

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года
Айастан кенсабанакан андес

Խմբագրական կոլեկտիվ՝ Մ. Մ. Ավագյան, Վ. Բ. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադյան, Հ. Գ. Բատիկյան, Ա. Շ. Փալատյան (գլխավոր տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Վ. Հ. Ղաղարյան, Կ. Ս. Մարտիրոսյան (պատ. քարտուղար), Ս. Հ. Մովսիսյան:

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

ԽՄԲԱԳՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍՑԵՆ՝

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

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

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

© Издательство АН Армянской ССР, 1979 г.

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

СИНХРОТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ

Շ. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ, Տ. Գ. ԴԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ա. Տ. ԿԱՐԱԳԵՅՅԱՆ, Մ. Մ. ԿՈՐԽՄԱՅՅԱՆ

Современные гигантские электронные кольцевые ускорители являются источником интенсивных пучков синхротронного излучения. Синхротронные пучки являются уникальным инструментом для исследований в области физики твердого тела, биологии, медицины. Применение СИ в биологии открыло новые направления в радиационной и молекулярной биологии. Приводятся экспериментальные материалы, показывающие перспективы использования СИ в биологии.

В конце XIX века Линеард [27] показал, что электрон, движущийся по окружности, вследствие большого ускорения должен стать источником электромагнитного излучения. Шотт в 1907 г. [34], исследуя движение электронов по окружности, пытался объяснить природу волн, которые охватывали диапазон от ультрафиолета до рентгеновской области.

В 1947 г. американскими учеными на синхротроне «Дженерал электрик» с энергией 70 Мэв были проведены экспериментальные исследования по спектральному распределению излучения в области видимого спектра [39].

Для изучения микромира физиками в дальнейшем были построены ускорители и накопители электронов. Современные гигантские электронные кольцевые ускорители с предельной энергией 5÷12 Гэв являются источниками интенсивных пучков синхротронного излучения (СИ) [2]. Широкий диапазон длин волн, излучаемых электронами в течение циклов работы ускорителя, высокая степень поляризации ($\sim 98\%$), большие мгновенные интенсивности потока фотонов в узком энергетическом интервале $\frac{\Delta E}{E} \sim 10^{-4}$ и незначительная расходимость пучка $\sim 10^{-4}$ радиан, делают синхротронные пучки уникальным инструментом для исследований в области физики твердого тела, биологии, медицины и т. д. Именно этим и объясняется огромный интерес к синхротронным пучкам электронных ускорителей. В настоящее время на всех действующих электронных ускорителях созданы специальные каналы, выводящие синхротронные пучки в экспериментальные помещения [15, 29].

Синхротронные пучки отведены и от ускорителя электронов Ереванского физического института, на которых с 1971 г. проводятся ка-

либровка астрофизических приборов [9], работы по физике твердого тела, кристаллографии, рентгеноструктурному анализу, радиационной биофизике [6, 18]. Распределение числа фотонов в рентгеновском диапазоне длин волн СИ Ереванского ускорителя досконально рассчитано в работе Алиханяна и др. [2], где дано спектральное распределение СИ, охватывающее область от 0,6 до 7 А° с максимумом при 1,5 А°.

Одной из фундаментальных задач биологии является изучение структурных превращений при функционировании биологических систем. Временные характеристики этих процессов падают в диапазоне тысячных долей секунд. Так как биополимеры слабо рассеивают излучение, то на традиционных рентгеновских установках дифракционные картины можно получить лишь при экспозиции в десятки часов, но в этом случае можно извлечь информацию только о статическом состоянии биологической системы. Метод рентгеноструктурного анализа дает принципиальную возможность исследовать динамику структурных превращений, так как время этих превращений значительно больше времени взаимодействия излучения с веществом (10^{-9} — 10^{-16} сек.). Наличие интенсивных потоков фотонов позволит определять мгновенные структурные состояния биологических систем.

В 1971 г. в Гамбурге Розенбаум, Холмс и Вите [31] на синхротроне «ДЕЗИ» поставили эксперимент, который открыл новую эру в молекулярной биологии. Они показали на вирусе табачной мозаики и летательной мышце *Lethoceros maximus* выигрыш во времени в два раза по сравнению с экспериментами на рентгеновских трубках с вращающимся анодом. Впоследствии были получены дифракционные картины с большой четкостью за тысячные доли секунды, позволяющие следить за динамическими процессами [7]. Малая расходимость пучка СИ (10^{-4} рад.) в совокупности с большой интенсивностью его позволяет видеть дифракционную картину при малых углах и получать информацию о биологических объектах со структурным периодом в десятки ангстрем.

В 1972 г. впервые в СССР на Ереванском синхротроне была показана принципиальная возможность получения дифракционных картин от мышц лягушки [6]. Применение СИ с ЭВМ дало возможность сотрудникам ИЯФ СО АН СССР и ИБФ наблюдать за структурными превращениями в биологических объектах, на пучке накопителя ВЕПП-3. В этих экспериментах детектором служила однокоординатная пропорциональная камера [32], разработанная в ИЯФ [10]. Эксперименты показали, что за 100 сек получается кривая рассеяния с нужной статистической точностью. На рентгеновской трубке время экспозиции составляло 20—40 часов. Большой выигрыш был получен при монохроматизации ($\lambda = 1,5 \text{ А}^\circ$, $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \approx 6 \cdot 10^{-5}$) и диафрагмировании пучка. Сокращение мышц вызывалось генератором импульсов. Цикл сокращения мышцы ~ 65 мсек был разбит на 8 временных интервалов и информация с детектора в каждом интервале регистрировалась в одной из 8-ми

групп памяти анализатора импульсов. Система регистрации позволяла снять восьмикладовый фильм и наблюдать за изменением структуры мышцы в разных фазах сокращения [7]. Применение СИ в структурном анализе на накопителе ВЕПП-3 показало, что время экспозиции можно уменьшить в 100 раз при изучении структуры белка и получить рентгенограмму от белкового кристалла размером $\sim 10^{-3}$ мм² за 60 мин [10]. Это позволило перейти к изучению структуры белковых кристаллов объемом $10^{-4} \div 10^{-6}$ мм³, что очень важно, так как получение крупных и пригодных для анализа белковых кристаллов весьма сложно.

Использование СИ открыло новые возможности в исследованиях электронной структуры вещества, основанных на анализе спектров поглощения, отражения, флуоресценции, фотоэлектрической эмиссии. Широкий диапазон энергии СИ, от 1,6 эв до 200 кэв, дает возможность перекрыть всю область характерных надъядерных энергий [38]. Поглощение рентгеновских лучей при прохождении через вещество описывается формулой $J = J_0 e^{-\mu x}$, где J_0 — интенсивность падающего пучка, J — интенсивность пучка, после прохождения через вещество, μ — коэффициент поглощения, x — толщина образца. Когда энергия падающего рентгеновского кванта равна энергии связи электрона в атоме, тогда электрон, поглощая энергию кванта, переходит из связанного состояния в свободное. В этом случае наблюдается резкий скачок на кривой поглощения [5]. В соответствии с энергиями связи электронов разных уровней, которые принято обозначать через K, L и т. д., края поглощения обозначаются соответственно K, L и т. д. Для разных атомов энергия связи электронов на одноименных уровнях разная, и поэтому, например, K — край разных элементов на энергетической шкале разделены. Зная K — край поглощения элемента, можно определить сорт атома поглотителя. Известно, что кривая поглощения рентгеновских лучей в зависимости от энергии выше K — края дает сложные осцилляции. При этом асимптотика кривой поглощения монотонно убывает [26]. Осцилляции ниспадающей части кривой названы EXAFS — extended x-ray absorption fine structure. Хотя это явление было известно еще в 30-ых годах, применение его в структурных исследованиях биополимеров началось в 1974 г., когда накопительные кольца электронов дали возможность получать пучки СИ в $10^5 \div 10^6$ раз более интенсивные, чем самые хорошие трубки с вращающимся анодом. В последнее время EXAFS успешно используется для изучения структуры вещества. Исследование коэффициента поглощения μ рентгеновского излучения при энергиях выше K — края поглощения изучаемого атома позволило определить расстояние между ним и окружающими его атомами [33]. Экспериментально было показано, что точность определения расстояния между атомами составляла $\pm 0,05 - 0,015$ Å. Особую ценность метод EXAFS приобретает при изучении локального окружения металла в металлсодержащих белках.

В цель данной обзорной статьи не входит описание сложного математического аппарата, описывающего это явление. Об этом сказано

в ряде работ [16, 17, 36]. Мы остановимся на физике возникновения EXAFS.

Выбитый рентгеновским квантом электрон распространяется как электронная сферическая волна [11], рассеивающаяся на ближайших соседних атомах. Часть волны отражается в обратном направлении, и интерференция отраженной волны с падающей электронной волной является причиной этих осцилляций выше K —края поглощения. В дипольном приближении зависимость поглощения рентгеновских лучей K —оболочкой атома выражается формулой [37].

$$W = \frac{2\pi^2 e^2}{\omega c^2 m^2} |M_{fs}|^2 \rho(E_f), \quad (1)$$

где $M_{fs} = \langle f | p \varepsilon | s \rangle$; $|s\rangle$ — K — оболочное состояние; $\langle f|$ — финальное состояние; $\rho(E_s)$ — плотность состояний на единицу энергии конечного состояния; ω — частота падающих рентгеновских лучей; p — оператор момента; ε — вектор электрического поля рентгеновских лучей.

Вышеупомянутая интерференция приводит к появлению осцилляционного члена в M_{fs} и тем самым в поглощении W . Путем математических вычислений получают формулу для EXAFS [22].

$$\chi(k) = \sum \frac{-N_j |f(k, \pi)|}{k R_j^2} \cdot e^{-2\tau_j^2 k^2} \cdot e^{-2iR_j} \sin(2kR_j + \delta_j(k)),$$

где $\chi(k) = \Delta\mu/\mu_0$; μ_0 — коэффициент ослабления без EXAFS; $\Delta\mu$ — амплитуда осцилляций; N_j — число рассеивающих атомов на расстоянии R_j ; $f(k, \pi)$ — амплитуда рассеяния электронов в обратном направлении от j -го атома

$e^{-2\tau_j^2 k^2}$ — фактор Дебая-Уоллера, который учитывает температурные искажения с средне-квадратичной флуктуацией τ_j^2 ; e^{-2iR_j} — член, который учитывает неупругое рассеяние электронов, $1/\lambda$ — обратная средняя длина; $\sin(2kR_j + \delta_j(k))$ — синусоидальный интерференционный член, $\delta_j(k)$ — функция разности фаз.

Очевидно, что спектр EXAFS содержит большую информацию об изучаемом веществе, количестве атомов, окружающих поглощающий атом (N_j), сортах окружающих атомов ($f(k, \pi)$), так как каждый атом рассеивает по-своему, о расстоянии этих атомов от поглощающего атома (R_j) и т. д. Для получения этой информации из экспериментальных данных используют известный в математике Фурье—анализ [28, 37].

В последние годы EXAFS был удачно применен для структурных исследований в биологии, химии и физике твердого тела.

Этот метод, позволяя изучать локальную структуру макромолекул с большим разрешением ($0,05 \div 0,01$ А), в то же время не предъявляет жестких и трудоемких требований к состоянию образца. А это зна-

чительно расширяет границы применения EXAFS по сравнению с рентгеноструктурным анализом, дающим представление о структуре всей белковой глобулы, но требующим наличия крупных и пригодных для исследования кристаллов. Возможность изучать методом EXAFS биологические соединения не только в кристаллическом состоянии, но и в растворе позволяет исследователям изучать практически все известные металлсодержащие белки.

Методом EXAFS можно исследовать тяжелый атом и его ближайшие лиганды, и именно этот участок металлсодержащих ферментов представляет наибольший интерес для биологов, так как в этом локусе фермента совершается ферментативная реакция. Изучение структуры этого участка молекулы и структурных превращений в нем в ходе биохимической реакции позволяет подойти ближе к пониманию механизма функционирования ферментов.

Метод EXAFS в биологии еще нов—первая публикация появилась в 1975 г. [35]. Пока еще разрабатываются методические и аппаратные аспекты применения этого метода для структурных исследований биологических соединений, совершенствуются методы расчета спектров, но уже получены интересные результаты на некоторых ферментах. В частности, по данным рентгеноструктурного анализа, в рубредоксине и гемоглобине между атомом железа и его лигандами имеется одна «напряженная» более короткая связь, которая, предполагают, ответственна за совершение реакции (например, из 4-х Fe-S связей в рубредоксине длина трех $= 2,24 \text{ \AA}$, а четвертая, более короткая, $= 2,05 \text{ \AA}$). По данным же EXAFS, подобных «напряженных» связей нет ни в рубредоксине, ни в гемоглобине [22, 35], и, по-видимому, надо искать другой механизм функционирования этих соединений.

Интенсивно исследуется также нитрогеназа—ферментная система клубеньковых бактерий, участвующая в биосинтезе аммиачных соединений из азота воздуха. Применение метода позволило идентифицировать координационное положение молибдена, входящего в активный центр фермента, определить его химическое состояние (Mo в нитрогеназе пентавалентен), лиганды первой координационной сферы: 3 N, 2 O, 1 S. Выяснено, что 2 атома Mo работают сообща и присутствие субстрата вызывает изменение в координационном окружении Mo [21, 24].

Методом EXAFS получены ценные результаты и на другой малоизученной белковой системе—гемоцианине, имеющем 2 атома меди в активном центре и обратимо связывающем O_2 . Гемоцианин—крупная молекула, и изучение ее активного центра другими методами очень сложно. EXAFS позволяет изучать локальное окружение меди. Уже определено валентное состояние ее в различных гемоцианинах (двухвалентна в окси- и нитрогемоцианине и одновалентна в дезоксигемоцианине), количество атомов на первой координационной сфере (5—6 атомов лигандов в окси- и нитрогемоцианине, 3—4—в дезоксигемоцианине), расстояние до 1 координационной сферы, с точностью до $0,03 \text{ \AA}$, ($1,96 \text{ \AA}$ —в оксигемоцианине, $1,99 \text{ \AA}$ —в дезоксигемоцианине и $2,01 \text{ \AA}$ —в нитрогемоцианине) [35].

Этот далеко не полный перечень результатов, полученных методом EXAFS, свидетельствует об уникальности метода, о возможностях, которые открываются перед исследователями в области молекулярной биологии.

Одной из актуальных проблем применения СИ является взаимодействие СИ с живыми объектами и влияние его на особенности их функционирования. Биологическое действие монохроматических источников рентгеновских лучей было исследовано Глезером и др. [23]. Авторы пришли к выводу, что резкое падение интенсивности излучения при его монохроматизации делает невозможным изучение радиобиологических эффектов. С другой стороны, известно, что для изучения радиобиологической реакции желательна монохроматизация источника, так как коэффициент поглощения, квантовый выход и состав образующихся продуктов могут зависеть от длины волны. Поэтому высокая монохроматичность излучения поможет исключить неопределенности, связанные с использованием немонохроматизированного пучка.

Впервые на канале СИ Ереванского кольцевого ускорителя были поставлены эксперименты по биологическому действию СИ на хромосомный аппарат растений и ДНК животного происхождения [1, 3, 18, 19]. При проведении работ по радиобиологии возникает необходимость точного измерения числа поглощенных фотонов N заданной длины волны λ на единицу события. Такая работа была нужна для более точной оценки поглощенной биообъектами дозы. Был измерен коэффициент поглощения $\mu(\lambda)$ [19] для семян гороха, пшеницы, табака, а также дистиллированной воды. Пучок СИ с помощью вакуумного пучкопровода длиной 25 м транспортировался от орбиты ускорителя на коллимирующую и спектрометрическую аппаратуру, позволяющую выделять заданную длину волны λ . Спектрометр был собран на базе гониометра ГУР-5 с использованием идеального кристалла Si (111), имеющего ширину дифракционного максимума $\sim 15^{-11}$. Измерение числа отраженных от кристалла фотонов осуществлялось с помощью 2-х ионизационных пролетных камер длиной в 1 и 20 см. Результаты измерений $\mu(\lambda)$ для образцов и для воды представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты измерений $\mu(\lambda)$

Угол падения пучка	6°	8°	9°	10°	12°
$\mu(\lambda)$					
H ₂ O эксп.	0,899	1,92	2,64	3,57	5,79
$\mu(\lambda)$					
Горох эксп.	0,820	1,74	2,35	3,38	5,40
$\mu(\lambda)$					
Пшеница эксп.	0,730	1,53	2,12	2,73	4,30
$\mu(\lambda)$					
Табак эксп.	0,463	0,93	1,25	1,72	2,75
(А°)	0,661	0,873	0,980	1,089	1,304
Ефот (кэв)	18,72	14,17	12,63	11,36	9,49
M(x) (1)	0,89	1,93	2,66	3,58	5,83
H ₂ O (2)	0,96	2,07	2,86	3,34	6,32
Расчет					

Дистиллированная вода, взятая в качестве монитора, подтверждает достоверность проведенных измерений $\mu(\lambda)$. Расчет производился согласно Блохину [4], где $\mu(\lambda) = 0,0115 \cdot Z_{\text{эфф}}^{2,78} \cdot \lambda^{2,78} \cdot Z_{\text{эфф}}$

$Z_{\text{эфф}}$ для воды $\approx 7,23-7,42$.

В дальнейшем при сравнительном изучении биологического действия СИ и рентгеновских лучей на ДНК измерялись [26] спектры ЭПР, а также релаксационные и рекомбинационные свойства парамагнитных центров (ПЦ), образующихся под действием этих излучений. Спектры ЭПР регистрировались при -196° . В обоих случаях были получены одинаковые результаты.

При сравнительном действии немонохроматизированного и монохроматизированного СИ и рентгеновских лучей (установка РУП-200) на семена табака были получены результаты, приведенные в табл. 2. Подсчет клеток [18, 21] проводился в ана- и телофазах.

Из таблицы видно, что действие сплошного спектра СИ резко отличается от действия излучения рентгеновских трубок. Цитологические исследования свидетельствуют о заметной задержке митозов. При облучении рентгеновским источником и монохроматическим СИ, при длинах волн, равных 0,55, 1,52 и 3,04 Å, и дозе 3263 рад. наблюдается небольшое отклонение в пределах 3—8%, в то время как действие немонохроматизированным спектром СИ при той же дозе приводит к летальному эффекту.

Исследовался также «кислородный эффект» СИ на 4-дневных меристематических клетках проростков табака. Оказалось, что при облучении корешков Х-лучами в атмосфере кислорода процент выхода хромосомных aberrаций составляет при 2500 рад. 2,5%, тогда как при действии СИ—23—24% [20].

Эксперименты на семенах пшеницы [12] также выявили резкое различие в действии Х-лучей и СИ. Рентгеновское облучение дозами 0,5—10 крад не влияет на митотическую активность клеток, при дозе 15 крад наблюдается слабое угнетение клеточного деления. При облучении же семян СИ эффект намного сильнее: при дозе 15 крад наблюдается полное подавление митотической активности и выхода хромосомных aberrаций.

В последнее время японскими учеными проводятся обширные исследования по исследованию действия вакуумного ультрафиолета (УФ) на микроорганизмы. Сравнительные эксперименты были поставлены на пучках накопительного кольца Токийского университета с максимумом энергии 0,4 ГэВ [14, 30]. В работе [30] исследовалось действие СИ, вакуумного УФ-163 нм и дальнего спектра УФ-254 нм на инактивацию гемагглютинаина, нейраминазы, Sendai—вируса. Биологическое действие этих двух спектров показало специфичность поглощения разных длин волн разными молекулами вируса. Были проведены также эксперименты на бактериофаге T1 и на E. coli, исследовалась инактивация, фотореактивация и выживаемость.

Таблица 2

Содержание аберрантных клеток при воздействии рентгеновскими лучами, монохроматическим и сплошным спектром СИ на семена
Nicotiana tabacum L., %

Показатели	Контроль	Рентгеновское излучение	Монохроматическое излучение			Сплошной спектр СИ		
Длина волны, А°	—	К ~ 0,05 А°	0,55	1,52	3,04	0,11—3,13		
Энергия, кэв	—	248	22,49	8,14	4,07	112,48—3,95		
Доза облучения, рад	0	3263	3263	3263	3263	980	2283	3263
Число аберрантных клеток, %	1,2±0,1	8,4±2,4	3,5±1,0	5,4±1,5	5,2±1,4	22±1,4	38±3,9	летальный эффект
Число исследованных клеток в ана-, тело-фазе	213	250	182	202	237	143	127	—

Профессором Ито с сотр. [13, 25] были проведены эксперименты по изучению радиационных эффектов УФ и мягких X-лучей. Используя СИ накопителя с энергией 0,3 Гэв $\lambda < 115$ нм, они облучали споры *Bacillus subtilis* в сухом виде. В эксперименте были использованы споры UVR, UVS и UVP, отличающиеся между собой по репарации ДНК (с дефектом в ДНК-полимеразе). Авторы пришли к выводу, что вакуумный УФ и дальний УФ вызывают различного рода повреждения ДНК и дополнительно действуют на смертность и мутацию в спорах.

Перечисленные данные, конечно, не являются достаточными для выяснения механизма биологического действия СИ, однако сильное повреждающее действие СИ, по-видимому, объясняется поляризацией СИ, которая может вызвать анизотропию радикалов [8]. Известно, что спектральная плотность СИ в рентгеновской части спектра ($2 \div 100$ кэв) на шесть порядков выше тормозного спектра и на три порядка выше характеристического излучения обычных рентгеновских трубок [10]. Поэтому следует ожидать, что при действии СИ эффект повреждений будет больше. Спектральный состав немонохроматизированного СИ сложный, и при одновременном действии всего спектра СИ можно ожидать нелинейный эффект. Наконец, есть экспериментальные данные [7], согласно которым сильное повреждающее действие СИ объясняется наличием в немонохроматизированном СИ длинноволнового компонента, значительно сильнее поглощаемого биологическими объектами.

Все вышеизложенное является рабочей гипотезой, которую предстоит доказать экспериментально в дальнейших радиобиологических работах.

Ереванский физический институт ГКАЭ.
Лаборатория радиационной биофизики,
кафедра цитологии ЕГУ

Поступило 30.X 1979 г.

ՍԻՆԽՐՈՏՐՈՆԱՅԻՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱ ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ԿԵՆՍԱՐԱՆՈՒԹՅԱՆ ՄԵՋ

Մ. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ս. Գ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ա. Ս. ԿԱՐԱԳՅՈՋՅԱՆ,
Մ. Մ. ԿՈՐԽՄԱՋՅԱՆ

Ժամանակակից օդակածե կլեկտրոնային արագացուցիչները հանդիսանում են սինխրոտրոնային ճառագայթների առաքման աղբյուր։ Ունենալով լայն ալիքային դիապազոն, մինիմալ շեղում և բարձր ինտենսիվություն, սինխրոտրոնային ճառագայթները դարձել են արտակարգ գործիք՝ մոլեկուլյար կենսաբանության, բժշկության, ռադիոբիոլոգիական հետազոտություններում։ Հնդվածում բերված աշխատանքների համառոտ շարադրանքը ցույց է տալիս այդ ճառագայթների օգտագործման հեռանկարները։

SYNCHROTRON RADIATION (SR) AND ITS APPLICATION IN BIOLOGY

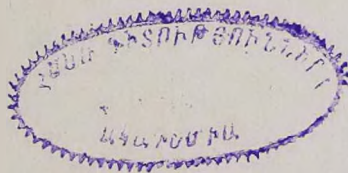
Ts. M. AVAKIAN, S. G. GEVORKIAN, A. S. KARAGUEUZIAN,
M. M. KORKHMAZIAN

Modern huge electron circular accelerators present sources for intensive SR beams. Synchrotron beams are unique instruments for research in solid state physics, biology, medicine. The use of SR in biology opened new trends in radiation and molecular biology. The paper concerns experimental materials illustrating the prospects of SR application in biology.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авакян Ц. М., Карагезян А. С., Даниелян А. Х., Батикян Г. Г. Радиобиология, 17, 3, 1977.
2. Алиханян А. И., Авакян Ц. М., Безирганян П. А., Карабеков И. П., ПТЭ, 3, 1974.
3. Асатуryan P. A. *Studia Biophysica*, Берлин, В-71, 1978.
4. Блохин М. И. Физика рентгеновских лучей. М., 1957.
5. Бокий Г. Б. Практический курс рентгеноструктурного анализа. М., 1951.
6. Вазина А. А., Герасимов В. С., Матюшин А. М., Франк Г. М., Авакян Ц. М., Алиханян А. И. Биофизика, 20, 801, 1975.
7. Вазина А. А. Молекулярная биология, 8, II, М., 1976.
8. Гринберг О. Я., Дубинский А. А., Лебедев Я. С. ДАН СССР, 193, 4, 848—850, 1970.
9. Гурзадян Г. А., Оганесян Дж. Б. *Астрономический журнал*, 48, 6, (1289), 1971.
10. Кулипанов Г. Н., Сиринский А. Н. Использование СИ, состояние и перспективы. Препринт ИЯФ 77-11, Новосибирск, 1977.
11. Ландау А. Д., Лифшиц Е. М. Квантовая механика. М., 1974.
12. Минасян М. А., Авакян Ц. М., Семерджян С. П. Радиобиология, 18, 5, 1978.
13. Abstracts of the 6—International Congress of Radiation Research, Japan, May 13—19, 1979.
14. Activity Reports of SR Lab. University of Tokyo, 1978.
15. Annual Reports, DNPL, 1971.
16. Ashley C. A. SSRP. Report, 74/01, 1974.
17. Ashley C. A. Doniach S. SSRP, Report 74/02, 1975.
18. Avakian Ts. M., Karaguesian A. S.: The action of SR on *Nicotiana tabacum* Seeds. VII Int. Congress of Photobiology, Rome, 1976.
19. Avakian Ts. M., Karabekov I. P., Martirosian M. A. Preprint YEI—256, 49, 1977.
20. Avakian Ts., Karaguesian A. S., Danellian A. Ch. *Studia Biophysica* B—72, Berlin, 1978.
21. Eccles T. K. SSRP, 78/01, 1978.
22. Eisenberger P., Shulman E. G., Brown G. S., Ogawa S. PNAS, USA, 73, 491, USA, 1978.
23. Glasser O., Quimby E. H., Taglor L. S., Weatherwax J. I. Physical Foundation of radiology, Hoeber, N. Y., 1944.
24. Gramer S. P., Eccles T. X., Kutzles F., Hodgson K., Mortenson L. E. SSRP 75/08, USA, 1978.
25. Ito T. Photochem. Photobiol., 25, 47, 1977.
26. Kronig R. Z. Phys., 70, 317, 1931.
27. Lineard A. L'Eclair. elektr., 16, 5, 1898.

28. *Lyle F. W., Sayers D. E., Stern E. A.* Phys. Rev. B, 11, 4825, 1975.
29. *Paul W., Brauch K., Winick H.* Proposal for a SR Facility at the Cambridge Electron Accelerator, USA, 1969.
30. Progress Report Vacuum UV, 2, Tokyo, 1979.
31. *Rosenbaum G., Holmes K. C., Witz K. C.* Nature, 230, 434—437, 1971.
32. *Savli F.* Principles of Operation of Multiwire Proportional and Drift Chambers. CERN, 77—09, 1977.
33. *Sayers D. E., Stern E. A.* Phys. Rev., 11, 4825, 1975.
34. *Schott G. A.* Ann. L. Phys., 24, 625, 1907.
35. *Shulman R. G., Eisenberger P., Blumenerg W. E., Stombough N. A.* PNAS, USA, 72, 4003, 1975.
36. *Stern E. A.* Phys. Rev., 10, 3027, 1974.
37. *Stern E. A., Sayers D. E., Lyle F. W.* Phys. Rev., 11, 4836, 1975.
38. Synchrotron Radiation a Perspective View for Europe—European Science Foundation, Strasburg, 1977.
39. *Tomboulia P. H., Hartman P. L.* Phys. Rev., 102, 1423, 1956.



СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ ЗДОРОВЫХ И ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

В. М. АСЛАНЯН, С. Г. АРУТЮНЯН, П. П. ЯСЕМ, Ю. С. БАБАЯН,
 Дж. В. ГАРИБЯН, Г. М. СТЕПАНЯН

Исследовались некоторые изменения в структуре ДНК в процессе опухолевого роста. Обнаружены отличия в степени метилирования и форме кривых плавления ДНК опухолей и ДНК тканей здоровых и опухоленосящих крыс. Показано, что в процессе опухолевого роста увеличивается степень метилирования и количество дестабилизированных дефектных участков (протяженностью как минимум несколько десятков пар оснований) в ДНК и особенно в ДНК, выделенных из опухолевых тканей.

Результаты большого количества экспериментальных работ последних лет, посвященных выявлению различий в физико-химических свойствах ДНК опухолей по сравнению с ДНК нормы, показывают, что в опухолевых ДНК возможны изменения в первичной и вторичной структуре [7—10, 13, 16, 19, 27].

В окончательном формировании вторичной структуры и биологических свойств ДНК у животных существенную роль играет включение метильных групп в пятом положении цитозина (5 МЦ) [1—6, 11, 23, 24], которые, не изменяя количество комплиментарных водородных связей, заметно изменяют внутримолекулярные Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, стабилизируя вторичную структуру ДНК [15].

Вопрос о метилировании представляет особый интерес, так как у опухолевых ДНК выявлены различия в степени метилирования по сравнению с нормой [12, 20], что, по-видимому, находится в прямой корреляции с транскрипцией и, возможно, амплификацией генов [20].

Анализируя полученные ранее данные, можно сказать, что изменения во вторичной структуре ДНК опухолей в основном сводятся к увеличению количества дефектных (однонитчатые разрывы, локально денатурированные участки и т. д.) участков цепи ДНК и к изменению степени метилирования. Эти характерные для опухолевых ДНК дефектные участки могут быть выявлены на кривой плавления. Они могут изменить интервал (ΔT) и температуру (T_m) плавления, если имеют длину как минимум несколько десятков пар оснований [1, 2].

Поэтому, чтобы выяснить возможные изменения в структуре ДНК при малигнизации, в настоящей работе УФ-спектрофотометрическим методом исследовались ДНК, выделенные из опухолей и разных органов (селезенка, семенники, печень) здоровых и опухоленосящих крыс.

Материал и методика. В опытах использовались здоровые и с трансплантированной саркомой 45 белые беспородные крысы массой 100—120 г. Для исследования кинетики опухолевого роста и анализа возможных изменений в первичной структуре опухолевых ДНК исследовались ДНК из тканей здоровых животных и тканей опухоленосящих крыс, выделенные на 5-й, 8-й и 15-й дни после пересадки саркомы 45. Такой выбор дней объясняется тем, что для этой опухоли первые 5 дней являются периодом интенсивного роста, 8—9-й—периодом максимального роста опухоли, а на 15-й наступает некроз и гибель животного. Замороженную ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии однопроцентного додецилсульфата натрия при pH 8 и из гомогената с помощью хлороформной и фенольной депротенинизации выделяли препараты суммарной ДНК. Полученные препараты обрабатывали панкреатической РНК-азой и затем проназой в стандартных условиях для удаления РНК и белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [18], количество белка и РНК препаратов не превышало 0,5%. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5 МЦ, препараты высушивали при 105° и гидролизовали до оснований (99%-ная муравьиная кислота, 175°, 30 мин), основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге. Разделенные основания определяли спектрофотометрически [26].

Плавление ДНК проводили в буфере 0,1 SSC (1 SSC=0,15 М NaCl+0,015 М цитрат натрия, pH 7,3). Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP-8000 с плотно закрывающимися 5-миллиметровыми кварцевыми кюветами, при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25° в мин. Точность определения температуры 0,05°, оптической плотности—0,020 Д. Гиперхромность для всех препаратов ДНК составляла 36—38%, что характерно для нативных ДНК.

Поскольку на кривых плавления, полученных с помощью спектрофотометра, структурные особенности ДНК проявляются слабо, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП)*. При этом исходная кривая плавления нормировалась и несколько раз сглаживалась многочленом третьего порядка, проведенным через 5 точек методом наименьших квадратов. Затем проводилось численное дифференцирование. Для расчетов использовались ЭВМ ЕС-1022 и ЕС-1030.

Результаты и обсуждение. Сравнительное изучение ДНК из семенников, селезенки и печени здоровых животных показывает, что характеристики кривой плавления этих ДНК (температура, T_m и интервал ΔT плавления), общий вид ДКП (два пика и одно плечо), расположение пиков (на рисунке показан общий вид ДКП всех ДНК органов здоровых животных), степень метилирования (таблица) и нуклеотидный состав (для всех препаратов ДНК соблюдаются правила Чаргаффа) одинаковы.

Анализ ДКП препаратов ДНК, выделенных из органов опухоленосящего животного, показывает, что общий вид их сохраняется, изменяется только начало (рисунок) и место расположения второго пика. Из таблицы следует, что у ДНК из органов опухоленосящих животных есть тенденция к уменьшению T_m и увеличению 5 МЦ по сравнению с нормой. По-видимому, к понижению T_m приводит увеличение количества протяженных дефектных участков, эффект которого превалирует над эффектом возрастания степени метилирования, приводящего к стабилизации ДНК [15]. ДКП опухолевой ткани существенно отличаются

* Дифференцирование кривых плавления проведено в ИБОХ АН БССР, за что авторы благодарны Д. Ю. Ладо.

от ДКП ДНК остальных препаратов (рис.). У опухолевой ДНК в начале плавления отмечается дополнительное плечо в интервале 56—60°, которое, по-видимому, свидетельствует о наличии в цепи опухолевой ДНК повышенного количества дестабилизированных дефектных участков, содержащих не менее нескольких десятков пар оснований по сравнению с ДНК нормы и ДНК из органов опухоленосящих животных. Существенно отличаются и другие характеристики (нуклеотидный состав, T_m ,

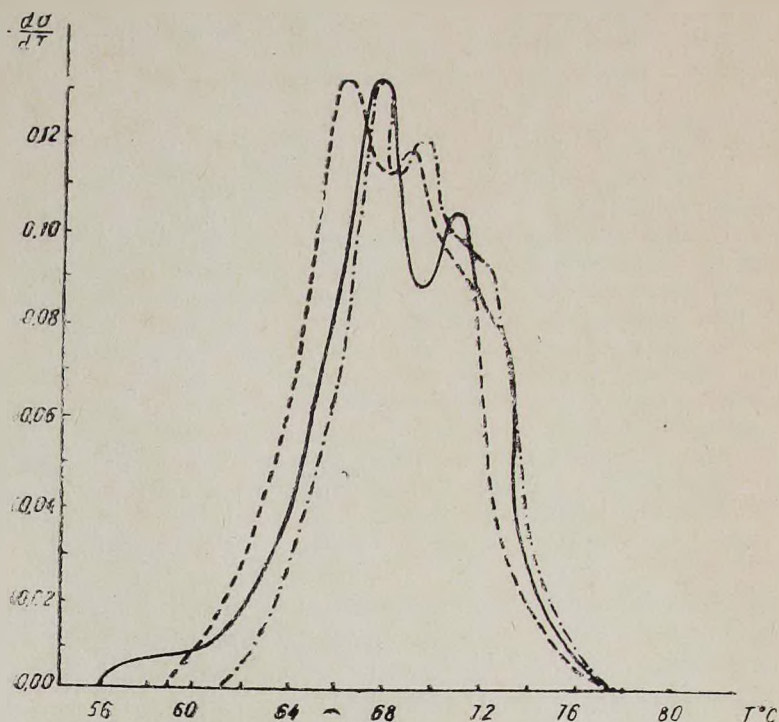


Рис. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов здоровых (—), опухолевых тканей (---) и из тканей опухоленосящих крыс (-.-) в процессе опухолевого роста. τ —степень спиральности ДНК.

ΔT). В настоящее время нет единого мнения относительно изменения нуклеотидного состава ДНК в процессе опухолевого роста. Одни авторы [21] приводят данные о повышении содержания 5 МЦ, согласно другим [14], содержание 5 МЦ понижается, по сравнению с ДНК нормы. Однако изменение степени метилирования может рассматриваться как один из возможных механизмов регуляции транскрипции [17, 25]. Увеличение степени метилирования ДНК из органов опухоленосящих животных и опухолевой ткани (таблица), по-видимому, можно объяснить изменением структуры хроматина, что дает возможность лучше работать соответствующим метилазам. Следовательно, наши данные о разном содержании 5 МЦ в нормальных и раковых клетках согласуются с данными о неодинаковой акцепторной способности ДНК

при метилировании *in vivo* в этих клетках, повышении ДНК метилазной активности в раковых клетках [3]. Изменение характеристик опухолевых ДНК достигают насыщения у ДНК, выделенных на 8-й день после перевивки опухоли. Видимо, это связано с тем, что 8—9-й день является периодом максимального роста опухоли. Интересно себя ведут T_m и ΔT . Как следует из таблицы, эти показатели почти не изменяются у ДНК из органов больных животных, тогда как у ДНК опухоли ΔT увеличивается на $0,2^\circ$, а T_m уменьшается на $0,5—0,6^\circ$. Это соответствует T_m ДНК 8-дневной опухоли. В дальнейшем T_m и ΔT существенных изменений не претерпевают. Полученные результаты можно объяснить исходя из известных предположений о возможном образовании в ДНК из опухолевых тканей повышенного количества дефектных участков, содержащих как минимум несколько пар оснований, и увеличении количества 5 МЦ в опухолевых ДНК по сравнению с ДНК нормы. Следовательно, в процессе опухолевого роста возможны изменения в структуре ДНК как в опухолевых тканях, так и в тканях органов опухоленосящих животных. Сопоставляя данные о метилировании T_m и ΔT , можно сделать вывод об относительной эффективности влияния этих факторов на вторичную структуру ДНК. Например, так как T_m ДНК мало изменяется в 8—15-дневной опухоли (таблица), то, по-видимому,

Таблица

Нуклеотидный состав, температура и интервал плавления ДНК из органов здоровых, опухолевых тканей и из тканей опухоленосящих крыс в процессе опухолевого роста

Время после перевивки опухоли, сутки	Источник ДНК	Содержание оснований, мол. %			T_m°	ΔT°
		АТ	ГЦ	5МЦ		
0	печень	55,6	43,6	$1,02 \pm 0,022$	68,9	6,0
	селезенка	56,3	42,5	$1,12 \pm 0,018$	69,1	6,0
	семенники	56,7	42,3	$1,00 \pm 0,001$	68,9	6,0
5	печень	56,2	42,6	$1,39 \pm 0,021$	68,9	5,9
	селезенка	56,3	41,4	$1,60 \pm 0,03$	68,7	6,0
	семенники	57,5	41,3	$1,23 \pm 0,053$	68,8	5,8
	опухоль	55,8	42,5	$1,68 \pm 0,010$	68,8	6,0
8	печень	57,2	41,3	$1,71 \pm 0,045$	68,7	5,8
	селезенка	58,9	39,4	$1,71 \pm 0,035$	68,7	6,0
	семенники	56,4	42,0	$1,66 \pm 0,017$	68,6	5,8
	опухоль	59,1	38,8	$1,93 \pm 0,017$	68,4	6,2
15	печень	59,3	39,6	$1,07 \pm 0,011$	68,8	5,8
	селезенка	56,7	41,8	$1,25 \pm 0,022$	68,7	6,0
	семенники	56,9	42,1	$1,01 \pm 0,018$	68,8	5,9
	опухоль	53,8	44,3	$1,35 \pm 0,025$	68,3	6,2

у 8-дневной опухоли по сравнению с 15-дневной эффект уменьшения содержания 5 МЦ и количества дефектных участков взаимно компенсируют друг друга по действию на T_m .

Таким образом, изменение характера метилирования генома и дефекты во вторичной структуре могут лежать в основе нарушения регуляции транскрипции генома и клеток в опухолях. Поэтому можно заключить, что рост некоторых опухолевых клеток сопровождается увеличением метилирования генома и изменением вторичной структуры ДНК, а так как, по-видимому, ДНК является мишенью при действии различных противоопухолевых препаратов [22], то можно предположить, что изучение нарушения первичной и вторичной структуры опухолевых ДНК может привести к более целенаправленному синтезу противоопухолевых препаратов.

Ереванский государственный университет,
кафедра молекулярной физики и биофизики,
ИТОХ АН АрмССР

Поступило 5.X 1979 г

**ԱՌՈՂՋ ԵՎ ՈՒՌՈՒՅՔԱԿԻՐ (ՍԱՐԿՈՄԱ 45) ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ
ՀՅՈՒՍՎԱՆՔՆԵՐԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ
ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ՈՒՌՈՒՅՔԻ ԱՃՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ**

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Պ. Պ. ՅԱՍԵՄ,
ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ, Զ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Հ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրված է ուռուցքի աճման ընթացքում ԴՆԹ-ի կառուցվածքում կատարվող հնարավոր փոփոխությունները: Հայտնաբերված են տարբերություններ առողջ և ուռուցքակիր առնետների հյուսվածքների ԴՆԹ-ների մեթիլացման աստիճանում և հալման կորերի տեսքում: Յուրյց է տրված, որ ուռուցքի աճման ընթացքում ավելանում է ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանը և ապակայունացված դեֆեկտային տեղամասերի (առնվազն մի քանի տասնյակ զույգ հիմքեր երկարությամբ) քանակը, հատկապես ուռուցքային հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ում:

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF DNA, SEPARATED
FROM TISSUES OF HEALTHY AND TUMOR-CARRYING RATS
(SARCOMA 45) IN THE PROCESS OF TUMOR-GROWING**

V. M. ASLANIAN, S. G. HARUTYUNIAN, P. P. YASEM,
Yu. S. BABAYAN, G. V. GHARIBIAN, G. M. STEPANIAN

The possible changes in structure of DNA in tumor-growing process are investigated. The differences in degree of methylation, in form of tumoral DNA melting curve and DNA tissues of healthy and tumorcarrying rats are found. It's shown, that in the process of tumor-growing the degree of methylation and the quantity of destabilized defective sections (with minimum extent of several tens base-pairs) in DNA and especially strongly in DNA, separated from tumoral tissues, increases.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т. Мол. биол., 11, 1065, 1977.
2. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т., Крот В. И. Мол. биол., 11, 555, 1977.
3. Бурцева И. Н. и др. Биохимия, 43, 11, 2082, 1978.
4. Ванюшин Б. Ф. и др. ДАН СССР, 147, 9581, 1962.
5. Ванюшин Б. Ф. Успехи совр. биол., 695, 169, 1968.
6. Васильев В. К. и др. ДАН СССР, 205, 721, 1972.
7. Жижина Г. П., Бобович С. Н. и др. ДАН СССР, 295, 3, 1977.
8. Жижина Г. П., Бобович С. Н. и др. ДАН СССР, 217, 3, 1974.
9. Кузьмина С. В., Стражевская И. Б. Биофизика, 15, 1133, 1970.
10. Миль Е., Завериев С. К. и др. ДАН СССР, 209, 217, 1973.
11. Строение ДНК и положение организмов в системе, 279, М., 1972.
12. Чачоян А. А. и др. Журн. эксп. и клин. мед., 17, 4, 1977.
13. Чанчанашивили З. Н. и др. Сб. Конформационные изменения биополимеров в растворах, Тбилиси, 1975.
14. Desai L. S. et al. Exptl. Cell. Res., 65, 260, 1971.
15. Ehrlich M., Ehrlich K., Mayo J. A. BBA, 395, 109, 1975.
16. Fiel L. S., Bardos T. J. et al. Cancer. Res., 25, 1244, 1965.
17. Kappler J. W. J. Cell. Physiol., 78, 33, 1971.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
19. Suslu P., Postescu P. Stud. Biophys., 35, 89, 1973.
20. Syemayer BBA, 224, 10, 1970.
21. Silber R. et al. BBA, 123, 633, 1965.
22. Swan P. F., Magee P. W. J. Biochem., 110, 39, 1968.
23. Vanyushin B. F., Tkatchyova S. G. et al. Nature, 225, 918, 1970.
24. Vanyushin B. F. et al. BBA, 29, 397, 1973.
25. Vanyushin B. F. et al. Clerotologia, 19, 130, 1973.
26. Vanyushin B. F., Masin A. L. et al. BBA, 299, 1979.
27. Webb S. J., Bater A. Phys. Med. Biol., 15, 271, 1970.

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА РАЗРЫВА БИСЛОЙНЫХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Л. Г. МИКАЕЛЯН, С. А. АДЖЯН

Систематически изучалась зависимость потенциала разрыва бислойных липидных мембран от структуры органического растворителя и соотношения холестерин/фосфолипид в липидном растворе, а также от ионной силы, рН и концентрации додецилсульфата натрия в водном растворе.

Введение Мюллером с соавт. [14] в практику мембранологии метода плоских бислойных липидных мембран (БЛМ) открыло широкие возможности для моделирования различных функций клеточных мембран. Более чем двадцатилетняя практика «реконструкционных» исследований с использованием БЛМ показала, что для успешной реконструкции существенное значение имеет подбор адекватной системы—белок-липидный матрикс. Сейчас уже ясно, что структура матрикса, включая растворитель, принципиально важна для успешного включения функционального белка в БЛМ. В связи с этим возникла необходимость более детального изучения физических и физико-химических параметров немодифицированных БЛМ с учетом их конституциональных особенностей и методов формирования.

Одним из важных физических параметров БЛМ является их устойчивость к различным воздействиям (тепловым, механическим, электрическим и др.). Проблема устойчивости БЛМ—это проблема устойчивости тонких пленок и дисперсных систем, теория и практика которой разработаны пока недостаточно. Для «реконструкционных» исследований особый интерес представляет устойчивость БЛМ к электрическому полю, поскольку клетки функционируют в условиях существования на мембране разности электрических потенциалов. Вместе с тем, изучение устойчивости БЛМ к электрическому полю является важным с точки зрения выяснения физической картины электрического пробоя биологических и модельных мембран.

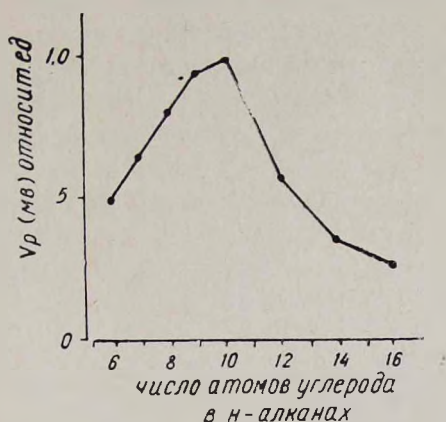
В связи с вышесказанным была поставлена задача систематически изучать зависимость потенциала разрыва (V_p) БЛМ от химического состава липидного и водного растворов.

Материал и методика. Материалом для БЛМ служили липиды мозга быка, выделенные по методу, описанному в работе Мюллера и др. [14], и яичный лецитин, выделенный по методу, описанному в работе Блая и Дайера [6]. БЛМ формировали на отверстии диаметром 1 мм в перегородке тефлонового стаканчика на границе двух

водных растворов. Напряжение на БЛМ подавали от генератора линейного напряжения с помощью хлорсеребряных электродов марки ЭВЛ-5. Разрыв БЛМ регистрировали на самописце марки ЭП-99 или осциллографе с памятью марки С8-11. Запуск генератора производили через 5—10 мин после полного почернения цветных мембран, процесс которого контролировали визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС-2. Во всех экспериментах скорость приложенного напряжения была равна 100 мВ/мин. Каждая точка на графиках представляет среднее значение V_p , полученных на 25—50 мембранах.

Результаты и обсуждение. Зависимость V_p БЛМ от химического состава липидного раствора. 1. Влияние структуры растворителя. Для выяснения роли структуры растворителя в устойчивости БЛМ к электрическому полю был выбран гомологический ряд *n*-алканов от гексана (C_6H_{14}) до гексадекана ($C_{16}H_{34}$). На рис. 1 представлены результаты

Рис. 1. Зависимость V_p БЛМ из общих липидов мозга от длины углеводородной цепи *n*-алканов. Водный раствор содержал 0,1 NaCl. Температура раствора 24—26°. За единицу принята величина V_p БЛМ в *n*-декане, равная $500,0 \pm 8$ мВ.



этих экспериментов, которые показывают, что с увеличением длины углеводородной цепи в ряду гексан-декан V_p БЛМ возрастает в 2 раза. Наклон кривой составляет приблизительно 65 мВ на одну метиленовую группу. Дальнейшее увеличение длины алифатической цепи в ряду декан—гексадекан приводит к уменьшению V_p БЛМ в 3 раза. Наклон кривой на этом участке в среднем также равен 65 мВ на одну метиленовую группу. Таким образом, из этих данных следует, что структура растворителя существенно влияет на устойчивость БЛМ к электрическому полю. Зависимость V_p БЛМ от длины углеводородной цепи *n*-алканов имеет максимум в *n*-декане.

Влияние структуры *n*-алканов на свойства БЛМ изучено в ряде работ [5, 9]. Показано, что толщина БЛМ из глицеринмоноолеата, рассчитанная по данным измерений специфической геометрической емкости (C_m), незначительно изменяется в ряду гексан-декан, но линейно уменьшается в ряду декан—гексадекан. Аналогичным образом изменяется парциальный объем растворителя в бислое. Таким образом, наблюдаемое в наших экспериментах уменьшение V_p БЛМ на участке декан—гексадекан хорошо согласуется с уменьшением толщины БЛМ на этом участке. Отсутствие корреляции на участке гексан—декан, по-видимому, связано со следующим. Под влиянием электричес-

кого поля происходит электросжатие БЛМ, вследствие чего растворитель перераспределяется между бислоем, липидным тором и водным раствором. При кратковременном действии малых напряжений порядка 10—50 мв, используемых при определенных C_m , электросжатие БЛМ мало и изменение его толщины будет незначительным. В случае же линейного роста электрического напряжения на БЛМ вплоть до разрыва электросжатие мембраны максимально, и ее толщина будет зависеть от свойств растворителя, в частности, его растворимости в воде. Так как толщина БЛМ на участке гексан—декан постоянна, а парциальные объемы этих растворителей в мембране одинаковы [5], то при сильном электросжатии мембраны изменение ее толщины будет зависеть от количества вышедшего из бислоя растворителя, определяемого его растворимостью в воде. По данным Франкса [10], растворимость *n*-алканов в воде линейно уменьшается в ряду гексан—декан, а затем вновь увеличивается в ряду декан—гексадекан. Исходя из этого, можно предположить, что в момент разрыва толщина БЛМ, содержащей гексан, меньше, чем толщина БЛМ, содержащей декан. Альтернативное объяснение заключается в том, что если разрыв БЛМ происходит при определенной критической толщине, то время достижения этой толщины при постоянной скорости линейного напряжения будет больше для тех мембран, которые содержат менее растворимый в воде растворитель, т. е. разрыв БЛМ будет происходить при более высоких значениях потенциала.

2. *Влияние холестерина.* Холестерин является одним из мажорных компонентов липидной фракции многих биомембран. В структурном отношении холестерин обеспечивает необходимую жидкость липидного матрикса мембраны, оптимизируя условия конформационных перестроек мембранных белков. Иными словами, физиологические концентрации этого стероида в биомембранах поддерживают ее жидкокристаллическую структуру, противодействуя факторам, нарушающим ее. В связи с этим мы изучали зависимость V_p БЛМ от соотношения холе-

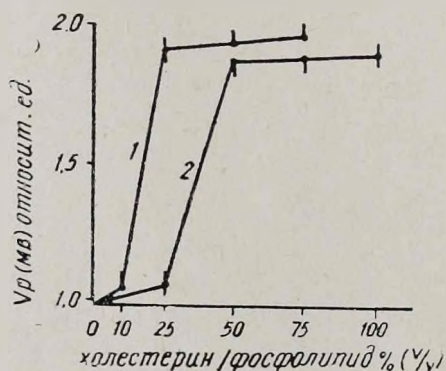


Рис. 2. Зависимость V_p БЛМ от соотношения холестерин/фосфолипид в липидных растворах. 1—общие липиды мозга, 2—яичный лецитин. Величины V_p БЛМ из соответствующих растворов липидов в *n*-гептане в отсутствие холестерина были равны $235,0 \pm 10$ и $115,0 \pm 8,0$ мв и приняты за единицу. Водный раствор содержит 0,1 М NaCl. Температура 22°.

стерин/фосфолипид в липидном растворе в пределах 0/1—1/1 по объему. Результаты экспериментов представлены на рис. 2. Видно, что с увели-

чением соотношения холестерин/фосфолипид в липидных растворах V_p БЛМ резко возрастает в определенных пределах соотношений и затем не изменяется при дальнейшем повышении концентрации холестерина. Кривые 1 и 2 качественно идентичны, однако для БЛМ, сформированных из яичного лецитина, максимум V_p смещен в область более высоких концентраций холестерина. Нами обнаружено также, что при соотношениях холестерин/фосфолипид больше 75% для общих липидов мозга и 100% для яичного лецитина мембраны не чернели и были неустойчивы из-за сильного увеличения вязкости липидных растворов. Полученные кривые характерны для кооперативных процессов. Существование областей насыщения для V_p хорошо коррелирует с данными по замедлению роста количества холестерина в БЛМ по мере увеличения соотношения холестерин/фосфолипид в липидных растворах [7]. По-видимому, существует критическая концентрация холестерина в БЛМ (причем количественно различная для БЛМ из разных липидов), при которой происходит кооперативная перестройка ее структуры, возможно, по типу фазового перехода. Сдвиг максимума БЛМ из яичного лецитина, вероятно, связан с тем, что в эквимольных смесях фосфолипидов холестерин предпочтительно связывается с фосфатидхолинами [13]. С этой точки зрения холестеринсвязывающая «емкость» лецитиновых бислоев будет больше, чем емкость бислоев из общих липидов мозга.

Влияние холестерина на физические свойства БЛМ изучено в ряде работ [8, 11, 12, 15]. Голдап и др. [12] показали, что повышение концентрации холестерина в бислое увеличивает их устойчивость. Ханай и др. [11] обнаружили, что емкость лецитиновых БЛМ увеличивается с увеличением количества холестерина в липидном растворе. На том же объекте Шерри и др. показали, что введение холестерина в БЛМ не изменяет ее толщины [8]. В согласии с Ханай и др., но в противоречии с Оки [15], Шерри с соавт. заключили, что увеличение емкости БЛМ при введении холестерина обусловлено увеличением диэлектрической постоянной мембраны. Независимо от того, какой из этих параметров БЛМ в действительности изменяется при увеличении количества холестерина, направление их изменения будет увеличивать величину V_p БЛМ, что и наблюдается в наших экспериментах [8].

Зависимость V_p БЛМ от химического состава водного раствора.
1. Влияние ионной силы и pH. При электрохимических исследованиях на мембранах ионная сила и pH являются наиболее часто варьируемыми параметрами водного раствора. Изменение этих параметров приводит к изменению поверхностного заряда на мембране. Поэтому изучение зависимости V_p БЛМ от ионной силы и pH может дать важную информацию о роли поверхностного заряда БЛМ в их устойчивости к электрическому полю. Как видно из рис. 3, величина V_p БЛМ обратно пропорциональна логарифму концентраций KCl и NaCl в водном растворе. При низких концентрациях солей в величинах V_p БЛМ нет разницы. Из рис. 3 видно также, что двухвалентные ионы кальция на 2—3 порядка эффективнее уменьшают V_p БЛМ.

Поверхностный заряд БЛМ обусловлен диссоциацией полярных групп молекул липидов (фосфатные, карбоксильные и аминогруппы). По данным электрофоретической подвижности, БЛМ из общих липидов мозга несут отрицательный заряд [2]. При введении в водный раствор ионов металлов, последние адсорбируются на поверхности БЛМ, снижая заряд на мембране. Помимо физической адсорбции, ко-

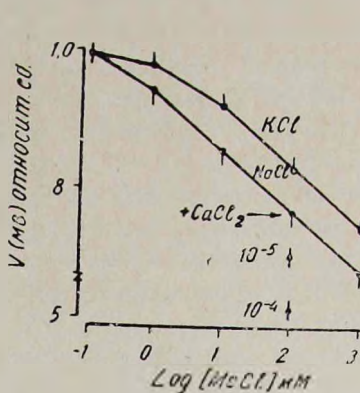


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость V_p БЛМ из общих липидов мозга в *n*-декане от концентрации KCl, NaCl и CaCl_2 в водном растворе. За единицу принята величина V_p БЛМ в дистиллированной воде, равная $320,0 \pm 11,0$ мВ.

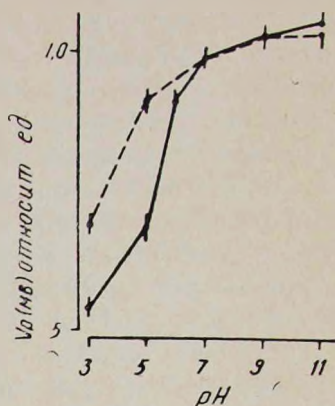


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость V_p БЛМ от pH водного раствора. Пунктирная линия—БЛМ из общих липидов мозга, сплошная линия—БЛМ из яичного лецитина в *n*-декане. За единицу принята величина V_p БЛМ из общих липидов мозга при pH 7, равная $375,0 \pm 7,0$ мВ. pH раствора изменяли добавлением HCl и NaOH.

торая имеет место в присутствии одновалентных катионов, поливалентные катионы (например Ca^{+2}) вступают также в химические соединения с диссоциированными группами липидов, эффективнее снижая поверхностный заряд БЛМ [4]. Этим, по-видимому, и объясняется большая эффективность ионов кальция, обнаруженная в наших экспериментах.

Согласно Берестовскому [3], поверхностный заряд БЛМ монотонно растет при повышении pH водного раствора, причем основной прирост заряда происходит в области pH 3–5. Как видно из рис. 4, V_p БЛМ с увеличением pH сильно возрастают в области pH 3–6, а затем их рост замедляется. Причем V_p БЛМ из яичного лецитина с ростом pH увеличивается значительно больше, чем V_p БЛМ из общих липидов мозга. Полученные данные указывают на важную роль поверхностного заряда БЛМ в устойчивости последних к электрическому полю.

Зависимость V_p БЛМ от величины поверхностного заряда на мембране, вероятно, не является прямой, а связана с изменением толщины БЛМ. В пользу такого предположения говорят данные Уайта [16], согласно которым повышение ионной силы водного раствора приводит

ло к увеличению специфической геометрической емкости БЛМ, т. е. к уменьшению толщины гидрофобной области мембраны.

2. Влияние NaDS. Липофильные поверхностно-активные вещества типа NaDS (додецилсульфат натрия) могут эффективно встраиваться в структуру БЛМ из водного раствора и заметно модифицировать ее структуру. Показано, что в присутствии NaDS в водном растворе увеличивается интегральная проводимость БЛМ, обусловленная возникновением в структуре мембраны каналов проводимости [1].

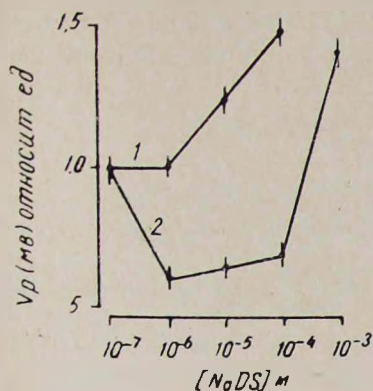


Рис. 5. Зависимость V_p БЛМ от концентрации NaDS в водном растворе, 1—на фоне 0,1 М NaCl, 2—в дистиллированной воде. За единицу принята величина V_p БЛМ в дистиллированной воде, равная $300,0 \pm 9,5$ мВ. БЛМ сформирована из общих липидов мозга в н-декане. Температура водного раствора 24° .

Как видно из рис. 5, характер влияния NaDS на устойчивость БЛМ к электрическому полю существенно зависит от ионной силы водного раствора. В присутствии 0,1 М NaCl V_p линейно возрастает с повышением концентрации NaDS в пределах 10^{-6} -- 10^{-4} М. В дистиллированной воде низкие концентрации NaDS уменьшают величину V_p БЛМ, которая практически не изменяется с концентрацией детергента до значения 10^{-4} М, но резко возрастает при концентрации 10^{-3} М. Увеличение БЛМ в растворе с высокой ионной силой (0,1 М NaCl) можно объяснить увеличением поверхностного заряда мембраны по мере включения аниона DS^- в ее структуру. Однако почему уменьшается V_p БЛМ при добавлении NaDS в дистиллированную воду объяснить трудно. По-видимому, существует оптимальная величина поверхностного заряда, при которой БЛМ наиболее устойчивы.

Результаты, полученные в настоящей работе, дают основание предположить, что толщина БЛМ и ее поверхностный заряд играют важную роль в ее устойчивости к электрическому полю.

Ереванский физический институт ГКНАЭ

Поступило 5.X 1979 г.

ՆԵՐՈՒՆԱԿԱՆ ԵՎ ՆԵՐՈՒՆԱԿԱՆ ԿԵՐԱՆՈՒՄԻ ՊԵՐՄԵԱԲԻԼԻՏԵՏ

Լ. Գ. ՄԻՔԱՅԷԼՅԱՆ, Ս. Ա. ԼՍԶՅԱՆ

Սինթետիկորեն ստանալիս կազմակերպվել է երկշերտ լիպիդային մեմբրանների խզման պոտենցիալի կախվածությունը օրգանական լուծիչի կառուցվածքից և լիպիդային լուծույթում խոլեստերին ֆոսֆոլիպիդ հարաբերությունից ինչ-

որես նաև՝ ջրային լուծույթի իոնական ուժից, pH-ից և նատրիումի դոզեցիայից, սուլֆատի խտությունից:

STUDY OF BREAKDOWN VOLTAGE OF BILAYER LIPID MEMBRANES

L. G. MIKAELIAN, S. H. HADGIAN

The dependence of breakdown voltage of bilayer lipid membrane on structure of solvent, cholesterol/phospholipid ratio in lipid-forming solution, as well as on the ionic strength, pH and sodium dodecylsulfate in water solution has been studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ксёнжик О. С., Омельченко А. М., Коганов М. М. ДАН СССР, 218, 219, 1974.
2. Ненашев В. А., Шилов Ю. В. Биология и научно-технический прогресс. Пушчинские материалы конф., 209, 1974.
3. Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Физико-химические свойства бимолекулярных липидных мембран, № 1888-76. Деп., Пушкино, 1976.
4. Bangham A. D., Papahadjopoulos D. Biochem. et biophys. Acta, 126, 181, 1966.
5. Benz R., Fröhlich O., Läuger P., Montal M. Biochem. et biophys. Acta, 394, 1975.
6. Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911, 1959.
7. Bue A. C., Hider R. C. Biochem. et biophys. Acta, 363, 423, 1974.
8. Cherry R. J., Graham D. E., Chapman D. Chem. Phys. Lipids, 6, 125, 1971.
9. Fettiplace R., Andrews D. M., Haydon D. A. J. Membr. biol., 5, 277, 1971.
10. Franks F. Nature, № 5031, 87, 1966.
11. Hanai T., Haydon D. A., Taylor J. J. Theor. Biol., 9, 422, 1965.
12. Goldup A., Ohki S., Danielly J. F. Recent Progr. in Surface Sci., 3, 193, 1970.
13. De Kruijff B., Van Dijck P. W. M., Demel R. A., Schuijffe A., Brants F., Vliegenhart J. F. M., Deenen L. L. M. Biochem. et biophys. Acta, 356, 1, 1974.
14. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C. Nature, 194, 979, 1962.
15. Ohki S. Biophys. J., 9, 1195, 1969.
16. White S. H. Biochem. et biophys. Acta, 323, 343, 1973.

ВЛИЯНИЕ КРАСИТЕЛЯ ГРЮН ТЕСТА НА ВЕЛИЧИНУ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ КОРЕШКОВ И КОЛЕОПТИЛЕЙ КУКУРУЗЫ И ПШЕНИЦЫ

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

Исследовали влияние различных концентраций красителя грюн теста на распределение величин мембранного потенциала по разным зонам корешков и coleoptiles кукурузы и пшеницы. Показано, что при использовании 10^{-4} %-ного раствора грюн теста ΔE больше в меристематических зонах корешков и coleoptiles. Высказывается предположение, что краситель может явиться индикатором функционального состояния клеток высших растений.

Ранее [1] было показано, что клетки корешков и coleoptiles кукурузы и пшеницы по-разному реагируют на присутствие в перфузате высоких или низких концентраций красителей трифенилметанового ряда; высокие концентрации деполяризуют, а низкие—гиперполяризуют мембрану клеток.

Исследованиями [2—4] установлено, что наиболее активно метаболизируют клетки первой (считая с кончика) зоны корешков, которые, как известно, характеризуются недифференцированностью структур, отсутствием четко выраженного ядра (хотя ядерный материал в клетках имеется) и вакуолей. Клетки последующих зон более специализированы, в них появляются оформленные ядра и вакуоли.

Можно предположить, что наряду с изменением функционального состояния клеток различных зон, происходит определенная перестройка мембранных структур, которая выражается, по-видимому, в изменении электрохимических свойств. Подобная перестройка может зависеть также от синтеза липопротеидов во время роста корня, входящих в состав протоплазматических и эндоплазматических мембран.

Целью настоящих исследований было выяснение взаимодействия красителя грюн теста с мембранами клеток различных зон корешков и coleoptiles кукурузы и пшеницы.

Материал и методика. Методы получения трехдневных проростков кукурузы и пшеницы и регистрации мембранного потенциала (МП) описаны ранее [5]. Использовали 10^{-2} и 10^{-4} %-ные растворы красителя грюн теста (ГТ, фирма Sigma), которые готовили на 1 мМ KCl.

Сначала регистрировали контрольные значения МП в 1 мМ KCl, затем этот раствор заменяли раствором соответствующей концентрации красителя и МП измеряли в течение 3—5 мин. Эффект влияния красителя выражали в ΔE (разница между

экспериментальными и контрольными величинами МП). В каждой точке проводили в среднем 25 измерений.

Корень очень удобный объект для изучения закономерностей роста клеток у высших растений, так как зоны деления и растяжения клеток пространственно разделены. Согласно Эсау [6], схема расположения зон роста в растущей части корня следующая: А—зона деления, Б—зона растяжения, В—зона корневых волосков. В свою очередь зона Б делится на две подзоны, а зона В—на три. Таким образом, исходя из приведенной схемы, в эксперименте корешок делили приблизительно на шесть равных зон и МП отводили от середины каждого участка.

Разграничение колеоптилей на зоны затрудняется тем обстоятельством, что в них деление происходит одновременно с растяжением [7].

В эксперименте колеоптиль также делили на шесть частей, не выделяя конкретно зоны, и МП отводили от середины каждого участка.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов исследовали влияние 10^{-4} %-ного раствора ГТ на распределение величин МП по различным зонам колеоптиля пшеницы. Наименьшая разница в величинах ΔE наблюдается в первых двух зонах (считая от кончика), наибольшая—в последующих зонах (рис. 1А).

При исследовании влияния 10^{-2} %-ного раствора ГТ на распределение МП по зонам колеоптиля выяснилось, что разницы в величинах ΔE по всем исследованным зонам нет (рис. 1, Б).

Во второй серии экспериментов исследовали влияние вышеуказанных концентраций красителя на распределение величин МП в различных зонах корешка кукурузы. Данные рис. 2, А показывают, что при исследовании 10^{-4} %-ного ГТ наибольшей чувствительностью к красителю отличаются клетки первой зоны и наименьшей—клетки последующих зон. При регистрации МП в присутствии 10^{-2} %-ного раствора ГТ (рис. 2, Б), как и в случае с колеоптилями пшеницы, разницы в величинах ΔE по различным зонам не наблюдалось.

Необходимо отметить, что контрольные значения МП каждого участка по всей длине колеоптиля или корешка практически не отличаются друг от друга. Разница появляется при использовании различных концентраций красителя.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод, что разница в величинах ΔE по всем исследованным зонам колеоптиля и корешка пшеницы и кукурузы обусловлена присутствием в перфузате 10^{-4} %-ного раствора красителя.

Выше было отмечено, что в отличие от корешка у колеоптиля трудно разграничить зоны деления и растяжения клеток. Опыты, проведенные на колеоптилях, показали, что при регистрации МП по всей длине колеоптиля выявляются группы клеток, обладающих различной чувствительностью к красителю.

Ранее было показано [8], что обработка семян кукурузы и пшеницы высокими и низкими (10^{-2} —и 10^{-4} %-ными соответственно) концентрациями растворов красителя ГТ приводит к изменению электрохимических свойств плазматических мембран. Это изменение проявляется в том, что клетки корешков или колеоптилей, выросшие из се-

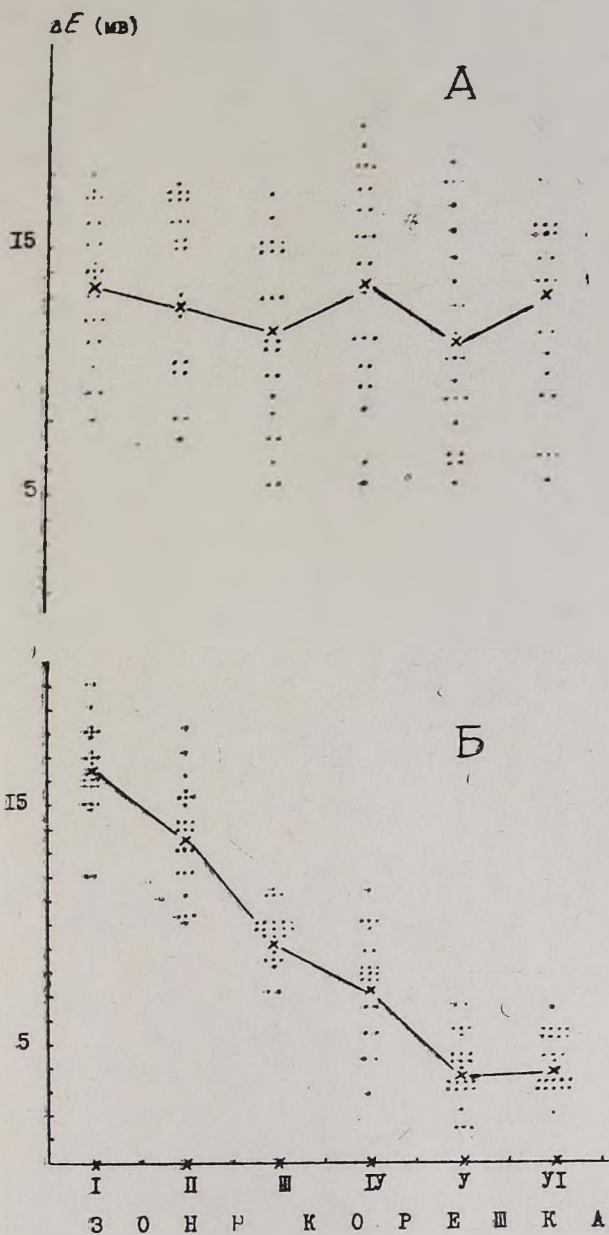


Рис. 1. Распределение величин ΔE по зонам корешка кукурузы. (Здесь и далее). А—в присутствии 10⁻²%-ного раствора ГТ; Б—в присутствии 10⁻⁴%-ного раствора ГТ.

мян, обработанных высокой концентрацией, генерируют МП, величина которого на 15—20 мв ниже контрольных значений для необработанных семян; а при обработке низкими концентрациями генерируется потенциал, величина которого на 12—18 мв выше контрольных значений.

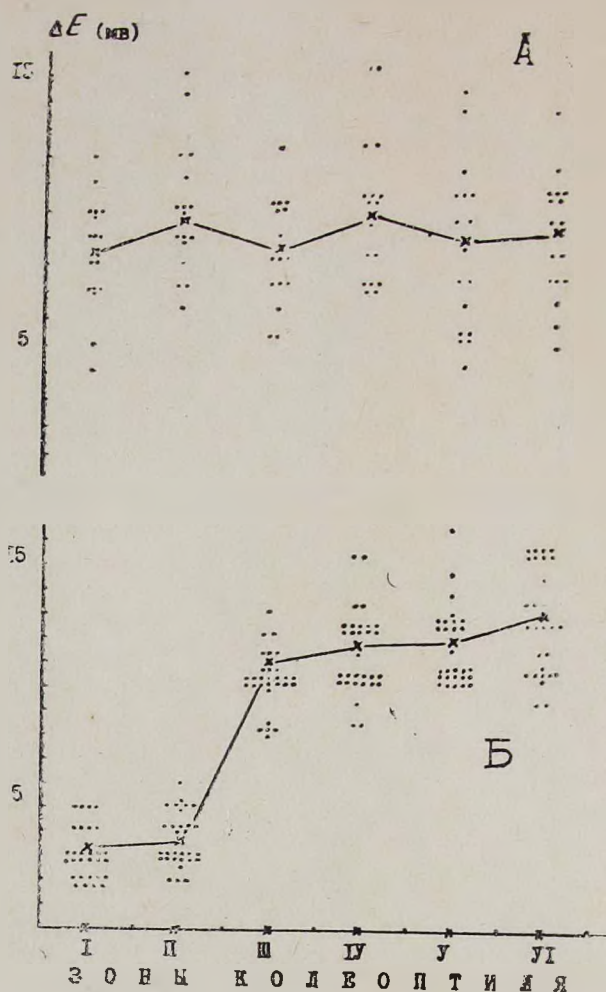


Рис. 2. Распределение величин ΔE по зонам колеоптиля пшеницы.

Представляло определенный интерес исследование влияния обработки семян на распределение величин мембранного потенциала в различных зонах корешков кукурузы.

Семена кукурузы обрабатывали высокими (10^{-2} %-ный) и низкими (10^{-4} %-ный) концентрациями красителя ГТ и регистрировали МП в присутствии 10^{-2} - и 10^{-4} %-ных растворов ГТ. Результаты эксперимента, приведенные на рис. 3, А, показывают, что обработка высокой концентрацией ГТ не влияет на распределение величин ΔE по зонам корешка при регистрации МП в присутствии 10^{-4} %-ного раствора кра-

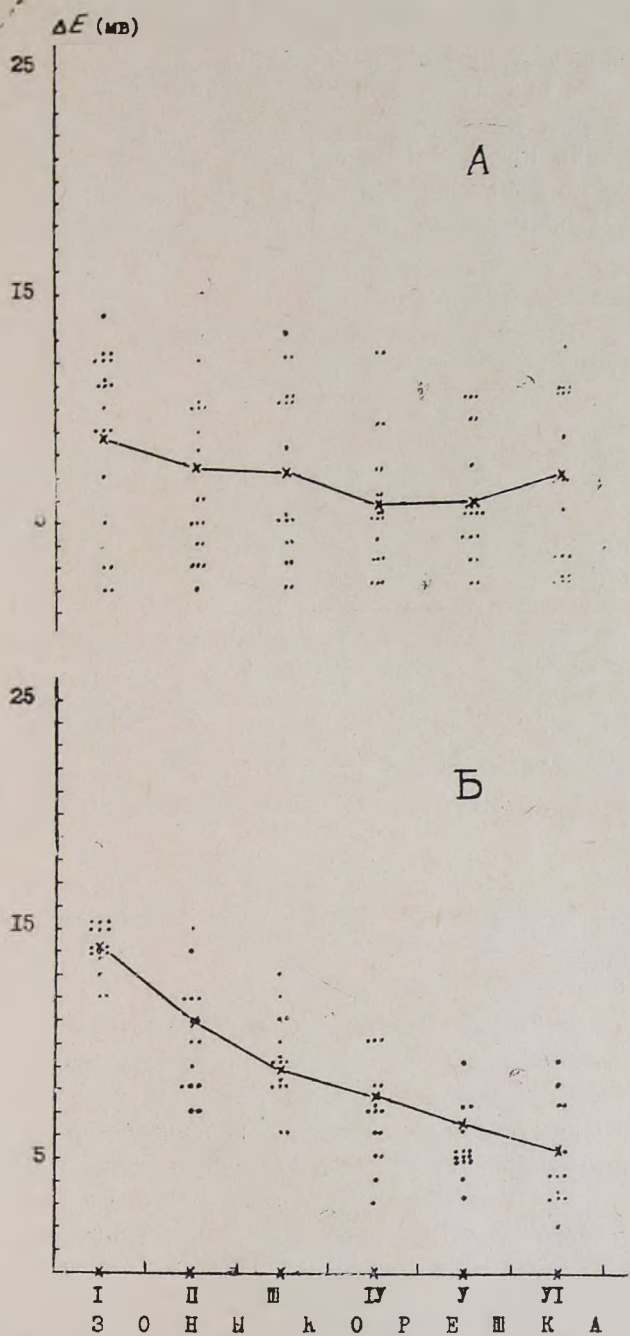


Рис. 3. Распределение величин ΔE по зонам корешка кукурузы, выросшей из семян, обработанных 10-2%-ным раствором ИТ.

сителя. При регистрации МП в присутствии 10^{-2} %-ного раствора ГТ не наблюдается разницы в величинах ΔE по всем исследованным зонам (рис. 3, Б).

При обработке низкой (10^{-4} %-ной) концентрацией ГТ и измерении МП в присутствии 10^{-2} и 10^{-4} %-ных растворов красителя наблюдается следующая картина. В присутствии 10^{-2} %-ного раствора ГТ, как показано на рис. 4, А, разницы в величинах ΔE по зонам корешка нет, а в присутствии 10^{-4} %-ного раствора ГТ наблюдается резко выраженная разница по всем зонам (рис. 4, Б). Необходимо отметить, что аналогичная закономерность получена в экспериментах с колеоптилями кукурузы.

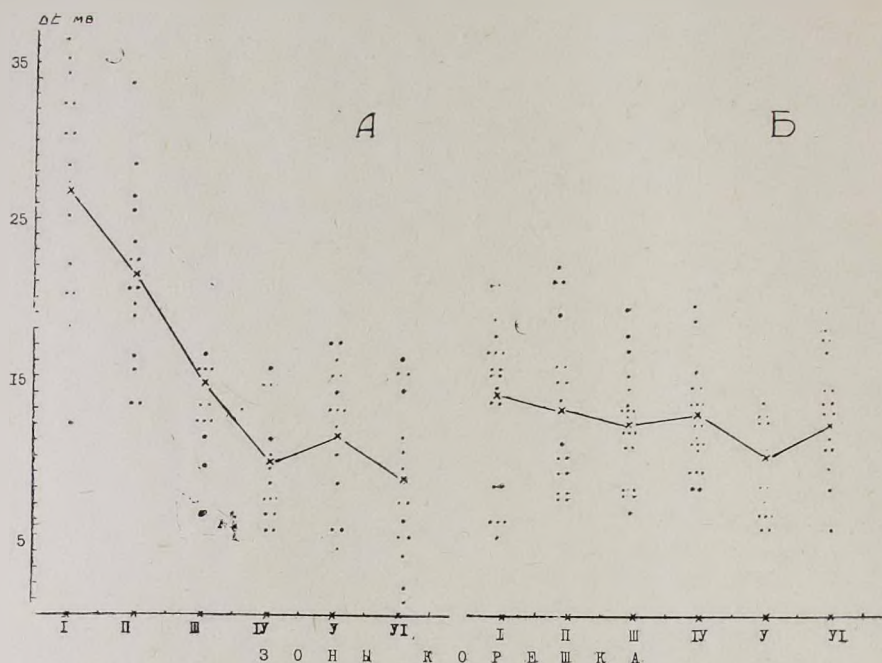


Рис. 4. Распределение величин ΔE по зонам корешка кукурузы, выросшей из семян, обработанных 10^{-4} %-ным раствором ГТ.

При обработке семян 10^{-4} %-ным раствором красителя разброс в величинах ΔE по всем исследованным зонам очень большой (рис. 4, Б), а при регистрации МП необработанных корешков в присутствии 10^{-4} %-ного раствора ГТ разброс ΔE по зонам сравнительно меньше. Можно предположить, что обработка 10^{-4} %-ным раствором красителя приводит к дестабилизации мембранных структур, увеличивает чувствительность плазматических мембран по отношению к красителю.

Следовательно, обработка семян разными концентрациями красителя никоим образом не влияет на характер распределения величин ΔE по всем исследованным зонам корешков или колеоптилей. Характер распределения зависит только от присутствия в перфузате определенной концентрации (10^{-4} %-ный) красителя.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 13.VI 1979 г.

ԳՐՅՈՒՆ ՏԵՍՏ ՆԵՐԿԻ ԱԶԴԵՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵԳԻՊՏԱՅՈՐԵՆԻ
ԵՎ ՅՈՐԵՆԻ ԱՐՄԱՏՆԵՐԻ ՈՒ ԿՈԼԵՈՊՏԻԼՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐԻ
ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ՄԵԾՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Հ. Տ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Գ. Ն. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Գ. Ա. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Հետադոտվել է գրյուն տեստ (ԳՏ) ներկի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը եղիպտացորենի և ցորենի արմատների և կոլեոպտիլների տարբեր հատվածներում մեմբրանային պոտենցիալի մեծության բաշխման վրա: Յույց է տրված, որ ԳՏ-ի 10^{-4} %-անոց լուծույթի ազդեցության տակ ΔE -ն (մեմբրանային պոտենցիալի փորձնական և ստուգիչ մեծությունների միջև եղած տարբերությունը) մեծ է արմատների և կոլեոպտիլների մերիստեմատիկ հյուսվածքի հատվածներում: Ենթադրվում է, որ ներկը կարող է հանդիսանալ բարձրակարգ բույսերի բջիջների ֆունկցիոնալ վիճակի ինդիկատոր:

THE INFLUENCE OF TREEFENYLAMINE DYES ON THE MEMBRANE
POTENTIAL LEVEL IN CELLS OF DIFFERENT ZONES OF ROOT
AND COLEOPTILES OF CORN AND WHEAT

G. T. KASARYAN, G. N. KHATCHATRYAN, G. A. PANOSYAN

The influence of various concentrations of dye GT on E distribution in different zones of roots and coleoptiles of corn and wheat have been investigated. It has been shown that under the use of 10^{-4} % GT solution ΔE (the difference between the experimental and control values of membrane potential) is greater in the meristematic zones. It has been suggested that the dye may indicate the cell functional state of higher plant.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Казарян Г. Т., Паносян Г. А., Хачатрян Г. Н. Биолог. науки, 37, 5, 1978.
2. Казарян Г. Т., Хачатрян Г. Н., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 30, 12, 49, 1977.
3. Казарян Г. Т., Хачатрян Г. Н., Паносян Г. А. Физиология растений, 25, вып. 6, 1158, 1978.
4. Обручева Н. В. Физиология растущих клеток корня. М., 1965.
5. Esau K. Plant anatomy. Chapman and Hall press. N. York—London, 1953.
6. Koller D., Tayer A., Kopp M. Annual review of plant phys, 13, 437, 1962.
7. Yensen W. A. Experimental cell research, 25, 12, 575, 1973.
8. Wright S. F. J. of experimental botany, 12, 35, 303, 1961.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЛКИЛИРУЮЩЕГО КАНЦЕРОЛИТИКА НА НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДНК ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС

В. М. АСЛАНЯН, А. А. АХРЕМ, П. П. ЯСЕМ, Ю. С. БАБАЯН, Д. Ю. ЛАНДО,
 С. Г. АРУТЮНЯН, Дж. В. ГАРИБЯН, Г. М. СТЕПАНЯН

Исследовалось влияние противоопухолевого алкилирующего препарата из группы диэтиленимидов алкоксибензил пиримидин амидофосфорных кислот на уровень метилирования и профиль кривых плавления ДНК из тканей здоровых, опухоленосящих животных и из опухоли. Обнаружены различия в степени метилирования и форме кривых плавления ДНК опухоли и тканей здоровых и опухоленосящих животных. Показано, что канцеролитик, не нарушая спиральной структуры ДНК здоровых животных, оказывает дестабилизирующее влияние на ДНК опухоленосящих животных и опухоли. Обнаружено понижение уровня метилирования опухолевой ДНК и ДНК из тканей опухоленосящих животных в процессе воздействия канцеролитика.

Сравнительное изучение нормальных и опухолевых клеток имеет исключительно важное значение для понимания природы злокачественного роста и механизма его подавления противоопухолевыми соединениями. Большой интерес представляют различия в структуре ДНК опухолевых и нормальных клеток, а также ее изменения под действием различных канцеролитиков.

В связи с этим в настоящей работе рассматривается действие *in vivo* активного канцеролитика, синтезированного в ИТОХ АН АрмССР из группы диэтиленимидов алкоксибензил пиримидин амидофосфорных кислот [3], на ДНК из семенников, селезенки и печени здоровых крыс, из тканей опухоленосящих крыс и опухолевой ткани. Соединения этого типа могут ковалентно сшивать нити ДНК, причем количество повреждений коррелирует со степенью метилирования [5].

Материал и методика. Для изучения влияния активного канцеролитика на содержание 5-метилцитозина (5МЦ) в ДНК печени, селезенки, семенников и опухолевой ткани в процессе опухолевого роста использовались здоровые и с трансплантированной саркомой 45 белые беспородные крысы массой 100—120 г. Тридцати здоровым крысам ежедневно внутривенно вводили активный канцеролитик в оптимальной терапевтической дозе 60 мг/кг, в виде суспензии, приготовленной *ex tempore* на 0,5-процентном растворе карбоксиметилцеллюлозы. Через сутки после четырех инъекций 15 животных забивали декапитацией. Вторую группу животных (15 крыс) забивали через сутки после восьми инъекций. Одновременно в те же сроки забивали контрольных животных, не получивших препарат. Извлеченные после забоя животных органы и ткани замораживали и выделяли ДНК [8]. Белок определяли по методу Лоури [6], а РНК—спектрофотометрически [4]. Количество белка и РНК препаратов не

превышало 0,5%. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5 МЦ, препараты высушивали при 105° и гидролизовали до оснований. Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге. Разделенные основания определяли спектрофотометрически [12]. На 5-е сутки после трансплантации саркомы 45 животных разделяли на подопытную и контрольную группы. Подопытным крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили активный канцеролитик в дозе 60 мг/кг и забивали декапитацией, первую группу после 4-х, а вторую группу после 8-ми инъекций. Контрольные животные за этот период лечения не получали. Из извлеченных после забоя животных органов и тканей выделяли ДНК описанным методом.

Плавление ДНК проводили в буфере 0,1 SSC (1SSC=0,15 М NaCl+0,015 М цитрат натрия, pH 7,3). Ионная сила $[Na^+] = 0,0195$. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP-8000 с плотно закрывающимися 1-сантиметровыми кварцевыми кюветами при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25°/мин. Точность определения температуры: 0,05°. Гиперхромность для всех препаратов ДНК составляла 36—37%, что характерно для нативных ДНК.

Кривые плавления каждого образца снимались 5—7 раз. Из каждой кривой вычислялись нужные характеристики ДНК, которые потом усреднялись. Поскольку на кривых плавления структурные особенности ДНК проявляются слабо, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Во избежание случайных ошибок исходная кривая плавления нормировалась и несколько раз сглаживалась многократном третьем порядке, проведенным через пять точек наименьших квадратов. При этом нас интересовал общий характер ДКП (начало плавления, место нахождения плеч и пиков).

Результаты и обсуждение. Сравнительное изучение ДНК из тканей здоровых, опухолепоясших животных и из опухолевой ткани показывает, что по нуклеотидному составу они не отличаются и соответствуют правилам Чаргаффа. Различие между ДНК здоровых и опухолепоясших животных обнаруживается по содержанию 5 МЦ. В ДНК из тканей всех исследованных органов опухолепоясших животных и самой опухоли уровень метилирования на 5-е и 8-е сутки после перевивки саркомы 45 значительно повышен (таблица). Однако через 15 суток после перевивки содержание 5 МЦ в ДНК из тканей опухолепоясших животных снижается до исходного уровня. В ДНК опухоли оно также существенно ниже, чем на 5-е и 8-е сутки, но все же выше исходного уровня.

Кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных и опухолевой ткани заметно различаются. Особенно характерным является появление плеча в низкотемпературной части кривой плавления опухолевой ДНК (рис. 3). Различия в кривых плавления ДНК из тканей опухолепоясших животных и здоровых менее значительны.

При введении канцеролитика здоровым животным наблюдается увеличение степени метилирования ДНК в органах по сравнению с ДНК из тканей животных, не подвергавшихся химиотерапевтическому воздействию. На кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных канцеролитик существенного влияния не оказывает (рис. 1).

В отличие от ДНК из тканей здоровых животных у опухолепоясших животных происходит понижение уровня метилирования при введении канцеролитика (таблица), что, по всей вероятности, объясняется разной CH_3 -акцепторной способностью ДНК из разных органов при метилиро-

Временная зависимость процентного содержания 5 МЦ в ДНК различных органов и опухолей животных, получивших и не получивших алкилирующий противоопухолевый препарат

Время после перививки опухоли (С-45)	Здоровые животные, получившие препарат	Опухолоносущие животные, не получившие препарат	Опухолоносущие животные, получившие препарат
Печень			
5	—	1,39	—
8	1,22	1,71	1,27
15	1,29	1,07	0,83
Селезенка			
5	—	1,60	—
8	1,27	1,71	1,02
15	1,46	1,25	1,11
Семенники			
5	—	1,23	—
8	1,18	1,66	1,53
15	1,33	1,01	0,88
Опухоль			
5	—	1,68	—
8	—	1,93	1,10
15	—	1,35	0,98

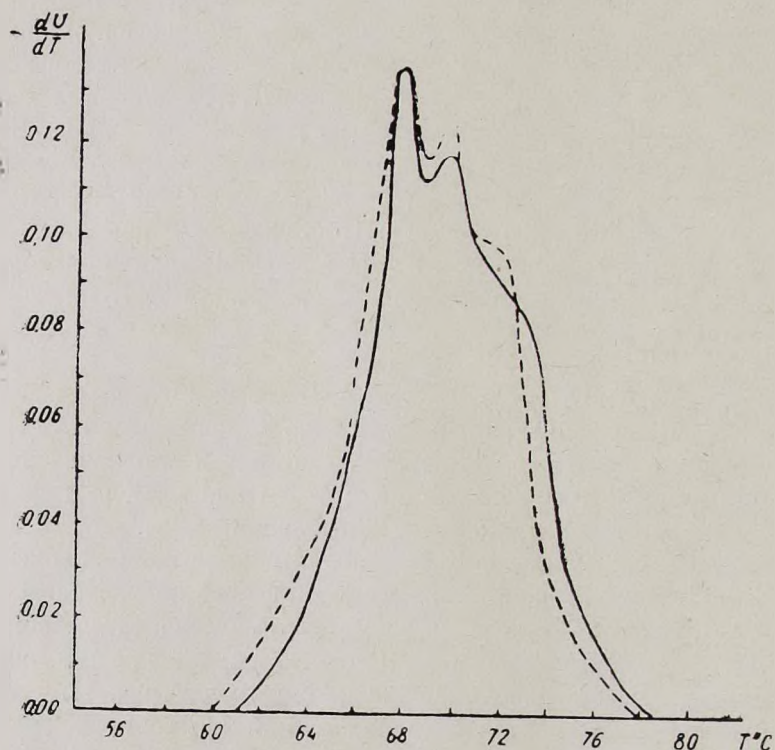


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов здоровых животных (—) и здоровых животных, получивших канцеролитик (---). v —степень спиральности.

вании [9]. Причем в ДНК из печени, селезенки и опухоли на 8-е сутки уровень метилирования почти приближается к норме. Выше нормы он в семенниках, хотя и здесь значительно понижен (таблица). Таким образом, после нескольких инъекций активного канцеролитика наступает обратимое изменение метилирования генома (содержание 5 МЦ в изученных органах приближается к норме), что, по-видимому, происходит путем энзиматического деметилирования (активацией деметилаз под действием алкилирующего препарата).

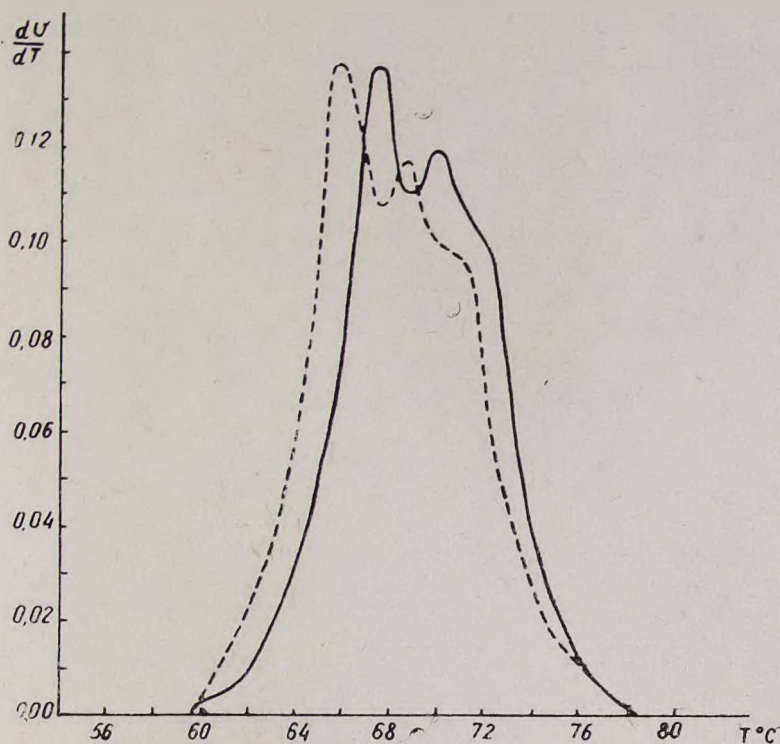


Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов больных животных, получивших (—) и не получивших (----) канцеролитик. U —степень спиральности.

Сильное влияние оказывает канцеролитик на кривую плавления опухолевой ДНК. Во-первых, исчезает характерное для нее низкотемпературное плечо, и кривая плавления принимает форму, свойственную ДНК из интактных тканей; во-вторых, происходит смещение всей кривой в область низких температур (рис. 3). Аналогичная картина отмечается в ДНК из тканей опухоленосящих животных (рис. 2). Еще раз отметим, что подобного смещения кривых плавления ДНК у здоровых животных не наблюдается (рис. 1).

Таким образом, полученные данные показывают, что канцеролитик, не влияя на термостабильность ДНК здоровых животных, оказывает дестабилизирующее воздействие на ДНК из тканей опухоленосящих животных и опухоли.

На основании представленных данных можно предложить следующий механизм действия канцеролитика на ДНК опухолевых тканей.

В опухолевой ДНК имеются характерные для нее протяженные дестабилизированные участки (дефекты), при плавлении которых на кривой возникает низкотемпературное плечо (рис. 3). Эти участки имеют

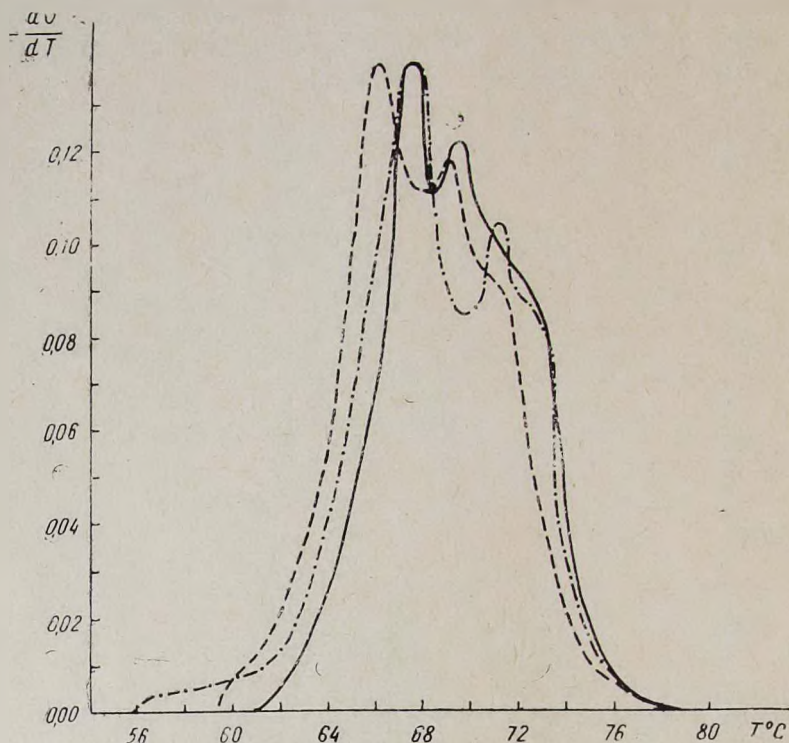


Рис. 3. Дифференциальные кривые плавления ДНК из тканей здоровых животных (---) и из опухоли животных, получивших (— · —) и не получивших (— · —) канцеролитик. v — степень спиральности.

длину как минимум в несколько десятков пар оснований. Такой вывод можно сделать на основании ранее полученных данных [1, 2], согласно которым более короткие участки с измененной структурой не могут обусловить появление плеча на дифференциальной кривой плавления. Известно также, что алкилирующие препараты разрывают, а затем сшивают цепи макромолекул ДНК [7, 10]. Данные настоящей работы показывают, что рассматриваемый канцеролитик, видимо, разрывает цепи на дефектных участках опухолевой ДНК (по-видимому, 5 МЦ обогащенных), о чем свидетельствует исчезновение на кривой плавления плеча, характерного для опухолевой ДНК, и изменение количества 5 МЦ (таблица, рис. 3). После выпадения дефектных участков происходит сшивка, на месте которой, однако, структура ДНК нарушена, на что указывает смещение кривой плавления опухолевой ДНК в область низких температур и снижение температуры плавления на $0,5-1,0^\circ$, т. е.

при воздействии канцеролитика один вид дефектов (онкологических) заменяется другим (нарушение структуры ДНК на месте сшивки).

Отметим, что дефектные участки на месте сшивки в отличие от участков, характерных для опухолевых ДНК, имеют небольшую длину. Это следует из указанных выше работ [1, 2], в которых показано, что короткие участки (меньше нескольких десятков пар оснований) не проявляются на кривых плавления в виде отдельного пика или плеча, а вызывают равномерное смещение всей кривой. Как видно из рис. 3, именно этот эффект равномерного смещения кривой плавления опухолевой ДНК имеет место в присутствии канцеролитика.

Таким образом, можно предположить, что снижение уровня метилирования и частичное восстановление структурных характеристик (судя по ДКП) опухолевых ДНК под влиянием алкилирующего препарата могут быть обусловлены канцеролитической активностью препарата.

Ереванский государственный университет,
кафедра молекулярной физики и биофизики,
ИТОХ АН АрмССР, ИБОХ АН БССР

Поступило 5.X 1979 г.

**ԱԼԿԻԼԱՅՆՈՂ ԿԱՆՑԵՐՈԼԻՏԻԿ ՄԻԱՑՈՒԹՅԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՌԻՍԿԱՄԵՐԻՏԻՆԻ ՌԻՈՒՅՔԱԿԻՐ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՈՐՈՇ
ԲՆՈՒԹԱԳԻԶՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՎՐԱ**

Վ. Մ. ՍՍԼԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԱՆՐԵՄ, Պ. Պ. ՏԱՍԵՄ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ,
Դ. ՅՈՒ. ԼԱՆԿՈ, Ս. Գ. ՀԵՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Զ. Վ. ՂԱՐԻՅԱՆ, Հ. Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Ընտրամասիրվել է օրգանիզմ ներարկված ալկոքսիբենզիլպիրիմիդինի աճի-
դոֆոսֆորական թթուների դիէթիլենիմիդների խմբին պատկանող հակառուց-
քային պրեպարատի ազդեցությունը առողջ և ուռուցքակիր (սարկոմա 45)
առնետների հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ի մեթիլացման մակարդակի
և հաժման կորերի պրոֆիլի վրա: Տարբերություններ են նկատվել այդ
ԴՆԹ-ների մեթիլացման մակարդակի և հաժման կորերում: Ցույց է տրվում,
որ կանցերոլիտիկը չխախտելով առողջ կենդանու ԴՆԹ-ի զսպանակային կա-
ռուցվածքը, դեպտաբիլիզացնող ազդեցություն է թողնում ուռուցքակիր կեն-
դանու ուռուցքից և օրգաններից անջատված ԴՆԹ-ների վրա: Ընդ որում,
ուռուցքային ԴՆԹ-ի հաժման կորի վրա անհետանում են նրա բնութագրի-
չորահատկությունները և կորի տեսքով այն մոտենում է առողջ կենդանու
ԴՆԹ-ի հաժման կորին: Կանցերոլիտիկ միացության ազդեցության հետե-
վանքով նկատվել է ուռուցքակիր կենդանիների օրգաններից և ուռուցքից
անջատված ԴՆԹ-ների մեթիլացման աստիճանի նվազում:

INVESTIGATION OF ALKYLIZING CANCEROLYTIC INFLUENCE ON SOME CHARACTERISTICS OF DNA FROM TUMOR-CARRYING RATS

V. M. ASLANIAN, A. A. ACHREM, P. P. YASEM, U. S. BABAIAN,
D. U. LANDO, S. G. HARUTYUNIAN, G. V. GHARIBIAN, G. M. STEPANIAN

The influence of inserted into organism alkylizing antitumoral preparation from the group of diethylenimide alkoxibenzyl pyrimidin of amidophosphoric acid on the methylation level and on the profile of melting curves of DNA from tissues of healthy, tumor-carrying (with sarcoma 45) animals and from tumor is investigated. The differences in the degree of methylation and melting curve form of tumoral DNA and DNA of healthy and tumor-carrying animals are found out. It's shown, that the cancerolytic not disturbing the coiled structure of DNA from healthy animals has a destabilizing influence on DNA of tumor-carrying animals and tumoral DNA. Lowering the methylation level of tumoral DNA and DNA from tissues of tumor-carrying animals in the process of cancerolytic influence is found out.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Крот В. И., Андрианов В. Т. Мол. биол., 11, 555, 1977.
2. Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т. Мол. биол., 11, 1065, 1977.
3. Крамер М. С., Саакян А. Г., Степанян Г. М., Ароян А. А. Арм. хим. журн., 39, 9, 752—755, 1977.
4. Спирин А. С. Биохимия, 23, 656, 1958.
5. Brambilla G., Cavana M., Parodi S., Sciaba L., Pino A., Robiano L. Int. J. Cancer., 22, 2, 174—180, 1978.
6. Lowery O. H., Rosenbrough H. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
7. Lown J., William J., McLaughlin Larry W., Chang Van Min. Bioorg. Chem., 7, 1, 97—110, 1978.
8. Marmur J. J. Mol. Biol., 3, 208, 1961.
9. Morgan W. W., Cameron J. L. Cancer. Res., 33, 441, 1973.
10. Nakamura T., Sasada M., Tatsumi K. Acta Haematol. Jap., 40, 6, 1131—1144, 1977.
11. Phulmann H. W., Gercharch H. Z. Rirbsfarseh und Klin. Onkol., 33, 177, 1978.
12. Vanyushin B. F., Masin A. L. et al. BBA, 299, 397, 1973.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН И СОСТАВ ЯДЕРНОМЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ ГИДРОКОРТИЗОНОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Ж. В. ЯВРОЯН, А. А. МИНАСЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Выделены препараты ядерных мембран из клеток печени крыс и определены их состав и активность пяти ферментов-маркеров. Показано, что выделенные препараты обладают достаточной чистотой. Выявлен состав белков ядерной мембраны в контроле и при введении в организм животных гидрокортизона. Показано, что одна из 22—24 фракций ядерномембранных белков чувствительна к воздействию гормона.

Хотя в структурном отношении ядерные мембраны достаточно хорошо изучены [14, 16, 24, 30], многие вопросы, касающиеся функций этих образований, остаются далеко невыясненными. В последние годы внимание исследователей было обращено к изучению химического состава, ферментативной активности ядерных мембран, выявлению роли этих структур в установлении динамического равновесия между ядром и цитоплазмой, к изучению биогенетической взаимозависимости между эндоплазматическим ретикулумом и ядерной мембраной. Несмотря на большое сходство ядерной мембраны с другими мембранными образованиями клетки, она отличается от последних двумя существенными моментами. Во-первых, ядерная мембрана проницаема для макромолекул с молекулярным весом до 40 тыс. [8, 9], которые свободно проходят через поры, пронизывающие всю толщу внешней и внутренней мембраны. Во-вторых, характерной особенностью ядерномембранной оболочки является то, что ее внутренняя мембрана частично связана с хроматином [17]. Непосредственная связь структур внутренней ядерной мембраны с хроматином предполагает их возможное участие в изменении функциональной активности генома у эукариотов. С этой точки зрения представляется возможным также участие ядерномембранных компонентов (в особенности белков и фосфолипидов) в процессах специфической регуляции генетической активности, в частности, в механизмах гормональной регуляции, на что указывают работы Джаксона и Чалкли [18].

Настоящая работа посвящена выделению и определению ряда параметров ядерной мембраны клеток печени крыс, выявлению состава ядерномембранных белков в контроле и при гидрокортизоновом воздействии в целях дальнейшего изучения механизмов гормональной индукции в печеночной ткани и роли ядерномембранных структур в этом процессе.

Материал и методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола. Гидрокортизон (фирмы «Рихтер», ВНР), вводили в концентрации, индуцирующей ряд ферментативных систем—5 мг на 100 г массы животного. Животных забивали через 4 ч после введения гормона.

Ядра выделяли по методу Блобела и Потера [7]. Перфузированную и размельченную ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 10 объемах смеси, содержащей 0,32 М сахарозу, 0,025 М KCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5. Гомогенат фильтровали через 4—5 слоев марли, центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин. Осадок промывали в гомогенизирующей смеси с последующим центрифугированием до получения прозрачного супернатанта. Полученный осадок ресуспендировали в той же смеси, однако вместо 0,32 М сахарозы применяли 2,2 М сахарозу, центрифугировали 45 мин при 18000 об/мин. Осадок промывали 2—3 раза в том же растворе (вместо 2,2 М сахарозы добавляли 0,25 М сахарозу) до получения прозрачного супернатанта; центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин и в осадке получали чистые ядра.

Ядерные мембраны выделяли по методу Березня и др. [4]. Чистые ядра ресуспендировали в растворе, содержащем 0,025 М KCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,5 и добавляли ДНК-азу в тот же раствор с конечной концентрацией 100 мкг/мл. Полученную суспензию инкубировали 30—40 мин при комнатной температуре, постоянно перемешивая на магнитной мешалке. Действие ДНК-азы останавливали добавлением 1,5 объема того же холодного раствора. Затем центрифугировали 20 мин при 18000 об/мин. Осадок промывали 2—3 раза в том же растворе с добавлением 0,25 М сахарозы. После каждой промывки ядерные мембраны осаждали центрифугированием 20 мин при 18000 об/мин.

Активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы и глюкозо-6-фосфатазы в препаратах ядер и ядерных мембран определяли по методу Центгрофа и др. [32], а активность щелочной и кислой фосфатаз—по методу Лоури и др. [22]. Результаты выражали в единицах мкмоль выделившегося P₂O₅ на 1 мг белка в час.

Электрофорез препаратов ядер и ядерных мембран проводили в системе Na-додецилсульфат—полиакриламидный гель по методу Бланше [6]. Образцы растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 1%-ный Na-додецилсульфат, 10%-ную сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ β-меркаптоэтанол, в течение 30 мин при 37°. На каждую трубочку наносили 300 мкг белка. Электрофорез проводили при силе тока, равной 8 мА на трубочку, в течение двух часов. Гели окрашивали согласно методу Фейрбанкса и др. [11].

Белок определяли по методу Лоури и др. [23], ДНК и РНК—спектрофотометрически по методу Шмидта и Танхаузера [27]. Количественное определение фосфолипидов проводили по методу Фиске и Суббароу [12]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Выделение и изучение химического состава ядерных мембран требует применения разных методических подходов, позволяющих разрыхлять их очень компактную структуру. При этом возникает необходимость сильной физической или химической обработки ядерных препаратов, включающей применение гипотонического шока [2, 31], ультразвука [13, 20], высокой ионной силы [24, 25], ДНК-азы [4, 21], природного полианиона гепарина [10, 26] или же различных сочетаний этих факторов [15, 21, 32]. Естественно, что эти методы выделения обеспечивают разную степень чистоты ядерномембранных препаратов, порой затрудняющих сопоставление и сравнение результатов. Обработка ультразвуком, применение высокой ионной силы приводят к выделению частично фрагментированных препаратов ядерной оболочки и отделению внутренней ядерной мембраны от внеш-

ней; при этом содержание ДНК в выделенных препаратах ничтожно [16]. Малые количества ДНК содержатся также в препаратах, выделенных с применением гепарина, способного растворять хроматин в ядрах путем специфического взаимодействия с ядерными белками [5]. Препараты ядерных оболочек, выделенные этим методом, не требуют дальнейшей очистки и имеют 100%-ный выход [10]. С другой стороны, препараты, выделенные с применением ДНК-азы и гипотонического шока, содержат значительные количества ДНК (до 8%), однако в них сохраняется морфология ядерной оболочки. Структура внешней и внутренней мембран не нарушается, сохраняются также комплексы ядерных пор [16]. Такая обработка позволяет выделить препараты, содержащие частично связанный с внутренней мембраной остаточный хроматин [16]. Ясно, что в аспекте выявления возможного участия ядерномембранных компонентов в процессах специфической регуляции генетической активности и изучения их связи с компонентами хроматина методы выделения с применением ДНК-азы и гипотонического шока представляются предпочтительными.

В табл. 1 суммированы результаты химического анализа препаратов ядерных мембран, выделенных нами с применением ДНК-азы. Полученные ощутимые количества ДНК (7,7%) и РНК (6,2%) согласуются с литературными данными и, видимо, свидетельствуют о том, что выделенные препараты ядерных мембран—структуры, связанные, с одной стороны, с хроматином, с другой—с цитоплазмой, в частности с рибосомами.

Другой важнейшей характеристикой препаратов ядерных мембран является определенная активность ряда ферментов. В настоящее время тщательно изучена активность 15—16 ферментов ядерной оболочки, однако результаты крайне разноречивые [14, 16, 19]. Вариабельность активности одного и того же фермента в разных препаратах ядерных мембран во многом зависит от различия методических подходов при их выделении.

Нами изучалась активность пяти ферментов в ядерных и ядерномембранных препаратах (табл. 2). Все пять ферментов обнаруживаются в препаратах ядерных мембран. Активность Na^+ - K^+ -АТФ-азы в обоих препаратах почти одинакова, что хорошо согласуется с данными Франке и сотр. [15]. 5'-нуклеотидазная активность на 30% выше в ядерных препаратах; о чем свидетельствуют и литературные данные [14]. Очень разноречивые данные имеются в литературе относительно глюкозо-6-фосфатазной активности ядерных мембран [14, 16]. Известно, что этот фермент является маркером эндоплазматического ретикулаума клеток печени. В работах Збарского и др. [31], Франке и др. [15] показано, что большая часть фермента локализована в микросомах и ядерной фракции, в препаратах ядерных мембран активность фермента незначительна. Вместе с тем в ряде работ [19—21] показана значительно большая активность глюкозо-6-фосфатазы именно в ядерномембранных препаратах. В наших опытах активность фермента в

Таблица 1

Процентное содержание и соотношения основных компонентов препаратов ядер и ядерных мембран клеток печени крыс

Фракция	Процентное содержание				Соотношение компонентов			
	белок	ДНК	РНК	фосфолипиды	ДНК/белок	РНК/белок	фосфолипиды/белок	ДНК/фосфолипиды
Ядра	58,5 $\pm$ 3,20	20,5 $\pm$ 1,98	6,08 $\pm$ 0,88	12,8 $\pm$ 1,50	0,37 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,23
Ядерные мембраны	64,7 $\pm$ 2,81	7,7 $\pm$ 0,73	6,21 $\pm$ 0,68	21,3 $\pm$ 2,54	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,04

Таблица 2

Активность ряда ферментов в препаратах ядер и ядерных мембран

Фермент	Ядра	Ядерные мембраны	Ядерные мембраны/Ядра
(Na ⁺ , K ⁺)—АТФ-аза	5,61	6,17	1,08
5'-нуклеотидаза	6,87	5,06	0,76
Глюкозо-6-фосфатаза	3,66	5,57	1,75
Кислая фосфатаза	4,36	5,62	1,29
Щелочная фосфатаза	5,21	4,97	0,95

Приведены средние значения от пяти серий опытов.

ядерных препаратах на 35% выше активности его в ядрах. Активности двух фосфатаз обнаруживается как в препаратах ядер, так и ядерных мембран (табл. 2). Оба фермента имеют почти одинаковую активность в обоих препаратах, активность кислой фосфатазы на 23% выше в ядерных мембранах.

Нами проводилось также фракционирование ядерномембранных белков в контроле и при введении в организм животных гидрокортизона. При изучении состава негистоновых белков хроматина печени крыс при гидрокортизоновой индукции ранее нами было высказано предположение о возможной чувствительности фракций ядерномембранных белков к гормональному воздействию [1]. Белки ядерной мембраны могут контролировать не только транспорт гормон-рецепторных комплексов через поры, но непосредственно или опосредованно участвовать в специфической регуляции генетической активности. В этой связи интересны работы Джаксона и Чалкли [18], показавших, что 17 β -эстрадиол высокоаффинно связывается с ядерномембранной фракцией клеток эндометрия матки, а также Вигнери и др. [29] о специфическом связывании инсулина с ядерной мембраной клеток печени крыс.

Электрофореграммы белков ядер и ядерных мембран выявляют соответственно 28—30 и 22—24 фракции разной интенсивности, причем почти все фракции ядерных мембран представлены на электрофореграммах белков ядер (рис.). Наличие на электрофореграммах белков

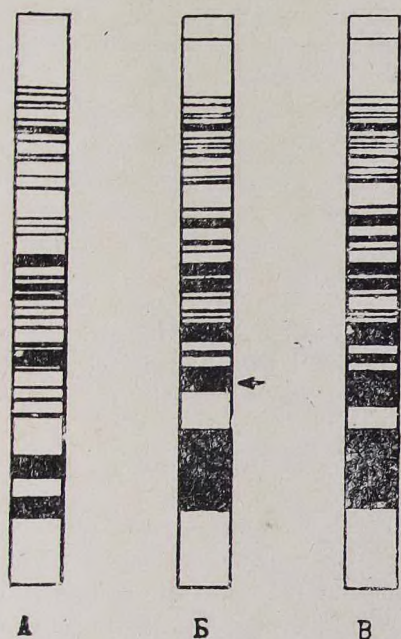


Рис. Электрофореграммы белков препаратов ядер и ядерных мембран. А—белки ядер, Б—белки ядерных мембран, В—белки ядерных мембран после введения гидрокортизона. Стрелкой на электрофореграммах показана фракция, утолщающаяся при гидрокортизоновом воздействии.

ядерных мембран низкомолекулярных фракций высокой подвижности свидетельствует о частичной загрязненности препаратов гистонами, в то время как высокомолекулярные фракции, вероятно, представлены негистоновыми белковыми контаминантами или же белками плазматичес-

ческой мембраны. Такой широкий белковый спектр препаратов ядерных мембран является следствием сравнительно слабой химической обработки при выделении. Истинные ядерномембранные белки, обладающие средней электрофоретической подвижностью и имеющие молекулярную массу в пределах 50000—80000, сосредоточены в середине электрофореграммы [17]. Именно среди них обнаруживается белковая зона, заметно утолщающаяся после введения животным гидрокортизона (рис.). Изменение интенсивности белковой фракции на электрофореграмме ядерных мембран свидетельствует о ее возможной ключевой роли в механизме действия гормона на генетический аппарат клетки. Эта ядерномембранная белковая фракция может способствовать проникновению гидрокортизон-рецепторного комплекса в ядро или же непосредственно участвовать в связывании этого комплекса в ядре, приводящем к специфическому активированию генома.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 20.VII 1979 г.

**ԿՈՐԻԶԱԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՊՐԵՊԱՐԱՏՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ
ՈՒ ԿՈՐԻԶԱԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՀԻԳՐՈԿՐԻՏՈՆԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈՒՄ**

ժ. Վ. ՅԱՎՐՈՅԱՆ, Ա. Ա. ՄԻՆԱՍՅԱՆ, Է. Ս. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Առնետի լյարդի բջիջներից անջատվել են կորիզային թաղանթների պրեպարատները, որոշվել են նրանց մի քանի պարամետրերը: Պարզվել է, որ անջատված պրեպարատները ունեն բավարար մաքրություն: Որոշված է կորիզաթաղանթային սպիտակուցների բաղադրությունը կենդանիներին հիդրոկորտիզոն ներարկելուց հետո: Ցույց է տրված, որ կորիզաթաղանթային սպիտակուցների 22—24 ֆրակցիաներից մեկն զգալուն է հորմոնի ազդեցության նկատմամբ:

**NUCLEAR MEMBRANE PREPARATE ISOLATION AND
COMPOSITION OF NUCLEAR MEMBRANE PROTEINS
UNDER THE HYDROCORTISONE ACTION**

J. V. YAVROYAN, A. A. MINASYAN, E. S. GEVORKIAN, G. A. PANOSYAN

Nuclear membrane² preparates have been isolated from rat liver cells and some of their parameters determined. Satisfactory purity of isolated preparates has been shown. Nuclear membrane protein composition has been determined in control and under hydrocortisone administration. It has been shown that one of 22—24 bands of nuclear membrane proteins is hormone sensitive.

1. Геворкян Э. С., Джербашьян А. А., Паносян Г. А. Биол. ж. Армении, 31, 4, 370, 1978.
2. Збарский И. Б., Перевощикова К. А., Делекторская Л. Н. ДАН СССР, 177, 2, 445, 1967.
3. Agutter P. S. Bioch. Bioph. Acta, 255, 397, 1972.
4. Berezney R., Funk L. K., Crane F. L. Bioch. Bioph. Acta, 203, 531, 1970.
5. Berlowitz L., Kitchin R., Fallotta D. Bioch. Bioph. Acta, 262, 160, 1972.
6. Blanchet J. P. Exptl. Cell Res., 84, 159, 1974.
7. Blobel G., Potter V. R. Science, 154, 76, 1966.
8. Bonner J. M. J. Cell Biol. 64, 421, 1975.
9. Bonner J. M. J. Cell Biol., 64, 431, 1975.
10. Borners M., Courvalin J.-C. J. Cell Biol., 76, 191, 1978.
11. Fairbanks G., Steck T. L., Wallack D. F. H. Biochemistry, 10, № 13, 2606, 1971.
12. Fiske C. H., Subbarow. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
13. Franke W. W. J. Cell Biol., 31, 619, 1966.
14. Franke W. W. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B, 268, 67, 1974.
15. Franke W. W., Deumling B., Ermen B., Jarasch E.—D., Kleinig H. J. Cell Biol. 46, 379, 1970.
16. Harris J. R. Bioch. Bioph. Acta, 515, 55, 1978.
17. Jackson R. C. Biochemistry, 15, 25, 5641, 1976.
18. Jackson V., Chalkley R. J. Biol. Chem., 249, 5, 1615, 1974.
19. Kartenbeck J., Jarasch E. D., Franke W. W. Exptl. Cell Res. 81, 175, 1973.
20. Kashling D. M., Kasper C. B. J. Biol. Chem., 244, 3786, 1969.
21. Kay R. R., Fraser D., Johnston J. R. Eur. J. Bioch., 30, 145, 1972.
22. Lowry O. H., Lopez I. A. J. Biol. Chem., 162, 3, 421, 1946.
23. Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr A. K., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
24. Merriam R. W. J. Bloch. Bioph. Cytol., 11, 559, 1961.
25. Monneron A., Blobel G., Palade G. E. J. Cell Biol., 55, 104, 1972.
26. Prescott D. M. Meth. Cell Biol., 15, 163, 1977.
27. Schmidt G., Tannhauser J. J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
28. Sikstrom R., Lanolx J., Bergemon J. J. M. Bloch. Bioph. Acta, 448, 88, 1976.
29. Vigneri R., Goldfine I. D., Wong K. Y., Smith G. J., Pezzino V. J. Biol. Chem., 253, 7, 2098, 1978.
30. Watson M. Z. J. Bioph. Bloch. Cytol., 6, 149, 1959.
31. Zbarsky I. B., Perevoscikova K. A., Delectorskaya L. N., Delectorsky V. V. Nature (London), 221, 257, 1969.
32. Zentgraf M., Deumling B., Jarasch E. D., Franke W. W. J. Biol. Chem., 246, 9, 2986, 1971.

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОСАРКОМЫ УОКЕРА

А. В. НЕРКАРАЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Изучался изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в сердце, головном мозге и печени крыс при развитии карциносаркомы Уокера. Обнаружены дополнительные фракции в изоферментном спектре лактатдегидрогеназы печени. Общая активность фермента в печени увеличивается незначительно, в мозге наблюдается сначала уменьшение, а затем повышение ее и содержания Н-субъединиц. В сердце при развитии карциносаркомы повышается и общая активность фермента, и содержание Н-субъединиц. Обсуждаются возможные механизмы отмеченных изменений и их значение.

В процессе развития неопластического превращения происходят изменения активности и изоферментного состава ряда ферментов как в тканях, пораженных этим процессом, так и в отдаленных от них тканях.

Исследование изоферментного спектра лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови, опухоли и тканях опухоленосителей показало, что реакция организма на развитие злокачественного перерождения различна. В большинстве работ сообщается об увеличении синтеза М-субъединиц [1, 6, 8—10], наблюдается также повышение активности изофермента ЛДГ-3 [11, 14, 15] и увеличение синтеза Н-субъединиц [7, 13, 17].

Изменения в изоферментном составе и общей активности обнаруживаются не только при развитой злокачественной опухоли, но и в предопухолевой фазе. О существовании биохимических нарушений, опережающих гистологические изменения, сообщали при исследовании изоферментного спектра и общей активности ЛДГ в процессе развития карциномы желудка Оливер и др. и Вулламс и др. [12, 16], индукции канцерогеном опухоли молочной железы Зарецкая и др. и Терещенко и др. [2, 4].

Нами было установлено, что в процессе развития асцитной карциномы Эрлиха в печени подопытных мышей увеличивается относительное содержание Н-субъединиц и общая активность ЛДГ [3].

Данная работа посвящена исследованию изоферментного спектра ЛДГ тканей крыс при введении опухолевых клеток карциносаркомы Уокера.

Материал и методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 100—120 г. Штамм карциносаркомы Уокера получен из Института тонкой органической химии АН АрмССР. Опухоль перевивали внутримышечным введением в область задней конечности суспензии опухолевых клеток в физиологическом растворе. Для получения клеточной суспензии периферические участки опухоли, лишенные кровоизлияний и некроза, пропускали через ручной пресс из нержавеющей стали. Полученную массу развешивали физиологическим раствором в отношении 1:2. Крысам вводили по 0,3 мл суспензии. Для поддержания опухоли и в опытах использовали 10-12-дневную опухоль.

Получение тканевых экстрактов, обладающих ЛДГ-активностью, электрофоретическое разделение ЛДГ, определение активности ее и процентного содержания изоферментов проводили методами, описанными ранее [3].

Результаты и обсуждение. При исследовании изоферментов спектра и общей активности ЛДГ в сердце, печени и головном мозге крыс при развитии карциносаркомы Уокера, как и при развитии асцитной карциномы Эрлиха, наибольшие изменения выявлены в печени (табл. 1).

Таблица 1

Общая активность ЛДГ и содержание Н-субъединиц в тканях крыс при развитии опухоли, %

Время	Сердце		Мозг		Печень	
	А	Н	А	Н	А	Н
Контроль	100	56,5	100	64,43	100	27,02
12 ч	139,89	54,25	78,35	61,04	108,7	41,14
18 ч	131,38	65,67	87,34	56,57	109,42	41,39
20 ч	135,69	63,44	58,10	53,09	115,21	
II день	142,02	62,19	83,94	60,41	111,6	
III день	164,48	64,45	77,33	56,78	108	
IV день	166,27	61,32	82,57	62,63	110,87	32,36
V день	167,35	64,33	85,59	63,34	112,02	32,60
VII день	169,50	63,90	102,47	66,39	112,32	23,06
IX день	170,21	64,35	107,16	73,41	122,45	21,01

А—общая активность ЛДГ, Н—содержание Н-субъединиц

В головном мозге уже через 20 ч. после введения опухолевых клеток процентное содержание Н-субъединиц уменьшалось примерно на 11%, затем постепенно повышалось и на девятый день было на 9% выше нормы. Эти изменения коррелируют с изменением общей активности ЛДГ (табл. 2). В печени через 12 ч после введения клеток карциносаркомы Уокера содержание Н-субъединиц увеличивается примерно на 14%, а через 20 ч на электрофореграммах между ЛДГ-3 и ЛДГ-4 появляется новая полоса, не обнаруженная на электрофореграммах нормальной печени. На второй день две дополнительные фракции появляются между ЛДГ-1 и ЛДГ-2 и еще одна, с большим отрицательным зарядом, по сравнению с ЛДГ-1 (табл. 3, рис.).

Появление четырех дополнительных фракций может быть следствием появления Н-субъединицы нового типа, способной ассоциировать с М-субъединицей. Она может образоваться из нормальной Н-

Изоферментный спектр ЛДГ в головном мозге при развитии карциносаркомы Уокера, $M \pm m$

Время	H_4	H_3M_1	H_2M_2	H_1M_3	M_4
Контроль	30,36 $\pm$ 2,6	24,48 $\pm$ 1,07	24,64 $\pm$ 1,02	13,55 $\pm$ 0,98	6,97 $\pm$ 0,87
12 ч	19,85 $\pm$ 1,5	26,76 $\pm$ 1,20	31,08 $\pm$ 2,82	22,31 $\pm$ 1,15	0
18 ч	27,05 $\pm$ 1,1	35,29 $\pm$ 1,96	28,58 $\pm$ 1,40	7,30 $\pm$ 0,57	1,78 $\pm$ 0,23
20 ч	17,58 $\pm$ 5,0	24,79 $\pm$ 2,39	26,61 $\pm$ 2,18	15,45 $\pm$ 1,12	15,57 $\pm$ 0,77
II день	25,66 $\pm$ 1,6	24,72 $\pm$ 1,02	21,33 $\pm$ 2,41	22,18 $\pm$ 2,16	6,11 $\pm$ 1,03
III день	23,66 $\pm$ 0,9	22,79 $\pm$ 2,31	23,05 $\pm$ 1,01	18,00 $\pm$ 1,42	12,50 $\pm$ 1,10
IV день	29,50 $\pm$ 1,2	25,56 $\pm$ 1,45	20,15 $\pm$ 3,12	15,55 $\pm$ 1,95	9,24 $\pm$ 1,33
V день	29,85 $\pm$ 1,7	23,48 $\pm$ 0,94	22,95 $\pm$ 1,45	17,61 $\pm$ 2,21	6,11 $\pm$ 0,82
VII день	29,21 $\pm$ 2,1	26,66 $\pm$ 1,19	25,61 $\pm$ 1,37	18,52 $\pm$ 1,55	0
IX день	39,78 $\pm$ 1,8	26,97 $\pm$ 1,07	20,36 $\pm$ 2,60	12,89 $\pm$ 1,13	0

Изоферментный спектр ЛДГ печени

Время	H_4 (I)	H_4	H_4 (II)	H_3M_1 (I)	H_3M_1
Контроль		1,98 $\pm$ 0,22			7,6 $\pm$ 1,03
12 ч		9,45 $\pm$ 1,21			19,04 $\pm$ 1,56
18 ч		1,87 $\pm$ 0,45			22,64 $\pm$ 1,18
20 ч		5,10 $\pm$ 0,85			11,78 $\pm$ 1,26
II день	1,19 $\pm$ 0,26	6,89 $\pm$ 1,02	3,47 $\pm$ 0,6	3,25 $\pm$ 0,7	11,78 $\pm$ 1,21
III день	1,87 $\pm$ 0,15	7,24 $\pm$ 1,13	4,41 $\pm$ 0,4	5,37 $\pm$ 0,6	10,95 $\pm$ 0,99
IV день		1,07 $\pm$ 0,25			12,66 $\pm$ 0,31
V день		2,91 $\pm$ 0,33			12,66 $\pm$ 1,41
VII день		0			10,00 $\pm$ 1,65
IX день		1,44 $\pm$ 0,11			5,06 $\pm$ 0,47

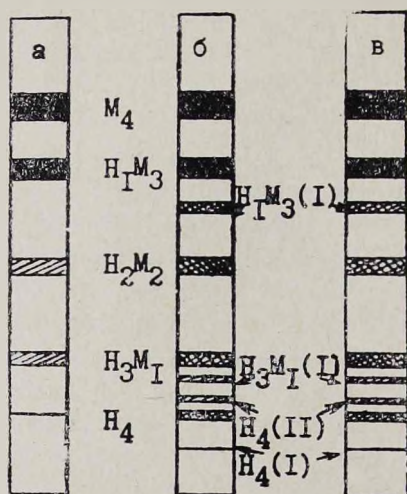


Рис. I

Рис. Изоферменты ЛДГ печени крыс: а—контроль, б, в—второй и третий дни развития опухоли соответственно, H_4 (I), H_4 (II), H_3M_1 (I) и H_1M_3 (I)—дополнительные фракции ЛДГ.

субъединицы под воздействием каких-то регулирующих факторов, либо синтезироваться de novo в присутствии тех же факторов. Подобные регулирующие факторы, способные нарушить работу генетического аппарата клетки, обнаружены в опухолевых клетках [5]. По-видимому,

такие факторы попадают в организм с опухолевыми клетками и вызывают изменения в предопухолевой фазе.

Исследование изоферментного спектра ЛДГ в сердце в процессе развития опухоли значительных изменений не выявило (табл. 4). Наблюдается некоторое увеличение содержания Н-субъединиц, повышение активности изоферментов ЛДГ-2 и ЛДГ-3. На девятый день исчезает ЛДГ-5. Повышается общая активность ЛДГ, причем прямо пропорционально времени развития опухоли (табл. 1).

Таким образом, эксперименты показали, что развитие карциносаркомы Уокера вызывает изменения в изоферментном спектре и общей активности ЛДГ в головном мозге, сердце и печени крыс опухоленосителей.

Показано, что наибольшие изменения происходят в изоферментном

Таблица 3

при развитии опухоли, $M \pm m$

H_2M_2	$H_1M_3(I)$	H_1M_3	M_4
20,55 $\pm$ 1,19		36,27 $\pm$ 1,89	33,60 $\pm$ 2,16
18,29 $\pm$ 1,22		33,07 $\pm$ 1,73	20,15 $\pm$ 1,34
27,13 $\pm$ 2,31		36,60 $\pm$ 2,12	11,76 $\pm$ 0,97
21,87 $\pm$ 1,26	21,75 $\pm$ 1,17	15,68 $\pm$ 1,14	23,82 $\pm$ 1,25
16,72 $\pm$ 1,26	18,49 $\pm$ 1,25	17,75 $\pm$ 2,57	20,36 $\pm$ 1,97
18,23 $\pm$ 1,15	12,07 $\pm$ 1,11	16,99 $\pm$ 1,45	22,87 $\pm$ 1,63
12,74 $\pm$ 2,04	13,97 $\pm$ 1,39	33,32 $\pm$ 3,26	36,14 $\pm$ 4,15
22,77 $\pm$ 2,25		35,22 $\pm$ 3,51	26,44 $\pm$ 2,26
12,34 $\pm$ 2,49		37,54 $\pm$ 2,98	40,12 $\pm$ 4,33
14,97 $\pm$ 1,43		33,15 $\pm$ 2,17	45,38 $\pm$ 4,28

Таблица 4

Изоферментный спектр ЛДГ в сердце при развитии опухоли, $M \pm m$

Время	H_4	H_3M_1	H_2M_1	H_1M_3	M_4
Контроль	23,8 $\pm$ 1,25	26,00 $\pm$ 1,43	23,40 $\pm$ 1,12	17,90 $\pm$ 1,63	8,9 $\pm$ 0,73
12 ч	17,11 $\pm$ 1,16	22,34 $\pm$ 2,01	29,61 $\pm$ 2,16	22,32 $\pm$ 1,24	8,62 $\pm$ 0,9
18 ч	26,18 $\pm$ 1,45	32,32 $\pm$ 3,37	22,72 $\pm$ 1,98	15,56 $\pm$ 1,09	3,22 $\pm$ 0,2
20 ч	23,77 $\pm$ 1,77	30,35 $\pm$ 2,59	25,91 $\pm$ 1,72	15,82 $\pm$ 1,15	4,15 $\pm$ 0,2
II день	22,64 $\pm$ 1,53	28,46 $\pm$ 2,38	28,26 $\pm$ 1,75	16,30 $\pm$ 1,02	4,34 $\pm$ 0,5
III день	25,00 $\pm$ 2,13	31,43 $\pm$ 2,56	25,09 $\pm$ 2,11	13,35 $\pm$ 1,00	5,13 $\pm$ 0,6
IV день	23,47 $\pm$ 1,74	27,82 $\pm$ 2,27	26,35 $\pm$ 1,98	16,05 $\pm$ 1,12	6,31 $\pm$ 0,8
V день	24,89 $\pm$ 1,65	30,72 $\pm$ 2,49	25,49 $\pm$ 1,32	16,63 $\pm$ 1,51	2,27 $\pm$ 0,3
VII день	21,32 $\pm$ 2,01	31,91 $\pm$ 3,35	29,47 $\pm$ 2,16	16,05 $\pm$ 2,28	1,25 $\pm$ 0,1
IX день	23,20 $\pm$ 1,69	29,80 $\pm$ 2,76	28,0 $\pm$ 1,89	18,80 $\pm$ 2,17	0

спектре печени, где с первых дней развития опухоли увеличивается синтез Н-субъединиц и появляются дополнительные фракции.

На девятый день развития опухоли изоферментный спектр ЛДГ возвращается к нормальному, а общая активность ЛДГ в печени опухоленосителей выше, чем у здоровых крыс. Исследуя изоферментные спектры ЛДГ тканей животных, мы обнаружили, что наиболее резкие отклонения от нормы происходят в первые часы и дни после введения опухолевых клеток.

Аналогичные изменения были обнаружены нами в экспериментах с асцитной карциномой Эрлиха [3]. Подобная реакция печени в первые часы и дни после введения или начала развития опухоли может оказаться чрезвычайно важным диагностическим тестом для обнаружения начальных этапов развития опухолевого процесса.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 5.X 1979 г.

**ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԼԱԿՏԱՏԳԵԶԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ
ԻԶՈՅԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ ՈՒՈԿԵՐԻ ԿԱՐՑԻՆՈՍԱՐԿՈՄԱՅԻ
ԶԱՐԴԱՑՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ**

Ա. Վ. ՆԵՐԿԱՐԱՐԻԱՆ, Դ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտային կազմը սրտում, գլխուղեղում և լյարդում Ուոլկերի կարցինոսարկոմայի զարգացման ընթացքում: Հայտնաբերվել են լրացուցիչ ֆրակցիաներ լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտային կազմում, որոնք երևան են դալիս ուռուցքային բջիջների ներարկումից 20 ժամ հետո և անհետանում են 4 օր հետո: Ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվության փոփոխությունը լյարդում աննշան է: Ուղեղում դիտվել է սկզբում ընդհանուր ակտիվության և H- ենթամիավորի պարունակության նվազում, իսկ հետո՝ ավելացում: Սրտում, կարցինոսարկոմայի զարգացման ընթացքում, ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվությունը և H- ենթամիավորի պարունակությունը ավելանում է: Քննվում են նշված փոփոխությունների առաջացման հնարավոր մեխանիզմները և նրանց նշանակությունը:

**LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES SPECTRUM OF RAT
TISSUES UNDER THE DEVELOPMENT OF WALKER
CARCINOSARCOMA**

A. V. NERKARARIAN, G. A. PANOSYAN

The isoenzyme spectrum of lactate dehydrogenase of heart, brain and liver under the development of Walker carcinosarcoma have been studied. The additional fractions in the isoenzyme spectrum of liver have been discovered. The total enzyme activity in liver increases insignificantly, in brain at first its decrease with following increase is observed, in heart it increases. Possible mechanisms of mentioned alterations and their significance are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Голубев А. М., Чернухин А. А. *Вопр. онкол.*, 17, 18, 30, 1971.
2. Зарецкая И. С., Бойкова В. И., Терещенко И. П., Кизленко О. И. *Бюлл. экспер. биол. мед.*, 77, 12, 59, 1974.
3. Неркарян А. В., Паносян Г. А. *Биолог. ж. Армении*, 32, 4, 337, 1979.

4. Терещенко И. П., Зарецкая Н. С., Шубина А. В., Бойкова В. Н. Вестн. Акад. мед. наук СССР, 3, 23, 1977.
5. Шапог В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., 1975.
6. Fottrell P. F., Spemman C. N., O'Dwyer E. M. Cancer Res. 34, 5, 979, 1974.
7. Henderson A. R., Dildar A., McKenzie D. Clin. Chem. 29, 11, 1466, 1974.
8. Hilf R., Rector W. D., Orlando R. A. Cancer (Phila), 37, 4, 1825, 1976.
9. Kullo I., Sato S., Ishii T. Leber Magen Darm. 6, 6, 335, 1976.
10. Massey W. H., Dannis D. L., Fletcher W. S. Amer. J. Surg. 122, 2, 209, 1971.
11. Nakamura T., Utsunomiya J., Hamaguchi E., Sakagishi Y. J. Jap. Soc. Cancer Ther. Engl. Abstr. 1, 1972, из РЖ Биологическая химия, 11, 11Ф1624, 1973.
12. Oliver J., Abdalla A. M. Brit. J. Urol. 43, 3, 321, 1971.
13. Rosada A., Morris H. P., Weinhouse S. Cancer Res. 29, 9, 1673, 1969.
14. Starkweather W. H., Schoch H. K. Biochim. Biophys. Acta 62, 440, 1962.
15. Van Gennip A. H., Tabak-Van Gorcum J. A., Taminian J. A. Clin. Chim. Acta 58, 1, 85, 1975.
16. Woollams R., Barratt P. J., Orwell R. L., Piper D. W. Digestion, 14, 1, 20, 1976.
17. Yamaguchi I. Sapporo Med. J., 47, 4, 321, 1978.

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ АППАРАТОМ КЛЕТКИ

Э. С. ГЕВОРКЯН

В статье суммированы литературные данные по механизму действия глюкокортикоидных гормонов в ядрах клеток. Основное внимание уделяется взаимодействию гормон-рецепторных комплексов с акцепторными участками в ядре, приводящему к специфическому активированию генетического аппарата. Приводятся современные представления о механизме этого взаимодействия.

Имеющиеся в литературе многочисленные данные по механизму действия стероидных гормонов в разных тканях свидетельствуют о том, что эти гормоны способны регулировать метаболическую активность клеток-мишеней, контролируя синтез РНК, и что, по-видимому, существует универсальный механизм действия всех стероидов [24, 29, 38, 44, 45, 47, 62, 63]. В настоящее время считается доказанным, что стероидные гормоны, входящие в клетку, прочно и специфически связываются с цитоплазматическими белками-рецепторами [8, 10, 11, 17, 56]. В результате такого связывания происходит образование комплексов гормон—рецептор, которые, активируясь, становятся способными взаимодействовать с определенными участками хроматина [5, 6, 12, 14, 19, 40, 43, 49, 57, 58]. Такой механизм лежит в основе действия всех стероидных гормонов.

Наряду с этим, разнообразие наблюдаемых физиологических ответов тканей на разные стероидные гормоны является следствием сложного и специфического взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с разными акцепторными участками ядра. Именно этот этап в сложном, многоступенчатом механизме действия стероидных гормонов является важным в аспекте изучения механизмов активации генной экспрессии гормонами, как одной из форм внутриклеточной регуляции.

При изучении взаимодействия стероид-рецепторных комплексов с ядром ряд авторов наблюдали насыщение связывания с повышением содержания рецепторов в пробах при постоянной концентрации ядерных компонентов [33, 37, 48], в то время как другие предполагают, что наблюдаемое насыщение является скорее артефактом *in vitro* исследований [21, 34]. Вопрос насыщаемости вплотную связан с вопросом о наличии специфических к взаимодействию с гормон-рецепторными комплексами акцепторных участков на хроматине. В настоящее время

имеется много данных по идентифицированию разных компонентов ядра—ДНК [9, 32, 39, 64], кислых негистоновых белков [48, 59], основных белков [51], ядерномембранных структур [36] в качестве специфических акцепторных участков.

Механизм действия глюкокортикоидных гормонов на генетический аппарат эукариотов в настоящее время интенсивно изучается. Глюкокортикоиды, повышающие глюконеогенез, индуцируют ряд печеночных ферментов, участвующих в обмене аминокислот. Эту ткань можно считать мишенью для глюкокортикоидных гормонов. Считается, что в печени содержится, по крайней мере, три растворимых белка, способных связывать глюкокортикоиды. Один из этих рецепторов—это идентичный с транскортином (то есть кортикостероид-связывающим белком, глобулином) растворимый белок [41]. Транскортин синтезируется в печени и вместе со многими печеночными компонентами переходит в плазму. Второй—цитоплазматический белок А, который также связывается с природными глюкокортикоидами. Природа белка А остается невыясненной. Возможно, он является продуктом деградации или же промежуточным продуктом транскортина. Необходимо отметить, что оба рецептора связываются с гидрокортизоном и кортикостероном, однако не связываются с другими биологически активными, но синтетическими глюкокортикоидами—дексаметазоном и триамкинолоном. Этим в основном они и отличаются от третьего рецепторного белка глюкокортикоидов—белка G, который также локализован в цитоплазме. Известно, что именно белок G является посредником во многих биологических реакциях глюкокортикоидов [13, 16]. Так, было показано, что белок G довольно лабилен в цитоплазме, и только связывание с гормоном стабилизирует его. Комплекс белок G—гормон в активированной форме способен взаимодействовать с ДНК. К сожалению, этот рецептор пока не получен в высокоочищенной форме. Некоторые авторы установили, что белок G имеет стереохимическую специфичность по отношению к аналогам глюкокортикоидов в зависимости от их биологической потенции [28]. В то же время показано, что этот белок может участвовать во многих опосредованных гормональных эффектах внутри клеток печени. Существует определенная корреляция между дозой введенного гормона и степенью *in vivo* насыщения рецептора, а также между степенью насыщения рецептора и уровнем биологического ответа клетки на гормон [28]. Интересные результаты получены в опытах на адреналэктомированных животных. Показано, что удаление надпочечников приводит к резкому уменьшению количества кортикостероидных рецепторных белков в ядрах клеток печени. Иными словами, ядра клеток печени оперированных животных содержат меньшее количество белка G, чем ядра клеток печени нормальных, т. е. существует корреляция между количеством стероидных гормонов и концентрацией рецепторных молекул. Вместе с тем введение гидрокортизона адреналэктомированным животным приводит к уменьшению количества цитоплазматического рецептора, в то время как число рецепторных молекул в ядре увеличивается в три раза [15].

Следовательно, именно белок G, а не транскортин или белок A, является глюкокортикоидным рецептором биологической важности, а его функция заключается во взаимодействии и связывании с глюкокортикоидом.

В настоящее время считается доказанным, что для взаимодействия с хроматином или его компонентами комплекс гормон—рецептор должен активироваться. Химическая природа этого процесса полностью не выяснена. В ряде работ было показано, что процесс активирования комплекса и связывания его с чистой ДНК зависит от температуры [7, 30]. Активирования комплекса можно добиться термической трансформацией—подогреванием комплекса до 20° с последующим охлаждением до 0° [28]. Активированный таким образом комплекс становится способным легко связываться с ДНК или с ядром.

Стимулирование гидрокортизоном синтеза РНК в ядрах печени крыс установлено сравнительно давно [24, 44, 54]. Этот эффект сопровождается повышением активности РНК-полимеразы [18, 52]. В дальнейшем было обнаружено, что влияние гидрокортизона на матричную активность хроматина печени не связано с изменением скорости ацетилирования, метилирования и фосфорилирования гистонов [53]. Эти данные привели к предположению о ключевой роли негистоновых белков хроматина в специфической регуляции генетической активности [25, 50, 61].

В ранних работах Круха и сотр. [25] было показано, что кортикостерон при инкубации с ядерными компонентами клеток печени крыс связывается с негистоновыми белками хроматина. В дальнейшем было обнаружено, по крайней мере, три белка среди негистоновых белков хроматина печени, связывающих кортикостерон и эстрадиол. Если два из них специфически связывались с отдельными гормонами, то третий связывался с обоими стероидами, однако эта связь была низкоаффинной [26]. В последующих работах этих авторов [27] доказывается наличие непосредственной связи между этим акцепторным для кортикостерона—негистоновым белком и цитоплазматическим рецептором гормона. Основываясь на экспериментальных данных, авторы приходят к выводу, что глюкокортикоидные гормоны высокоаффинно и специфически связываются с определенным негистоновым белком хроматина, который представляет собой перешедший из цитоплазмы в ядро рецептор гормона. На основании этого авторы выдвигают гипотезу, согласно которой глюкокортикоидный рецептор, присутствующий в составе негистоновых белков, состоит из трех компонентов: белоксвязывающего компонента (R), положительного (PM) и отрицательного (NM) модуляторов. Для связывания гормона с рецептором необходимо взаимодействие R с PM. Вместе с тем отрицательный модулятор также способен связаться с PM и тем самым предотвратить образование комплекса R-PM. Предполагается, что PM находится в составе негистоновых белков хроматина и осуществляет специфическое связывание [43].

О важной роли негистоновых белков в специфическом активировании генома свидетельствует также работа Шелтон и Олфри [55], показавших селективное повышение синтеза негистонового белка с молекулярным весом 41000 хроматина печени при действии гидрокортизона.

Интересные результаты были получены Воробьевым и сотр. [3, 42] при изучении состава хроматина из клеток печени крыс после введения кортизона. Обнаружено, что гормон лишь в незначительной степени может изменить состав белков хроматина. Специфичным является лишь увеличение содержания белка с молекулярным весом 22000, который имел меньшую электрофоретическую подвижность, чем гистон H1. Методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в составе общего кислоторастворимого белка обнаружена дополнительная подфракция гистона H1 и показано увеличение количества белка, расположенного на электрофореграмме между гистонами H1 и H3 [3]. Выявленная дополнительная фракция отличается от специфического белка, обнаруженного Шелтон и Олфри, хотя бы тем, что белок этот кислоторастворим. Было показано также, что удаление гистона H1 и слабосвязанных негистоновых белков экстракцией хроматина 0,7 М NaCl не изменяет специфического характера транскрипции. Только экстракция 1 М NaCl, нарушающая суперструктуру хроматина, полностью снимает вызванное кортизоном изменение транскрипции. Авторы предполагают, что увеличение содержания белковых фракций, прочно связанных в хроматине, в ответ на введение кортизона вызывает ослабление ДНК-белковых взаимодействий в хроматине и тем самым активирует гормоноспецифическую транскрипцию [3].

Хамана и Иваи в ряде работ [31, 35] изучали связываемость глюкокортикоид-рецепторного комплекса с негистоновыми белками и ДНК. Было показано, что комплекс проявляет вдвое большую связываемость с агрегированным и дегистонированным хроматином, чем с интактным. Авторы заключают, что этот комплекс специфически связывается с определенными негистоновыми белковыми компонентами и с определенным участком ДНК в хроматине печени.

В последнее время появилось много работ, показывающих ключевую роль ДНК во взаимодействии гормон-рецепторных комплексов с геномом. По данным Фейгельсона и сотр. [28], ядра печени связывают в 20 раз меньше глюкокортикоид-рецепторного комплекса, чем то же количество депротеинизированной ДНК. Обсуждая роль белков хроматина в специфическом связывании, авторы предполагают, что они могут иметь рестриктирующую функцию в процессе гормональной регуляции—выставлять те участки ДНК, которые способны к специфическому взаимодействию.

Интересные результаты были получены Беато и сотр. [20, 23] в экспериментах по изучению связываемости частично очищенных рецепторов глюкокортикоидов с хроматином и ДНК печени крыс. Авторами предварительно проводилась частичная очистка рецептора (в 3000 раз) на фосфоцеллюлозе [22]. Этот рецептор имел молекулярный вес, рав-

ный 33500, и не содержал примесей. Он связывался с ДНК, хроматином, а также с его субъединицами—нуклеосомами. Авторы установили, что нуклеосомы хроматина печени крыс и эритроцитов кур связывают равные количества гормон-рецепторного комплекса, хотя известно, что нефракционированный хроматин печени намного эффективнее связывает гормональный рецептор, чем хроматин эритроцитов кур. Следовательно, факторы, ответственные за такое различие в связывании, не расположены на нуклеосомах: они либо находятся на участках генома, не образующих нуклеосомы, либо связаны с высокоорганизованной структурой хроматина [23]. В другой работе этих авторов [20] показано, что связывание комплекса триамкинолон-рецептор с печеночным хроматином и ДНК имеет одинаковую скорость ассоциации и диссоциации, однако способность к связываемости у ДНК в 10 раз выше, чем у интактного хроматина. Авторы заключают, что большинство рецепторных молекул, *in vitro* связывающихся с хроматином, взаимодействует с доступными участками ДНК, и что на фоне такого низкоаффинного связывания возможность обнаружить высокоспецифичные участки связывания в геноме ничтожно мала. На это указывают также работы Ахрема и сотр. [1], изучавших взаимодействие рецептора глюкокортикоидных гормонов из печени крыс с ДНК в двухфазной системе декстран-полиэтиленгликоль. Ненасыщенный характер связывания комплексов гормон-рецептор с ДНК свидетельствует о низкоаффинном взаимодействии, по-видимому, маскирующем специфическое связывание, величина которого несравнимо мала. К аналогичному выводу пришли и мы, изучая связываемость гидрокортизон-рецепторного комплекса с разными группами негистоновых белков, находящихся в комплексе с ДНК [2]. Наши опыты не выявили ни в одной из групп негистоновых белков фракции, предпочтительно связывающейся с гормон-рецепторным комплексом, причем оказалось, что чистая ДНК связывает гораздо больше гормон-рецепторного комплекса, чем разные комплексы ДНК-негистоновый белок. К интересному предположению о роли компонентов хроматина в связывании гормон-рецепторных комплексов приходят в своей работе Смирнов и сотр. [4]. По мнению этих авторов, в ядре имеется, по крайней мере, два типа связывания. Первый тип—присоединение гормон-рецепторного комплекса к активному хроматину, в котором немаловажную роль могут играть белковые компоненты хроматина. Результатом такого присоединения является структурное изменение хроматина, приводящее к выставлению дополнительных участков для последующего, более специфического связывания новых порций гормон-рецепторных комплексов (второй тип). При этом специфичность гормонального эффекта может быть объяснена узнаванием гормон-рецепторного комплекса особых нуклеотидных последовательностей в ДНК [4].

Обобщая приведенные данные, можно заключить, что хотя полностью не раскрыт механизм взаимодействия глюкокортикоидных гормонов с геномом эукариотов, в достаточной мере не выяснена структу-

ра акцепторных участков, важную роль двух компонентов хроматина— ДНК и негистоновых белков в связывании гормон-рецепторных комплексов можно считать доказанной. По всей вероятности, на ДНК имеется большое количество акцепторных участков, связывающих гормон-рецепторные комплексы, однако эта связь низкоаффинная. Возможно, что специфическое связывание также имеет место, однако величина его мала и потому маскируется низкоаффинным связыванием. Высокую специфичность связывания могут обеспечить белковые компоненты хроматина, в частности негистоновые белки, что не всегда удается обнаружить. Возможно, что роль негистоновых белков хроматина в таком связывании выявляется при наличии сложной структуры нуклеопротеидного комплекса хроматина. Всякое нарушение данной структуры может привести к потере способности белков хроматина специфически связываться с гормон-рецепторным комплексом.

Греванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 20.VII 1979 г.

ԲՋՁԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱՊԱՐԱՏԻ ՀԵՏ ԴՆՅՈՒԿՈՆՐՏԻԿՈՒԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋ

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Հոդվածում ի մի են բերված բնիչների կորիզներում գլյուկոկորտիկոիդ հորմոնների ազդեցության մեխանիզմի վերաբերյալ գրականության մեջ եղած բազմաթիվ տվյալները: Հիմնականում ուշադրություն է դարձվում բնի ալկալոստրային հատվածների հետ հորմոն-ռեցեպտորային կոմպլեքսների փոխազդեցությանը, որ հանգեցնում է գենետիկական ապարատի սպեցիֆիկ ակտիվացմանը: Տրվում են ժամանակակից պատկերացումներ այդ փոխազդեցության մեխանիզմի վերաբերյալ:

ON THE MECHANISM OF GLUCOCORTICOID INTERACTION WITH THE GENETIC APPARATUS OF THE CELL

E. S. GEVORKIAN

Literature data on the mechanism of glucocorticoid hormones action in cell nuclei have been summarized. The special attention has been paid to the interaction between the hormone-receptor complexes and cell acceptor sites, that results in specific activation of genetic apparatus. Modern views on the mechanism of this interaction have been cited.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Барай В. Н., Зинченко А. И., Марцев С. П., Чащин В. Л. Биохимия, 43, 7, 1184, 1978.
2. Геворкян Э. С. Вопросы мед. химии, 1980 (в печати).
3. Константинова И. М., Туроверова Л. В., Воробьев В. И. Молек. биол., 12, 4, 879, 1978.

4. Смирнов В. Г., Кирьянов Г. И., Ваньшин Б. Р. Биохимия, 43, 10, 1845, 1978.
5. Abraham A. D., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 297, 142, 1973.
6. Alberga A., Massol N., Raynaud J. P., Baulieu E. E. Biochemistry, 10, 3835, 1971.
7. Anderson K. M., Liao S. Nature New Biol., 219, 277, 1968.
8. Arias F., Warren J. C. Bioch. Bioph. Acta, 230, 550, 1971.
9. Baxter J. D., Rousseau G. G., Benson M. C., Garcea R. L., Ito J., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1892, 1972.
10. Baxter J. D., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 68, 932, 1971.
11. Beato M., Biesewig D., Braendle W., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 192, 494, 1969.
12. Beato M., Braendle W., Biesewig D., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 203, 125, 1970.
13. Beato M., Feigelson P. Journ. Biol. Chem., 247, 7890, 1972.
14. Beato M., Homoki J., Sekeris C. E. Exptl. Cell. Res., 55, 107, 1969.
15. Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Endocrinology, 94, 377, 1974.
16. Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Bioch. Bioph. Res. Comm., 47, 1134, 1972.
17. Beato M., Schmid W., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 263, 764, 1972.
18. Borthwick N. M., Bell Ph. A. FEBS Lett., 60, 2, 393, 1975.
19. Bruchovsky N., Wilson J. D. Biol. Chem., 243, 5953, 1968.
20. Bugany H., Beato M. Mol. Cell Endocrin., 7, 49, 1977.
21. Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L. Biochemistry, 13, 327, 1974.
22. Climent F., Bugany H., Beato M. FEBS Lett., 66, 2, 317, 1976.
23. Climent F., Doenecke D., Beato M. Biochemistry, 16, 21, 4694, 1977.
24. Dahmus M. E., Bonner J. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 1370, 1965.
25. Dastugue B., Defer N., Kruh J. FEBS Lett., 16, 121, 1971.
26. Defer N., Dastugue B., Kruh J. Biochimie, 56, 559, 1974.
27. Defer N., Dastugue B., Kruh J. Biochimie, 56, 1549, 1974.
28. Feigelson P., Beato M., Colman P., Kalimi M., Killewich L. A., Schutz G. Recent Progr. Horm. Res., 31, 213, 1975.
29. Gopalakrishnan T. V., Sadgopal A. Bioch. Bioph. Acta, 287, 164, 1972.
30. Gorski J., Toft D., Shyamala G., Smith D., Notides A. Recent Progr. Horm. Res., 24, 45, 1968.
31. Hamana K., Iwai K. J. Bioch., 83, 1, 279, 1978.
32. Harris S. E. Nature New Biol., 231, 246, 1971.
33. Higgins S. J., Rousseau G. G., Baxter J. D., Tomkins G. M., J. Biol. Chem., 248, 5866, 1973.
34. Higgins S. J., Rousseau G. G., Baxter J. D., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 70, 3415, 1973.
35. Iwai K., Hamana K. J. Ster. Bioch., 5, 349, 1974.
36. Jackson V., Chalkley R. J. Biol. Chem., 249, 1615, 1974.
37. Kalimi M., Beato M., Feigelson P. Biochemistry, 12, 3365, 1973.
38. Karlson P., Sekeris C. E. Acta endocrin., 53, 505, 1966.
39. King R. J. B., Gordon J. Nature New Biol., 240, 185, 1972.
40. King R. J. B., Gordon J., Steggle A. W. Bioch. J., 114, 1969.
41. Koblinsky M., Beato M., Kalimi M., Feigelson P. J. Biol. Chem., 247, 7897, 1972.
42. Konstantinova I. M., Vorobev V. I., Turoverova L. V. Studia Biophysica, Berlin, band 67, 127, 1978.
43. Kruch J., Defer N., Dastugue B., Tichonicky L. Cell Differ. Microorg. plants and animals, 94, 1977.
44. Lukacs I., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 134, 85, 1967.
45. Means A. R., Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 56, 1594, 1966.
46. Monder C., Walker M. C. Biochemistry, 9, 2489, 1970.
47. O'Malley B. W., McGuire W. Z., Korenman S. G. Bioch. Bioph. Acta, 145, 204, 1967.
48. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggle A. W. Nature New Biol., 235, 141, 1972.

49. O'Malley B. W., Toft D. O., Sherman M. R. J. Biol. Chem., 246, 1117, 1971.
50. Paul J., Gilmour R. S. J. Molec. Biol., 34, 305, 1963.
51. Puca G. A., Sica V., Nola E. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 979, 1974.
52. Seifart K. H., Sekeris C. E. Eur. J. Bioch., 7, 408, 1969.
53. Sekeris C. E. Bioch. J., 124, 5, 43p, 1971.
54. Sekeris C. E., Homoki J., Beato M., Gallwitz D., Seifart K. H., Lukacs I. Jr.,
Advances in the Biosciences, 2, 222, N. Y., Pergamon Press, 1968.
55. Shelton K. R., Alfrey V. G. Nature, 228, 132, 1970.
56. Sherman M. R., Corvol P. L., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 245, 6085, 1970.
57. Sluyser M. Bioch. Bioph. Acta, 182, 235, 1969.
58. Sluyser M. Bioch. J., 130, 49—50p, 1972.
59. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 246, 4188, 1971
60. Spelsberg T. C., Steggles A. W., Chytil F., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 247,
5, 1368, 1972.
61. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. I. Science, 183, 817, 1974.
62. Trachewsky D., Segal S. J. Eur. J. Bioch., 4, 279, 1968.
63. Vorobev V. I., Konstantinova I. M. FEBS Lett., 21, 169, 1972.
64. Yamamoto K. R., Alberts B. M. Proc. Nat. Acad. Sci, 49, 69, 2105, 1972.

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, С. Л. МКРТЧЯН

Исследовалась интенсивность сигналов ЭПР митохондрий печени крыс после воздействия электростатического поля.

Показано, что воздействие электростатического поля приводит к понижению концентрации свободных радикалов в митохондриях.

В наших предыдущих сообщениях [7, 8] было показано определенное влияние электростатического поля (ЭСП) на процессы энергетического обмена в митохондриях. В частности, было установлено, что ЭСП тормозит скорость переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий без существенного нарушения их АТФ-синтезирующей функции. При тех же экспозициях поля (суточной и недельной) активность сукцинатдегидрогеназы и сукцинатцитохром-с-редуктазы также оказывалась ниже контрольного уровня.

Одним из важных показателей, характеризующих функциональное состояние митохондрий, является концентрация в них стабильных свободных радикалов с g-фактором, близким к g-фактору неспаренного электрона, обнаруживаемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Работами ряда исследователей [1, 2, 10] было доказано, что уровень свободнорадикальной активности в митохондриях зависит от таких важных процессов, как перенос электронов, изменяющий окислительно-восстановительное состояние переносчиков дыхательной цепи, от активности отдельных ее участков, а также АТФ-синтезирующей системы.

Таким образом, изучение интенсивности сигналов ЭПР в митохондриях после воздействия ЭСП поможет нам полнее представить себе механизмы нарушений энергетического обмена, обнаруженные нами ранее.

Материал и методика. Эксперименты проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 150—180 г. Животные подвергались воздействию ЭСП, напряженностью 2000 в/см, продолжительностью в один час, сутки и неделю по 6 ч. в день. Электростатическое поле создавалось при помощи установки конденсаторного типа со строго контролируемым электрическими параметрами.

Во избежание влияния циркадных ритмов опыты проводились в одно и то же время суток.

Митохондрии печени крыс извлекались по известной методике [9]. Сразу после выделения определенное количество осадка митохондрий помещалось в специальную.

форму, которая погружалась в жидкий азот [5]. Получаемая таким образом таблетка служила образцом для измерения на ЭПР-спектрометре типа ЭПР-В X-диапазона с частотой модуляции 100 кГц при температуре паров жидкого азота. Внутренним стандартом служил поликристаллический MgO с микропримесью Mn²⁺. Стандарт помещался в специальный держатель и постоянно находился в резонаторе радиоспектрометра. Сигнал ЭПР исследуемых свободных радикалов записывался между третьей и четвертой линиями сверхтонкой структуры стандарта. Концентрация свободных радикалов в образцах выражалась в относительных единицах, вычисляемых по фор-

муле $A = \frac{I_1 \cdot I_3}{I_2 \cdot c}$, где A—концентрация свободных радикалов в относительных единицах; I_1 —амплитуда сигнала ЭПР образца в мм; I_2 —амплитуда сигнала ЭПР 3-й линии эталона в мм; I_3 —амплитуда сигнала ЭПР 4-й линии эталона в мм; c—количество белка в каждом образце в мг, определяемое по Лоури.

Полученные результаты обрабатывались статистически с применением критерия достоверности Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Замороженные суспензии митохондрий печени интактных крыс дают сигнал ЭПР, представленный на рисунке. Этот сигнал имеет g-фактор $= 2,005 \pm 0,004$, расстояние между точками наклона равно $12,38 \pm 3,0$ э. Амплитуда сигналов устойчива и не изменялась даже после хранения образцов в жидком азоте в течение нескольких суток.

Величины сигналов ЭПР митохондрий после воздействия ЭСП приведены в таблице. Прежде всего надо отметить, что при всех исследуе-

Таблица

Амплитуда сигналов ЭПР замороженных митохондрий после воздействия ЭСП (в относительных единицах)

Контроль	Часовое воздействие	Суточное воздействие	6—суточное воздействие
8,80	10,56	7,29	5,50
11,21	6,59	4,81	11,45
13,74	7,78	5,85	8,45
13,69	5,73	4,80	8,68
7,61	7,84	8,70	11,90
10,62	13,83	4,42	7,66
10,66	19,95	4,68	6,61
12,65	5,63	4,01	6,07
14,75	11,91	3,13	9,84
13,54	9,24	9,79	5,67
22,70	13,26	4,99	11,20
14,9		8,10	
7,34			
13,71			
7,85			
n 15	11	12	11
M _{ср} 12,26	10,21	5,88	8,46
σ 3,94	4,32	2,11	2,40
m 1,02	1,30	0,61	0,72
t —	1,34	5,31	3,04

мых экспозициях ЭСП выявлена качественно однородная реакция со стороны уровня свободнорадикальных центров митохондрий—снижение их количества. Однако это снижение имело свои особенности при раз-

личных экспозициях. Так, если после часовой экспозиции ЭСП уменьшение амплитуды сигнала было статистически недостоверным, то суточная экспозиция поля уменьшила величину сигнала почти в два раза. Аналогичные изменения наблюдались после недельной экспозиции, хотя и в меньших масштабах, чем после суточной.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшие изменения сигнал ЭПР претерпевает после суточной экспозиции поля. Эти данные хорошо коррелируют с результатами наших предыдущих исследований [7, 8], когда максимальные изменения энергетического аппарата митохондрий также наблюдались после суточного воздействия ЭСП. Это еще раз подтверждает наличие тесной взаимосвязи между продолжительностью действия ЭСП и функциональным состоянием митохондрий. Несколько меньший эффект длительного воздействия ЭСП, очевидно, можно объяснить включением определенных адаптационных механизмов, не успевающих сработать при более кратковременных воздействиях.

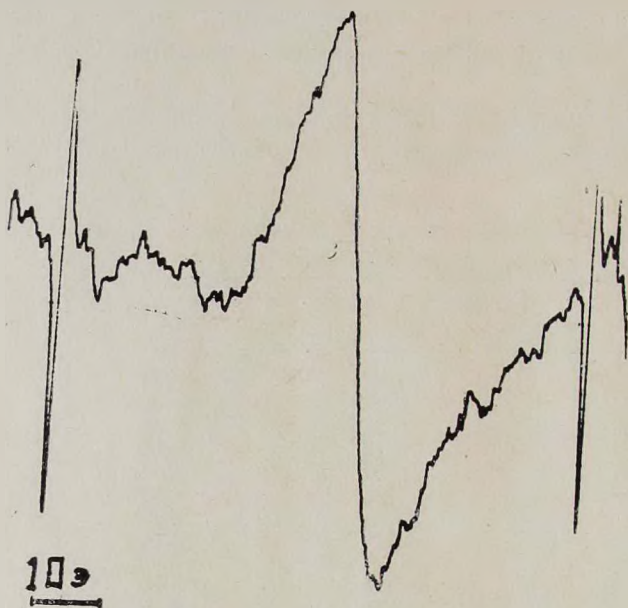


Рис. Сигнал ЭПР митохондрий печени крыс

Согласно современным представлениям о природе стабильных свободных радикалов в митохондриях с g -фактором 2,004, их подразделяют на два типа: возникающие в результате транспорта электронов по дыхательной цепи и образующиеся в ходе АТФ-синтетазной реакции [6]. В первом случае это скорее всего семихиноны флавиновых коэнзимов и коэнзима Q_{10} , т. е. переносчиков, локализующихся на начальных участках электронтранспортной цепи. И понятно, что блокировка этих участков (особенно сукцинатдегидрогеназы) ведет к уменьшению концентрации свободных радикалов вследствие быстрого окисления

семихинонов [1]. Опираясь на наши данные о снижении активности комплекса II—III дыхательной цепи, что, очевидно, является причиной вялости процесса дыхания в митохондриях после воздействия ЭСП [7, 8], можно предположить, что в данном случае происходит именно ингибирование начальных звеньев электронтранспортной цепи, ведущее к уменьшению количества свободных радикалов. Этот эффект может иметь место вследствие возможных структурных перестроек в мембране под действием ЭСП [3], влекущих за собой изменение окислительно-восстановительных потенциалов дыхательных переносчиков, а следовательно, и нарушение равновесной концентрации их семихинонных форм.

Как указывалось, вторым, не менее важным, источником свободных радикалов в митохондриях являются процессы синтеза АТФ. Не исключено, что замедление этих процессов после действия ЭСП играет определенную роль в снижении свободнорадикальной активности митохондрий, тем более что ЭСП является отрицательным модулятором не только свободного окисления, но и активного дыхания [7]. Однако вклад этого процесса в механизм вышеописанных изменений сигнала ЭПР представляется нам незначительным, вследствие того, что настоящие исследования велись в первом метаболическом состоянии по Чансу, т. е. в отсутствие экзогенных субстратов и акцепторов фосфата. А так как интактные митохондрии печени крыс все-таки богаты эндогенными субстратами, то наблюдаемый сигнал ЭПР скорее относится к электропереносящей системе (а не АТФ-синтезирующей), в которой, очевидно, и происходят наибольшие изменения при воздействии ЭСП.

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

Поступило 13.VI 1979 г.

ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻ ԱԶՍՏ ԹԱԴԻԿԱԼԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ԱՐՏՐՈՒՆԻ, Ս. Լ. ՄԿՐՏՉԱՆ

Հետազոտվել է առնետների լյարդի միտոքոնդրիաների էՊՐ ազդանշանի ինտենսիվությունը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո: Ցույց է տրված, որ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը հանգեցնում է ազատ ռադիկալների կոնցենտրացիայի իջեցմանը միտոքոնդրիաներում:

FREERADICAL ACTIVITY OF MITOCHONDRION AFTER THE ELECTROSTATIC FIELD EFFECT

G. G. ARTSRUNY, S. I. MKRTCHIAN

The intensity of electronic paramagnetic resonance signal of rat liver mitochondrion after the effect of electrostatic field has been studied. It has been shown that the effect of electrostatic field leads to the decrease of free radical concentration in mitochondrion.

1. Бржевская О. Н., Каюшин Л. П., Кондрашова М. Н., Неделина О. С., Шекшеев Э. М. Биофизика, 11, 6, 1076, 1966.
2. Бржевская О. Н., Неделина О. С., Шекшеев Э. М., Маринов Б. С., Кондрашова М. Н., Каюшин Л. П. Биофизика, 12, 839, 1967.
3. Гольдштейн Н. И. В кн.: Проблемы клинической биофизики. 10, Рига, 1977.
4. Калмансон А. Э., Чумаков В. М. В кн.: Механизмы дыхания, фотосинтез и фиксация азота. М., 1967.
5. Коваленко О. А., Анфалова Т. В., Соколов В. С., Чибыркин В. М. Биофизика, 16, 4, 663, 1971.
6. Козлов Ю. Г. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. 34, М., 1973.
7. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 750, 1978.
8. Мкртчян С. Л. Биолог. ж. Армении, 32, 2, 1979.
9. Мосолова И. М., Горская И. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии, 45, М., 1975.
10. Commoner B., Townsend J., Pake A. Nature, 174, 689, 1954.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОЛИЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, Р. С. ОВСЕПЯН, Г. С. ПЕПАНЯН

Изучено действие различных экспозиций электростатического поля на протеолиз в печени белых беспородных крыс. Выявлено, что воздействие электростатического поля приводит к угнетению этого процесса.

Имеющиеся в литературе данные о влиянии электростатического поля (ЭСП) на биообъекты свидетельствуют о его высокой биологической активности. Рядом авторов [4, 5, 8, 13] было показано, что воздействие ЭСП приводит к интенсификации окислительно-восстановительных процессов, находящихся в норме в стационарном равновесии с неокислительными процессами. Естественно было предположить, что изменения в окислительно-восстановительном звене, происходящие под влиянием ЭСП, могут привести к соответствующим сдвигам и в неокислительных процессах, в частности, протеолизе.

В доступной нам литературе мы не встречали работ по воздействию ЭСП на протеолитические реакции, являющиеся четкими индикаторами, сигнализирующими об изменении обмена веществ [7, 11].

Задачей данной работы было исследование протеолиза в печени белых беспородных крыс в различные сроки после воздействия электростатических полей.

Материал и методика. ЭСП создавалось при помощи установки конденсаторного типа со строго регулируемым параметрами поля, подробное описание которой дано в наших предыдущих работах [1, 3].

Объектом исследования служила печень белых беспородных крыс-самцов массой 150—170 г, подвергшихся воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы по 50 крыс в каждой. Длительность воздействия ЭСП составляла в I группе час, во II—24 ч., в III—6 дней по 6 ч. в день. В каждой группе имелось по 10 контрольных интактных животных.

Сразу после воздействий, а также через 1, 4, 7 и 14 суток животные забивались декапитацией. Извлеченная печень промывалась дистиллированной водой и гомогенизировалась в четырехкратном объеме физиологического раствора. В полученных гомогенатах протеолитические реакции исследовались сразу же и каждый час (1—6) в процессе инкубирования гомогенатов в термостате при 37°. Контрольные пробы обрабатывались аналогично.

Интенсивность протеолиза оценивалась по нарастанию количества азота свободных аминокислот в инкубируемых гомогенатах печени, определение которого производилось по колориметрическому методу Жема и Кокинга [12], где интенсивность протеолиза выражается в единицах оптической плотности раствора в пробах. Воз-

растание последней строго пропорционально увеличению содержания аминокислот. Вычисление количества аминокислот в мг¹⁰⁰ производилось при помощи калибровочной кривой, полученной на растворе β-аланина.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты наших исследований, после воздействия ЭСП происходят выраженные сдвиги в реакциях протеолиза в сторону их подавления. Согласно данным табл. 1, сразу после часового воздействия ЭСП количество аминокислот как *in vivo* (в первой неинкубированной пробе), так и *in vitro* (в процессе инкубирования) достоверно снижается. Через сутки оно в исходной пробе все еще ниже контроля, но в последующих пробах достоверных различий уже не выявляется. В последующие сроки исследований (4, 7 и 12 дней) как *in vivo*, так и *in vitro* существенных различий в протеолизе между контролем и опытом при часовой экспозиции не наблюдается.

Наиболее резкие изменения в протеолизе выявляются при суточной и шестидневной экспозиции. Как видно из табл. 2, при суточной экспозиции поля глубокое угнетение протеолитических реакций происходит уже сразу же после воздействия. Исходное количество аминокислот в печени подопытных крыс более чем в 2 раза меньше контрольного, что свидетельствует о подавлении протеолиза *in vivo*. При инкубации этих проб в термостате нарастание аминокислот происходит почти с такой же скоростью, что и в контроле, хотя количество его в пробах намного меньше контрольного уровня.

Иная картина наблюдается через день после суточной экспозиции. Исходное количество аминокислот не только уменьшается, но и наглядно снижается скорость распада белка *in vitro*.

Через 4 дня протеолиз *in vivo* почти восстанавливается до нормы, но *in vitro* все еще отмечается резкое торможение его. Спустя 7 дней после действия ЭСП происходит повторное снижение как интенсивности, так и скорости распада белка, а через 14 дней протеолиз в печени опытных крыс приближается к контрольному уровню.

При 6-дневной экспозиции поля (табл. 3) происходят аналогичные сдвиги, с той лишь разницей, что на 7-е сутки торможение протеолиза наблюдается только при инкубации проб, а в исходной пробе количество аминокислот не отличается от контроля.

Более резкие изменения при суточном воздействии по сравнению с 6-дневной дробной экспозицией, по всей видимости, являются следствием адаптационных возможностей организма к ЭСП, о чем свидетельствуют работы ряда авторов [4, 13]. Повторное торможение протеолиза на 7-е сутки после воздействия ЭСП можно объяснить неоднородной по времени ответной реакцией организма на данное воздействие. Аналогичные выбросы эффектов ЭСП отмечаются и в других наших работах [4, 6]. Полученное же нами расхождение в результатах изучения протеолиза *in vivo* и *in vitro*, на наш взгляд, есть следствие работы компенсаторных механизмов целостного организма. Динамика изменений протеолиза после воздействия ЭСП хорошо коррелирует со сдви-

Таблица 1

Протеолиз в печени крыс после часовой экспозиции ЭСП

Сроки после воздействия ЭСП, дни	Число животных	Количество аммиазота, мг %						
		до инку- бации	продолжительность инкубации, часы					
			1	2	3	4	5	6
Контроль	10	6,4 $\pm$ 0,29	7,4 $\pm$ 0,16	8,4 $\pm$ 0,07	10,0 $\pm$ 0,29	12,2 $\pm$ 0,6	14,6 $\pm$ 0,5	16,95 $\pm$ 0,3
Сразу	10	5,0 $\pm$ 0,35	6,4 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,08	8,4 $\pm$ 0,33	11,2 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 0,5
		t=3,1	t=4	t=16	t=4	t=1,4	t=4,5	t=3,7
1	10	5,0 $\pm$ 0,25	6,8 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,4	10,4 $\pm$ 0,3	11,8 $\pm$ 2,3	16,6 $\pm$ 1,3
		t=3,5	t=1,2	t=1,8	t=0,4	t=2,6	t=0,5	t=0,3
4	10	7,0 $\pm$ 0,15	8,4 $\pm$ 0,07	9,8 $\pm$ 0,4	11,2 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,43	13,4 $\pm$ 0,5	16,8 $\pm$ 0,24
		t=1,8	t=6	t=3,4	t=2	t=2,4	t=2,4	t=1
7	10	6,6 $\pm$ 0,3	7,35 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,07	8,6 $\pm$ 0,1	9,8 $\pm$ 0,15	12,8 $\pm$ 0,6	16,2 $\pm$ 1,3
		t=0,5	t=0,3	t=2	t=4,5	t=5,5	t=2,25	t=0,6
14	10	7,0 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,1	12,45 $\pm$ 0,9	13,4 $\pm$ 0,2	13,4 $\pm$ 0,15	14,0 $\pm$ 0,12	16,8 $\pm$ 0,28
		t=1	t=0,6	t=4,4	t=9,7	t=2	t=1,2	t=0,4

Таблица 2

Протеолиз в печени крыс после суточной экспозиции ЭСП

Сроки после воздействия ЭСП, дни	Число животных	Количество аминокислот, мг %						
		до инку- бации	продолжительность инкубации, часы					
			1	2	3	4	5	6
Контроль	10	6,4 $\pm$ 0,29	7,4 $\pm$ 0,16	8,4 $\pm$ 0,07	10,0 $\pm$ 0,29	12,2 $\pm$ 0,6	14,6 $\pm$ 0,5	16,95 $\pm$ 0,32
Сразу	10	2,8 $\pm$ 0,06 t=12	4,2 $\pm$ 0,23 t=12	5,0 $\pm$ 0,3 t=10,9	5,4 $\pm$ 0,4 t=9	6,8 $\pm$ 0,3 t=8	7,4 $\pm$ 0,09 t=14	8,4 $\pm$ 0,7 t=11
1	10	3,2 $\pm$ 0,33 t=7,3	5,8 $\pm$ 0,43 t=3,5	6,2 $\pm$ 0,51 t=4,3	6,8 $\pm$ 0,6 t=4,8	8,2 $\pm$ 0,85 t=3,8	8,8 $\pm$ 0,4 t=9	10,0 $\pm$ 0,9 t=7,2
4	10	5,8 $\pm$ 0,3 t=1,4	6,2 $\pm$ 0,22 t=4,4	6,8 $\pm$ 0,15 t=9,4	7,8 $\pm$ 0,3 t=5	8,2 $\pm$ 0,4 t=2,8	9,2 $\pm$ 0,35 t=9	10,8 $\pm$ 0,2 t=16
7	10	4,8 $\pm$ 0,2 t=4,2	5,8 $\pm$ 0,4 t=3,8	6,4 $\pm$ 0,21 t=9	7,4 $\pm$ 0,3 t=6	8,9 $\pm$ 0,15 t=5,3	11,2 $\pm$ 0,23 t=6	11,8 $\pm$ 0,3 t=11,7
14	10	6,2 $\pm$ 0,15 t=0,7	6,8 $\pm$ 0,15 t=2,7	7,6 $\pm$ 0,5 t=1,6	8,4 $\pm$ 0,52 t=2,7	9,4 $\pm$ 0,6 t=3,3	9,8 $\pm$ 0,6 t=9,6	12,2 $\pm$ 0,05 t=7

Протеолиз в печени крыс после 6-дневной дробной экспозиции ЭСП

Сроки после воздействия ЭСП, дни	Число животных	Количество аминокислот, мг %						
		до инку- бации	продолжительность инкубации, часы					
			1	2	3	4	5	6
Контроль	10	$6,4 \pm 0,29$	$7,4 \pm 0,16$	$8,4 \pm 0,07$	$10,0 \pm 0,29$	$12,2 \pm 0,6$	$14,6 \pm 0,5$	$16,95 \pm 0,32$
Сразу	10	$2,7 \pm 0,22$ $t = 10$	$4,8 \pm 0,13$ $t = 13$	$6,0 \pm 0,17$ $t = 13$	$7,2 \pm 0,11$ $t = 9$	$7,8 \pm 0,4$ $t = 6$	$10,4 \pm 0,24$ $t = 8$	$12,5 \pm 0,22$ $t = 11,5$
1	10	$5,0 \pm 0,1$ $t = 4$	$6,2 \pm 0,22$ $t = 4,4$	$7,2 \pm 0,22$ $t = 5$	$8,4 \pm 0,25$ $t = 1,6$	$9,8 \pm 0,15$ $t = 4$	$12,0 \pm 0,28$ $t = 4,6$	$13,3 \pm 0,6$ $t = 8$
4	10	$5,6 \pm 0,35$ $t = 1,8$	$6,4 \pm 0,27$ $t = 3$	$7,8 \pm 0,15$ $t = 3,5$	$9,1 \pm 0,22$ $t = 2,7$	$10,8 \pm 0,3$ $t = 2$	$13,4 \pm 0,5$ $t = 4$	$14,0 \pm 0,2$ $t = 7$
7	10	$6,4 \pm 0,16$ $t = 0$	$6,6 \pm 0,12$ $t = 4$	$6,8 \pm 0,23$ $t = 7$	$7,4 \pm 0,7$ $t = 3,4$	$9,0 \pm 0,3$ $t = 4,6$	$10,8 \pm 0,3$ $t = 6$	$12,8 \pm 0,14$ $t = 12,6$
14	10	$6,0 \pm 0,4$ $t = 0,9$	$6,1 \pm 0,2$ $t = 5$	$8,0 \pm 0,3$ $t = 1$	$9,9 \pm 0,2$ $t = 0,3$	$11,4 \pm 0,15$ $t = 1,3$	$12,4 \pm 0,09$ $t = 4,4$	$14,4 \pm 0,05$ $t = 8$

гами в окислительных процессах, выявленными в предыдущей нашей работе [4].

Говорить о конкретных механизмах воздействия ЭСП на процессы протеолиза на данном этапе исследований не представляется возможным. Однако можно выдвинуть следующие предположения: сдвиги в интенсивности распада белков связаны или с изменением проницаемости лизосомальных мембран, или с нарушением конформации протеолитических ферментов. О возможностях непосредственного влияния ЭСП на биологические макромолекулы свидетельствуют данные ряда работ [2, 9, 10, 14]. Не исключено, что оба эти механизма действуют одновременно или один из них превалирует.

Несомненным остается факт, что воздействие ЭСП приводит к подавлению протеолиза в печени подопытных животных. Степень же угнетения и время восстановления зависят от экспозиции ЭСП.

Ереванский медицинский институт. ЦНИЛ,
лаборатория биофизики и молекулярной биологии

Поступило 24.I 1979 г.

ՊՐՈԹԵՈԼԻԶԻ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴՈՒՄ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ԱՐՄՐՈՒՆԻ, Ռ. Ս. ՆՈՎՍԵՓՅԱՆ, Գ. Ս. ՊԵՊԱՆԻԱՆ

Ուսումնասիրվել է էլեկտրաստատիկ դաշտի տարբեր էքսպոզիցիաների ազդեցությունը սպիտակ առնետների լյարդի սլոթենոլիտիկ պրոցեսների վրա: Ցույց է տրվում, որ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությամբ տեղի է ունենում պրոթեոլիզի ընկճում, որի ստորիճանն ու վերականգնման ժամանակը կախված են դաշտի էքսպոզիցիայից:

THE DYNAMICS OF PROTEOLYSIS CHANGES IN RAT LIVER AFTER THE EFFECT OF ELECTROSTATIC FIELD

G. G. ARTSRUNY, R. S. OVSEPIAN, G. S. PEPANIAN

The influence of electrostatic field at different expositions on the proteolytic processes in rat liver have been studied. It has been established that after the effect of electrostatic field the depression of proteolysis in rat liver takes place.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арцруни Г. Г. Мат-лы научн. конф. мол. уч., посвящ. XXV съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.
2. Арцруни Г. Г., Вардапетян Р. Р. Тез. докл. мол. уч. по органическому синтезу и биоорганической химии, посвящ. XXV съезду КПСС, 70, Ереван, 1976.
3. Арцруни Г. Г., Ромаков Г. В., Кутузов А. Д. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 435, 1973.
4. Арцруни Г. Г., Тер-Маркосян А. С. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 739, 1978.
5. Катрушенко А. Г. Канд. дисс., Л., 1968.

6. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биолог. ж. Армении. 31, 7, 750, 1978.
7. Шведова В. Н., Фирсова В. И. Тр. ЛХФИ, 20, 2, 54, 1967.
8. Altmann G. Meteorol. geophys. Bioklimatol. ser. Radiat. Research., 17, 263, 1969.
9. Hill T. J. Amer. Chem. Soc., 8, 2142, 1958.
10. Hill T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 111, 1967.
11. Horky J., Placer Z. Wien. z. inn. Med., 46, 12, 1965.
12. Jemm E., Corking E. The analyst, 80, 948, 209, 1955.
13. Möse J., Schug S., Fischer G. Biomed. Techn., 17, 2, 55, 1972.
14. Schwarz C., Joachins S. Biopielapnes, 6, 9, 1263, 1968.

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА УПРУГО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ

Э. Е. МХЕЯН, С. Э. АКОПОВ, О. П. СОЦКИН

Показано, что гликолипиды в значительной степени снижают способность эритроцитов к деформации, повышая при этом их осмотическую стойкость. Холестерин не влияет на пластичность эритроцитов, но препятствует понижаящему пластичность воздействию других факторов.

Как показали исследования последних лет, одним из главных факторов, регулирующих ток крови на уровне микроциркуляции, являются реологические свойства крови [13], в частности деформируемость эритроцитов. Способность к деформации позволяет эритроцитам проходить через узкие просветы капиллярной сети, диаметр которых много меньше среднего диаметра эритроцитов. Показано, что деформируемость эритроцитов значительно изменяется при некоторых формах нарушений кровообращения [12].

Однако не ясны факторы, определяющие пластические свойства эритроцитов. В настоящей работе приведены данные о влиянии липидного состава эритроцитов на способность последних к деформации.

Материал и методика. Эритроциты получали из свежей донорской крови. Отмывая их от кальция производили как это описано в работе Постнова и др. [5], с некоторыми изменениями.

Деформируемость эритроцитов определяли по проходимости последних через фильтр [12] со средним диаметром пор 10 мкм. Мерой способности эритроцитов к деформации служила величина $\Delta = C'/C \cdot 100\%$, где C и C' — соответственно исходное количество и количество эритроцитов, прошедших через фильтр. Концентрацию эритроцитов определяли по методу Кленина и др. [2], а гемолиз эритроцитов — по выходу гемоглобина при инкубации их в гипотоническом растворе NaCl (0,53%) и оценивали величиной $D'/D \cdot 100\%$, где D' и D — оптическая плотность супернатанта при инкубации в 0,53%-ном растворе NaCl и в условиях полного гемолиза соответственно. Ганглиозиды, цереброзиды и сфингомиелин выделяли из мозга людей, погибших от несчастных случаев, соответственно по методам Богоча в нашей модификации [4], Вейса [15] и Кленка [10]. Ганглиозиды вносили в пробу в концентрации 300 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов [9]. Обогащение и обеднение эритроцитов холестерином проводили по методу Бруддорфера [8], обрабатывая их липосомами из лецитина (обеднение) и лецитин-холестерина в отношении 0,5 (обогащение). Цереброзиды и сфингомиелин вносили в пробу в виде озвученной дисперсии в концентрации 300 и 500 мкг/мл соответственно. Липосомы получали по методу Бангема [7]. Наличие или отсутствие синергизма различных эффекторов находили пользуясь соотношениями, приведенными в работе Курганова [3].

Термические конформационные переходы эритроцитарных мембран регистрировали по поглощению 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) [6].

Данные обработаны статистически с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [1].

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1 А, ганглиозиды вызывают определенное понижение деформируемости отмытых от Ca^{2+} эритроцитов в условиях их инкубации в изотоническом буфере, не содержащем CaCl_2 . Аналогичный эффект наблюдается при внесении в пробу цереброзидов и сфингомиелина. Однако, если эффект ганглиозидов значительно усиливается при инкубации эритроцитов в растворе, содержащем CaCl_2 , то эффект цереброзидов и сфингомиелина изменя-

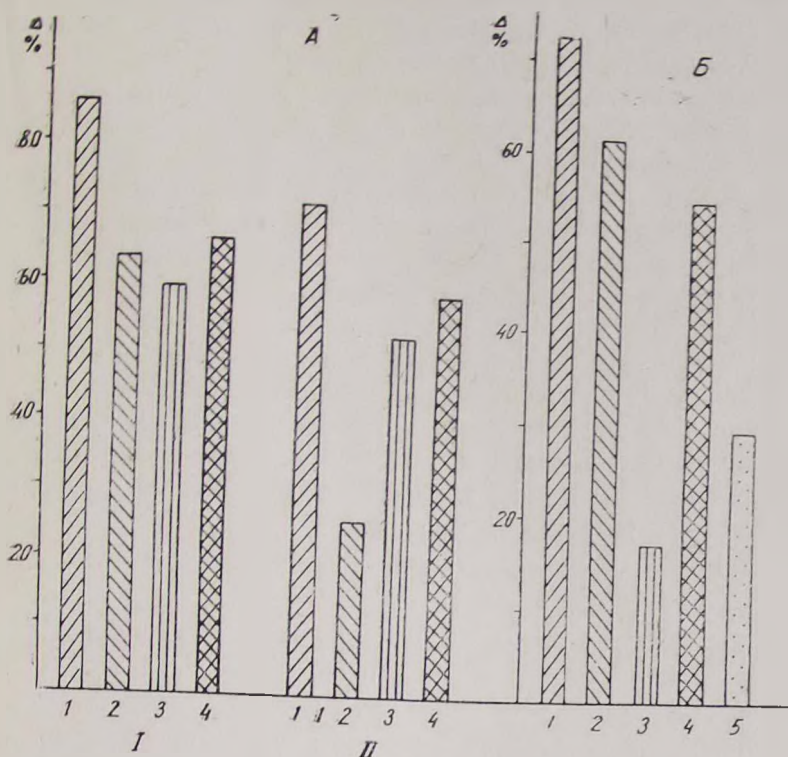


Рис. 1 А—1. Влияние гликолипидов и сфингомиелина на деформируемость эритроцитов при инкубации последних в среде, не содержащей CaCl_2 ; II—в среде, содержащей CaCl_2 . 1—контроль, 2—ганглиозиды, 3—цереброзиды, 4—сфингомиелин. Б—влияние ганглиозидов на эффект серотонина и адреналина. 1—контроль, 2—серотонин ($5 \cdot 10^{-6}$ моль), 3—серотонин+ганглиозиды, 4—адреналин (10^{-5} моль), 5—адреналин+ганглиозиды.

ется незначительно. Известно, что ионы кальция вызывают снижение пластичности эритроцитов [13]. Очевидно, усиление эффекта ганглиозидов в среде, содержащей CaCl_2 , связано с их способностью связывать кальций и увеличивать проницаемость для него эритроцитов. Наблюдаемый эффект гликолипидов и сфингомиелина на деформируемость эритроцитов в отсутствие CaCl_2 , очевидно, связан с их непосредственным воздействием на мембрану, наступающим, вероятно, при внедрении общей для них керамидной части в липидную фазу эритроцитарных мембран.

В последующих экспериментах было обнаружено, что ганглиозиды

способны усиливать подавляющий деформируемость эффект серотонина (рис. 1 Б), при этом наблюдается синергизм совместного действия ганглиозидов и серотонина, связанный, вероятно, со способностью ганглиозидов связывать серотонин. Внедряясь в эритроцитарную мембрану, ганглиозиды способны создавать дополнительные рецепторы для серотонина, увеличивать его связывание и тем самым потенцировать его эффект. В случае же с адреналином, который ганглиозиды не связывают, наблюдается независимое подавление. Что касается цереброзидов и сфингомиэлина, то в обоих случаях имеет место лишь простая суммация эффекта.

Таким образом, ганглиозиды способны как самостоятельно понижать пластичность эритроцитов, так и усиливать подавляющий пластичность эффект других факторов (Ca^{2+} , серотонин).

Иная картина наблюдается в отношении холестерина. Как обогащение, так и обеднение эритроцитов холестерином не приводит к существенным изменениям их деформируемости, что коррелирует с имеющимися в литературе аналогичными данными Рогауша [14]. Однако, не влияя непосредственно на пластичность эритроцитов, холестерин действует на эффекты других факторов, например, подавляет эффект лизолецитина, уменьшающего деформируемость эритроцитов [16].

В наших экспериментах обогащение эритроцитарных мембран холестерином вызывало уменьшение подавляющего деформируемость влияния ганглиозидов, серотонина и адреналина, а обеднение приводило к противоположным результатам (рис. 2).

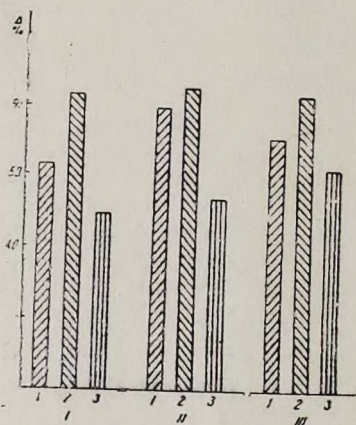


Рис. 2.

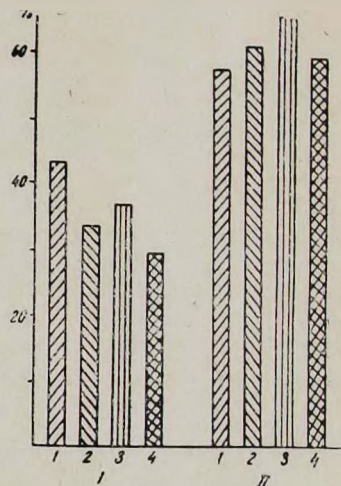


Рис. 3.

Рис. 2. Влияние содержания холестерина в эритроцитарной мембране на эффекты ганглиозидов (I), адреналина (II) и серотонина (III). 1—контроль, 2—эритроциты, обогащенные холестерином, 3—эритроциты, обедненные холестерином.

Рис. 3. I—Влияние ганглиозидов (2), цереброзидов (3) и сфингомиэлина (4) на осмотическую резистентность эритроцитов. II—Влияние ганглиозидов (2, 4) на эффект серотонина (1, 2) и адреналина (3, 4) на осмотическую резистентность эритроцитов.

Влияя на пластичность эритроцитов, ганглиозиды оказывают воздействие и на их осмотическую стойкость. Как следует из рис. 3, они вызывают повышение осмотической стойкости эритроцитов. Аналогичный эффект обнаруживают цереброзиды и сфингомиелин. Серотонин и адреналин снижают осмотическую резистентность эритроцитов, причем при их воздействии на эритроциты, обработанные ганглиозидами, наблюдается некоторое увеличение эффекта серотонина и некоторое уменьшение эффекта адреналина, что, по-видимому, связано с появлением дополнительных рецепторов для серотонина. Холестерин не оказывает существенного влияния на осмотическую стойкость эритроцитов.

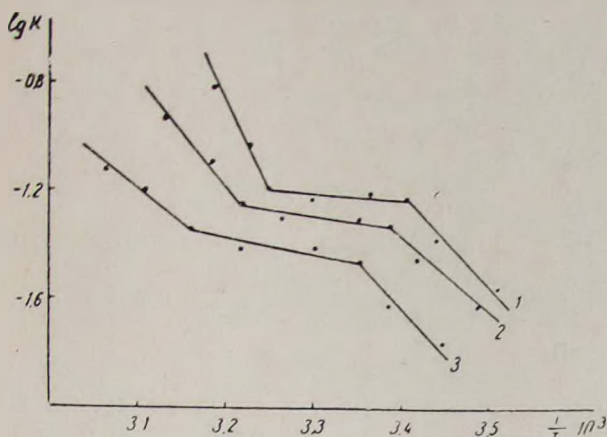


Рис. 4. Графики Аррениуса для константы связывания АНС— эритроцитами. 1—контроль, 2—эритроциты, обработанные ганглиозидами, 3—эритроциты, обработанные холестерином.

Таким образом, ганглиозиды и холестерин оказывают в определенной мере противоположное действие на упруго-механические свойства эритроцитов. Однако обогащение мембран как холестерином, так и ганглиозидами приводит к смещению как высокотемпературного, так и низкотемпературного изломов графиков Аррениуса для поглощения АНС⁻¹ эритроцитами, что свидетельствует о повышении упорядоченности липидной фазы эритроцитарной мембраны (рис. 4). Вероятно, разнонаправленность эффекта ганглиозидов и холестерина на деформируемость эритроцитов опосредуется их влиянием не на липидную, а на белковую фазу эритроцитарных мембран.

Итак, липидный состав мембраны эритроцитов во многом определяет их упруго-механические свойства, что тем более важно, поскольку при многих заболеваниях изменяется липидный состав крови.

Ереванский медицинский институт

Поступило 11.VII 1979 г.

ՀԱՐՊԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՐԻՏՐՈՑԻՏՆԵՐԻ ՄԵՆԱՆԻԿՈ-ԱՌԱՋԳԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Է. Ե. ՄԵՆՅԱՆ, Ս. Է. ԱՎՈՊՈՎ, Օ. Պ ՍՈՅԿԻ

Ցույց է տված, որ դանդաղորդները զգալիորեն թուլացնում են էրիտրոցիտների պլաստիկականությունը, բարձրացնելով օսմոտիկ կայունությունը:

կոլեստերինը չի ազդում էրիտրոցիտների ադեզացիայի ենթարկվելու հատկության վրա, բայց խանգարում է պլաստիկականության իջեցմանը՝ սերիշ ֆակտորների ազդեցությամբ:

THE LIPID INFLUENCE ON THE ELASTIC-MECHANICAL CHARACTERISTICS OF THE ERYTHROCYTES

E. E. MKHEIAN, S. E. AKOPOV, O. P. SOTSKI

It has been shown that glycolipids to a considerable extent decrease the erythrocyte ability to deformation and at the same time increase their osmotic steadfastness. Cholesterin does not influence the deformation ability of the erythrocytes but prevents the elasticity decreasing effect of other factors.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медикобиологических исследованиях. М., 1973.
2. Кленин В. И., Степовик Л. В., Хайруллина А. Б., Чемолосов Ю. В. Биофизика, 23, 658, 1978.
3. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М., 1978.
4. Мхейн Э. Е., Шахбатьян Ш. Л. Вопросы биохимии мозга, 10, 187, Ереван, 1975.
5. Постнов Ю. В., Орлов С. Н., Шевченко А. С. Бюлл. exper. биол., 7, 41, 1977.
6. Черницкий Е. А., Воробей А. В., Конев С. В. Биофизика, 23, 80, 1978.
7. Bangham A. D. In Advances in lipid Research, 1, 96, 1963.
8. Bruckdorfer K. R., Deemel R. A., De Gier J. van Deenen L. Biochim. Biophys. Acta, 183, 334, 1969.
9. Galies R., Schwarzmann G., Radsak K. K., Slegert R., Wiedendt H. Eur. J. Biochem., 80, 425, 1977.
10. Klenk B. Личное сообщение.
11. Ehrly A. M., Köhler H.-J. Vasa, 5, 319, 1976.
12. Ehrly A. M., Rossbach P. Bibl. anat., 11, 55, 1973.
13. Rogausch H. Pflügers Arch., 373, 43, 1978.
14. Rogausch H. Pflügers Arch. 373, 39, 1978.
15. Weis B. J. Biol. Chem., 223, 523, 1973.
16. Fransworth P. N., Piscopo J., Stoil B., Strafford M., Isaguirre E. Proc. 6th Int. Conf. X-Ray Optics and Microanal., Tokyo, 1972.

ЯДРО ООЦИТА В ООГЕНЕЗЕ КОШЕНИЛИ (ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ХРОМОСОМНО-ЯДРЫШКОВОГО АППАРАТА)

Ю. А. МАГАҚЯՆ, С. Р. МАҚАРЯՆ, Л. А. АҚОПЯՆ, А. В. ПЕТРОСЯՆ

Показано, что начиная со II стадии дофолликулярного периода, а именно со стадии лептотены—зипотены, в ядре ооцита формируется тесно связанное с одной из хромосом ядрышко. В течение фолликулярного периода оно значительно увеличивается в размерах, иногда почкуется и к концу оогенеза выбрасывается в ооплазму. Хромосомы вначале сильно конденсированные в бивалентах, затем частично декоонденсируются, образуют сложные переплетения и к концу оогенеза формируют тонкую хроматиновую сеть. Хромосомно-ядрышковый аппарат ооцита кошенили сохраняет высокую активность в течение оогенеза, что несвойственно большинству животных с политрофной структурой овариол и активно функционирующими трофоцитами.

Предыдущими исследованиями было установлено, что оогенез ара-ратской кошенили осуществляется по нутриментарному типу, а овариола имеет политрофное строение [4, 5, 7]. Позже, учитывая особенности строения овариолы кошенили, отличающие его от чисто политрофного, мы сочли возможным классифицировать этот тип строения как «политрофно-фолликулярный» [3]. Вместе с нами к аналогичному выводу пришли Мкртчян и др. [6], назвав, однако, его «фолликулярно-политрофным». Нам представляется все же более удачным первое название, так как строение овариол кошенили и других представителей семейства кокцид имеет значительно больше общих признаков с политрофными овариолами, чем с фолликулами, свойственными большинству позвоночных животных [3, 5, 7]. Важнейшим из этих признаков является наличие трофоцитов, активно участвующих в снабжении ооцита РНК и другими продуктами питания. Высокая интенсивность синтетических процессов в трофоцитах обеспечивается гиперрепликацией ДНК в их ядрах до значений 128—256 с. [3, 4]. Как правило, в этих случаях (т. е. при нутриментарном типе питания ооцита) ядро ооцита либо вообще не принимает участия в процессах накопления запасных веществ ооплазмы, либо проявляет незначительную активность в течение непродолжительного времени в самом начале развития ооцита [1, 2]. Между тем, согласно полученным нами ранее данным [3, 7], в ядре ооцита кошенили отсутствуют признаки подавления активности генома: не формируется кариосфера, имеется увеличивающееся в размерах ядрышко, хромосомы слабо конденсированы, размеры самого ядра значительно возрастают в ходе оогенеза и пр. Все это побудило нас более подробно исследовать поведение хромосомно-ядрышкового аппарата

ядра ооцита кошенили с применением цитоморфологических, количественных цитохимических и радиоавтографических методов.

Данное сообщение посвящено анализу цитоморфологических данных, характеризующих морфо-функциональные изменения в хромосомно-ядрышковом аппарате ядра ооцита в оогенезе кошенили.

Материал и методика. Яичники личинок разного возраста и половозрелых самок кошенили извлекали в 0,75%-ном растворе NaCl, фиксировали в жидкости Буэна или в смеси формалин—этиловый спирт—уксусная кислота (ФСУ; 9:3:1) и готовили парафиновые срезы (5 мкм). Препараты окрашивали азаном по Гейденгайну, железным гематоксилином, фуксином по Фельгену и амидочерным 10 Б [8].

Результаты и обсуждение. Ранее [7] оогенез араратской кошенили был подразделен на два периода: дофолликулярный и фолликулярный. В дофолликулярном выделено две, а в фолликулярном пять стадий. На рис. представлены микрофотографии ядер ооцитов начиная со II стадии дофолликулярного периода.

В течение II стадии дофолликулярного периода оогонии, завершившие 4-й тур гонимальных делений, проходят последовательные фазы мейотических преобразований хромосом (на рис. а, б представлены лишь фазы зиготены и диплотены). Уже со стадии зиготены в ядре ооцита обнаруживается ярко окрашенное небольшое ядрышко, которое (насколько можно об этом судить на уровне светового микроскопа) связано с одной из хромосом (рис. а). К началу I стадии фолликулярного периода хромосомы представлены в виде сильно конденсированных диакинетических бивалентов (мнимая редукция числа хромосом), с одним из которых связано не увеличившееся в размерах, но ярко окрашенное ядрышко (рис. б). В дальнейшем в течение длительного времени связь ядрышка с хромосомой сохраняется, а размеры его все время увеличиваются (рис. в-д и ж-и). При этом диакинетические хромосомы постепенно деконденсируются, удлиняются и образуют сложные переплетения (рис. в-и). Во время пре- и вителлогенеза (стадия III—V) четких фигур диакинетических хромосом уже наблюдать не удастся, хроматин разрыхляется и образует сеть из тонких нитей (рис. к-м и р-т). Деконденсированное состояние хроматина сохраняется вплоть до формирования метафазных хромосом I деления, созревания и исчезновения ядрышка (рис. т). В течение этого времени ядрышко претерпевает существенные преобразования. Чаще всего наблюдается дальнейшее увеличение его размеров (рис. н, п); оставаясь в единственном числе, оно становится огромным и занимает больше половины площади ядра (рис. п). В таких случаях вокруг ядрышка образуются так называемые ядрышкоподобные образования (ЯПО), которые, постепенно увеличиваясь в числе, концентрируются на периферии ядра и выходят в ооплазму. В отличие от ядрышка ЯПО не окрашиваются белковыми красителями, но хорошо выявляются при окраске железным гематоксилином и фуксином по Фельгену (сравни: рис. н, о и п).

В ряде случаев можно наблюдать образование ЯПО в непосредственной близости от ядрышка в виде плотной группы хорошо окрашиваю-

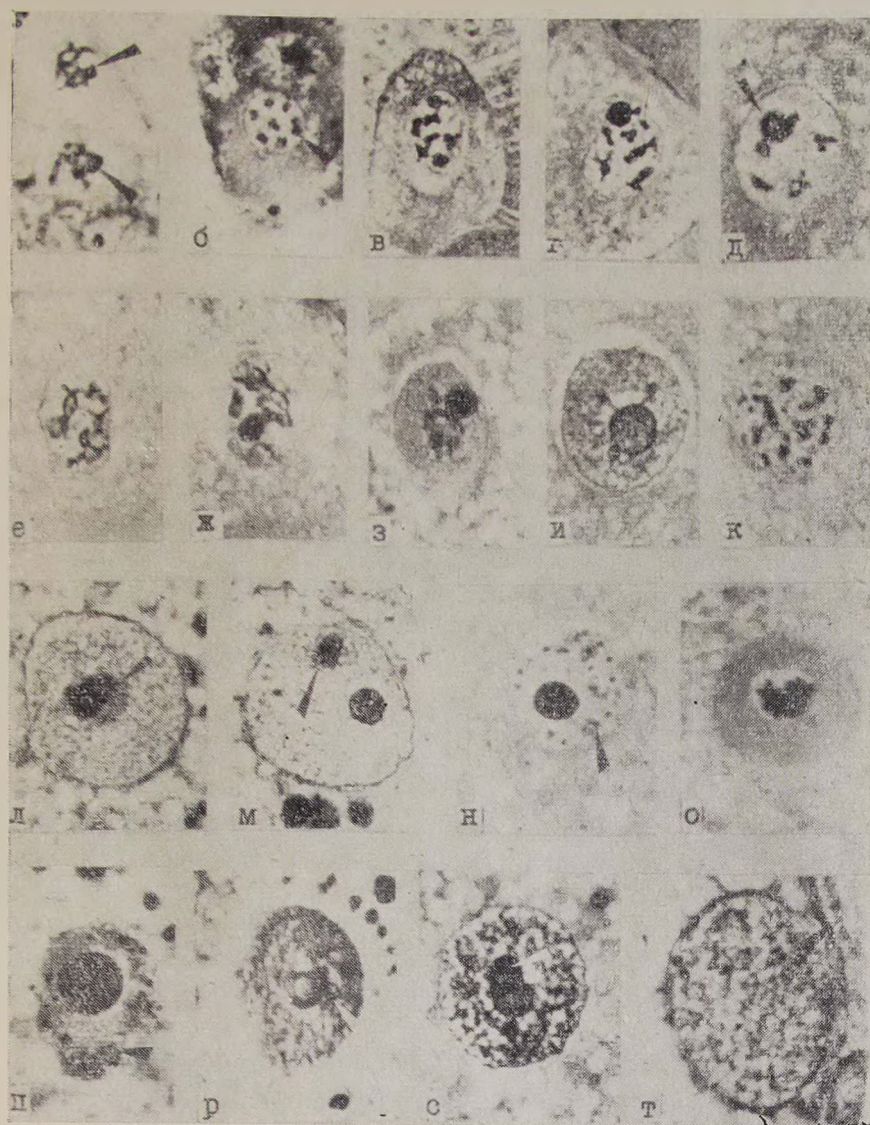


Рис. Изменения в состоянии хромосомно-ядрышкового аппарата ядра ооцита в оогенезе кошенили. а—ядра оогоний на II стадии дофолликулярного периода (зиготена), в ядре видно небольшое ядрышко, связанное с хромосомой (стрелки). б—ядро ооцита в начале I стадии фолликулярного периода, диплонтные биваленты, небольшое ядрышко, связанное с хромосомой (стрелка). в—д—то же на II (в) и III (г, д) стадиях, увеличение размеров связанного с хромосомой ядрышка, постепенная деконденсация хроматина. е—к—то же в начале (е, ж) и в конце (з-к) IV стадии, диакинез, деконденсация хроматина, связанное с хромосомой ядрышко продолжает увеличиваться в размерах. л-т—то же в начале (л, о) и в конце (д, м, п-т) V стадии, еще большее увеличение размеров ядрышка формирование ЯПО (н, п, стрелки), выделение гранул ЯПО из ядрышка (л, стрелка) и передвижение группы ЯПО к периферии ядра (м, стрелка), почкование (р, стрелки) и деление (с) ядрышка, хроматин в виде тонкой сети (л-н, п-т), ядро ооцита расположено вблизи фолликулярных клеток (т, стрелки). Окраска: а, в, г, д, и, л, с, т—железным гематоксилином; б, м—азаном; е-з, к, н, п, р—железным гематоксилином и фуксином по Фельгену; о—амидочерным

10 Б. Увел.: а—об. 100X, ок. 10X; б—т—об. 100X, ок. 8X.

щихся телец (рис. л), которые впоследствии, оставаясь сгруппированными в виде плотной массы, передвигаются к периферии ядра (рис. м). Наконец, нередки случаи почкования ядрышка (рис. р) или деления ядрышка на два (рис. с) или три, меньших по размерам.

К концу оогенеза ни ядрышек, ни ЯПО обнаружить не удается (на уровне светового микроскопа), ядро же в это время передвигается к периферии ооплазмы и тесно примыкает к слою фолликулярных клеток, окружающих ооцит (рис. т).

Описанные выше процессы—деконденсация хроматина, образование сначала связанного с хромосомой, а затем отделяющегося от нее ядрышка, длительное существование и значительное увеличение размеров его, почкование и деление ядрышка, образование ЯПО—в совокупности свидетельствуют о весьма вероятной высокой активности хромосомно-ядрышкового аппарата ооцита кошенили.

Известно [2], что у многих животных в ооците функционирует экстрахромосомная ДНК, которая в виде плотного тельца присутствует уже на стадиях лептотены и зиготены профазы мейоза. На стадии пахитены наблюдается вспышка синтеза этой ДНК и тельце значительно увеличивается в объеме, на стадии поздней пахитены и в диплотене начинается деконденсация хроматина, образование «ламповых щеток» и диспергирование экстра-ДНК по ядру.

На этой стадии ооциты вступают в период большого роста, в первую половину которого происходит интенсивный рост ядра и цитоплазмы (цитоплазматический рост). Ламповые щетки и ядрышко достигают максимального развития и активно участвуют в процессах транскрипции. Во вторую половину большого роста (трофоплазматический рост) осуществляется процесс вителлогенеза, в ядре ооцита наблюдается спад синтеза РНК, а хромосомы и ядрышки нередко объединяются в единый комплекс, образуя кариосферу [2]. В конце оогенеза хромосомы ламповые щетки снова конденсируются, сильно укорачиваются; наступает диакинез.

Появление и длительное функционирование ламповых щеток и интенсивно развитого ядрышкового аппарата характерно для ооцитов, не имеющих специализированных питающих клеток (солитарный и фолликулярный типы оогенеза). Там, где имеются трофоциты (нутриментарный тип), например, у кошенили, период существования ламповых щеток обычно сокращен или вообще отсутствует, а ядрышки функционируют либо короткое время, либо не развиваются вовсе, хромосомы же рано формируют кариосферу [2]. Между тем, как можно было видеть из представленного нами материала, хромосомно-ядрышковый аппарат ооцита кошенили сохраняет, по-видимому, высокую активность на протяжении всего оогенеза, несмотря на активное функционирование трофоцитов [4, 7].

Данные световой микроскопии не позволяют с уверенностью говорить об образовании ламповых щеток и структуре ядрышка у кошенили, однако известные литературные сведения разрешают сделать пред-

положение о том, что в ядре ооцита кошенили должен идти интенсивный синтез РНК и, возможно, происходит амплификация ДНК. Эти вопросы представляют большой интерес и будут рассмотрены в следующих сообщениях.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 30 VIII 1979 г.

ՈՐԳԱՆ ԿԱՐՄԵՐԻ ԶՎԱԲԶՋԻ ԿՈՐԻԶԸ ՕՕԳԵՆԵԶՈՒՄ
(ՔՐՈՄՈՍՈՄ-ԿՈՐԻԶԱԿԱՅԻՆ ԱՊԱՐԱՏԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ
ՄՈՐՖՈԼՈԳԻԱՆ)

ՅՈՒ. Հ. ՄԱԳԱԿԻԱՆ, Ս. Ռ. ՄԱԿԱՐԻԱՆ, Լ. Հ. ՀԱԿՈՅԱՆ,
Ա. Վ. ՊԵՏՐՈՍԻԱՆ

Ֆիտոմորֆոլոգիական մեթոդներով հետազոտվել է արարատյան որդան կարմրի ձվաբջջի քրոմոսոմ-կորիզակային ապարատը, որի օվարիոլն ունի պոլիտրոֆիկոկուլյար կառուցվածք: Պարզվել է, որ արդեն սկսած մինչ ֆոլիկուլյար ժամանակամիջոցի 2-րդ փուլից, երբ ձվաբջջի քրոմոսոմները ենթարկվում են մեյոտիկ փոփոխությունների, այսինքն լեպտոտենա-գիգոտենա փուլից ձվաբջջի կորիզում ձևավորվում է կորիզակ, որը սերտ կապված է քրոմոսոմներից մեկի հետ: Ֆոլիկուլյար ժամանակաընթացքում կորիզակը զգալիորեն մեծանում է, երբեմն բողբոջվում և օօգենեզի ավարտին դուրս է մղվում օօպլազմա: Քրոմատինը սկզբում խիստ կոնդենսացված է բիվալենտներում, ապա մասամբ դեկոնդենսվում է՝ առաջացնելով բարդ միասյուսվածք և օօգենեզի վերջում ձևավորում է նույր քրոմատինային ցանց:

Համաձայն ստացված տվյալների, որդան կարմրի ձվաբջջի քրոմոսոմ-կորիզակային ապարատը ամբողջ օօգենեզի ընթացքում պահպանում է բարձր ակտիվություն, որը հատկանշական չէ այն կենդանիների մեծ մասին, որոնք ունեն օվարիոլներ պոլիտրոֆ կառուցվածքով և ակտիվ գործող տրոֆոցիտներով:

THE OOCYTE NUCLEUS IN THE OOGENESIS OF COCHINEAL
(FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF CHROMOSOMO-
NUCLEOLAR APPARATUS)

YU. A. MAGAKIAN, S. R. MAKARIAN, L. A. HAKOPIAN,
A. V. PETROSSIAN

The structure and functional state of chromosomo-nucleolar apparatus of oocyte of Ararat cochineal having a polytrophic-follicular structure of ovarioles, have been investigated by cytomorphological methods. It has been shown that beginning from the 11 stage of pre-follicular period, when the oocyte chromosomes undergo meiotic transformation, namely from the leptotene-zygotene, in the oocyte nucleus a nucleolus is formed closely related with one of its chromosomes. During the follicular period its size significantly increases, sometimes is buded and at the end of the oogenesis is thrown into ooplasm. The chromosome at

first is strongly condensed in the bivalents, then partly is decondensed, forming a complicated interlacing and at the end of the oogenesis forms a fine chromatin. According to the data obtained the chromosomal-nucleolar apparatus of the cochineal oocyte maintains the high activity during the oogenesis, which is not peculiar to most animals with polytrophic structure of ovarioles and actively functioning trophocytes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айзеништадт Т. Б. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 5, М., 1977.
2. Грузова М. Н. В кн.: Современные проблемы оогенеза. 51, М., 1977.
3. Магакян Ю. А. Биолог. ж. Армении, 32, 4, 279, 1979.
4. Магакян Ю. А., Каралова Е. М., Хачатрян М. Г. Цитология, 21, 5, 548, 1979.
5. Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Петросян А. В., Мкртчян Л. П., Аброян Л. О., Акопян Л. А. Цитология, 18, 8, 932, 1976.
6. Мкртчян Л. П., Саркисов Р. Н., Саркисян С. М. Биолог. ж. Армении, 32, 3, 204, 1979.
7. Хачатрян М. Г., Акопян Л. А., Петросян А. В., Каралова Е. М., Макарян С. Р., Магакян Ю. А. Цитология, 21, 4, 382, 1979.
8. Geyer G. Acta histochem., 10, 5/8, 286, 1960.

НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ Т-КРИТЕРИЯ И F-КРИТЕРИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Т. Г. ОГАНЯН, Г. Х. КОДКИНД

Приводятся статистики, позволяющие получать новые непараметрические критерии для анализа многоуровневых и многофакторных медико-биологических экспериментов. Предлагаемые методы позволяют проводить анализ, если даже результаты опытов оказываются «испорченными», т. е. когда известные статистические методы применить невозможно.

С помощью предложенных методов решается задача по исследованию чувствительности титрования вирусов гриппа стабилизированными эритроцитами, которая не могла быть решена традиционными методами.

Непараметрические методы применяются в случае нарушения исходных предпосылок дисперсионного и регрессионного анализа (нормальности распределения отклика, однородности дисперсий и т. п.). Непараметрические критерии позволяют проводить анализ с использованием не только количественных определений, но и качественных.

Свободные от распределения, или непараметрические методы, основанные на ранговых критериях, не требуют знания законов распределения, поэтому обладают более широкими возможностями для применения. Их эффективность при проверке гипотез не намного ниже соответствующих параметрических критериев, в случае же «плохих» условий, когда некоторые предпосылки параметрических методов не выполняются, непараметрические критерии имеют ряд преимуществ, благодаря чему эти методы в последние годы получают все большее применение в медико-биологических исследованиях [4, 6, 10, 12, 13].

Пусть имеется многоуровневый факторный план для r -уровневого фактора в s блоках. Значения выходного показателя y_{iv} ранжируются в порядке возрастания непосредственно в каждом блоке. Затем значение y_{iv} , стоящего в ранжированном ряду на R -том месте, заменяется некоторой меткой $a_{Ni}(R_v)$, которую можно задать одним из двух способов:

1. $a_{Ni}(R_v) = R_v$, где R_v — ранг наблюдения,
2. $a_{Ni}(R_v) = E[R_v, N_i]$, где $E[R_v, N_i]$ — так называемая нормальная метка, являющаяся математическим ожиданием R_v -той порядковой статистики выборки объема N_i из нормальной совокупности $N(0, 1)$ [5].

Рассмотрим следующую статистику:

$$L_k = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^p W_j^{ks} a_{Ni} (R_{ij.}) / n_{ij}, \quad (1)$$

где

$a_{N_i} (R_{ij.}) = \sum_{s=1}^{n_{ij}} a_{N_i} (R_{ijs.})$ — сумма меток в i -том блоке при j -том уровне фактора,

$N_i = \sum_{j=1}^p n_{ij}$ — число наблюдений в i -том блоке,

$N_j = \sum_{i=1}^c n_{ij}$ — число наблюдений для j -того уровня фактора,

$N = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^p n_{ij} = \sum_{i=1}^c N_i = \sum_{j=1}^p N_j$ — общее число наблюдений,

n_{ij} — число параллельных наблюдений для j -того уровня фактора в i -том блоке,

k — порядок тренда.

В зависимости от постановки задачи W_j^{ks} может быть задана одним из трех способов:

1. $\tilde{R}_{kj}$ — априорными рангами [7]. Например, для четырехуровневого фактора эти ранги равны:

$k = 1$	$\tilde{R}_{1j} = 1$	2	3	4
$k = 2$	$\tilde{R}_{2j} = 1,5$	3,5	3,5	1,5
$k = 3$	$\tilde{R}_{3j} = 1,5$	3,5	1,5	3,5

или

$k = 1$	$\tilde{R}_{1j} = 4$	3	2	1
$k = 2$	$\tilde{R}_{2j} = 3,5$	1,5	1,5	3,5
$k = 3$	$\tilde{R}_{3j} = 3,5$	1,5	3,5	1,5

Два вида априорных рангов $\tilde{R}_{kj}$ и $\tilde{R}_{kj}^*$ необходимы для того, чтобы проверить гипотезы о наличии составляющих как положительного, так и отрицательного знака.

2. Θ_{kj} — ортогональными полиномами k -того порядка, которые с точностью до констант соответствуют априорным рангам [7]. Значения ортогональных полиномов задаются в виде:

$$\Theta_{kj} = \alpha + \beta x_j + \gamma x_j^2 + \dots + \eta x_j^k,$$

где $x = 0, 1, 2, \dots, (p-1)$; $k = 1, 2, \dots, (p-1)$, константы $\alpha, \beta, \gamma, \dots, \eta$ определяются из условий ортогональности:

$$\sum \Theta_{kj} = 0; \sum \Theta_{ij} \Theta_{kj} = 0; \dots; \sum \Theta_{k-1, j} \Theta_{kj} = 0.$$

3. T_j^s [3, 6], где

$$T_j^s = \begin{cases} 1, & \text{если рассматривается } s\text{-тый уровень фактора,} \\ 0 & \text{в других случаях.} \end{cases}$$

Статистики типа L_k имеют асимптотически нормальное распределение [8, 10]. Выражения математического ожидания и дисперсии статистики L_k в общем виде запишутся следующим образом:

$$M \{L_k\} = \sum_{j=1}^p W_j^{ks} \sum_{i=1}^c M \{a_{N_i}(R_{ij.})/n_{ij.}\}, \quad (2)$$

$$\begin{aligned} D \{L_k\} &= \sum_{i=1}^c D \left\{ \sum_{j=1}^p W_j^{ks} a_{N_i}(R_{ij.})/n_{ij.} \right\} = \\ &= \sum_{i=1}^c \left[\sum_{j=1}^p (W_j^{ks})^2 D \{a_{N_i}(R_{ij.})/n_{ij.}\} + \right. \\ &\quad \left. + \sum_{1 < j < \tau < p} W_j^{ks} W_{\tau}^{ks} \text{cov} \{a_{N_i}(R_{ij.})/n_{ij.}; a_{N_i}(R_{i\tau.})/n_{i\tau.}\} \right]. \end{aligned} \quad (3)$$

Известно, [2, 9], что;

$$D \{R_{ij.}/n_{ij.}\} = (N_i - n_{ij.})(N_i + 1)/12n_{ij.}, \quad (4)$$

$$\text{cov} \{R_{ij.}/n_{ij.}; R_{i\tau.}/n_{i\tau.}\} = - (N_i + 1)/12, \quad (5)$$

$$D \{E [R_{ij.}, N_i]/n_{ij.}\} = \frac{(N_i - n_{ij.})}{N_i(N_i - 1)n_{ij.}} \sum_{j=1}^p \sum_{\tau=1}^{n_{ij.}} (E [R_{ij\tau.}, N_i])^2, \quad (6)$$

$$\begin{aligned} &\text{cov} \{E [R_{ij.}, N_i]/n_{ij.}; E [R_{i\tau.}, N_i]/n_{i\tau.}\} = \\ &= - \frac{1}{N_i(N_i - 1)} \sum_{j=1}^p \sum_{\tau=1}^{n_{ij.}} (E [R_{ij\tau.}, N_i])^2. \end{aligned} \quad (7)$$

Имеем также

$$M \{E [R_{ij.}, N_i]/n_{ij.}\} = 0, \quad (8)$$

$$\sum_{j=1}^p \theta_{kj} = 0, \quad (9)$$

$$\sum_{1 < j < \tau < p} W_j^{ks} W_{\tau}^{ks} = \left[\left(\sum_{j=1}^p W_j^{ks} \right)^2 - \sum_{j=1}^p (W_j^{ks})^2 \right] / 2. \quad (10)$$

При наличии связанных рангов выражение (4) принимает следующий вид:

$$D \{R_{ij.}/n_{ij.}\} = \frac{(N_i - n_{ij.})(N_i + 1)}{12 n_{ij.}} - \frac{\sum_{l=1}^r (t_l^3 - t_l)}{12 (N_i - 1) n_{ij.}}, \quad (11)$$

где r —число групп с совпавшими наблюдениями, а t_l —число совпадений в группах.

Подставляя (4—11) в (2) и (3), после преобразований получаем значения математических ожиданий и дисперсий статистики L_k при каждом способе ранжирования:

I способ ранжирования

$$\begin{aligned} M\{L_{1k}\} &= \sum_{j=1}^p \tilde{R}_{kj} \sum_{i=1}^c M\{R_{ij}/n_{ij}\} = \\ &= \sum_{j=1}^p \tilde{R}_{kj} \sum_{i=1}^c (N_i + 1)/2 = p(p+1)(N+c)/4, \\ M\{L_{2k}\} &= \sum_{j=1}^p \Theta_{kj} \sum_{i=1}^c M\{R_{ij}/n_{ij}\} = 0, \\ M\{L_{3k}\} &= \sum_{j=1}^p T_j^s \sum_{i=1}^c M\{R_{ij}/n_{ij}\} = \sum_{i=1}^c (N_i + 1)/2, \\ D\{L_{1k}\} &= \sum_{i=1}^c \left[\frac{N_i(N_i+1)}{12} - \frac{\sum_{j=1}^p (t_j^3 - t_j)}{12(N_i-1)} \right] \sum_{j=1}^p \frac{\tilde{R}_{kj}}{n_{ij}} - \\ &- (N+c)(p+1)^2 p^2 / 48, \\ D\{L_{2k}\} &= \sum_{i=1}^c \frac{(N_i+1)N_i}{12} \sum_{j=1}^p \frac{\Theta_{kj}^2}{n_{ij}}, \\ D\{L_{3k}\} &= \sum_{i=1}^c \frac{(N_i+1)N_i}{12} \sum_{j=1}^p \frac{\Theta_{kj}^2}{n_{ij}}. \end{aligned}$$

II способ ранжирования

$$\begin{aligned} M\{L_{1k}\} &= M\{L_{2k}\} = M\{L_{3k}\} = 0, \\ D\{L_{1k}\} &= \sum_{i=1}^c \frac{1}{N_i(N_i-1)} \sum_{j=1}^p \sum_{v=1}^{n_{ij}} (E[R_{ijv}, N_i])^2 \times \\ &\times \left[N_i \sum_{j=1}^p \tilde{R}_{kj}^2 / n_{ij} - p^2(p+1)^2 / 4 \right], \\ D\{L_{2k}\} &= \sum_{i=1}^c \frac{1}{(N_i-1)} \sum_{j=1}^p \Theta_{kj}^2 \sum_{v=1}^{n_{ij}} (E[R_{ijv}, N_i])^2 / n_{ij}, \\ D\{L_{3k}\} &= \sum_{i=1}^c \frac{(N_i - n_{is})}{N_i(N_i-1)n_{is}} \sum_{j=1}^p \sum_{v=1}^{n_{ij}} (E[R_{ijv}, N_i])^2. \end{aligned}$$

Следует отметить, что статистика L_k является непараметрическим аналогом t -критерия Стьюдента. Проверка гипотез сводится к вычислению значений

$$Z_k = \frac{L_k - M\{L_k\}}{[D\{L_k\}]^{1/2}}$$

и сравнению их с критическим значением стандартного нормального распределения для выбранного уровня значимости.

Для получения непараметрического аналога F-критерия рассмотрим случайную величину

$$T_j = \sum_{i=1}^c a_{N_i} (R_{ij}) / n_{ij},$$

имеющую асимптотически нормальное распределение со средним

$$M\{T_j\} = \begin{cases} \frac{N+c}{2}, & \text{при } a_{N_i}(R_{ij}) = R_{ij}, \\ 0, & \text{при } a_{N_i}(R_{ij}) = E[R_{ij}, N_i] \end{cases}$$

и дисперсией

$$D\{T_j\} = \sum_{i=1}^c \frac{S_i}{(N_i-1)} \left[\frac{1}{n_{ij}} - \frac{1}{N_i} \right],$$

где

$$S_i = \sum_{j=1}^{N_i} \left[a_{N_i}(R_{ij}) \right]^2 - \left[\sum_{j=1}^{N_i} a_{N_i}(R_{ij}) \right]^2 / N_i.$$

Тогда статистика

$$\Phi = \sum_{j=1}^p \left| \sum_{i=1}^c a_{N_i}(R_{ij}) / n_{ij} - M\{T_j\} \right|^2 / D\{T_j\}$$

имеет асимптотически распределение χ^2 с $(p-1)$ степенями свободы. Статистика Φ является непараметрическим аналогом F-критерия.

Проверка гипотез сводится к вычислению значений Φ —статистики и сравнению их с критическим значением χ^2 —распределения для выбранного уровня значимости.

Использование преобразования $W_i^{ks} = \Theta_{kj}$ позволяет проводить анализ многоуровневых факторных планов с неравным числом наблюдений для каждой комбинации уровней факторов.

Рассмотрим полный многоуровневый факторный план типа $P_1 \times P_2 \times \dots \times P_m // N$, включающий все $P_1 \times P_2 \times \dots \times P_m = N$ возможные комбинации уровней факторов. Для оценки значимости s -того фактора с P_s уровнями рассчитываются статистики Φ и L_k с $P = P_s$, $c = N/P_s$ (т. е. комбинации уровней остальных факторов рассматриваются как блоки). С помощью статистики Φ определяется значимость фактора, затем по L_k (при $W_i^{ks} = \Theta_{kj}$) проверяются гипотезы о наличии линейного, квадратичного и т. д. тренда и, наконец, по L_k (при $W_i^{ks} = T_j^s$) оценивается достоверность различий отдельных уровней данного фактора.

Проверка взаимодействий факторов $X_1 X_2 \dots X_{s-1} X_{s+1} \dots X_m$ проводится аналогично. При этом

$$P = P_1 P_2 \dots P_{s-1} P_{s+1} \dots P_m,$$

$$C = N/P,$$

$$W_{ij \dots m}^{qp \dots \omega(s)} = \Theta_{qi} \Theta_{nj} \dots \Theta_{\omega m}.$$

Для планов главных эффектов и неполноблочных сбалансированных схем анализ проводится также поочередно по каждому фактору так, как для однофакторной классификации ($c=1$) с предварительной (до ранжирования) корректировкой наблюдений на эффекты остальных факторов или блоков [4].

При использовании $a_{N_i}(R_v) = E\{R_v, N_i\}$ асимптотическая относительная эффективность (АОЭ) рассмотренных критериев:

$$АОЭ \rightarrow 1, \text{ когда } N \rightarrow \infty.$$

При $a_{N_i}(R_v) = R_v$, АОЭ зависит от значений p и c и колеблется в пределах от $(p+1)\pi/4$ до $(p+1)\pi/3$ [10].

Отметим, что предложенные статистики L^k и Φ в зависимости от значений p , c , n_{ij} , W_j^{ks} , k , $a_{N_i}(R_v)$ можно свести к известным критериям, а также получить новые. Рассмотрим наиболее интересные частные случаи, получающиеся из статистик L_k и Φ .

а) При $W_j^{ks} = \tilde{R}_{kj}$ и $W_j^{ks} = \Theta_{kj}$ получаются статистики, позволяющие проверять гипотезу случайности против альтернатив тренда произвольного порядка, которые впервые были предложены в работе Оганяна, Кодкин [7].

Если имеем один блок $c=1$ и $W_j^{ks} = \Theta_{kj}$, то

$$M\{L_{1k}\} = M\{L_{2k}\} = 0,$$

$$D\{L_{1k}\} = \left[\frac{N(N+1)}{12} - \frac{\sum_{i=1}^r (t_i^3 - t_i)}{12N(N-1)} \right] \sum_{j=1}^p \frac{\Theta_{kj}^2}{N_i},$$

$$D\{L_{2k}\} = \frac{1}{(N-1)} \sum_{j=1}^p \Theta_{kj}^2 / N_j \sum_{v=1}^{N_j} (E\{R_{ij^v}, N\})^2.$$

б) При $L_k = L_{1k}$, $a_{N_i}(R_v) = R_v$, $k=1$, $\tilde{R}_{kj} = j$ получается статистика, позволяющая проверять гипотезу случайности против альтернативы линейного тренда, которая была рассмотрена в работе Гетманшпергера [10]. Параметры распределения этой статистики следующие:

$$M\{L_1\} = p(p+1)(N+c)/4,$$

$$D\{L_1\} = \sum_{i=1}^c \frac{(N_i+1)}{12} \left\{ N_i \sum_{j=1}^p \frac{j^2}{n_{ij}} - \frac{p^2(p+1)^2}{4} \right\}.$$

Если результаты представлены одинаковым числом параллельных наблюдений, т. е. $n_{ij} = n$, получим

$$M\{L_1\} = cp(p+1)(np+1)/4,$$

$$D\{L_1\} = cp(p^3-p)(np+1)/144.$$

в) При $W_j^{ks} = \tilde{R}_{kj}$, $c=1$, $a_{N_i}(R_v) = R_v$, $n_{ij}=1$, $p=N$ статистика L_k превращается в ранговый коэффициент корреляции [1].

г) При $W_j^{ks} = \bar{R}_{kj}$, $a_{N_i}(R_j) = R_j$, $n_{ij} = 1$, $c \geq 3$, $p \geq 3$, $k = 1$ статистика L_k эквивалентна критерию Пейджа [11].

д) При $W_j^{ks} = T_j$, $p = 2$, $c = 1$ получаем двухвыборочный критерий сдвига, причем при I способе ранжирования имеем критерий Вилкоксона, а при II — критерий нормальных меток [1].

е) При $W_j^{ks} = T_j$, $p \geq 3$ статистика L_k может применяться для проверки гипотез о существенности уровней фактора [3, 6].

ж) При $p \geq 3$, $c = 1$ статистика Φ превращается в статистику, используемую при однофакторном дисперсионном анализе. Когда $a_{N_i}(R_j) = R_j$, получаем критерий Крускала-Уоллиса, а при $a_{N_i}(R_j) = E[R_j | N_i]$ имеем критерий типа нормальных меток [1, 4].

з) При $p \geq 3$, $n_{ij} = 1$ статистика Φ соответствует статистике критерия для анализа двухфакторных классификаций.

Когда $a_{N_i}(R_j) = R_j$, получаем критерий Фридмана, а при $a_{N_i}(R_j) = E[R_j | N_i]$ имеем критерий нормальных меток для планов типа случайных блоков [1, 4].

Рассмотрим пример применения предложенных методов при исследовании чувствительности титрования вирусов гриппа стабилизированными эритроцитами в реакции прямой гемагглютинации [6].

При изучении влияния изменения рецепторной структуры стабилизированных эритроцитов на их способность к гемагглютинации был реализован полный многоуровневый факторный план $6 \times 6 \times 4 // 144$. В качестве выходного показателя был использован титр вируса гриппа А1 в реакции гемагглютинации. Изучалось влияние следующих факторов: X_1 — вид ингибитора на 6-ти уровнях (физиологический раствор, глюкоза, маноза, фруктоза, лецитин, кефалин), X_2 — тип фермента на 6-ти уровнях (необработанные, трипсин, рибонуклеаза, гиалуронидаза, коллагеназа, лизоцим), X_3 — способ стабилизации эритроцитов на 4-х уровнях (нативные (НЭ), акроленизированные (АЭ), глютаризированные (ГЭ), формалинизированные (ФЭ)) (табл. 1).

В эксперименте в 48-ми из 144-х опытов результат нельзя было представить количественно из-за имевшего место гемолиза эритроцитов или спонтанной агглютинации. Поскольку эти явления свидетельствуют о нестабильности реакции и связаны с действием исследуемых факторов, их необходимо учитывать при анализе. Однако результаты такого эксперимента не поддаются анализу известными методами. Поэтому анализ результатов многоуровневого факторного плана, представленного в табл. 1, был проведен с помощью предложенных статистик, которые позволяют обрабатывать не только количественные результаты опытов, но также полуколичественные и качественные, если существует возможность как-то их упорядочить.

При ранжировании титров гемолиз эритроцитов и спонтанная агглютинация оценивались как наихудшие показатели. Поскольку все факторы качественные, анализ проводился с помощью статистик Φ и L_{3k} . При решении задачи применялся I способ ранжирования.

Результаты эксперимента $6 \times 6 \times 4$ по титрованию вируса гриппа А1
стабилизированными эритроцитами морской свинки

$X_2 X_3$	X_1						T_j
	1	2	3	4	5	6	$(X_2 X_3)$
1 1	8,3	8	8,7	8,3	г	г	71
1 2	9	0	8	3,3	3,3	9	90,5
1 3	9,7	0	3,3	8,3	10	8,3	99,5
1 4	7	7,7	7	7,7	9	7,3	71,5
2 1	8,3	8,7	9	9,3	г	г	83
2 2	8	8,7	8	9,3	8,3	8	97
2 3	7,3	10	9	8	8,7	7,7	99,5
2 4	7,3	7,7	7,7	8	8,3	7	71,5
3 1	г	г	г	г	г	г	13
3 2	с	с	с	с	с	с	37
3 3	с	с	с	с	с	9	53
3 4	9,3	9	9	11	8,7	8	122,5
4 1	9	9	8,3	9	г	г	82
4 2	с	с	с	с	с	8,7	51
4 3	с	с	с	с	с	8	44,5
4 4	9,3	с	с	с	с	8	62
5 1	г	г	г	г	г	г	13
5 2	8,7	9,3	9	5,7	0	8,3	102,5
5 3	с	с	с	6,9	0	8,3	57,5
5 4	8	8	7,7	8,3	0	9	91
6 1	9	9	8,7	9,3	г	г	86,5
6 2	8	8,3	8	9,3	10,3	8,3	107
6 3	8,7	10	8,7	10	9,3	7,7	116,5
6 4	7	8	7,3	8,3	8,7	7,3	77,5
$T_j (X_1)$	79	87,5	76	101,5	80,5	76,5	

Примечание: г—гемолиз эритроцитов, с—спонтанная агглютинация.

При проверке существенности эффекта фактора X_1 имеем

$$a_{N_1}(R_{ij}) = R'_{ij}, \quad N'_i = 6, \quad n'_j = 1, \quad p_1 = 6, \quad c_1 = 24,$$

Расчетные значения статистики

$$T_j(X_1) = \sum_{i=-}^{c_1} R'_{ij}$$

приведены в табл. 1.

Затем вычислялись среднее и дисперсия

$$M \{T_j(X_1)\} = (N + c_1)/2 = 84,$$

$$D \{T_j(X_1)\} = \sum_{i=1}^{c_1} \frac{S_i}{(N_i - 1)} \left[1 - \frac{1}{N_i} \right] = 84.$$

Далее находилось значение Ф-статистики:

$$\Phi(X_1) = \sum_{j=1}^p \left[\sum_{i=1}^{c_1} R'_{ij} - 84 \right]^2 / 84 = [(79-84)^2 + (87,5-84)^2 + \\ + (76-84)^2 + (101,5-84)^2 + (80,5-84)^2 + (79,5-84)^2] / 84 = 5,24.$$

Поскольку расчетное значение Ф-статистики меньше критического

$$\Phi(x_1) = 5,24 < \chi_{0,05}^2(6-1) = 11,07,$$

то нулевая гипотеза не отвергается, т. е. эффект фактора X_1 не оказывает существенного влияния на результативный признак.

При проверке эффекта взаимодействия $X_2 X_3$ имеем $a_{N_{ij}}^*(R_{ij}) = R_{ij}^*$, $N_i^* = 24$, $n_{ij}^* = 1$, $c_{23} = 6$. В табл. 1 приведены расчетные значения статистики:

$$T_j(X_2 X_3) = \sum_{i=1}^{c_{23}} R_{ij}^*.$$

Для среднего и дисперсии получаются следующие значения:

$$M\{T_j(X_2 X_3)\} = (N + c_{23}/2) = 75,$$

$$D\{T_j(X_2 X_3)\} = \sum_{i=1}^{c_{23}} \frac{S_i^*}{(N_i - 1)} \left| 1 - \frac{1}{N_i - 1} \right| = 300.$$

Далее имеем:

$$\Phi(X_2 X_3) = [(71-75)^2 + (90,5-75)^2 + (99,5-75)^2 + \dots + (116,5-75)^2 + (77,5-75)^2] / 300 = 60,45.$$

Поскольку

$$\Phi(X_2 X_3) = 60,45 > \chi_{0,01}^2(24-1) = 41,64,$$

то нулевая гипотеза отвергается, т. е. эффект взаимодействия $X_2 X_3$ существенно влияет на величину титров.

Аналогично был проведен анализ по остальным факторам и взаимодействиям:

$$\Phi(X_2) = 7,96 < \chi_{0,05}^2(6-1) = 11,07,$$

$$\Phi(X_3) = 5,94 < \chi_{0,05}^2(4-1) = 7,82,$$

$$\Phi(X_1 X_2) = 51,5 > \chi_{0,05}^2(36-1) = 49,80,$$

$$\Phi(X_1 X_3) = 35,9 > \chi_{0,05}^2(24-1) = 35,20.$$

Для выявленных существенных эффектов проводился более детальный анализ. С помощью предложенной статистики L_{3k} проводилась проверка значимости эффектов сочетаний уровней факторов. Результаты анализа приведены в табл. 2.

При анализе все парные взаимодействия оказались значимыми, а это означает, что при разных способах стабилизации эритроциты по-разному реагируют на обработку ферментами и ингибиторами.

Таким образом, несмотря на отсутствие количественных показателей в части опытов, применение свободных от распределения статистик

Результаты непараметрического анализа плана $6 \times 6 \times 4$

Уровни	$Z(X_1 X_2)$	Уровни	$Z(X_1 X_3)$	Уровни	$Z(X_2 X_3)$
Фруктоза—коллагеназа	3,21	Лецитин—НЭ	-3,68	Лизоцим—ФЭ	2,79
Фруктоза трипсин	2,20	Кефалин—НЭ	-3,68	Коллагеназа—АЭ	1,99
Глюкоза—коллагеназа	2,18			Коллагеназа—ГЭ	2,43
Маноза рибонуклеаза	-2,00			Лизоцим—НЭ	-3,68
Лецитин—рибонуклеаза	-2,75			Лизоцим—АЭ	-2,24
				Гиалуронидаза—НЭ	-3,68

позволило провести анализ и получить информацию о влиянии факторов.

Институт эпидемиологии, вирусологии
и медицинской паразитологии им. А. Б. Алексаняна,
МЗ АрмССР

Поступило 16.VII 1979 г.

**1-ՉԱՓԱՆՆԵՐԻ ԵՎ F-ՉԱՓԱՆՆԵՐԻ ՈՉ ՊԱՐԱՄԵՏՐԻԿ ՀԱՄԱՆՈՐԴՆԵՐԸ
ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԿՐԻՏԵՐԻՄԸ ԲՅՇԿԱ-ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ**

Տ. Գ. ՕՃԱՆՅԱՆ, Գ. Խ. ԿՈԴԿԻՆԴ

Թվյալ-կենսաբանական փորձերի բազմամակարդակային և բազմագործոնային վերլուծության համար առաջարկվում են նոր, ոչ պարամետրիկ մեթոդներ, որոնք հիմնված են բաշխումից ազատ չափանիշների վրա:

Առաջարկված մեթոդների օգնությամբ լուծվում է էքստրոպոլյացիայի կախումացված (ստաբիլիզացված) զրիպի վերլուծների տիրաքիայի զգայնության ուսումնասիրության խնդիրը, որը չի լուծվում հայտնի մեթոդներով:

**NONPARAMETRIC ANALOGUES OF T—CRITERION
AND F—CRITERION AND THEIR APPLICATION TO
MEDICO-BIOLOGICAL INVESTIGATIONS**

T. G. OGANYAN, G. Ch. KODKIND

Nonparametric methods of analysis of some multifactory design type meant for experimentation under heterogeneity conditions have been suggested. An example of their application to biological investigations has been given.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаек Я., Шидак Э. Теория ранговых критериев. М., 1971.
2. Кендалл М. Дж., Стьюарт А. Статистические выводы и связи. М., 1973.

3. Кодкин Г. Х., Оганян Т. Г. Мат-лы III Всесоюзной конф. по биолог. кибернетике. 173, М., 1978.
4. Лисенков А. Н., Никитина Е. П., Оганян Т. Г. Непараметрические методы анализа многофакторных экспериментов. М., 1976.
5. Огава Дз. Сб.: Введение в теорию порядковых статистик. 21, М., 1970.
6. Оганян Т. Г. Автореф. канд. дисс., М., 1978.
7. Оганян Т. Г., Кодкин Г. Х. Сб.: Статистические методы планирования и анализа медико-биологических экспериментов. 23, Киев, 1975.
8. Benard A., van Elteren Ph. Indagationes mathematicae, 15, 358, 1953.
9. Gibbons J. D. Nonparametric statistical inference. New York, 1971.
10. Hettmansperger T. P. Psychometrika, 40, 53, 1975.
11. Page E. B. JASA, 3, 216, 1963.
12. Lienert G. A. Verteilungsfreie Methode in der Biostatistik, Meisenheim, 1975.
13. Savage J. P. Bibliography of nonparametric statistics. New York, 1968.

ВЛИЯНИЕ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ПОЛИЭФИРОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Г. М. ПАРОНИКЯН, Л. Г. АКОПЯН, Т. Р. АКОПЯН, Е. Г. ПАРОНИКЯН

Приводятся результаты изучения генетического действия макроциклических полиэфиров, синтезированных в качестве потенциально активных лечебных средств. Установлено, что исследуемые полиэфиры, в зависимости от их структуры, проявляют в разной степени мутагенное и антимуtagenное действие на микроорганизмы.

Биологические свойства нового класса соединений—макроциклических полиэфиров (краун-эфиров)—изучены недостаточно, отсутствуют сообщения и об их действии на генетические структуры клеток. В связи с этим представляло интерес изучение влияния синтезированных в нашем институте краун-эфиров [4, 5] на возникновение мутации у микроорганизмов и выявление связи между строением этих веществ и их генетическим действием.

Материал и методика. В нашем распоряжении было 23 краун-эфира фуранового ряда, из коих десять соединений содержали в структуре амидные группировки. Общая формула полиэфиров и значение радикала приведены в табл. 1. Генетическая активность краун-эфиров сравнивалась с известным мутагеном гидроксиламмином (ГА) и с протекторами 2-меркаптоэтиламином (МЭА), диметилсульфоксидом (ДМСО), тиоциевиной и L-цистеином [1—3, 8—10].

Объектами служили биохимические штаммы: *Escherichia coli* P-678, ауксотрофный по треонину (получен от М. Г. Оганесяна, Чаренцаванский филиал ВНИИГенетика), *Actinomyces rimosus* 222 (исходный штамм BS-21), ауксотрофный по лизину (получен от А. В. Владимирова, ВНИИ антибиотиков) и *Salmonella typhimurium* TA-1535, ауксотрофный по гистидину, несущий мутацию типа замены основания в молекуле ДНК, генотип his G 46, LPS⁻¹ rfa, Δ uvr B (получен от Л. М. Фонштейна ИНИ по БИХС, оригинатор штамма доктор Б. Эйме, США). Мутагенное и протекторное действие исследуемых соединений изучалось методом «доза—эффект» и определялось по частоте встречаемости ревертантов от ауксотрофного к прототрофному состоянию, по локусам, ответственным за синтез треонина, лизина и гистидина [7]. Генетическое действие соединений на индикаторном штамме *Salm. typhimurium* TA-1535 изучалось методом, описанным ранее [11].

УФ облучение объекта проводили бактерицидной лампой низкого давления БУФ-30, на расстоянии 60 см от источника излучения, при постоянном перемешивании в затемненной комнате, по известному методу [6].

Результаты и обсуждение. Результаты изучения мутагенного эффекта краун-эфиров и контрольных соединений в отношении ауксотрофных штаммов кишечной палочки и актиномицетов приведены в табл. 1. Видно, что большинство из изученных соединений оказывает очень сла-

бое мутагенное действие. Сравнительно более активными в отношении треонинового локуса кишечной палочки оказались соединения 2, 13, 15 и 16, которые увеличивают частоту встречаемости ревертантов соответственно в 142, 80, 37 и 186 раз больше контроля (спонтанные мутации). Соединения 3, 5 и 12 оказывают противоположное, антимутагенное действие; уменьшают число мутаций на 29, 32 и 20% соответственно по сравнению с контролем. На актиномицеты только два препарата—2 и 16—оказали мутагенное действие, индуцировали мутации в 277 и 519 раз больше контроля соответственно. Соединения 5, 10 и 11 еще больше снижают число мутаций у этого же штамма по сравнению с контролем, соответственно на 37, 60 и 46%, причем соединение 5 оказало подобное действие на два тест-объекта.

Наиболее активные по мутагенному действию соединения оказывают либо одинаковое с ГА действие, либо более сильное. Так, например, соединение 15 при одинаковой выживаемости клеток тест-объектов оказывает действие, подобное ГА, а соединения 2, 13 и 16 заметно превосходят его по мутагенной активности. Соединения 3, 5 и 12 обладают антимутагенным действием в отношении треонинового локуса кишечной палочки, мало чем отличаются по активности от контрольных протекторов МЭА и в особенности от ДМСО. В то же время на лизисовый локус актиномицетов соединения 5, 10 и 11 заметно превосходят их по протекторному действию. Гиомочевина и L-цистеин на исследуемые тест-объекты не оказали антимутагенного действия.

Если рассматривать полученные данные с точки зрения строения и генетического действия соединений, можно отметить следующее.

В зависимости от числа остатка этиленгликоля в молекуле соединений меняется направление действия соединений. В тех случаях, когда число их нечетное (соединения 2, 4), они обладают мутагенным действием, в случае четного числа (соединения 3, 5)—антимутагенным. Не влияет на активность соединений положение кислорода или аминогруппы в бензольном кольце молекулы соединений (8 и 9 или 17—19). Увеличение числа метиленовых групп в диамидном остатке в молекулах соединений (14—16) приводит к существенному увеличению мутагенной активности их. Исследуемые краун-эфиры, содержащие в молекуле амидные группировки, лишены антимутагенного эффекта.

Краун-эфиры, оказавшие в той или иной степени мутагенное или антимутагенное действие на актиномицеты и кишечную палочку, были изучены и на индикаторном штамме *Salm. typhimurium* TA-1535. Из данных табл. 2 видно, что и на этом высокочувствительном штамме многие соединения проявляют невысокую мутагенную активность или вовсе лишены ее. Только соединения 2 и 13 индуцируют реверсии, соответственно в 59 и 190 раз больше контроля.

Выявленные среди краун-эфиров вещества, обладающие протекторным эффектом, были исследованы более детально, изучено их влияние на частоту возникновения УФ-индуцированных реверсий. Штаммы культур перед облучением обрабатывали исследуемыми полиэфрами

Таблица 2

Мутагенное и латентное действие краун-эфиров
на *Salm. typhimurium* TA-1535

Соединения	Д о з а		Частота встречаемости ревертантов (гис ⁺ → гис ⁻) на 10 ⁶ выживших клеток		
	мМоль	время, мин	выживаемость, %	число	% к контролю
1	25	120	3,7±0,3	875±13,5	1250
2	25	120	1,8±0,06	4128±139,05	5900
3	25	120	10,6±1,0	585±31,7	835
4	25	120	66±3,4	85±7,5	120
5	25	120	42±2,9	123±9,4	170
12	25	120	49±3,9	105±11,0	150
13	25	120	0,4±0,05	13300±611,0	19000
15	25	120	9,2±0,6	652±36,5	930
16	25	120	4,2±0,25	1420±70,5	2030
23	25	120	21±0,9	220±16,5	330
Контроль (спонтанная мутация)		—	100	70±3,8	100
ГА	500	30	2±0,2	2275±112	3200

Таблица 3

Влияние краун-эфиров и контрольных протекторов на частоту встречаемости
УФ-индуцированных реверсий

Соединения	Д о з а				E. coli P-678 thr ⁻		Act. rimosus lys ⁻		
	соединения		УФ облучение		частота встречаемости ревертантов на 10 ⁶ выживших клеток				
	мМоль	мин	см	сек	число	% к контролю	число	% к контролю	
3	20	10	60	90	5,0 ± 0,3	100	40 ± 3,1	1000	
4	20	10	60	90	5,75 ± 0,4	115	2,12 ± 0,35	53	
5	20	10	60	60	2,5 ± 0,2	50	3,6 ± 0,2	90,0	
7	20	10	60	90	2,5 ± 0,15	50	1,68 ± 0,05	42	
10	20	10	60	90	3,0 ± 0,25	60	1,25 ± 0,04	28	
11	20	10	60	90	4,0 ± 0,3	80	1,44 ± 0,03	36	
12	20	10	60	90	3,9 ± 0,26	78	2,5 ± 0,3	62	
13	20	10	60	90	260 ± 11,5	5200	2,9 ± 0,2	72	
МЭА	100	10	60	90	0,9 ± 0,1	18,3	2,53 ± 0,25	63,3	
ДМСО	500	10	60	90	1,15 ± 0,06	23	2,73 ± 0,3	68,3	
Тиомочевина	100	10	60	90	2,0 ± 0,12	40	3,06 ± 0,2	76,6	
L-цистин	25	10	60	90	4,4 ± 0,31	87,5	3,33 ± 0,4	83,3	
Контроль (УФ облучение)				60	90	5,0 ± 0,28	100	4,0 ± 0,23	100

и контрольными протекторами. Из табл. 3 видно, что на кишечную палочку соединения 5, 7, 10, 11 и 12 оказывают заметное антимуагенное действие, уменьшая число реверсий по сравнению с контролем (реверсии, индуцированные только ультрафиолетом) на 20—50%. Контрольные

соединения также оказались активными на этом штамме и по антиму-тагенному эффекту превзошли краун-эфиры, за исключением L-цистеина. На актиномицетном штамме краун-эфиры (кроме соединения 3) оказались более активными, они снизили число УФ-индуцированных реверсий на 10—72% и по протекторному действию превзошли контрольные соединения.

Таким образом, многие из исследованных макроциклических полиэфиров оказали слабое генетическое действие. Изменение структуры полиэфиров, введение в макроциклическое кольцо различных групп, приводит к существенному изменению их действия на наследственные структуры микроорганизмов, в частности, к появлению заметного му-тагенного или антимутагенного эффекта.

Институт тонкой органической химии
им. А. Л. Муджояна АН АрмССР

Поступило 3.VIII 1979 г.

ՄԱԿՐՈՑԻԿԼԻԿ ՊՈԼԻԵԹԵՐՆԵՐԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՍՏՐՈՒԿՏՈՒՐԱՅԻ ՎՐԱ

Գ. Մ. ՊԱՐՈՆԻԿՅԱՆ, Լ. Գ. ՀԱԿՈՔՅԱՆ, Տ. Ռ. ՀԱԿՈՔՅԱՆ, Ե. Գ. ՊԱՐՈՆԻԿՅԱՆ

Ուսումնասիրված է մակրոցիկլիկ պոլիէթերների (կրաուն-էթերների) մու-տագեն և հակամուտագեն ազդեցությունը բիոքիմիական մուտանտների՝ *E. coli* P—678 thr⁻, *Act. rimosus* 222 lys⁻ և *Salm. typhimurium* TA—1535 his⁻ նկատմամբ:

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ուսումնասիրված կրաուն-էթերներից միայն մի քանիսն են օժտված նկատելի գենետիկական ակտիվու-թյամբ, որը կախված է այդ միացությունների որոշակի կառուցվածքից:

ACTION OF MACROCYCLIC POLYETHERS UPON THE GENETIC STRUCTURE OF BACTERIA

G. M. PARONIKIAN, L. G. HAKOPIAN, T. R. HAKOPIAN
Ye. G. PARONIKIAN

The mutagenic and the antimutagenic actions of macrocyclic polyet-thers (crown-ethers) upon the biochemical mutants *E. coli* P—678 thr⁻, *Act. rimosus* 222 lys⁻ and *Salm. typhimurium* TA—1535 his⁻ have been studied.

The obtained data show that only few of the studied crown-ethers display a notable genetic activity, which is connected with the specific structure of these compounds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутюнян Р. М., Кулеилов Н. П. Генетика, 8, 4, 148, 1972.
2. Бариляк И. Р., Неумерсицкая Л. В., Туркевич А. Н. Цитология и генетика, 12, 1, 50, 1978.

3. Батикян Г. Г., Арутюнян Р. М. Биолог. ж. Армении, 28, 1, 3, 1975.
4. Вартамян С. А., Акопян Т. Р., Пароникян Е. Г. Арм. хим. ж., 31, 349, 1978.
5. Вартамян С. А., Акопян Т. Р., Пароникян Е. Г., Авакимян Д. А. Арм. хим. ж., 32, 19, 1979.
6. Муллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
7. Пароникян Г. М., Акопян Л. Г., Дарбицян Г. А., Тумасян Э. А. Генетика, 12, 9, 1621, 1977.
8. Семенов Л. Ф., Прокудина Е. А. Мед. радиол., 4, 70, 1956.
9. Симонян Н. В., Джанполадян Н. А., Аджян С. А., Авакян Ц. М., Аджян Н. Биолог. ж. Армении, 27, 2, 91, 1974.
10. Турбин Н. В., Троцкий Н. А., Филиппова А. С., Будовский Э. П., Кочетков Н. К. ДАН СССР, 158, 5, 1197, 1964.
11. Фоништейн Л. М., Алибев С. К., Зехноз А. М., Шапиро А. А. Генетика, 12, 5, 119, 1976.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.3

УВЕЛИЧЕНИЕ СКОРОСТИ ГИДРОЛИЗА АТФ ПОСЛЕ
 ДОБАВЛЕНИЯ ОЛИГОМИЦИНА

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Известно, что митохондриальная АТФаза ингибируется антибиотиком олигомицином—ингибитором АТФазной и АТФ-синтетазной активности [2, 4, 5]. В то же время в литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что существует АТФаза, нечувствительная к олигомицину и локализованная на внешней мембране митохондрий сердца, коры почек и селезенки [3, 9]. В настоящей статье исследовано влияние олигомицина на АТФазную активность митохондрий печени крысы в зависимости от степени старения митохондрий с целью выявления олигомициннечувствительной АТФазы.

Материал и методика. Митохондрии печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования [8] в 0,3 М сахарозе и 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; промывали и суспендировали в той же среде. Активность АТФазы определяли по закислению среды инкубации [7] с помощью рН-метра, подключенного к самописцу. Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографически [1]. Количество митохондриального белка определяли методом Лоури [6].

Результаты и обсуждение. На рис., А и Б и в таблице представлены результаты опыта по действию олигомицина на АТФазную актив-

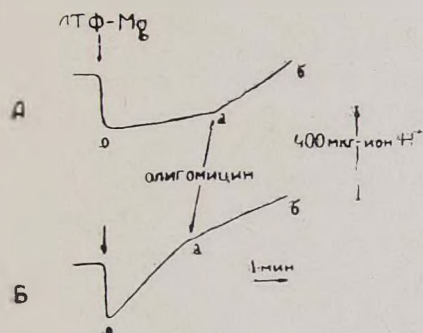


Рис. Влияние олигомицина на АТФазную активность. Среда инкубации: 0,1 М сахаразы, 0,1 М КСl, 2 мМ трис-НСl, рН 7,5. Конечная концентрация АТФ-Мg (1:1)—4 мМ. Олигомицин—1,8 мкг/мг белка, 3 мг митохондриального белка в 1 мл. А—опыт проведен сразу после выделения митохондрий; Б—опыт проведен после 26 ч. пребывания на холоду (0—4°).

ность митохондрий. АТФ-Мg добавлялся после 2—3 мин инкубации митохондрий.

Как видно из рис., А, начальная скорость гидролиза АТФ интактными митохондриями незначительна, после добавления олигомицина

она увеличивается. После 20 ч. пребывания на холоду АТФазная активность несколько повышается, и добавление олигомицина практически не изменяет активности фермента. После 26 ч. пребывания на холоду (рис., Б) скорость гидролиза АТФ увеличивается до такой степени, что олигомицин ингибирует АТФазную активность. Добавление олигомицина до внесения АТФ-Mg дает аналогичные результаты.

Таблица

Скорость гидролиза АТФ до и после добавления олигомицина,
мкг-ион Н⁺/мин мг белка

№	Время	Температура	V АТФ	V АТФ после добавления олигомицина
1	контроль	25°	4,7	15,3
2	20 ч.	0—4°	15,3	15,3
3	26 ч.	0—4°	22,4	10
4	30 мин	25°	10,5	11,7
5	45 мин	25 °	16,5	11,7

Судя по результатам опытов, олигомицин не влияет на АТФазную активность в течение 18—24 ч. в зависимости от степени интактности митохондрий. Чем больше дыхательный контроль по Чансу, тем больше олигомицин не влияет на скорость гидролиза АТФ и тем больше отношение скоростей на участках оа и аб (рис. 1А). По результатам нескольких экспериментов, отношение оа/аб составляет $2,75 \pm 0,5$ (дыхательный контроль $3,2 \pm 0,3$). Как видно из таблицы, в случае, показанном на рис., А, отношение аб/оа равно 3,25 (дыхательный контроль 3,3).

Инкубация митохондрий при комнатной температуре ($t=25^\circ$) приводит к тем же результатам, что и выдерживание их на холоду: при инкубации около 2—3 мин олигомицин повышает АТФазную активность, около 30—35 мин он не влияет на этот показатель, а при инкубации свыше 45 мин—ингибирует скорость гидролиза АТФ.

Мы хотим обратить внимание на следующий факт. Как видно из таблицы, скорости гидролиза АТФ после добавления олигомицина к свежевыделенным митохондриям и простоявшим 20 ч. на холоду практически равны (табл., 1, и 2). Когда митохондрии остаются на холоду более суток (табл., 3), скорость гидролиза АТФ после добавления олигомицина ниже, чем в предыдущих случаях. Аналогичные результаты получены при инкубации митохондрий в тепле (табл., 4 и 5).

Чем же вызвано столь необычное действие олигомицина? В митохондриях постоянно происходит гидролиз и ресинтез АТФ за счет эндогенных субстратов. После добавления олигомицина оба процесса, за которые ответственна олигомицинчувствительная АТФаза, ингибируются. Однако известно, что в митохондриях имеется компонент АТФазы, нечувствительный к олигомицину [3, 9]. Можно предположить, что после добавления антибиотика ингибируется ресинтез и регистриру-

ется только гидролиз АТФ олигомициннечувствительной АТФазой, счет чего и повышается скорость гидролиза.

При старении митохондрий (выдерживание на холоду в течение длительного времени, инкубация в тепле) целостность митохондриальной мембраны нарушается, происходит разобщение окислительного фосфорилирования и активируется олигомицинчувствительная АТФаза. В этом случае после добавления олигомицина АТФазная активность падает, и остается только активность олигомициннечувствительной АТФазы. То, что в постаревших митохондриях (табл., 3 и 5) активность олигомициннечувствительной АТФазы несколько ниже, чем в свежих и относительно свежих (табл., 1, 2 и 4), вероятно, говорит о том, что при старении митохондрий олигомициннечувствительная АТФаза портится.

Филиал Всесоюзного научно-исследовательского института
клинической и экспериментальной хирургии МЗ СССР, Ереван

Поступило 25.VII 1979 г.

ԱՆՖ-ի ՀԻԴՐՈԼԻԶԻ ԱՐԱԳՈՒԹՅԱՆ ՄԵՄԱՑՈՒՄԸ ՕԼԻԳՈՄԻՑԻՆ ԱՎԵԼՍՅՆԵԼՈՒՑ ՀԵՏՈՒ

Ա. Վ. ԳՅՈՒԼԵԱՆԿՍԱՆ

Հայտնաբերվել է առնետի լյարդի միտոքոնդրիանների Անֆազայի ակտիվացումը օլիգոմիցին ավելացնելուց հետո: Միտոքոնդրիանները սառը պայմաններում 18—24 ժամ պահելուց հետո Անֆազային ակտիվությունը մեծանում է, և օլիգոմիցինը պրակտիկորեն չի ազդում Անֆ-ի հիդրոլիզի արագության վրա, 25 ժամից ավել պահելուց հետո Անֆազային ակտիվությունը բարձրանում է մինչև այն աստիճանը, որ օլիգոմիցինը ընկճում է Անֆազային ակտիվությունը: Համաման արդյունքներ են ստացվել Անֆ-ի հիդրոլիզի արագության վրա օլիգոմիցինի ազդեցության ուսումնասիրության դեպքում՝ կախված սենյակային ջերմաստիճանում միտոքոնդրիանների ինկուբացման ժամանակից: Ենթադրվում է, որ Անֆազայի ակտիվության մեծացումը կապված է միտոքոնդրիանների օլիգոմիցին ոչ զգալուն Անֆազայով պայմանավորված Անֆ-ի հիդրոլիզի հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кондрашова М. Н. Сб. Руководство по изучению биологического окисления полярно-графическим методом. 50, М., 1973.
2. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
3. Gmaj F., Nowicka C., Angielski S. FEBS Letters. 47, 76, 1974.
4. Lardy H. A., Connelly J. L., Jonson D. Biochemistry, 3, 1961, 1964.
5. Lardy H. A., Witonksy P., Jonson D. Biochemistry, 4, 552, 1965.
6. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
7. Nishimura M., Yto T., Chance B. Biochim. Biophys. Acta, 59, 177, 1962.
8. Schneider W. C. J. Biol. Chem., 176, 259, 1948.
9. Vijayakumar E. K., Weidemann M. J. Biochem. J., 160, 383, 1976.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАЗНОСТНЫХ ПОТОКОВ НА ОДНОНАПРАВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Т. Г. АМБАРЦУМЯН

При изучении потоков ионов, проходящих через мышечную мембрану, часто приходится иметь дело с разностными потоками, представляющими собой сумму двух потоков, направленных в противоположные стороны. Изучение таких потоков, с одной стороны, позволяет исключить обменные потоки, идущие в соотношении один к одному, а с другой стороны, возникает сложность при разделении их на однонаправленные компоненты. Поэтому необходимо создание способа разделения разностных потоков на поток, направленный в клетку, и поток, направленный из клетки в наружную среду. В данной работе предлагается метод для подобного разделения потоков. В качестве примера рассматриваются натриевые потоки, однако предлагаемый метод с одинаковым успехом может применяться для потоков любого другого иона.

Поток натрия, направленный внутрь клетки (входящий поток J_{ax}^{Na}), является функцией наружной концентрации натрия Na_0 и обозначается $f(Na_0)$.

Поток натрия, направленный из клетки наружу (выходящий поток $J_{вых}^{Na}$), — функция внутренней концентрации Na_{in} , он обозначается $f(Na_{in})$. Очевидно, что концентрация Na_{in} сама является функцией Na_0 . Вид функциональной зависимости между Na_{in} и Na_0 неизвестен, однако экспериментально можно установить дискретные значения Na_{in} , соответствующие различным значениям наружной концентрации Na_0 . Эти значения приводятся в таблице. Можно ввести обозначение $Na_i = kNa_0$, где k — переменная величина, зависящая от Na_0 . Тогда $f(Na_{in})$ можно отождествить с $f(kNa_0)$.

Разностный поток (рис.) ионов натрия можно записать в виде функционального уравнения:

$$f(Na_0) - af(kNa_0) = \psi(Na_0). \quad (1)$$

Здесь $\psi(Na_0)$ — экспериментальный разностный поток ионов натрия, который следует разделить на входящий и выходящий; a — пере-

Т а б л и ц а
Зависимость внутриклеточной концентрации натрия от концентрации
натрия в растворе

Na_{in} , mM	Na , mM	$k = Na/Na_0$
2	29	14,5
10	35	3,5
30	46	1,5
50	57	1,1
70	60	0,9
90	68	0,8
120	55	0,5

Мышцы, предварительно обогащенные натрием, инкубировались в течение 5 ч. в бескальевом растворе Рингера с убаином.

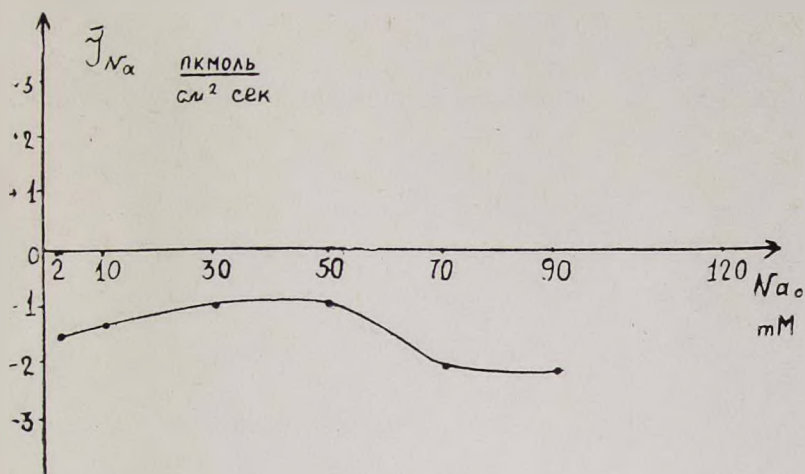


Рис. Зависимость не диффузионного разностного потока натрия от наружной концентрации Na_0 в бескальевом растворе Рингера с убаином (10^{-4} M), где NaCl заменен эквивалентным количеством $ChCl \cdot t = 22^\circ$.

менный коэффициент, устанавливающий связь между ними и получаемый экспериментально в каждом конкретном случае. Необходимость его введения связана с тем, что нами предполагается подобие функций $i(Na_0)$ и $i(Na_{in})$. Однако за каждый из описываемых этими функциями потоков ответственны различные механизмы, функциональный вид которых неизвестен. Поэтому мы вводим коэффициент a , который, являясь функцией Na_0 , не зависит от вида функции $i(Na_0)$ и «включает» в себя функциональное различие между входом и выходом.

Решение уравнения (1) имеет следующий вид*:

$$i(Na_0) = \sum_{n=0}^{\infty} a^n \psi(k^n Na_0) = \psi(Na_0) + a \psi(k Na_0) + a^2 \psi(k^2 Na_0) + \dots \quad (2)$$

* Черный Г. Г. Течение газа с большой сверхзвуковой скоростью. М., 1959 г.

Соответственно

$$af(kNa_0) = \sum_{n=0}^{\infty} a^{n+1} \psi(k^{n+1}Na_0) = a\psi(kNa_0) + a^2\psi(k^2Na_0) + \dots \quad (3)$$

Экспериментальный разностный поток $\psi(Na_0)$ можно аппроксимировать одной или несколькими прямыми линиями $\psi(Na_0) = cNa_0 + b$, и, подставляя $\psi(Na_0)$, можно вычислить суммы рядов (2) и (3):

$$f(Na_0) = \sum_{n=0}^{\infty} a^n (ck^n Na_0 + b) = \sum_{n=0}^{\infty} (ak)^n cNa_0 + \sum_{n=0}^{\infty} a^n b = \frac{cNa_0}{1-ak} + \frac{b}{1-a}$$

$$af(kNa_0) = \sum_{n=0}^{\infty} a^{n+1} (ck^{n+1} Na_0 + b) = \sum_{n=0}^{\infty} (ak)^{n+1} cNa_0 +$$

$$+ \sum_{n=0}^{\infty} a^{n+1} b = \frac{ackNa_0}{1-ak} + \frac{ab}{1-a}$$

при $a < 1$, $ak < 1$.

Таким образом, входящий поток ионов натрия определяется как

$$J_{вх}^{Na} = \frac{cNa_0}{1-ak} + \frac{b}{1-a},$$

а выходящий поток как

$$J_{вых}^{Na} = \frac{ackNa_0}{1-ak} + \frac{ab}{1-a}.$$

Если $a > 1$, $k > 1$, то, произведя замену переменных $k' = \frac{1}{k}$, которое < 1 , $\frac{1}{a} = a_1 < 1$, $Na_{01} = kNa_0$, получим соответствующие значения потоков:

$$J_{вх}^{Na} = \frac{-a_1^2 ck_1^2 Na_{01}}{1-a_1 k_1} - \frac{a_1^2 b}{1-a_1},$$

$$J_{вых}^{Na} = \frac{-a_1 ck_1 Na_{01}}{1-a_1 k_1} - \frac{a_1 b}{1-a_1}.$$

Таким образом, предложенный метод дает возможность «увидеть» в отдельности составляющие двустороннего процесса. Этот метод может применяться не только для разностных потоков, но и для суммарных. В случае суммарного потока решением функционального уравнения $\psi(Na_0) = f(Na_0) + af(Na_1)$ будет:

$$f(Na_0) = \sum_{n=0}^{\infty} a^n \psi(k^n Na_0) (-1)^n.$$

Предлагаемый метод имеет важное значение для понимания механизмов, лежащих в основе транспорта ионов через клеточные мембраны.

Ереванский физический институт ГКИАЭ

Поступило 5.X 1979 г.

ՄԱԹԵՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԵԹՈԴՈՎ ԷՔՍՊԵՐԻՄԵՆՏԱԼ
ԴՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՀՈՍՔԵՐԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ ՄԻԱԿՈՂՄԱՆԻ ՀՈՍՔԵՐԻ

Տ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ

Մաթեմատիկական անալիզի օգնությամբ առաջարկվում է էքսպերիմենտալ գումարային իրական հոսքերը միակողմանի կոմպոնենտների զատելու մեթոդ:

Առաջարկվող մեթոդն ունի կարևոր նշանակություն թաղանթի միջով իոնների տրանսպորտի հիմքում ընկած մեխանիզմների հասկացության համար:

ВЛИЯНИЕ N-ЭТИЛМАЛЕНИМИДА И УБАИНА НА ПОТОКИ Na^{22} В МЫШЦЕ ЛЯГУШКИ ПРИ ДЕФИЦИТЕ КАЛИЯ В РАСТВОРЕ РИНГЕРА

Г. Г. МАРИКЯН, С. Я. АДАМЯН, А. Л. СИМОНЯН

В присутствии убаина и при отсутствии калия в наружной среде наблюдается поток натрия (Na) из клетки, который существенно превышает расчетный диффузионный поток [6, 7, 9]. Для объяснения механизма этого явления постулируется наличие переносчика. На эритроцитах убаин-резистентные потоки Na оказались чувствительными к ингибиторам SH-групп [4—6]. Подобных данных, полученных на мышцах, в литературе не имеется.

Задачей данной работы было изучение действия N-этилмаленимида (НЭМ) на потоки Na в мышце в условиях максимального торможения ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) —АТФазной системы.

Материал и методика. Опыты проводились на портняжных мышцах озерной лягушки *Rana ridibunda*. Повышенная концентрация Na (40—60 мМ/кг внутриклеточной воды) достигалась путем выдерживания мышц в бескальиевом растворе Рингера (Р-К) при 2° в течение 36—48 ч. [1].

Однонаправленные потоки Na измерялись изотопом Na^{22} . Тщательно отпрепарированные мышцы привязывались за сухожильные концы к стеклянным распялкам и помещались на определенное время (1,0—1,5 ч.) в Р-К раствор с изотопом натрия. Для отмывки изотопа распялка с мышцей помещалась в последовательно сменяемые пробирки, содержащие 5 см³ неактивного раствора. График выхода натрия во времени представляет собой экспоненту, пересечение прямолинейного участка которой с осью ординат дает возможность определить количество натрия, вошедшее в мышечные волокна. Наклон прямолинейного участка отражает скорость выхода Na^{22} . Счет меченых проб проводился на приборе SL-30.

Измерения мембранного потенциала (МП) проводились ипрексовыми микроэлектродными, заполненными 3 М KCl, с потенциалом кончика не более 3—4 мВ. Измерение МП во времени при действии НЭМа длилось 1,5—2,0 ч. В каждой мышце измерялось примерно десять волокон для определенного промежутка времени.

Концентрации АТФ, АДФ и неорганического фосфата (Ф) определялись спектрофотометрическим методом в безбелковом экстракте мышц: АТФ—по методу Лампрехта и Траушельда [3], а АДФ—по методу Бергмейера [2]. Оба метода энзиматические. Неорганический фосфат определялся колориметрическим методом Стентона [8].

Состав экспериментального Р-К раствора следующий: NaCl —118, CaCl_2 —2, NaHCO_3 —2 мМ. Убаин использовался в концентрации 10^{-4} , НЭМ— $5 \cdot 10^{-6}$ М. Р-К и Р-К+убаин растворы являются бескальиевыми только номинально, ибо содержат в среднем 4—6 мкМ калия.

Все опыты проводились строго на парных мышцах.

Результаты и обсуждение. При добавлении НЭМа к Р-К раствору, содержащему убаин, наблюдается стимулирующее действие его как на вход, так и на выход натрия из мышц. При инкубации мышц в Р-К растворе с убаином константа скорости выхода натрия из мышц $k = 0,0063 \text{ мин}^{-1}$, а в присутствии НЭМа $k = 0,0084 \text{ мин}^{-1}$. Добавление НЭМа к инкубационному раствору в тех же условиях в течение 1,0—1,5 ч. вызывало увеличение входа натрия в 1,4 раза ($n=16$, n —количество мышц). Увеличение входа Na^{22} не может быть объяснено изменением электрических свойств мембраны. При 1,5-часовой инкубации мышц в растворе Р-К+убаин+НЭМ наблюдается изменение МП с -126 ± 2 до -46 ± 3 мВ ($n=16$). Это происходит за 10—15 мин, и затем в течение 30—50 мин потенциал не меняется. Для трех пар мышц не отмечалось изменения МП в течение 1,0—1,5 ч., и МП оставался равным -123 ± 2 мВ. При таком изменении МП следовало бы ожидать уменьшение входящего потока Na , а не увеличение, как это имело место в эксперименте.

Можно предположить, что НЭМ меняет пассивные свойства мембраны, увеличивая ее проницаемость. Считая весь вход Na пассивным, можно рассчитать коэффициент проницаемости для ионов Na (P_{Na}), который оказывается примерно в три раза больше, чем у контрольных мышц. Но даже такое увеличение P_{Na} не объясняет наблюдаемое изменение выходящего потока. Следовательно, следует признать, что НЭМ оказывает существенное влияние на недиффузионный компонент выходящего потока Na .

Сравнение констант скорости выхода Na в Р-К растворе ($k = 0,0075 \text{ мин}^{-1}$) и Р-К растворе с убаином ($k = 0,0060 \text{ мин}^{-1}$) с константой скорости выхода Na при добавлении НЭМа к убаиновому раствору ($k = 0,0084 \text{ мин}^{-1}$) показало, что последний сводит на нет влияние убаина на транспорт ионов Na : константа скорости выхода Na в растворе Р-К+убаин+НЭМ близка к таковой в Р-К растворе.

Для проверки предположения о том, что НЭМ препятствует действию убаина были поставлены опыты по влиянию его на концентрацию макроэргических соединений АТФ и АДФ и Φ_{H} в мышцах, обогащенных натрием и инкубированных в Р-К растворе с убаином.

Результаты опытов показали, что НЭМ статистически достоверно снижает концентрацию АТФ с $3,4 \pm 0,1$ до $2,7 \pm 0,2$ мМ/кг сырого веса ($n=16$) и увеличивает концентрацию Φ_{H} с $18,0 \pm 1,6$ до $24,4 \pm 1,6$ мМ/кг сырого веса ($n=8$). Это подтверждает высказанное предположение.

Вместо ожидаемого увеличения концентрации АДФ наблюдается статистически недостоверное снижение ее с 0,6 до 0,5 мМ/кг сырого веса ($n=4$). Возможно, это связано с действием аденилаткиназы мышцы, образующей АТФ и АМФ из двух молекул АДФ.

Таким образом, полученные результаты дают основание считать, что влияние НЭМа на поток Na в присутствии убаина связано с АТФ-азной активностью мышечной мембраны.

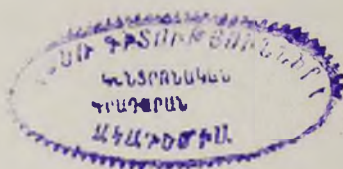
N-էթիլսպլեհեհիմիդի եւ ՌԱՔԱՆԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԳՈՐՏԻ ՄԿԱՆՈՒՄ Na^{22} ՀՈՍՔԵՐԻ ՎՐԱ ՌԻՆԳԵՐԻ ԼՈՒՄԻՆՑԻԱՄ
ԿԱԼԻՈՒՄԻ ԴԵՖԻՑԻՏԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ. Գ. ՄԱՐԻՅԱՆ, Ս. ՅԱ. ԱԴԱՄՅԱՆ, Ա. Լ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Հետազոտվել է N-էթիլսպլեհեհիմիդի ազդեցությունը Na^{22} հոսքերի վրա դորտի մկանում նատրիումի ակտիվ տրանսպորտի մաքսիմալ արգելակման պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ N-էթիլսպլեհեհիմիդը խոչընդոտում է ուաբաինի ազդեցությանը նատրիումի ելքային հոսքի վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Adrian R. H. and Slayman C. L. J. Physiol, 184, 4, 1966.
2. Bergmeyer H. Methods of enzymatic analysis, N. Y. L. 266, 1963.
3. Lamprecht W., Frauschold J. M. Methods of enzymatic analysis N. Y. L. 543, 1963.
4. Motais R. and Sola F. J. Physiol., 233, 2, 1973.
5. Rega A. F., Rothstein A., Weed R. S. 1. Cell Physiol., 70, 1, 1967.
6. Sachs J. R. J. Gen. Physiol., 57, 3, 1971.
7. Sjodin R. A. and Beazge L. A. J. Gen. Physiol., 61, 2, 1973.
8. Stanton M. G. Anal. Biochem., 22, 27, 1968.
9. Venosa R. A. and Horowicz P. J. Membr. Biol., 14, 2, 1973.



КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

А. Е. ТЕРТЕРЯН. *Определитель личинок слепней СССР*. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1979, 82 стр.

Морфологическое и таксономическое исследование преимагинальных фаз слепней, как и многих других двукрылых насекомых, значительно отстает в своем развитии от аналогичных исследований по взрослым фазам. Это связано с большими трудностями в добывании материала, содержании яиц и личинок в лаборатории, у слепней особенно длительного, меньшей склеротизацией покровов личинок, однотипностью внешнего облика. Не удивительно, что до последнего времени попытки составить определительные таблицы для личинок слепней были малочисленны и включали не более 20—25 видов (Скуфьин, 1967, 1973; Иваньшук, 1970, Jezek, 1977), т. е. около 5% от известного числа видов в Палеарктике. Появление на этом фоне специального определителя личинок слепней, составленного исследователем морфологии слепней А. Е. Тертерьяном, включающего 52 вида (около 27% от числа видов слепней СССР), представляет несомненный теоретический и практический интерес. В вводной части определителя дается краткая история вопроса и схема описания строения личинок, подготовки их к изучению и препаровке. Сам определительный ключ изложен лаконично, занимает 16 страниц и богато иллюстрирован 316 рисунками, сгруппированными в 28 таблиц. В основу ключа положены как собственные работы автора (цитируется 7 его работ), так и работы Н. А. Тамариной, И. П. Иваньшука, Р. Г. Соболевой, Г. Тески, И. Ежека и других, при этом используются рисунки при первоописаниях и добавляются оригинальные рисунки автора. Ключом охвачены роды *Chrysops* (9 видов), *Silvius* (1), *Nemorius* (1), *Haematopota* (6), *Heptatoma* (1), *Hybomitra* (12), *Atylus* (4), *Tabanus* (17), *Theriplectes* (1). Автор приводит новые доводы в пользу объединения рода *Nemorius* от рода *Silvius*, почерпнутые из морфологии личинок.

Как правило, личинки описывались разными авторами не вполне однотипно, иногда (Р. Г. Соболева) не делалось попытки свести собственные описания в определенную таблицу. Это обстоятельство сильно затрудняло работу составителя определителя, потребовало от него больших усилий для «состыковки» различных описаний и приведения их в таксономическую систему. Как видно, автору пришлось ограничить выбор признаков для включения в антитезы ключа, в частности свести к минимуму признаки придатков головы и более широко использовать не лишённые изменчивости признаки конфигурации хетоидных полей на сегментах тела. Этот невольный недостаток автор стремился компенсировать иллюстративной частью книги, где мы находим ряд изображений ротовых придатков, крючков на псевдоподиях и других деталей, помогающих дифференцировать трудноразличимые виды.

Надо отметить, что хотя книга отпечатана на ротапринте, она выглядит безупречно, не лишена некоторого изящества и может служить образцом для подобных изданий. Список литературы включает 26 источников (отметим в качестве упущения отсутствие в списке Определителя личинок слепней И. Ежека, 1977 г.).

Рецензируемый определитель ценен в теоретическом плане и является подведением итогов морфологического и таксономического исследования личинок слепней в СССР, в практическом использовании он будет служить пособием в работе медицинских и ветеринарных энтомологов, а также студентов соответствующих вузов. В связи с этим следует упрекнуть Институт зоологии АН АрмССР за слишком малый тираж (300 экз.).

К. В. СКУФЬИН
 1161

ԺԻՄ 907

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԱՊԵՏ

Հիմնադրվել է 1946 թ.

Հրատարակվում է տարեկան 12 անգամ

Հատոր XXXII, № 11

ԵՐԵՎԱՆ

Նոյեմբեր, 1979

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ ՈՒՆ

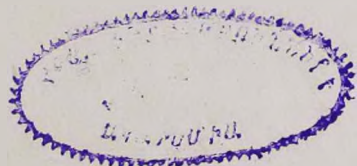
Փորձառական

- Ավագյան Ս. Մ., Գևորգյան Ս. Գ., Կառագյոզյան Ա. Ս., Կորյսմազյան Մ. Մ. Սին-
խրոտրոնային ճառագայթումը և նրա օգտագործումը կինսարանության մեջ 1053
- Ասլանյան Վ. Մ., Հաբուրյունյան Ս. Գ., Յասեմ Պ. Պ., Զարայան Յու. Ս., Ղարիբյան
Ջ. Վ., Ստեփանյան Հ. Մ. Առողջ և ուռուցքակիր (սարկոմա 45) առնետների
հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ների համեմատական բնութագրերը ուռուցքի
աճման ընթացքում 1064
- Մխիթարյան Է. Գ., Հաջյան Ս. Ա. Երկշերտիպիդային մեմբրանների խզման պոտենցիալի
ուսումնասիրությունը 1070
- Ղազարյան Հ. Տ., Խաչատրյան Դ. Ն., Փանոսյան Գ. Հ. Գրյուն տեսողական ներկի ազդեցությու-
նը եզրկապտոցների և ցորենի արմատների ու կոլենոպտիլների տարրեր հատված-
ների բջիջների մեմբրանային պոտենցիալի մեծության վրա 1077
- Ասլանյան Վ. Մ., Ախրեմ Ա. Ա., Յասեմ Պ. Պ., Բարսյան Յու. Ս., Լսեղո Գ. Յու., Հա-
բուրյունյան Ս. Գ., Ղարիբյան Ջ. Վ., Ստեփանյան Հ. Մ. Արևելացի կանցերոլի-
տիկ միացությունների ազդեցության ուսումնասիրումը ուռուցքակիր առնետների
ԴՆԹ-ի որոշ բնութագրիչների ցուցանիշների վրա 1084
- Յավրույան Ժ. Վ., Մինասյան Ա. Ա., Գևորգյան Է. Ս., Փանոսյան Գ. Հ. Կորիզաթաղան-
թային պրեսարատների անջատումն ու կորիզաթաղանթային սպիտակուցների բա-
ղադրությունը հիդրոկորտիզոնի ազդեցության ներքո 1091
- Ներկարարյան Ա. Վ., Փանոսյան Գ. Հ. Առնետների հյուսվածքների լակտատդեհիդրոգե-
նազի իզոֆերմենտային կազմը Ուոկերի կարցինոսարկոմայի զարգացման ըն-
թացքում 1093
- Գևորգյան Է. Ս. Բջջի գենետիկական ապարատի հետ գլյուկոկորտիկոիդների փոխազդե-
ցության մեխանիզմի հարցի շուրջ 1104
- Արծրունի Գ. Գ., Մկրտչյան Ս. Լ. Միտոքոնդրիանների ազդեցողականության ակտիվու-
թյունը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո 1112
- Արծրունի Գ. Գ., Հովսեփյան Ռ. Ս., Պետրյան Գ. Ս. Պրոթեոլիզի փոփոխման դինամի-
կան առնետների լաբորում էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո 1117
- Մխիթարյան Է. Ն., Ակոպով Ս. Է., Սոցկի Օ. Պ. Ճարպերի ազդեցությունը էրիտրոցիտների
մեխանիկո-առաձգական հատկությունների վրա 1124
- Ժաղաֆյան Յու. Հ., Մակարյան Ս. Ռ., Հակոբյան Լ. Հ., Պետրոսյան Ս. Վ. Որդան կար-
մերի ձվաբջջի կորիզը օոգենեզում (բրոմոսոմ-կորիզակային ապարատի ֆունկցիո-
նալ մորֆոլոգիան) 1129
- Օհանյան Տ. Գ., Կոպիկեղ Գ. Խ. Ե-շափանիչի և F-շափանիչի ոչ պարամետրիկ համանիշ-
ները և նրանց կիրառումը բժշկա-կենսաբանական հետազոտություններում 1135
- Պարոնիկյան Դ. Մ., Հակոբյան Լ. Գ., Հակոբյան Տ. Ռ., Պարոնիկյան Ն. Գ. Մակրոցիկլիկ
պոլիմերների ազդեցությունը մանրէների գենետիկական ստրուկտուրայի վրա 1146

Համառոտ հաղորդումներ

- Գյուլյանդանյան Ա. Վ. ԱՆԶ-ի հիդրոլիզի արագության մեծացումը օլիգոմիցին ալե-
լացնելուց հետո 1151

- Հայաստանի կենսաբանական հանդես, 1979 1047



Համբարձումյան Տ. Գ. Մաթեմատիկական տնայիզի մեթոդով էքսպերիմենտալ գումարային հոսքերի բաժանումը միակողմանի հոսքերի 1154

Մարիկյան Դ. Գ., Աղամյան Ս. Յա., Սիմոնյան Ա. Լ. Ն-էթիմալեի նիմիզի և ուարաի նի ազդեցությունը գորտի մկանում №22 հոսքերի վրա սինգլերի լուծույթում կայիում զեֆիցիտի ժամանակ 1158

Քննադատություն և գրախոսություն

Սիուֆին Կ. Ֆ. А. Е. Тертерян. Определитель личинок слетней СССР. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1979 г., 82 стр. 1161

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

Основан в 1946 году

Выходит 12 раз в год

Том XXXII, № 11

ЕРЕВАН

Ноябрь, 1979

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Экспериментальные

<i>Аевакян Ц. М., Геворкян С. Г., Карагезян А. С., Корхмазян М. М.</i> Синхротронное излучение и его применение в биологии	1053
<i>Асланян В. М., Арутюнян С. Г., Ясем П. П., Бабалян Ю. С., Гарибян Дж. В., Степанян Г. М.</i> Сравнительная характеристика ДНК, выделенных из тканей здоровых и опухоленосящих крыс в процессе опухолевого роста	1064
<i>Микаелян Л. Г., Аджян С. А.</i> Изучение потенциала разрыва бислойных липидных мембран	1070
<i>Казарян Г. Т., Хачатрян Г. Н., Паносян Г. А.</i> Влияние красителя грюн теста на величину мембранного потенциала клеток различных участков корешков и coleoptилей кукурузы и пшеницы	1077
<i>Асланян В. М., Ахрем А. А., Ясем П. П., Бабалян Ю. С., Ландо Д. Ю., Арутюнян С. Г., Гарибян Дж. В., Степанян Г. М.</i> Изучение влияния алкилирующего канцеролитика на некоторые характеристики ДНК опухоленосящих крыс	1084
<i>Явоян Ж. В., Микаелян А. А., Геворкян Э. С., Паносян Г. А.</i> Выделение препаратов ядерных мембран и состав ядерномембранных белков при гидрокортизоновом воздействии	1091
<i>Неркарян А. В., Паносян Г. А.</i> Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы тканей крыс при развитии карциносаркомы Уокера	1098
<i>Геворкян Э. С.</i> К вопросу о механизме взаимодействия глюкокортикоидов с генетическим аппаратом клетки	1104
<i>Арцруни Г. Г., Мкртчян С. Л.</i> Свободнорадикальная активность митохондрий после действия электростатического поля	1112
<i>Арцруни Г. Г., Обсепян Р. С., Пепанян Г. С.</i> Динамика изменений протеолиза в печени крыс после воздействия электростатического поля	1117
<i>Мхехян Э. Е., Акопов С. Э., Соцкий О. П.</i> Влияние липидов на упруго-механические свойства эритроцитов	1124
<i>Магакян Ю. А., Макарян С. Р., Акопян Л. А., Петросян А. В.</i> Ядро ооцита в оогенезе кошенили (функциональная морфология хромосомно-ядрышкового аппарата)	1129
<i>Оганян Т. Г., Кодкин Г. Х.</i> Непараметрические аналоги Т-критерия и F-критерия и их применение в медико-биологических исследованиях	1135
<i>Пароникян Г. М., Акопян Л. Г., Акопян Т. Р., Пароникян Е. Г.</i> Влияние макроциклических полиэфиров на генетические структуры микроорганизмов	1146

Краткие сообщения

<i>Гюльханданян А. В.</i> Увеличение скорости гидролиза АТФ после добавления олигомицина	1151
<i>Амбарцумян Т. Г.</i> Разделение экспериментальных разностных потоков на однонаправленные методом математического анализа	1154
<i>«Биологический журнал Армении», 1979</i>	1049

Маркян Г. Г., Адамян С. Я., Симонян А. Л. Влияние N-этилмаленимида и уа-
баиша на потоки Na^{22} в мышце лягушки при дефиците калия в растворе
Рингера 1158

Критика и библиография

Скуфьян К. Ф. А. Е. Тертерян. Определитель личинок слепней СССР. Изд-во
АН АрмССР, Ереван, 1979 г., 82 стр. 1161

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Vol. XXXI, № 11

YEREVAN

November, 1979

C O N T E N T S

E x p e r i m e n t a l

<i>Avakian Ts. M., Gevorkian S. G., Karageuzian A. S.</i> The use of synchrotron radiation in biological studies	1053
<i>Aslanian V. M., Harutyunian S. G., Yasem P. P., Bubaian Yu. S., Gharibian G. V., Stepanian G. M.</i> Comparative characteristics of DNA separated from tissue of healthy and tumor-carrying rats (sarcoma 45) in the process of tumor-growing	1064
<i>Mikaelian L. G., Hadgjan S. H.</i> Study of breakdown voltage of bilayer lipid membranes	1070
<i>Kasaryan G. T., Khatchatryan G. N., Panosyan G. A.</i> The influence of triphenylamine dyes on the membrane potential level in cells of different zones of root and coleoptiles of corn and wheat	1077
<i>Aslanian V. M., Achrem A. A., Yasem P. P., Babaian U. S., Lando D. U., Harutyunian S. G., Gharibian G. V., Stepanian G. M.</i> Investigation of alkylizing cancerolytic influence on some characteristics of DNA from tumor-carrying rats	1084
<i>Yavroyan J. V., Minasyan A. A., Gevorkian E. S., Panosyan G. A.</i> Nuclear membrane prepare isolation and composition of nuclear membrane proteus under the hydrocortisone action	1091
<i>Nerkarian A. V., Panosyan G. A.</i> Lactate dehydrogenase isoenzymes spectrum of rat tissues under the development of Warker carcinosarcoma	1098
<i>Gevorkian E. S.</i> On the mechanism of glucocorticoid interaction with the genetic apparatus of the cell	1104
<i>Artsruny G. G., Mkrtchian S. L.</i> Freeradical activity of mitochondrion after the electrostatic field effect	1112
<i>Artsruny G. G., Ovsepian R. S., Pepanian G. S.</i> The dynamics of proteolysis changes in rat liver after the effect of electrostatic field	1117
<i>Mkheian E. E., Akopov S. E., Sotski O. P.</i> The lipid influence on the elastic-mechanical characteristics of the erythrocytes	1124
<i>Magakian Yu. A., Makarian S. R., Hakopian L. A., Petrosian A. V.</i> The oocyte nucleus in the oogenesis of cochineal (functional morphology of chromosomo-nucleolar apparatus)	1129
<i>Oganyan T. G.</i> Nonparametric analogues of T-criterion and F-criterion and their application to medico-biological investigations	1135
<i>Paronikian G. M., Hakopian L. G., Hakopian T. R., Paronikian Ye. G.</i> Action of macrocyclic polyethers upon the genetic structure of bacteria	1146

Short Communications

<i>Gyulkhandanyan A. V.</i> The increase of ATP hydrolysis rate after the addition of oligomycin	1151
<i>Hambartsumian T. G.</i> Separation of experimental net fluxes into unidirectional components by the method of mathematical analysis	1154
<i>„Biological Journal of Armenia“, 1979</i>	1051

- Marikian G. G., Adamian S. Y., Simonian A. L.* The effect of N-ethylmaleimide and ouabain on sodium²² fluxes in frog muscle at potassium deficit in Ringer's solution 1158

Critique and Bibliography

- Skuphin K. F.* А. Е. Тертерян. Определитель личинок слепней ССР. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1979 г, 82 стр. 1161