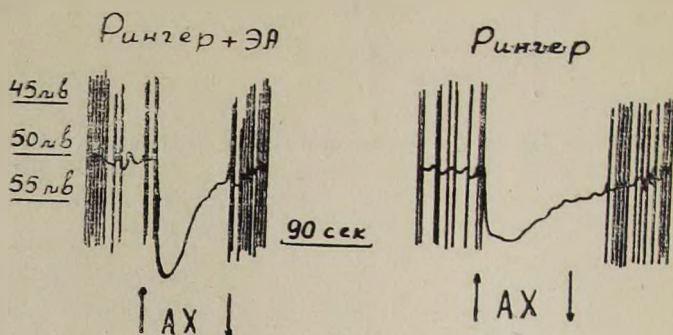


Рис. 4. Действие ЭА на гиперполяризационные АХ-ответы.

нивая действие ЭА на АХ-чувствительность мембраны в условиях активации Na -насоса (путем предварительного обогащения нейрона ионами натрия—рис. 2) и при инактивации его в бескальциевом растворе (рис. 1), можно видеть, что по мере вымывания ионов калия из среды, наряду с увеличением деполяризационного действия АХ, отмечается ослабление влияния ЭА на АХ-ответы мембраны. С другой стороны, как нами было ранее показано, инактивация электрогенного Na -насоса приводит к увеличению хемочувствительности мембраны в результате увеличения количества взаимодействующих с медиатором рецепторов за счет насос-вызванного набухания нейрона [2, 10].

В связи с этим можно высказать предположение, что ЭА действует как ингибитор электрогенного Na -насоса, чем и обусловлено вызванное им повышение хемочувствительности мембраны.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Ереванский зооветеринарный институт

Поступило 25.XII 1978 г.

ԷԹԱՆՈԼԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽԵՌՈՒՆՁԻ ՀՍԿԱՅԱԿԱՆ
ՆՅՅՐՈՆԵՐԻ ՄԵՄԲՐԱՆԻ ՔԵՄՈԶԳԱՑՈՂՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ռ. Գ. ԲԱՄԱԼՅԱՆ, Է. Ա. ԱՎԱԳԻՄՅԱՆ, Վ. Լ. ԱՐՎԱՆՈՎ, Ս. Ն. ԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է էթանոլամինի ազդեցությունը նեյրոնալ մեմբրանների էլեկտրազին Na -պոմպի աշխատանքի և քիմոզացողության վրա:

Յույց է արվել, որ էթանոլամինի ավելացումը ինկուբացիոն միջավայրի վրա, 10^{-3}M խտությամբ, բարձրացնում է մեմբրանների զգացողությունը ացետիլ-խոլինի նկատմամբ: K^{+} իոնների բացակայության դեպքում էթանոլամինի ազդեցությունը մեմբրանի քիմոզացողության վրա թուլանում է ինկուբացիայի ընթացքում:

Նեյրոնը Na^{+} -ով հագեցնելու դեպքում էթանոլամինը կասեցնում է K^{+} -ի առաջացրած մեմբրանների կարճատև հիպերբևեռացումը:

Կարևոր է ենթադրել, որ նեյրոնի մեմբրանների քիմոզացողության ուժեղացումը էթանոլամինի ազդեցությամբ պայմանավորված է էլեկտրազին նատրիումական պոմպի ակտիվացման արգելակմամբ:

ETHANOLAMINE EFFECT ON THE CHEMOSENSITIVITY
OF THE SNAIL GIANT NEWRONAL MEMBRANE

R. G. KAMALYAN, A. A. AVAGIMYAN, V. L. ARVANOV, S. N. AYRAPETYAN

Effect of ethanolamine (EA) on the electrogenic Na pump activity and on the neuron membrane chemosensitivity has been studied. The addition of 10^{-3}M EA to the medium increases the membrane sensitivity to acetylcholine (Ach). In potassium-free solution effect of EA on the membrane Ach. sensitivity is weaker. EA depresses the potassium-induced hyperpolarization of the neuron membranes enriched by Na ions. It is supposed that the increase in membrane chemosensitivity by EA is due to inactivation of the electrogenic Na pump.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айрапетян С. Н. Вопросы биохимии мозга, 9, 233—250, Ереван, 1974.
2. Арванов В. Л., Айрапетян С. Н. Мат-лы симп. «Транспортные АТФазы», 6, Тбилиси, 1978.
3. Демин Ю. М. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1970.
4. Джанполадян Е. Г. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1973.
5. Камалян Г. В. Коламин и его биологическое значение. Ереван, 1960.
6. Камалян Г. В., Барсегян Г. В. Тр. Ереванск. зоовет. ин-та, 27—29, 1965.
7. Камалян Р. Г., Ширинян Э. А., Камалян Г. В. Биолог. ж. Армении, 27, 5, 1974.
8. Мовсесян С. Г. Вопросы биохимии мозга, 2, 87—90, Ереван, 1961.
9. Самвелян В. М., Саркисян О. К. Мат-лы симп. «Биология этаноламина и его применение в народном хозяйстве», 110, Ереван, 1974.
10. Ayrapetyan S. N., Arvanov V. L. Comparative biochemistry and physiology, 58C, 153—155, 1977.
11. Carpenter D., Alving V. J. Gen. Physiol., 52, 1—21, 1968.
12. Casttels R., Droogmans D., Hendrichx H. J. Physiol., 217, 281—291, 1971.
13. Steveninck R. G. Nature, 190, 1072—1074, 1961.
14. Thomas R. Physiol. Rev., 62, 563—632, 1972.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ
НАДФ-МАЛИК-ФЕРМЕНТА ГРУШ

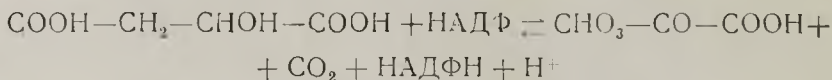
Т. А. МКРТЧЯН, Е. Г. САЛЬКОВА

Рассмотрены некоторые кинетические свойства НАДФ-малик-фермента: зависимость от концентрации субстрата, температуры, pH, молярности буфера. Установлено, что структурные аналоги яблочной кислоты ингибируют фермент. Лимонная, винная, малоновая, щавелевая кислоты не могут служить субстратом для действия этого фермента.

Биохимические процессы при созревании плодов изучены достаточно хорошо [2,15]. Интерес к этому вопросу понятен, так как изучение его способствует разработке оптимальных режимов хранения плодов.

Крупным успехом в изучении биохимии плодов можно считать сформулированные в последние годы представления о ключевых процессах созревания, согласно которым последовательность биохимических процессов в них такова: активация биосинтеза липидов, этилена, РНК и биосинтеза белков, в частности специфического белка—НАДФ-малик-фермента (L-малат-НАДФ-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.40).

Все эти процессы рассматриваются в настоящее время как ключевые. Наше внимание было сосредоточено на изучении НАДФ-малик-фермента, ведущего декарбоксилирование яблочной кислоты до пировиноградной и углекислого газа.



Активность НАДФ-малик-фермента в период созревания яблок и груш резко возрастает [4, 13, 16]. Несмотря на решающую роль его в механизме созревания плодов исследования в этом направлении немногочисленны, к тому же подавляющая часть их проведена на яблоках. Имеются единичные сведения о присутствии этого фермента в винограде [9, 14], вишнях [10—12], манго [6].

Материал и методика. Исследования проводились на трех сортах груш: Лесная красавица, Бере Лигеля и Дзмернук. Груши собраны с Мердзаванской экспериментальной базы Армянского НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства и заложены на хранение при трех температурных режимах: 20—22 (комнатное хранение), 5 и 2°.

Выделение активного препарата НАДФ-малик-фермента из груш проводилось по ранее описанному методу [5].

Для концентрирования ферментного белка к 30 мл препарата добавляли 5 г сефадекса g-50, два часа выдерживали при 4°, после чего центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин [1]. В надосадочной жидкости определяли активность НАДФ-малик-фермента и содержание белка.

Активность фермента определялась спектрофотометрическим методом при 340 нм в реакционной смеси, состоящей из 1 мл трис-буфера (0,1 М), 0,2 мл MnSO_4 (13 мМ), 0,6 мл яблочной кислоты (15 мМ), 0,8 мл ферментного препарата, 0,2 мл (12 мМ) НАДФ. Объем смеси доводили до 3 мл водой.

За единицу активности принималось изменение оптической плотности реакционной смеси на 0,01 за 1 мин. Результаты выражались в нмолях НАДФН₂ на 1 мг белка, а также на 1 г исходного сырого веса.

Содержание белка определялось по Лоури [1].

Результаты и обсуждение. Определение зависимости активности НАДФ-малик-фермента от концентрации субстрата показало, что при повышении содержания яблочной кислоты от 3 до 9 мкмоль скорость реакции декарбоксилирования его повышается, достигая максимума при 9 мкмоль. Дальнейшее повышение концентрации субстрата до 12 мкмоль не влияет на скорость этой реакции (рис. 1). Пользуясь пред-

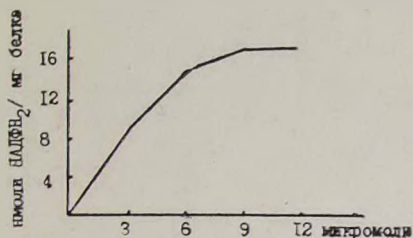


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от концентрации яблочной кислоты.

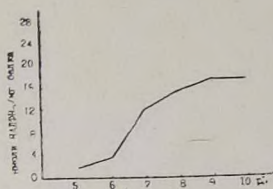


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от pH реакционной среды.

ставленным графиком, мы определили значение константы Михаэлиса (K_m) для НАДФ-малик-фермента груш. В условиях нашего опыта она оказалась равной $5,3 \cdot 10^{-4}$ М. По имеющимся литературным данным, K_m для НАДФ-малик-фермента яблок равна $5,5 \cdot 10^{-4}$ [16], $3,7 \cdot 10^{-4}$ [17], а груш — $4,5 \cdot 10^{-4}$ М [8]. Таким образом, наши данные близки к литературным.

Изучение влияния pH реакционной смеси на активность фермента показало, что наибольшей величины она достигает при щелочной реакции смеси (рис. 2).

Активность фермента в трис-буфере составляла 80% от его активности в фосфатном буфере. При повышении молярности последнего от 0,01 до 0,6 М она возрастала, а дальнейшее повышение до 1 М приводило к ее падению (рис. 3).

НАДФ-малик-фермент является термолабильным ферментом с температурным оптимумом, близким к 20°. Снижение температуры смеси до 2° сильно тормозило его активность, она возрастала при повышении

температуры до 20°. Дальнейшее повышение температуры приводило к постепенному снижению активности. При температуре 80° фермент ин- активировался. Температурный коэффициент Вант-Гоффа для НАДФ-малик-фермента равен 1,6. Данные этого модельного опыта согласуются с результатами изучения влияния различных температур хранения на активность фермента. Ранее нами было показано [5], что активация НАДФ-малик-фермента в ходе созревания и перезревания груш имеет два пика возрастания. Первый пик соответствует фазе созревания, второ- рой—фазе перезревания груш. Понижение температуры хранения груш задерживает наступление периода активации фермента, удлиняет его продолжительность. Наиболее интенсивно этот процесс протекает при температуре хранения 20—22° (рис. 4).

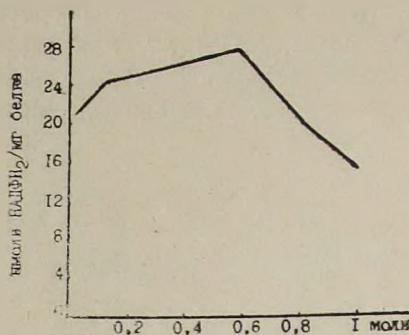


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от молярности фосфатного буфера.

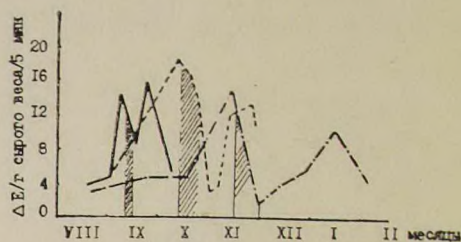


Рис. 4.

Рис. 4. Изменение активности НАДФ-малик-фермента при хранении груш сорта Лесная красавица при разных температурах.

Как известно, в плодах присутствуют структурные аналоги яблоч- ной кислоты. Представляло интерес выяснение их влияния на актив- ность НАДФ-малик-фермента. Нами рассмотрены следующие струк- турные аналоги яблочной кислоты: винная, лимонная, янтарная, мало- новая, щавелевая. Для сравнения были испытаны молочная гликоле- вая (оксимонокарбоновые), муравьиная кислота (монокарбоновая). Данные табл. 1 показывают, что только структурные аналоги яблочной кислоты ингибируют реакцию его декарбоксилирования. Винная кис- лота подавляет активность фермента на 25, малононовая и лимонная—на 50, щавелевая и янтарная—на 100%. Эти кислоты или сами являются промежуточными продуктами цикла Кребса (янтарная и лимонная кис- лоты), или легко могут вступить в цикл (винная, малононовая, щавеле- вая). Сказанное позволяет предположить, что кислоты цикла Кребса ингибируют активность НАДФ-малик-фермента. К такому же выводу пришли французские исследователи [8].

Нас интересовал вопрос, могут ли структурные аналоги яблочной кислоты служить субстратом для НАДФ-малик-фермента груш. С этой целью изучалась способность ферментного препарата восстанавливать

Таблица 1

Влияние различных кислот на активность НАДФ-малик-фермента

Добавленная кислота	Активность фермента, %
Яблочная	100
Муравьиная	100
Гликолевая	100
Молочная	100
Винная	75
Лимонная	50
Малоновая	50
Щавелевая	0
Янтарная	0

Таблица 2

Субстратная специфичность НАДФ-малик-фермента

Добавленная кислота, 15 мМ	Активность фермента	
	нмоль НАДФН ₂ / мин / мг белка	%
Яблочная	18,6	100
Лимонная	2,42	12,5
Винная	2,24	11,6
Малоновая	2,24	11,6
Щавелевая	1,3	6,8

Примечание: За 100% принята активность яблочной кислоты. В кювету вносили 5 мМ яблочной кислоты и 5 мМ исследуемой.

НАДФ в присутствии винной, малоновой, щавелевой, лимонной кислот. Результаты исследований показали, что наиболее слабо НАДФ восстанавливается в присутствии щавелевой кислоты, активность фермента при этом составляет 6,8% от активности фермента при инкубации срезов в яблочной кислоте (табл. 2). Восстанавливающая способность фермента в присутствии лимонной, винной, малоновой кислот составляет лишь 12%.

Таким образом, рассмотренные структурные аналоги яблочной кислоты не могут служить субстратом для НАДФ-малик-фермента груш.

Армянский НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства МСХ АрмССР, Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР

Поступило 9.II 1979 г.

ՏԱՆՁԻ ՊՏՈՒՂՆԵՐԻ НАДФ-ՄԱԼԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՋՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Տ. Ա. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Ե. Գ. ՍԱԿՈՎԱ

Ուսումնասիրվել են НАДФ-մալիկ ֆերմենտի կինետիկ հատկությունները՝ ֆերմենտի ափսիվության կախվածությունը միջավայրի կոնցենտրացիայից, ջերմաստիճանից, pH-ից, բուֆերի մոլյարությունից:

Պարզվել է, որ խնձորաթթվի կառուցվածքային անալոգները՝ գինեթթուն, լիմոնաթթուն, մալոնային թթուն, թրթնշկաթթուն, սաթաթթուն ինհիբացիոն են ֆերմենտին:

Լիմոնաթթուն, գինեթթուն, մալոնային թթուն, քացախաթթուն, թրթնշկաթթուն НАДФ-մալիկ-ֆերմենտի գործողության միջավայր չեն կարող հանդիսանալ:

SOME NADF-MALIC-ENZYME PROPERTIES OF PEARS

T. A. MKRTCHYAN, E. G. SALKOVA

The following kinetic properties of NADF-malic-enzyme have been studied: dependence on substrate concentration, temperature, actual acidity, concentration of buffer. The inhibition of enzyme by structural analogues of malic acid has been established.

Impossibility of citric, tartaric, malonic, oxalic acids to serve as a substrate for NADF-malic-enzyme activity has been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Конетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. 41, 311, М., 1971.
2. Метлицкий Л. В., Салькова Е. Г., Марселен Г. Прикладная биохимия и микробиология. 13, 3, 340, 1977.
3. Салькова Е. Г. Докт. дисс., М., 1973.
4. Сальникова Е. Г., Звягинцева Ю. В. Сб.: Иммуитет и покой растений. 235, М., 1972.
5. Салькова Е. Г., Мкртчян Т. А. Прикладная биохимия и микробиология, 14, 2, 284, 1978.
6. Baqui Salmz M., Mattoo A. K., Modi V. Phytochemistry, 13, 10, 2049, 1974.
7. Dilley D. R. Plant Physiol., 41, 214, 1965.
8. Drout A., Hartmann C. Phytochemistry, 16, 5, 505, 1977.
9. Goracia P., Buret M., Chambroy Y. C. r. Acad. agr. France., 60, 5, 1193, 1974.
10. Hartmann C. Qual. Plant. Mater. Veg., 20, 221, 1971.
11. Hartmann C. C. r. Acad. sci., 276, 12, 1851, 1973.
12. Hartmann C. Colloq. int. C. N. R. S., 238, 235, 1975.
13. Hartmann C., Lugon M., Valade D. Physiol. veg., 6, 279, 1968.
14. Hawker G. C. Phytochemistry, 8, 1, 19, 1969.
15. Hulme A. C. The biochemistry of fruit and their products, 1, London, 1970.
16. Hulme A. C., Gones G. D., Woollorton L. S. C. Proc. Roy. Soc. Biol. Sc., 158, 514, 1963.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 663.227/ 41.577.164.1 (479.25)

ПРИМЕНЕНИЕ ДРОЖЖЕВОГО АВТОЛИЗАТА С ЦЕЛЮ
УСКОРЕНИЯ ПРОЦЕССА ХЕРЕСОВАНИЯ

Л. А. ГЕВОРКЯН, Е. С. УНАНЯН

Среди ускоренных приемов обработки вина с целью улучшения его качества тепловое воздействие занимает особое место. Это правомерно не только в отношении ординарных, но и крепленых вин при нагревании их с дрожжами, а также с их автолизатами [2, 13]. Происходящие при этом процессы довольно многообразны и зависят от степени участия тех или иных компонентов вина и дрожжей. Имеются сведения о выделении нуклеиновых кислот в процессе теплового автолиза дрожжей, а также данные, хотя и немногочисленные, о действии ферментов вина в условиях высоких температур [1, 10].

Довольно детально изучена динамика азотистых веществ вина и дрожжей [3], а также альдегидов, углеводов, органических кислот и спиртов, участие которых обязательно в сложении органолептических показателей вина [11, 12].

Данные об аккумуляции дрожжами витаминов группы В в процессе брожения [4] навели на мысль использовать эти витамины для обогащения столового виноградного вина названными компонентами [5, 6].

Известно, что при спиртовом и хересном брожении значительно снижается содержание витаминов группы В [8]. Высказано предположение о возможности направленного изменения развития пленкообразующих дрожжей внесением в вино, подлежащее хересованию, дополнительных факторов питания, в частности витаминов группы В [9].

Наша цель заключалась в улучшении вкусовых и питательных показателей вина с одновременным ускорением процесса хересования, для чего использовался автолизат осадочных дрожжей.

Материал и методика. Нами применен тепловой автолиз дрожжей с переходом в автолизат витаминов группы В [6].

По окончании спиртового брожения дрожжевой осадок несколько раз промывали водой, затем ставили в термостат при температуре 47—48° для прохождения автолиза под действием собственных протеолитических ферментов клетки в течение 3-х суток (ход прохождения автолиза контролировался под микроскопом). Затем дрож-

живую массу выдерживали в кипящей водяной бане для более полного извлечения веществ из клеток, и отсасыванием отделяли осадок на воронке Бухнера. Фильтрат, т. е. автолизат, сгущали на водяной бане до сметанообразной массы и добавляли к опытному вину в соответствующей дозировке.

Дрожжевой автолизат был испытан в лабораторных условиях: в дозе 0,2, 0,5; 0,8; 1; 2% он вносился в виноматериал хереса после соответствующего роста хересной пленки культуры Херес-104.

Витамины группы В в вине определяли микробиологическими методами Одиновой [7].

Результаты и обсуждение. По истечении 2-месячного срока выдержки под хересной пленкой в опытных и контрольном образцах вина были определены витамины группы В (табл. 1).

Таблица 1
Содержание витаминов группы В в виноградном сусле и вине

Образцы	Содержание витаминов, мкг/л			
	тиамин	пиридоксин	пантотеновая кислота	никотиновая кислота
Виноградное сусло сорта „Воскеат“	0,390	0,72	6,270	45,57
Вино без добавления автолизата (контроль)	0,124	0,06	0,051	4,659
Вино с добавленным автолизатом, %	0,249	0,12	0,061	6,656
0,2				
0,5	0,234	0,10	0,057	9,318
0,8	0,374	0,096	0,051	4,992
1	0,249	0,12	0,071	7,987
2	0,468	0,13	0,092	9,984
Виноматериал хереса	0,111	0,12	—	5,990

Из данных табл. 1 следует, что тиамин и пиридоксин используются дрожжами при спиртовом брожении значительно меньше, чем пантотеновая и никотиновая кислоты. При хересном брожении тиамин используется также менее активно, чем пиридоксин и особенно пантотеновая и никотиновая кислоты. Максимальное увеличение содержания определяемых витаминов наблюдалось при внесении автолизата в количестве 2%, несколько меньше—при дозе 1%.

После 3-месячной выдержки вина с автолизатом была проведена дегустация, результаты которой обобщены в табл. 2.

Таблица 2
Дегустационная оценка опытного вина

Виноматериал хереса	Краткая характеристика	Общий балл
Без добавления автолизата (контроль)	нежный аромат хереса	8,1
С добавленным автолизатом, %	свежий аромат хереса в букете выражен значительно больше, чем во вкусе	8,35
0,2		
0,5	чувствуется наличие продуктов автолиза во вкусе характерная горечь	8,45
0,8	в букете выделяется посторонний аромат	8,5
1	в букете чувствуется посторонний аромат, следы хересных тонов	8,35
2		
Виноматериал хереса	чувствуются следы хересных тонов	8,3
		8,0

Лучшие дегустационные показатели получены при добавлении автолизата в количестве 0,8 и 0,5%, однако повышенное содержание витаминов наблюдалось при применении 2%-ного автолизата.

Таким образом, высокое содержание витаминов не является признаком хорошего качества вина.

Внесение в вино при хересовании биоактивных веществ в виде автолизата поддерживает пленку хересной культуры в состоянии физиологической молодости и непрерывного вегетативного размножения, а также ферментативного активирования, что, возможно, сокращает процесс хересования.

Институт виноградарства, виноделия
и плодоводства МСХ АрмССР

Поступило 9.11 1979 г.

ՇԱՔԱՐՆԵՐԻ ԱՎՏՈԼԻԶԱՏԻ ՕԴՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ԿԵՐԵՍԱՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ԱՐԱԳԱՑՄԱՆ ՆՊԱՏԱԿՈՎ

Լ. Ա. ԴԵՎՈՐԴՅԱՆ, Ե. Ս. ՈՒՆԱՆՅԱՆ

Սեր աշխատանքի նպատակն է եղել արագացնել խերեսացման պրոցեսը և բարձրացնել դինու օրգանոլեպտիկ և սննդային ցուցանիշները: Սա կարելի է իրագործել խերեսի արտադրությունում նստվածքային շաքարասնկերի ավտոլիզատի օգտագործմամբ: Կատարել ենք ջերմային ավտոլիզ, որի հետևանքով շաքարասնկերի մեջ կուտակված В խմբին պատկանող վիտամինները անջատվել են և ավտոլիզատի ձևով վերադարձվել գինուն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Герасимов М. А. и др. Виноделие и виноградарство СССР, 5, 1961.
2. Кишковский З. Н. Научн. конф. по итогам научн.-исслед. работ виноград. и винод., посвящ. 50-летию Великой Октябрьской Социалистической Революции. Тезисы докл., Ялта, 1967.
3. Лози В. М., Соболев Э. М. Изв. вузов. 4, 48, 1968.
4. Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. М.—Л., 1950.
5. Одинцова Е. Н. Реф. научн. работ за 1955 г. Всесоюзный НИИ виноделия и виноградарства «Магарач», М., вып. I, 1957.
6. Одинцова Е. Н., Бурьян Н. И., Тюрина Л. В. Всесоюзный НИИ виноделия и виноградарства «Магарач», М., 1957.
7. Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов. М., 1959.
8. Саенко Н. Ф. Вино Херес и технология его приготовления. Кишинев, 1975.
9. Сисакян Н. М. и др. Сб.: Биохимия виноделия. 4, 1953.
10. Смирнов А. П. Виноделие и виноградарство СССР, 2, 1967.
11. Соболев Э. М., Вострикова Е. И. Вопр. технологии и химии вина, вып. 2, Краснодар. 1969.
12. Тагунков Ю. Л. и др. Вопр. технологии и химии виноделия, вып. 2, Краснодар, 1969.
13. Унгуриян П. Н. Докл. и сообщ. на пленуме секции садоводства, виноградарства и субтроп. культур ВАСХНИЛ, вып. 3, Кишинев, 1960.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.092

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОКОАГУЛЯЦИИ ОКОЛОЩИТОВИДНЫХ
ЖЕЛЕЗ НА КОЛИЧЕСТВО РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК

В. А. ШЕКОЯН, М. И. ГЕВОРКЯН, В. С. ТОВМАСЯН

Исследованиями последних лет [1—3] показано, что гипофункция околощитовидных желез влияет на синтез ДНК, пролиферацию и митотическую активность лимфоцитов, угнетает популяцию антителообразующих клеток и титры гемагглютининов.

Целью настоящей работы было изучение влияния паратиреоидэктомии на популяцию иммунных розеткообразующих клеток (РОК) в селезенке.

Материал и методика. В экспериментах использовано 36 белых беспородных крыс. Животные были разделены на 3 группы: интактные, ложнооперированные и с коагуляцией околощитовидных желез. О развитии гипопаратиреоза судили по изменению концентрации ионов Са в сыворотке крови, определяемой по методу Де Ваарда.

Животных иммунизировали на 2-, 5-, 12-й дни после операции внутривенным введением 0,4 мл 1,10⁹ эритроцитов барана. Количество иммунных РОК определяли в селезенке на 5-й день иммунизации методом Заалберга [4]. Реакцию учитывали в световом микроскопе, розеткой считалась клетка, связавшая не менее 5 эритроцитов. Учет РОК велся на 1000 лимфоцитов.

Результаты и обсуждение. У крыс опытной группы (табл.), количество РОК резко понижено.

Т а б л и ц а
Количество РОК в различные сроки после электрокоагуляции
околощитовидных желез

Группы животных	Дни после операции	Количество РОК на 10 ⁶ лимфоцитов
Интактные		10000±796
С коагуляцией околощитовидных желез	2	2166±307 p<0,01
	5	1857±459 p<0,001
	12	2500±546 p<0,001
Ложнооперированные	2	3500±1191 p<0,05
	5	4000±436 p<0,001
	12	7000±1048 p>0,05

Так, на 2-й день после операции количество РОК в опытной группе было в 4,5 раза меньше, чем в контроле, на 5-й—в 5,3, на 12-й—в 4 раза.

В группе ложнооперированных животных на 2-й и 5-й дни после операции также наблюдается статистически достоверное уменьшение РОК по сравнению с контролем, однако к 12-му дню исследования наблюдается тенденция к увеличению его количества и достоверной разницы по сравнению с контрольными цифрами не отмечается.

На основании полученных данных можно заключить, что при гипопункции околощитовидных желез нарушается восприятие специфического антигенного раздражения специализированными рецепторами лимфоидных клеток, что приводит к уменьшению количества РОК.

ЦНИЛ, Ереванский медицинский институт,
лаборатория иммунологии

Поступило 22.I 1979 г.

ՀԱՐՎԱՀԱՆԱԴԵԴՁԵՐԻ ԿՈԱԴՈՒՅԱՅԻՍՅԵ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՎԱՐԴԱԿ ԳՈՅԱՅՆՈՂ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԻ ՎՐԱ

Վ. Ա. ՇԵԿՈՅԱՆ, Մ. Ի. ԴԵՎՈՐԴՅԱՆ, Վ. Ս. ԲՈՎՍՍԱՆ

Ուսումնասիրվել է հարվահանազեղների հիպոֆունկցիայի ազդեցությունը փայծաղի վարդակ գոյացնող բջիջների վրա: Ցույց է տրվում, որ հարվահանազեղների կոագուլյացիան առաջացնում է վարդակագոյացնող բջիջների քանակի ընկճում հետազոտման բոլոր ժամկետներում՝ կոնտրոլի համեմատությամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шекоян В. А., Геворкян М. И., Аветикян М. Б. и др. Тез. докл. II Всесоюзн. симпозіума Физиология иммунного гомеостаза. 177, Ростов—Дон, 1977.
2. Edwards D. T., Mekore T. et al. J. Endocrinol., 71, 2, 83, 1976.
3. Swierenga Sh. H. Mac Manus J. P. et al. J. Immunol., 117, 5, 1603, 1976.
4. Zaalberg O. B. Nature, 202, 1231, 1964.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.432.577.15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОД
ДЕЙСТВИЕМ КОРОНАРОАКТИВНЫХ НАЧАЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

С. С. МИСИРЯН, Ж. Г. АБЕЛЯН, Р. М. СРАПИОНЯН, А. А. ГАЛОЯН

В позитивном действии нейрогормона *C* на сердечную деятельность и коронарное кровообращение важное значение имеет регуляция гликолитических реакций в сердечной мышце, в частности, накопление лактата, утилизация пирувата и изменение фосфорилазной активности [1, 3]. Нами было установлено наличие низкомолекулярных соединений, активных в отношении коронарного кровообращения, в сердце различных животных (крупный рогатый скот, свиньи, кошки, крысы) [4]. При изучении физико-химических (электрофоретическая подвижность, спектральный анализ, реакция на нингидрин) и биохимических свойств (сохранение биологической активности при всех видах гидролиза) указанных соединений были получены данные, допускающие возможность идентичности их с нейрогормоном *C*.

Представляло значительный интерес выяснение вопроса о том, действуют ли выделенные из сердца факторы на гликогенолиз подобно нейрогормону *C*, выделенному из гипоталамуса крупного рогатого скота.

Материал и методика. Коронароактивные соединения выделяли из сердца по схеме, описанной ранее [2], включающей уксуснокислую экстракцию, гель-фильтрацию на сефадексе G-10, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе в сочетании с бумажной хроматографией в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) и рехроматографией в системе растворителей пиридин—ацетат—вода (1:10:100). Элюаты хроматограмм с соответствующими R_F-распределительной хроматографии 0,05; 0,35; 0,52 (условно обозначенные нами как I, II и III активные фракции) вводились внутривенно животным в количестве 0,5 мл, что соответствовало (в мЕ): для I активности—225, для II—175,5, для III—162. За единицу активности принимали такое количество препарата, которое ингибировало 1 миллиединицу цАМФ фосфодиэстеразы мозга за 1 мин. Расчеты делали, исходя из данных по измерению фосфодиэстеразы цАМФ под действием коронароактивных начал сердечной мышцы по методу, описанному ранее [2].

В опытах использовались крысы массой 120—150 г. Через 30 мин после введения исследуемых препаратов животных декапитировали. Исследуемые органы (мозг, печень, сердце, скелетная мышца) извлекали на холоду, взвешивали, промывали и гомогенизировали холодной водой в соотношении 1:1 гомогенизатором типа Уорринга. Инкубационная смесь содержала (в мл): 0,1 гомогената ткани, 0,14%-ного водного

раствора гликогена, 0,1 раствора АМФ на 64 мМ глюкозо-1-фосфата. Объем смеси доводили до 0,5 мл ТЭМ буфером (трис—0,04, ЭДТА—0,01 и МЭ—0,01 М), рН 6,8. Активность фосфорилазы определяли по Иллингвурту и Кори [5] и выражали в международных единицах (мкА P_n /мин/г свежей ткани). Сдвиги в содержании неорганического фосфора устанавливали по Таусски и Шору [6].

Результаты и обсуждение. Как известно из предыдущих исследований, внутривенное введение нейрогормона С в количестве 180 мЕ на животное снижало фосфорилазную активность в сердечной мышце на 36%, и увеличивало ее в скелетных мышцах на 56%. В печени и мозге существенных изменений не наблюдалось [3].

В наших экспериментах, как видно из рисунка, при введении всех трех коронароактивных фракций лишь фосфорилазная активность мозга не подвергается значительным изменениям. Во всех других исследуемых органах наблюдаются заметные сдвиги. Так, подавляется активность фосфорилазы в сердце. Первая фракция уменьшает активность фосфорилазы на 50,2% по сравнению с контролем, вторая—на 31,6, а третья—на 27. Можно предположить, что коронарорасширяющее



Рис. Влияние коронароактивных фракций, выделенных из сердца, на фосфорилазную активность тканей, мкА P_n мин/г свежей ткани.

действие этих фракций, подобно действию нейрогормона С, способствует эффективному протеканию аэробной фазы гликолиза в сердечной мышце благодаря улучшению снабжения мышцы кислородом (об этом свидетельствуют данные об усилении утилизации пирувата и накопления лактата) [1]. С этим предположением вполне согласуются данные об активировании процесса гликогенолиза в печени и, в меньшей степени, в скелетных мышцах. Из рис. видно, что при введении всех трех активных фракций существенным изменениям подвергается фосфорилаза пе-

чени. При внутривенном введении первой фракции активность фосфорилазы увеличивается на 330, второй фракции—на 219.2, а третьей—на 153.8%. Аналогичное действию нейроромона С. но в меньшей степени влияние оказывают эти фракции на фосфорилазную активность скелетных мышц. После введения первой фракции отмечается увеличение ее на 37.7, второй—на 14.8 и третьей—на 11.4%. Сравнивая данные об активности фосфорилазы во всех органах, можно заметить, что наибольшей активностью обладает первая коронарорасширяющая фракция.

Приведенные данные подтверждают, что активные начала, выделенные из сердца, оказывают влияние на биосинтез гликогена путем активирования или ингибирования в различных органах фосфорилазы.

Действие коронароактивных соединений, выделенных из сердечной мышцы, на фосфорилазную активность в различных органах наряду с другими данными свидетельствует, по-видимому, о сходстве этих соединений с нейроромоном С.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.1 1979 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ՍՐՏԱՄԿԱՆՆՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ
ՎԱՐԴԻՈՏՐՈՂ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս. Ս. ՄԻՍԻՐՅԱՆ, Ժ. Գ. ԱԲԵԼՅԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱԼՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է խոշոր եղջերավոր անասունների սրտամկանից անջատված սլավաձև անոթները լայնացնող նյութերի ազդեցությունը՝ սպիտակ առնետների տարբեր հյուսվածքների ֆոսֆորիլազայի ակտիվության վրա:

Սրտամկանում նկատվել է ֆերմենտի ակտիվության իջեցում, մինչդեռ լյարդում և կմախքային մկաններում ֆոսֆորիլազայի ակտիվությունը զգալիորեն բարձրանում է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Алексанян С. С. ДАН АрмССР, 58, 3, 1974.
2. Мисирян С. С., Срапионян Р. М., Бхейн М. Т., Сарибекян Г. А., Галоян А. А. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 397, 1979.
3. Парсаданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 66, 3, 1978.
4. Срапионян Р. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 56, 3, 1973.
5. Illingworth B. and Cori C. T. In Biochem. Preparations, 3, 1953.
6. Tausky H. H. and Shore E. J. Biol. Chem. 202, 675—685, 1953.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 591.1.05

ВЛИЯНИЕ ГОЛОДАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АТФ-АЗЫ СРЕЗОВ
 ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС

А. С. ОГАНЕСЯН, Ж. С. ГЕВОРКЯН, И Р. ФАТАЛОВА

В наших предыдущих исследованиях [5] было показано, что при голодании в срезах почек белых крыс подавляется поглощение как аминокислот, так и глюкозы. Установлено, что мембранная система АТФ—АТФ-аза играет важную роль в процессах регуляции трансмембранного переноса ионов калия, натрия, а также глюкозы и аминокислот [1, 4, 8, 10, 11]. Подавление активности одного из компонентов этой системы приводит к нарушению транспорта указанных соединений. Известно также, что при голодании снижается содержание АТФ и других макроэргических соединений в клетках различных тканей [2], т. е. снижается энергетический уровень организма. В связи с этим возникла необходимость изучения активности другого компонента упомянутой системы—АТФ-азы (АТФ-фосфогидролазы, К.Ф. 3.6.1.3) почечной ткани при голодании животных.

Материал и методика. Опыты проводились на белых крысах 3—4-месячного возраста. Подопытные животные подвергались голоданию в течение 2-х суток, без ограничения приема воды. Экспериментальных животных забивали декапитацией, извлекали почки и в условиях холода готовили срезы коркового и мозгового слоев в отдельности. Активность АТФ-азы срезов почек определяли по методу Бонтинга и сотр. [6] на трис-буфере (92 мМ) в присутствии ионов калия—5, натрия—58, магния—1 и АТФ—3 мМ. После 20-минутной инкубации действие фермента приостанавливали добавлением трихлоруксусной кислоты (1 мл—1,5 М) с последующим определением количества отщепленного от АТФ неорганического фосфора по методу Фiske-Суббарроу [7].

Результаты и обсуждение. Как видно из данных таблицы, активность АТФ-азы в срезах коркового слоя почек у нормальных животных составляет 70,9 мкМ неорганического фосфата/г ткани/20 мин, а у голодавших крыс наблюдается заметное снижение ее, составляя 52,7 мкМ неорганического фосфата/г ткани/20 мин. В мозговом слое в норме этот показатель по сравнению с корковым несколько ниже и составляет 58,9 мкМ; у голодавших животных и здесь отмечается заметное снижение активности фермента, достигающее до 45,3 мкМ.

Ввиду того, что тиоловые группы играют важную роль в функционировании АТФ-азы, мы решили изучить влияние восстановленного глю-

Изменение активности АТФ-азы в срезах коркового и мозгового слоев почек
белых крыс при голодании и последующем кормлении,
мкмоль/Р-неорг./г ткани/20 мин (средние данные 8-ми опытов)

Условия опыта	Контроль	% изменения активности	+ глутатион	% изменения активности
Корковый слой				
Норма	70,9 $\pm$ 3,0		77,4 $\pm$ 1,7	+ 9,1
Голодание 48 час.	52,7 $\pm$ 2,1 P<0,01	-25,7	74,8 $\pm$ 2,6	+29,6
Последующее кормление (через 24 часа)	69,5 $\pm$ 3,5	—	—	—
Мозговой слой				
Норма	58,9 $\pm$ 2,5			
Голодание 48 час.	45,3 $\pm$ 1,3 P<0,01	-23,1		

тациона на активность этого фермента. Результаты исследований показывают, что в присутствии восстановленного глутатиона активность АТФ-азы в срезах коркового слоя почек у голодавших заметно повышается (на 29,6%), в то время как у нормальных крыс в аналогичных условиях особых изменений не наблюдается. Интересно, что при переводе голодавших животных на нормальный режим питания наблюдается восстановление активности АТФ-азы до нормального уровня. Снижение активности АТФ-азы при голодании, по-видимому, связано с модификацией состояния сульфгидрильных групп (возможно превращение—SH в S—S—), входящих в состав этого фермента и играющих существенную роль в проявлении его функциональной активности. Это явление, возможно, обусловлено недостатком восстановленных серусодержащих соединений в организме при голодании (цистенн, глутатон). Мы не определяли содержания этих веществ, однако имеются данные, свидетельствующие о том, что при голодании в тканях животного снижается содержание сульфгидрильных групп [3]. В этих условиях, по-видимому, происходит обратимое изменение конформации белка-фермента. Можно предположить, что добавленный глутатион, восстанавливая тиоловые группы фермента, нормализует также его конформацию и функциональную активность.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что при голодании происходят заметные сдвиги в активности мембранной АТФ-азы почек, играющей важную роль в процессах транспорта ионов калия, натрия, а также глюкозы и аминокислот через клеточные оболочки.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 12.III 1979 г.

ՔԱՂՅԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ
ԿՏՐՎԱԾՔՆԵՐԻ ԱՏՖ-ԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս. Ս. ՀՈՎՀԱՆՈՒՄՅԱՆ, Ժ. Ս. ԴԵՎՈՐԻՅԱՆ, Ի. Ռ. ՅԱՏԱՆՈՎԱ

Սպիտակ առնետների երիկամների կեղևային և միջուկային շերտերի ԱՏՖ-ազայի ակտիվությունը քաղցի ընթացքում նվազում է: Ավելացրած զլխուտաթիւնը բարձրացնում է այդ ֆերմենտի ակտիվությունը քաղցած կենդանու երիկամների կտրվածքներում: Երբ քաղցած կենդանիներին փոխադրում ենք նորմալ կերային ռեժիմի, երիկամների ԱՏՖ-ազայի ակտիվությունը բարձրանում է մինչև կոնտրոլ կենդանու ֆերմենտի ակտիվության մակար-դակը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геворкян Ж. С., Автореф. канд. дисс., Ереван, 1969.
2. Громова К. Г. Вopr. мед. химии, 3, 2, 1957.
3. Гулый М. Ф., Литвиненко Л. Т., Мартиненко Ф. П., Кокупин В. А. Укр. биохим. журн., 40, 440, 1968.
4. Оганесян А. С. Некоторые вопросы гормональной регуляции почечной деятельности и мембранной проницаемости. Ереван, 1968.
5. Фаталова И. Р. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1977.
6. Bonting S. L., Simon K. A., Hawkins N. M. Arch. Biochem. Biophys., 95, 416, 1961.
7. Fiske C. H. Subbarrow J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
8. Glinn J. M. J. Physiol., 134, 278, 1956.
9. Lajtha A., Toth Y. J. Neurochem., 9, 119, 1962.
10. Post R. L. a Albricht C. D. In: Membrane transport and metabolism. Praga, 1961.
11. Post R. L., Merril C. R., Kinsolving C. R. a Albricht C. D. J. Biol. Chem., 235, 1796, 1960.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611—018—086—3

МЕТОД ПЛОСКО-ПАРАЛЛЕЛЬНОЙ ЗАЛИВКИ СРЕЗОВ ТКАНЕЙ
ДЛЯ КОРРЕЛИРОВАННОГО СВЕТО-ЭЛЕКТРОННО-
МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Т. С. АГЛИНЦЯН, Дж. А. МАРТИРОСЯН

Заливка гистологических срезов тканей в эпоксидные смолы в виде светомикроскопического препарата, позволяющего производить общий обзор ткани, поиск и выбор интересующих структур для последующего прицельного ультратомирования и электронномикроскопического изучения, проводилась единичными исследователями различными способами [4, 9].

Сущность предлагаемого нами метода заключается в том, что заливка срезов в эпоксидные смолы производится между параллельными пластинками из полиэтилена и листового эпон-аралдита или аралдита. Этот метод апробирован нами при электронногистохимическом выявлении активности кислой фосфатазы на срезах мозга крысы с использованием инкубационной смеси Чилингаряна [3], а также при выявлении миоглобина в биопсированном миокарде человека методом Джеймса [5]. 30–50-микронные замороженные срезы из альдегидфиксированного материала после указанных гистохимических реакций тщательно промывали в растворе сахарозы и монтировали на гладких обезжиренных полиэтиленовых пластинках размером 26×19–25 мм, (вырезанных из полиэтиленовых крышек или тары), затем высушивали при комнатной температуре и постфиксировали в чашках Петри при 4° накопыванием 1%-ного раствора четырехоксида осмия с 7,5% сахарозы в течение 1 часа, промывали в растворе сахарозы, вновь высушивали и обезжизивали 90%-ным и абсолютным ацетоном при комнатной температуре (две смены по 10 мин). Пропитывали по 1 часу в смеси смолы с ацетоном (в соотношении 1:2 и 2:1) и оставляли в заливочной смеси на ночь при комнатной температуре. Финальную заливку проводили следующим образом: на срез наносили несколько капель свежей заливочной смеси и пластинки срезами вниз укладывали на матовую поверхность подложки из листовой эпоксидной смолы. Подложки размером 76×25 мм и толщиной 0,7–0,8 мм заготавливали заранее из соответствующих смесей для заливок в эпон-аралдит [6] и аралдит [7] с помощью ограничивающих рамок из листовой пластмассы соответствующей

тей толщины, приклеиваемых к пластине из полиэтилена или продажного оргстекла. Полимеризацию проводили на абсолютно горизонтальной полке термостата, после чего эпоксидную подложку отделяли от основы и рамки, а перед употреблением матовую поверхность ее очищали ацетоном. На одну подложку можно уложить 3—4 пластинки со срезами. Этот «сэндвич» помещали между двумя пластинами из толстого стекла, предварительно покрытыми полиэтиленовой пленкой, чтобы в случае вытекания смола не приставала к стеклу, и ставили на полимеризацию при 60° на 24—48 час., после чего полиэтиленовые пластинки отщепляли, срезы при этом оставались на подложке. Препарат изучали под световым микроскопом, интересующую структуру маркировали загнутой на конце препаровальной иглой (можно использовать отметчики любой конструкции), иссекали пробойником микроблок, приклеивали его к свободному блоку смолы и после повторной полимеризации ультратомировали. Желательно, чтобы конечный продукт гистохимических реакций был бы окрашен светооптически и одновременно обладал необходимой электронной плотностью, как было в нашем случае. Это создает оптимальные условия для коррелированного светоэлектронномикроскопического исследования, хотя при отсутствии указанных условий, вероятно, можно прибегнуть и к фазовоконтрастной микроскопии.

Описанный вариант плоскопараллельной заливки может быть пригоден и для криостатных срезов, которые фиксируются альдегидами и осмиевой кислотой после соответствующих гистохимических реакций. Процедура замораживания—оттаивания, несомненно, отражается на сохранности ультраструктур, что, вероятно, можно устранить обработкой кусочков тканей 20%-ным диметилсульфоксидом [3]. В этом аспекте предлагаемый вариант может оказаться наиболее подходящим для заливки пленчатых препаратов.

В заключение необходимо отметить, что использование полиэтиленовых пластин взамен стекла при заливке [1], а также листового полиметакрилата как при заливке, так и при изготовлении эпоксидных подложек [2], целесообразнее, так как их легко отщеплять (отпадает необходимость длительного отмачивания и воздействия контрастом температур с помощью сухого льда и т. д.). Малая толщина подложки позволяет иссекать микроблок обычным пробойником вручную и не прибегать к выпиливанию электродрелью. Светооптические качества препарата хорошие, а при необходимости их можно значительно улучшить, покрывая его поверхность тонким слоем разбавленной ацетоном заливочной смеси и повторной полимеризацией. С целью экономии реактивов можно манипулировать со свободными, не прикрепленными к полиэтиленовой пластинке срезами и заливать их описанным способом после пропитки. Однако при этом срезы могут деформироваться и разрушаться.

Таким образом, предлагаемый метод по сравнению с существующими методами плоско-параллельной заливки проще и доступнее. Он

сокращает сроки обработки материала и не требует дополнительных затрат и приспособлений.

Филиал ВНИИК и ЭХ МЗ СССР, Ереван,
Институт физиологии им. акад. Л. А. Орбели АН АрмССР Поступило 28.VIII 1978 г.

**ՀԱՌՈՒՎԱԾՔԱՅԻՆ ԿՏՐՎԱԾՔՆԵՐԻ ՀԱՐԹ-ԶՈՒԳԱՀԵՌԱԿԱՆ
ԼՅՄԱՆ ՄԵԹՈԴԸ ԼՈՒՍԱՅԻՆ ԵՎ ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿԱՅԻՆ
ՀԱՄԱՀԱՐԱՔԵՐԱԿՑԱԿԱՆ ՌԻՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ**

Թ. Ս. ԱԳԼԻՑՅԱՆ, Զ. Հ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ

Նկարագրվում է հյուսվածքային կտրվածքների հարթ-զուգահեռական լցման նոր մեթոդ՝ էպոքսիդային խեժով, որը ներ է մտնում պոլիէթիլենային և էպոն-արալդիտից կամ արալդիտից պատրաստված թիթեղների միջև:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Рейнгольд В. Н., Акопян С. М., Лисак В. М., Шестопалова Н. М. Тез. докл. VII Всесоюзной конференции по электронной микроскопии, М., 1969.
2. Рейнгольд В. Н., Лисак В. М. Цитировано по Рейнгольду с соавт. Тез. докл. VII Всесоюзной конференции по электронной микроскопии. М., 1969.
3. Чилингарян А. М. Докт. дисс., Ереван, 1968.
4. Holländer H. Brain Research, 20, 1, 39—47, 1970.
5. James N. T. J. Histochem., 26, 4, 327—332, 1971.
6. Mollenhauer H. H. Stain Technology, 39, 111—114, 1964.
7. Weakly B. Электронная микроскопия для начинающих. М., 1975.
8. Zagury D., Model P. G., Pappas G. D. J. Histochem. Cytochem., 16, 40, 1968.
9. Zeitoun, Lehy T. Lab. Invest., 23, 2, 1970.

РЕФЕРАТ

УДК 57.087.4

А. М. ДИЛАНЯН

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ИНТАКТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

С целью денатурации и осаждения общего белка человеческой сыворотки, бычьего сывороточного альбумина и белка интактных бактериальных клеток была использована сульфосалициловая кислота.

Количественное определение белка сыворотки, альбумина и белка бактериальных клеток проводилось по оптической плотности—экстинкции фотоэлектроколориметра ФЭК-М.

При составлении калибровочной кривой вначале были применены сыворотки человеческой крови, а затем—бычий сывороточный альбумин.

В работе изложены методы определения общего белка человеческой сыворотки с выведением калибровочной кривой, калибровочной кривой по стандартным растворам альбумина и определением белка интактных бактериальных клеток *E. coli*.

Количество общего белка в цельной человеческой сыворотке определялось по известной методике рефрактометром по коэффициенту преломления.

Для составления калибровочных кривых сыворотки и альбумина, две навески которого соответствовали процентному содержанию белка двух проб сыворотки человеческой крови, были приготовлены разведения 1:10, 1:20, 1:40... 1:640. Разведенные сыворотки и стандартные растворы альбумина замутняли 2,5%-ным раствором сульфосалициловой кислоты, затем фотометрировали через несколько минут инкубации.

Из 10 млрд/мл маточной бактериальной суспензии пипетировали по 0,25 мл, т. е. такое количество сыворотки и альбумина, которое брали для замутнения, добавляли к 5 мл сульфосалициловой кислоты и для холостой пробы—к 5 мл физиологического раствора. По разности оптической плотности ФЭК-М опыта и холостой пробы определяли количество белка данной суспензии по калибровочной кривой сыворотки или альбумина.

Полученные результаты статистически достоверны.

Проведенные исследования позволяют нам рекомендовать турбидиметрический способ определения белка интактных бактериальных кле-

ток как *E. coli* и различных представителей энтеробактерий, так и других видов микроорганизмов.

Турбидиметрический способ определения белка может найти применение в медицинской, радиационной, ветеринарной, сельскохозяйственной, технической и промышленной микробиологии.

Страниц 19. Таблиц 5. Библиогр. 14 назв.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 23.X 1978 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ

РЕФЕРАТ

УДК 57.087.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ
(ҚФ 1.11.1.6) ИНТАКТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

А. М. ДИЛАНЯН

Определение активности каталазы проводилось манганометрическим методом, а количество белка—турбидиметрическим способом, предложенным нами.

Были использованы 19 эталонных культур *E. coli*. Показано количественное различие в содержании белка между отдельными штаммами *E. coli* при культивировании в одинаковых условиях.

Приведенные экспериментальные данные об удельной активности каталазы *E. coli* обработаны непараметрическим критерием статистики—вычислен коэффициент корреляции рангов Спирмена и коэффициент нормальной корреляции. Все расчеты показали отрицательную корреляцию между количеством белка интактных бактериальных клеток *E. coli* и их каталазной активностью с высоким уровнем надежности, позволяющим отвергнуть нулевую гипотезу. Имеется корреляционная связь между белком интактных бактериальных клеток и активностью их каталазы. Эта связь обратного характера выражена в сильной степени.

Полученные результаты позволяют нам рекомендовать методику определения удельной активности каталазы *E. coli*. Эту методику можно использовать для каталазопозитивных видов микроорганизмов и дрожжей.

Считаем целесообразным применение удельной активности ферментов у микроорганизмов соответственно количеству мг расщепленного субстрата или образовавшегося продукта на 1 мг белка в единицах, что позволит сравнивать активность различных ферментов в одной и той же суспензии при определенной концентрации, при одинаковых морфологических и физиологических свойствах взятых культур в условиях данного эксперимента.

Страниц 12. Таблиц 2. Библиогр. 12 назв.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 23.X 1978 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Л. А. МАТИНЯН. *Сравнительно-физиологические особенности компенсаторных приспособлений при повреждениях спинного мозга*. Изд-во «Айастан», Ереван, 1978, 327 с.

Рассматриваемая монографическая работа доктора биологических наук Л. А. Матиняна ценна в теоретическом и практическом отношении. Она является обширным экспериментальным исследованием, двадцатилетним трудом автора, изложенным на 327-ми страницах, иллюстрированным 78-ю рисунками, 25-ю таблицами, с использованием 637 литературных источников (478 русских и 159 иностранных) и заключением на английском языке.

В работе рассматриваются итимальные механизмы, основные закономерности и особенности восстановления нарушенных функций после различного рода повреждений спинного мозга, изучение которых имеет принципиальное значение в связи с тем, что дает возможность физиологам и клиницистам управлять этими процессами.

Отметим основные результаты работы, являющиеся солидным вкладом в рассматриваемую проблему и имеющие принципиальное значение.

Работа выполнена на большом количестве взрослых животных, стоящих на различных уровнях филогенетического развития (521 животное). Для решения поставленной задачи Л. А. Матинян применил большое разнообразие хирургического повреждения спинного мозга—дорсальные, вентральные и латеральные гемисекции. А для анализа динамики нарушения и восстановления, теоретических заключений и выводов автор использовал большое количество современных методик. Можно без преувеличения сказать, что это одна из немногих работ по насыщенности приемов исследования. Были применены условно-рефлекторные, электрофизиологические, биохимические, эндокринологические, гистоморфологические и гистохимические методики, а также математическая статистика. Таким образом, использование большого разнообразия животных (лягушек, черепах, птиц, крыс), а также применение большого количества методик позволило автору получить новые ценные факты и сделать достоверные теоретические заключения и выводы.

Экспериментальный материал работы изложен в 3-х главах.

Первая глава посвящена изучению закономерностей нарушения и восстановления функций после дорсальной и вентральной гемисекции спинного мозга. Здесь нам хотелось бы остановиться на следующих интересных фактах. Клинические наблюдения показали, что двигательные и вегетативные функции претерпели менее глубокие нарушения у лягушек и черепах и более значительные у голубей и кур. Но, что особенно важно, автору удалось эти наблюдения подтвердить гистоморфологическими исследованиями. Более глубокие гистологические деструктивные изменения отмечались у животных, стоящих на более высокой эволюционной ступени развития.

Для вскрытия итимальных механизмов восстановления нарушенных функций представляют интерес следующие наблюдения. Хотя автор и не отмечал регенерации нервной системы после дорсальной гемисекции спинного мозга, но в результате тщательных гистологических исследований ему удалось обнаружить в передних столбах, каудальном и особенно в краниальном участках, гипертрофию нейронов, их гиперхромность, многоотростчатость. Все это имеет важное значение для понимания процессов восстановления функций, которые до сих пор, к сожалению, еще недостаточно изучены.

Для дальнейшего изучения механизмов компенсации функций важны электрофизиологические исследования автора. О значительных и длительных расстройствах проведения афферентных и эфферентных импульсов в спинном мозге после дорсальной гемисекции автор судил по вызванным корковым потенциалам и регистрации биотоков мышц задних конечностей. Особый интерес в этом отношении представляют результаты, полученные при регистрации вызванных потенциалов, которые в коре больших полушарий после дорсальной гемисекции спинного мозга не исчезают, но значительно изменяются их латентный период, амплитуда, продолжительность и скорость проведения импульсов. К моменту восстановления нарушенных функций нормализуются и вызванные потенциалы.

В какой-то степени аналогичные данные и выводы были получены на тех же животных при одномоментной дорсальной и вентральной гемисекциях спинного мозга на разных его уровнях, но нарушения двигательных, чувствительных и вегетативных функций были более глубокими, и компенсация протекала намного медленнее. Здесь хотелось бы обратить внимание на то, что Л. А. Матинян делает важный и новый вывод о том, что восстановление нарушенных функций осуществляется посредством образования новых анатомических связей, основанных на способности нервных окончаний отдавать коллатерали к неповрежденным нервным структурам, а также путем усиления предшествующих связей—рекрутирования, уменьшения подпороговой каймы, облегчения ответов и др. Этот механизм компенсации функций заслуживает особого внимания как со стороны морфологов, физиологов, так и клиницистов.

Заслуживают также большого внимания данные, приведенные во второй и третьей главах. Мы придаем большое значение тому факту, что у животных после предварительной экстирпации брюшной симпатической цепочки последующая латеральная гемисекция спинного мозга вызывала более серьезные расстройства сенсомоторной и вегетативной функций организма и более медленное и неполное восстановление. Такая же гемисекция у интактных животных вызывала менее глубокие нарушения. У них, судя по электрофизиологическим исследованиям, все параметры ответов и скорость проведения импульсов со временем восстанавливались, тогда как у предварительно симпатикотомизированных животных эти показатели не восстанавливались и спустя длительное время после операции. Мы особо выделяем эти факты потому, что они имеют не только важное теоретическое, но и практическое значение, когда речь идет о необходимости операции на том или ином отделе симпатической нервной системы. Они важны еще и потому, что в последнее время исследований по выяснению значения симпатической нервной системы для многих функций животного организма проводится очень мало.

Весьма ценный экспериментальный материал был получен также при изучении функционального состояния коры надпочечников, содержания АТФ и АТФ-азы в скелетных мышцах и в спинном мозге при повреждениях спинного мозга. Эти данные помимо теоретического значения важны и для практической медицины, так как проливают дополнительный свет на питательные механизмы развития приспособительных явлений и позволяют управлять ими. Это истинное большое достижение автора.

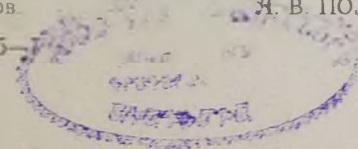
Монография написана хорошим литературным языком, прекрасно иллюстрирована рисунками и таблицами.

Таким образом, работа Левона Аршалуйсовича Матиняна посвящена весьма актуальному вопросу современной нейрофизиологии, нейроморфологии, выполнена на высоком научно-методическом уровне, на большом экспериментальном материале. В результате многолетних исследований сформулирован ряд новых, оригинальных положений, вносящих ценный вклад в физиологию и медицину. Результаты этих исследований открывают новые перспективы для дальнейших научных исканий.

Автором на рептилиях и птицах (гл. II) показаны изменения условнорефлекторной деятельности при повреждениях спинного мозга, к сожалению, в отношении грызунов этого не сделано. Желательно выяснить это и на грызунах, учитывая особенности развития их мозга (имеется как древняя кора, archicortex, так и новая, neocortex, однако отсутствуют извилины, образование которых связывается с развитием новой коры). Вызывает сожаление невысокое качество воспроизведения микрофотографий.

Книга представляет несомненный интерес для физиологов, нейроморфологов, патофизиологов, нейрохирургов, невропатологов.

Я. В. ПОЛЕЖАЕВ



Amc 487

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԳԵՄԻԱ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԳԵՍ

Հիմնադրվել է 1946 թ.

Հաստատվելով է տարեկան 12 անգամ

Համար XXXII, № 4

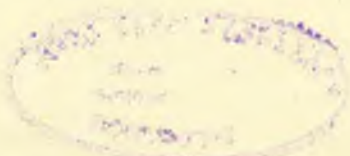
ԵՐԵՎԱՆ

Սպրիլ, 1979 թ.

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ ՈՒՆ

Փորձառական

Մաղախյան Յու. Հ. Օոցիտ—օմանդակ հյուսվածքների համակարգը որպես նմուշ նուկ- լեինաթթուների և սպիտակուցների սինթեզի ուսումնասիրման համար՝ հյուսվածք- ների տարբերակման պրոցեսում	279
Հակոբյան Ս. Մ., Գալուսյան Մ. Հ. Նուկլեինաթթուների կառուցվածքը (էլեկտրոնային մանրադիտակի տվյալների հիման վրա)	391
Աղաբալյան Ա. Ս., Պողոսյան Ռ. Գ., Ստեփանյան Գ. Ս., Փաշինյան Ս. Ա., Բսրայել- յան Յու. Ս., Զամարյան Ռ. Ա., Ղաթրբջանյան Բ. Տ. Ցիրկուլյար ԴնԹ սար- կոմա—45 առնետների ուռուցքային բջիջներից	320
Ալեխանյան Յու. Թ. Կուտիվացվող ուռուցքային բջիջների կողմից շիճուկային սպիտա- կուցների սինթեզի վերաբերյալ	325
Վանիկյան Կ. Ս., Հակոբյան Ժ. Ի. Առնետների հյուսվածքներում լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների հավաքների մաթեմատիկական անալիզը	330
Ներկարայան Ա. Վ., Փանոսյան Գ. Հ. Մկենի լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆեր- մենտային կազմի փոփոխությունը էոլիխի ասցիտային կարցինոմայի բջիջների ներարկումից հետո	337
Քոչարյան Շ. Մ. Escherichia coli K-12-ի աղենիլիզիկազայի և ցիկլավոր 3',5'-ազենո- զինմոնոֆոսֆատի բեցիտոտր սպիտակուցի մոտանմանների ընտրության պոզիտիվ մեթոդը	346
Կոնյան Ժ. Ա., Սարգսյան Ն. Ն. dp 8 ֆազի ԴնԹ-ի տրանսֆեկցիան Salmonella der- by-ի և լազիդոգայուն մոտանմանների մոտ	352
Կարբիլյան Ա. Գ., Զամարյան Ռ. Ա., Վարդանյան Մ. Կ., Դարալոյան Կ. Ս. dp 8 Salmonella derby բակտերիոֆագի ԴնԹ-ի ֆիզիկական հատկությունները	357
Եսլա լեր Մ. Ա., Ավագյան Հ. Մ., Բաղդասարյան Վ. Վ., Շահինյան Ա. Ա. Փոխադրե- ցության կոտիլերատիվությունը որպես մոլեկուլների ասոցիացման հատկանիշ	361
Համառոտ հաղորդումներ	
Գասպարով Վ. Ս. Նեյրոկուլերինի հետազոտումը բարձր կարգի լուծողության միջուկա- յին մազնիսական ռեզոնանսի մեթոդով	369
Հակոբյան Ս. Մ., Գալուսյան Մ. Գ., Քոչարյան Շ. Մ. Pseudomonas putida ֆագերի ֆիզիկա-քիմիական որոշ հատկությունները	372
Քոչարյան Շ. Մ., Քոչարյան Ռ. Մ. Աղենիլի բարձր կոնցենտրացիաների ճնշող ազդեցու- թյան վերացումը Escherichia coli K-12-ի մոտ աղենիլիֆոսֆորիլոտրանսֆե- րազի մուտացիաներով	375
Բեզլարյան Զ. Բ. Salmonella derby-ի ՈւՖ-մոտանմանների զգայունությունը քիմիական աղենտների նկատմամբ	378
Վանիկյան Կ. Ս., Սարգսյան Յ. Մ., Պետրոսյան Լ. Ա. Մարդու արյան սինուկի մեջ լակ- տատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտների հավաքների կազմավորման ուսումնա- սիրության մասին	382
Հայաստանի կենսաբանական հանդես	275



СОДЕРЖАНИЕ

Магакян Ю. А. Система «ооцит—вспомогательные клетки» как модель для изучения синтеза нуклеиновых кислот и белков в процессе дифференциации клеток	279
Акопян С. М., Галустян М. Г. Структурная организация нуклеиновых кислот (в свете данных электронной микроскопии)	301
Агабалян А. С., Погосян Р. Г., Степанян Г. М., Пашинян С. А., Исраелян Ю. А., Захарян Ф. А., Гарибджанян Б. Т. Циркулярные ДНК из клеток саркомы-45 крыс	320
Алексанян Ю. Т. О синтезе сывороточных белков культивируемыми опухолевыми клетками	325
Даниелян К. С., Акопян Ж. И. Математический анализ наборов изоферментов лактатдегидрогеназы в тканях крыс	330
Неркарян А. В., Паносян Г. А. Изменение изоферментного состава лактатдегидрогеназы печени мышей при введении клеток асцитной карциномы Эрлиха	337
Кочарян Ш. М. Позитивный метод отбора мутантов по аденилатциклазе и белку-рецептору циклического 3',5'-аденозинмонофосфата у <i>Escherichia coli</i> K-12	346
Кочян Ж. А., Саркисян Н. Н. Трансфекция ДНК фага ϕ 8 в <i>Salmonella derby</i> и радиочувствительных мутантах	352
Габриелян А. Г., Захарян Р. А., Варганян М. К., Карагезян К. С. Физические свойства ДНК фага ϕ 8 <i>Salmonella derby</i>	357
Новоселер М. А., Айвазян О. М., Багдасарян В. В., Шагинян А. А. Кооперативность взаимодействий как одно из свойств ассоциаций молекул	361

Краткие сообщения

Гаспаров В. С. Исследование нейрокупрена методом ядерного магнитного резонанса высокого разрешения	369
Акопян С. М., Галустян М. Г., Кочарян Ш. М. Физико-химические свойства некоторых фагов <i>Pseudomonas putida</i>	372
Кочарян Ш. М., Кочарян А. М. Снятие ингибирующего действия высоких концентраций аденина у <i>Escherichia coli</i> мутациями по аденинфосфорибозилтрансферазе	375
Бегларян Дж. Б. Чувствительность к химическим агентам УФ-мутантов <i>Salmonella derby</i>	378
Даниелян К. С., Саркисян Ф. М., Петросян Л. А. Формирование наборов изоферментов лактатдегидрогеназы в сыворотке крови человека	382
«Биологический журнал Армении», 1979	276

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Vol. XXXII, № 4

YEREVAN

April, 1979

CONTENTS

Experimental

<i>Magakian Yu. A.</i> The oocyte-auxiliary cell system as a model for the study of nucleic acid and protein synthesis during cell differentiation . . .	279
<i>Akopian S. M., Galustian M. C.</i> Structural organization of nucleic acids (according to new electron-microscopic data)	301
<i>Agabulian A. S., Pogosian R. G., Stepanian G. M., Pashinian S. A., Israelian Y. A., Zakarian R. A., Garibdjianian B. I.</i> The circular DNA from sarcoma tumor cells	320
<i>Aleksanyan Yu. T.</i> On the synthesis of the serum proteins by cultivated tumor cells	325
<i>Danielian K. S., Akopian Zh. I.</i> Mathematical analysis of the LDH isoenzyme patterns in rat tissues	330
<i>Nerkharlan A. V., Panosian G. H.</i> The changes of lactate dehydrogenase isoenzymes pattern in mice liver after injection of Ehrlich ascites tumor cells	337
<i>Kocharian Sh. M.</i> A positive method for selection of adenyl cyclase and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate receptor protein deficient mutants of <i>Escherichia coli</i> K-12	346
<i>Ktsojan Zh. A., Sarkissian N. N.</i> Transfection of phage ϕ 8 DNA in <i>Salmonella derby</i> and radiosensitive mutants	352
<i>Gabrielian A. G., Zacharian R. A., Vartanian M. K., Karagiozian K. S.</i> Physical properties of DNA ϕ 8 bacteriophage <i>Salmonella derby</i> . . .	357
<i>Novoseler M. A., Ajvasian H. M., Bagdassarian W. W., Shaginian A. A.</i> Cooperative interaction of molecule association	361

Short Communications

<i>Gasparov V. S.</i> The investigation of neurocureine by high resolution NMR method	360
<i>Akopian C. M., Galustian M. G., Kocharian Sh. M.</i> Physico-chemical characteristics of some <i>Pseudomonas putida</i> phages	372
<i>Kocharian Sh. M., Kocharian A. M.</i> Taking off the inhibitory action of high adenine concentration in <i>Escherichia coli</i> by adenine phosphoribosyltransferase mutations	375
<i>Beglarian J. B.</i> <i>Salmonella derby</i> UV-mutants sensitivity to chemical agents	378
<i>Danielian K. S., Sarkisian F. M., Petrosian L. A.</i> Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern formation in blood serum of a man	382
<i>„Biological Journal of Armenia“, 1979</i>	277