ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

3 43

Издается с 1946 года
Айастани кенсабанакан андес,

выходит 12 раз в год
на армянском и русском языках

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

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Շ. Ազաբաբյան, Հ. Ս. Ավետյան, Է. Դ. Աֆյան (խորհրդի նախագահ), Դ. Ն. Բաբայան, Ս. Ա. Բակունց, Ա. Լ. Թախտաջյան, Պ. Ա. Խուրշուդյան, Ս. Կ. Կարապետյան, Ե. Հ. Հասրաթյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Ջայլախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Հ. Տեր-Մինասյան,

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. Мовсесян.

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

© ՀՍՍՀ ԳԱ հրատարակչություն, Հայաստանի կենսաբանական հանդես,
Издательство АН Армянской ССР, Биологический журнал Армении 1980

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

Հիմնադրվել է 1946 թ. Հրատարակվում է տարեկան 12 անգամ

Հատոր XXXIII, № 11 Երևան Նոյեմբեր, 1980 թ.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձառական

Դալիվանյան Ա. Կ., Ծաղիկյան Ա. Ռ. *Հեմոգլոբին S-ի մոլեկուլների կողմնորոշումը ագրեգատներում* 1151

Յասեմ Պ. Պ., Ասլանյան Վ. Մ., Բաբայան Յա. Ս., Դալյան Ե. Բ. *Երկվալենտ մետաղների իոնների ազդեցությունը պոլիռիբոադենիլային թթվի մոլեկուլի կոնֆորմացիոն վիճակի վրա* 1157

Փանոսյան Գ. Հ., Ներկարարյան Ա. Վ. *Հորմոնների ազդեցությունը մկների լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի իզոֆերմենտային կազմի վրա Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի բջիջների ներարկման ժամանակ* 1165

Մարիկյան Գ. Գ., Աղասյան Ս. Յա., Ավագյան Ծ. Մ. *Գորտի մկաններում իոնների ուաբային-ռեզիստենտային հոսքերի վրա N-էթիլամալեինիմիդի ազդեցության մեխանիզմի մասին* 1171

Ավագյան Ծ. Մ., Կարագյոզյան Ա. Ս., Գևորգյան Ս. Գ. *Թթվածնի հետազդեցությունը* Nicotiana tabacum L. *սերմերը սինխրոտրոնային ճառագայթման ժամանակ* . 1176

Ցիրացույան Ս. Գ., Վարդապետյան Հ. Ռ., Փանոսյան Գ. Հ. *Կանաչ ամուրով մշակման հետևանքով ցորենի սաղմում որոշ դեհիդրոգենազաների ակտիվության և իզոֆերմենտային բաղադրության փոփոխումը* 1180

Արծրունի Գ. Գ., Մնձլումյան Լ. Ս., Սաճակյան Ռ. Ա. *Լիպիդների պերօքսիդացումը և նրա կարգավորող որոշ գործոնները էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո* 1185

Բաջինյան Ս. Ս. *Լիպոսոմները որպես բջջաթաղանթի մոդել և նրանց կիրառման նոր ասպեկտները* 1189

Արծրունի Գ. Գ., Ավագյան Լ. Ա., Մկրտչյան Ս. Լ. *Առնետների լյարդի միտոքոնդրիումների ուլտրակառուցվածքը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո* . 1195

Ալեքսանյան Ք. Ա., Մխիթարյան Վ. Գ. *Գլուտատիոնպերօքսիդազայի և գլուտատիոնռեդուկտազայի ակտիվությունը առնետների լյարդի և ուղեղի հյուսվածքներում ռենտգենյան ճառագայթների և ջերմային այրվածքների միատեղ ազդեցության ժամանակ* 1201

Դավթյան Մ. Ա., Ղազարյան Ռ. Ռ. *Քրոմատինի ֆլուորեսցենտող հատկությունների հետազոտությունը ամինաթթուների խառնուրդի ներարկումով* 1205

Զաքարյան Հ. Բ., Սառուխանյան Ա. Գ. *Ջրի և էլեկտրոլիտների քանակությունը ճագարների սրտի բաժինների հյուսվածքներում՝ տարբեր բարձրությունների պայմաններում* 1210

Ջավոշյան Ջ. Մ., Խաչատրյան Ն. Մ. *Քլորոֆիլ պարունակող որոշ համակարգերի թերմոինդուկցված ֆլուորեսցենցիայի ելքի փոփոխության հետազոտումը* . . . 1216

Համառոտ հաղորդումներ

Դաղիվանյան Ա. Կ., Ծաղիկյան Ա. Ռ. *Հեմոգլոբինի բաղադրության ազդեցությունը հեղուկ բյուրեղային փուլի առաջացման մինիմալ կոնցենտրացիայի վրա* . 1220

Միմայելյան Լ. Գ., Հաջիյան Ս. Ա. *Երկշերտ լիպիդային մեմբրանների խզման պոտենցիալի կախվածությունը գծային էլեկտրական լարման արագությունից* . . 1224

ՀՍՍՀ ԳԱ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՖՈՒՆԴԱՄԵՆՏԱԼ ԳՐԱԴԱՐԱՆ

Համբարձումյան Տ. Գ. *Էքսպերիմենտալ հոսքերի մաթեմատիկական բաժանման մեթոդով նատրիումի իոնների դիֆուզիոն թափանցելիության կախվածության ուսումնասիրությունը նրանց կոնցենտրացիայից* 1227
Գևորգյան Է. Ս., Յավրոյան Ժ. Վ., Փանոսյան Գ. Հ. *Առնետների լյարդի կորիզային մեմբրանի ֆոսֆոլիպիդային կազմը* 1231
Ավագյան Հ. Խ. *Կամպոզանի ազդեցությունը առնետների լյարդի միկրոսոմների ցիտոխրոմ P-450 ու մանգանի պարունակության և լիպիդների պերօքսիդացման վրա* 1234
Հովհաննիսյան Ջ. Հ., Ասմանա Ա. Պ., Հարությունյան Հ. Ա., Մխիթարյան Լ. Ս., Եփրեմյան Ջ. Վ., Մոժարով Յու. Պ., Սեմերջյան Ս. Պ. *Յորենի սերմերի ճառագայթման ազդեցությունը սպիտակուցների և նոսկլեինաթթուների քանակական փոփոխության վրա* 1237

Ռեֆերատներ

Հովհաննեսյան Մ. Է. Campanula rapunculoides և Campanula glomerata Լ.-ը *Հարավային Անդրկովկասում* 1240
Ներսեսյան Տ. Ս. *Մեխանիզացված հատման ազդեցությունը ծիրանի որոշ ֆիզիոլոգիական հատկանիշների վրա* 1241
Բարսեղյան Ռ. Հ. *Որոշ տվյալներ մեգի, ադյան, ձևավոր տարրերի, շիճուկի չոր նըստվածքի և միզուղիների քարերի սպեկտրոգրաֆիայի վերաբերյալ* . . . 1243

Լրատու

Տերտերյան Հ. Ե. *Մարգարիտա Երվանդի Տեր-Մինասյանի 70-ամյակը* . . 1244

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

Основан в 1946 г. Выходит 12 раз в год

Том XXXIII, № 11 ЕРЕВАН Ноябрь, 1980 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные

Дадиванян А. К., Цагикян А. Р. Ориентация молекул гемоглобина-S в агрегатах 1151
Ясем П. П., Асланян В. М., Бабаян Ю. С., Далян Е. Б. Влияние ионов двухвалентных металлов на конформационное состояние молекулы полирибоадениловой кислоты 1157
Паносян Г. А., Неркарарян А. В. Действие гормонов на изоферментный спектр лактатдегидрогеназы печени мышей при введении клеток асцитной карциномы Эрлиха 1165
Марикян Г. Г., Адамян С. Я., Авакян Ц. М. К механизму действия N-этилмалеинимида на уабаин-нечувствительные потоки ионов в мышцах лягушки 1171
Авакян Ц. М., Карагезян А. С., Геворкян С. Г. Последействие кислорода при синхротронном облучении семян Nicotiana tabacum. L. 1176
Тирацуян С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А. Изменение активности и изоферментного состава некоторых дегидрогеназ при обработке зародышей пшеницы зеленым прочным 1180
Арцруни Г. Г., Межлумян Л. М., Саакян Р. А. Липидная пероксидация и некоторые факторы ее регуляции после воздействия электростатического поля 1185
Баджинян С. А. Липосомы—модель клеточных мембран и новые аспекты их применения 1189
Арцруни Г. Г., Авакян Л. А., Мкртчян С. Л. Ультраструктура митохондрий печени крыс после воздействия электростатического поля 1195
Алексанян К. А., Мхитарян В. Г. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в мозговой и печеночной тканях крыс при совместном действии рентгеновских лучей и термического ожога 1201
Давтян М. А., Казарян Р. Р. Исследование флуоресцирующих свойств хроматина при введении смеси аминокислот 1205
Захарян А. Б., Саруханян А. Г. Содержание воды и электролитов в тканях сердца кроликов в условиях разных высот 1210
Джавршян Дж. М., Хачатрян Н. М. Исследование термоиндуцированного изменения выхода флуоресценции некоторых хлорофиллсодержащих систем 1216

Краткие сообщения

Дадиванян А. К., Цагикян А. Р. Влияние состава гемоглобина на минимальную концентрацию образования жидкокристаллической фазы 1220
Микаелян Л. Г., Аджян С. А. Зависимость потенциала разрыва бислойных липидных мембран от скорости подаваемого напряжения . . . 1224
Амбарцумян Т. Г. Изучение зависимости диффузионной проницаемости ионов натрия от их концентрации методом математического разделения экспериментальных потоков 1227

Геворкян Э. С., Яврсян Ж. В., Пачосян Г. А. Фосфолипидный состав ядерных мембран клеток печени крыс 1231
Авакян А. Х. Влияние кампозана на содержание цитохрома Р-450, марганца в микросомах печени крыс и перекисное окисление липидов 1234
Оганесян Дж. О., Асмаева А. П., Арутюнян Г. А., Мхитарян Л. С., Епремян Дж. В., Можаров Ю. П., Семерджян С. П. Влияние облучения семян пшеницы на количественные изменения белков и нуклеиновых кислот . 1237

Рефераты

Огенесян М. Э. Campanula rapunculoides L. и Campanula glomera L. в Южном Закавказье 1240
Нерсесян Г. С. Влияние механизированной обрезки на изменение некоторых физиологических показателей абрикоса 1241
Барсегян В. О. Некоторые данные о спектрографии плотного осадка мочи, сыворотки, форменных элементов крови и камней мочевыводящих путей . 1243

Хроника

Тертерян А. Е. К 70-летию Маргариты Ервандовны Тер-Минасян . . . 1244

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA
Founded in 1946 12 issues per year
Vol. XXXIII, № 11 YEREVAN November, 1980

CONTENTS

Experimental

Dadivaian A. K., Tsagikian A. R. The orientation of hemoglobin-S molecules in aggregates 1151
Yasem P. P., Aslanian V. M., Babaian Yu. S., Dalian E. B. The influence of divalent metal ions on conformational state of polyriboadenilis acidmolecule 1157
Fanosyan G. H., Nerkararian A. V. The effect of hormones on mice lactatedehydrogenase isoensyme pattern under injection of Ehrlich ascites tumor cell 1165
Mariklan G. G., Adamian S. Ya., Avakian Ts. M. On the mechanism of N-ethylmaleinimid effect on ouabain-resistant ion fluxes in frog muscles 1171
Avakian Ts. M., Karagueuzian A. S., Gevorkian S. G. The aftereffect of oxygen under irradiation of *Nicotiana tabacum L.* seeds with synchrotron radiation 1176
Tiratsnyan S. G., Vardapetyan R. R., Panosyan G. H. Changes of the activity and isoenzyme patterns of some dehydrogenases after treatment of isolated wheat germs with fast green 1180
Artsruni G. G., Meshlumian L. M., Saakian R. A. Lipid peroxidation and its regulation factors after an electrostatic field effect 1185
Badjinian S. A. Liposomes as a model of cell membrane and new aspects of their application 1189
Artsruni G. G., Avakian L. A., Mkrtchian S. L. Rat liver mitochondrion ultrastructure after electrostatic field effect 1195
Aleksanian K. A., Mkhitarian V. G. Glutathioneperoxidase and glutathionereductase activity in rat liver and brain tissue under combined effect of x-ray radiation and thermal burn 1201
Davtian M. A., Kazarian R. R. Study of fluopescenting properties of chromatin under aminoacid mixture injection 1205
Zakharyan A. B., Sarukhanian A. Z. Water and electrolyte content in tissues of rabbit neart sections under different height 1210
Javrshyan J. M., Khachatryan N. M. Study of thermoinduced changes of fluorescence on some chlorophyllcontaining systems 1216

Short communications

Dadivanian A. K., Tsagikian A. R. The effect of hemoglobin composition on the minimal concentration of the liquid crystalline phase formation . . . 1220
Micaelian L. G., Adjian S. A. The dependence of break potential of bilayer lipid membranes on the appliee tension speed 1224
Ambartsumyan T. G. Study of the dependence of sodium ion diffusion permeability on their concentration by the method of mathematical division of experimental fluxes 1227
Gevorkian E. S., Yavroyan J. V., Panosian G. A. Phospholipid composition of rat liver nucleic cell membran 1231

Avakian A. Kh. The effect of camposan on P—440 cytochrome and manganese content in rat liver microsomes and on lipid peroxidation 1234
Hovhannissian J. H., Harutunian H. A., Semerjian S. P., Asmayeva A. P., Mkhitarian I. S., Mozhak Y. P. The effect of radiation of wheat seeds on quantitative changes of their proteins and nucleic acids 1237

Abstracts

Oganesian M. E. On *Campanula L.* and *Campanula glomerata L.* in Southern Transcaucasica 1240
Nersesian T. S. Influence of mechanical cutting on the changes of some physiological characteristics of apricot 1241
Barsegian V. O. Some data on spectrography of dense urine residue, serum, elements of blood and stones of urinous ways 1243

Chronics

Terterian A. E. To the 70-the anniversary of Margerita Ervandovna Ter-Minasian 1244

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1151—1156, 1980

УДК 577.3

ОРИЕНТАЦИЯ МОЛЕКУЛ ГЕМОГЛОБИНА—S В АГРЕГАТАХ

А. К. ДАДИВАНЯН, А. Р. ЦАГИКЯН

Исследовано двойное лучепреломление в серповидных эритроцитах при различных длинах волн. При сравнении максимального двойного лучепреломления серповидных эритроцитов с двойным лучепреломлением кристаллов дезоксигемоглобина—S определена ориентация молекул гемоглобина—S в жидкокристаллической фазе. Установлено, что ось, в направлении которой поляризуемость молекул гемоглобина наименьшая, составляет с осью микротрубки угол 24±4°.

Ключевые слова: серповидные эритроциты, двойное лучепреломление, жидкокристаллическая фаза.

При определенных условиях молекулы дезоксигемоглобина—S, который отличается от нормального гемоглобина тем, что шестой аминокислотный остаток в его β-цепи заменен (вместо глутамила валил [3]), агрегируют с образованием [5] «микротрубок» и дальнейшим переходом в жидкокристаллическую фазу. В результате эритроциты вытягиваются, теряют эластичность, закупоривают мелкие капилляры, перестают переносить кислород, и организм погибает. Эта болезнь носит название серповидной анемии.

Очевидно, что для лечения серповидной анемии надо блокировать участки молекулы гемоглобина, взаимодействие между которыми приводит к агрегации гемоглобина.

Для нахождения этих межмолекулярных контактов необходимо знать ориентацию молекул белка в агрегате, так как при этом поиск контактов существенно упрощается [4].

Первая попытка определить ориентацию молекул гемоглобина—S в агрегатах была сделана Перутцом и Митчисоном, которые исследовали линейный дихроизм и двойное лучепреломление кристаллов дезоксигемоглобина—А и двойное лучепреломление серповидных клеток [9]. Показав, что коэффициент поглощения кристаллами больше в случае, когда электрический вектор излучения перпендикулярен направлению наибольших размеров игольчатых кристаллов, авторы пришли к выводу, что группы гема, грубо говоря, перпендикулярны этому направлению. Установив затем, что кристаллы и серповидные эритроциты при скрещенных поляризаторах окрашиваются одинаково, когда они устанавливаются параллельно друг другу, авторы заключили, что эти группы ориентированы перпендикулярно направлению вытянутости серпо-

видных эритроцитов. Муриями и сотр. на основании данных исследования линейного дихроизма серповидных эритроцитов пришли к противоположному заключению: группы гема ориентированы параллельно длине эритроцитов [8]. Об этом, по мнению Муриямы, свидетельствует также тот факт, что эритроциты в магнитном поле ориентируются перпендикулярно силовым линиям [7].

Следует отметить некорректность определения степени ориентации молекул в указанных работах. Действительно, отрицательный знак двойного лучепреломления можно получить при изменении угла между осью наименьшей поляризуемости молекулы и осью микротрубки в пределах 0—54,5°, а точность определения ориентации молекул в агрегатах в опытах по ориентации эритроцитов в магнитном поле не намного превосходит указанную выше.

Гофрихтер и др. сделали попытку количественно оценить степень ориентации молекул гемоглобина в агрегате [2]. Считая, что осциллятор, соответствующий поглощению полосы Сарье, находится в плоскости гема, авторы получили для коэффициентов поглощения молекулы ε_k выражение:

$$\varepsilon_k = \frac{3}{4}\bar{\varepsilon}\sum_i \sin^2\Theta_{ki}, \qquad (1)$$

где Θ_{ki} —угол между нормалью к плоскости i-ого порфирина и осью $k(k=x, y, z)$, $\bar{\varepsilon}$—коэффициент поглощения гема, i—номер гема.

В предположении, что все молекулы имеют одинаковую ориентацию по отношению к оси микротрубки, коэффициенты поглощения в направлениях, параллельном ($\varepsilon_\parallel$) и перпендикулярном ($\varepsilon_\perp$) оси микротрубки, определяются соотношениями:

$$\varepsilon_\parallel = \sum_k \varepsilon_k \cos^2\Phi_k, \qquad (2)$$

$$\varepsilon_\perp = \frac{1}{2}\sum_k \varepsilon_k \sin^2\Phi_k, \qquad (3)$$

где Φ_k—угол между k-ой молекулярной осью и осью микротрубки. Величина дихроичного отношения P_2 оказывается равной:

$$P \equiv \frac{\varepsilon_\perp}{\varepsilon_\parallel} = \frac{\sum_k \varepsilon_k \sin^2\Phi_k}{2\sum_k \varepsilon_k \cos^2\Phi_k} \qquad (4)$$

Используя значения параметров, характеризующих ориентацию групп гемов по карте электронных плотностей гемоглобина, полученной с разрешением 2,5 А° Тен Эйком и Арноном, авторы определили величины коэффициентов поглощения в трех взаимно перпендикулярных направлениях:

$$\varepsilon_k = \frac{3}{2}\bar{\varepsilon}\times 0{,}88;\ \varepsilon_y = \frac{3}{2}\bar{\varepsilon}\times 3{,}15;\ \varepsilon_z = \frac{3}{2}\bar{\varepsilon}\times 3{,}97. \qquad (5)$$

Далее они находят максимальное и минимальное значения для $\cos^2 \Phi_{k_y}$, предполагая, что оси z или y перпендикулярны оси микротрубки:

$$\cos^2 \Phi_x^{max} = \frac{2P\varepsilon_y - \varepsilon_z - \varepsilon_x}{(\varepsilon_y - \varepsilon_x)(2P+1)}, \quad (6)$$

$$\cos^2 \Phi_x^{max} = \frac{2P\varepsilon_z - \varepsilon_y - \varepsilon_x}{(\varepsilon_z - \varepsilon_x)(2P+1)}. \quad (7)$$

Исследовав около 10-ти серповидных клеток с наиболее выраженным дихроизмом, авторы нашли наибольшее значение дихроичного отношения, равное $3{,}0 \pm 0{,}1$. Отсюда они заключили, что наибольшее значение угла между направлениями оси микротрубки и оси x равно 22°. Отмечая качественное различие результатов, полученных этими авторами по сравнению с результатами, приведенными выше, следует указать некоторые недостатки их работы, которые могли повлиять на полученный ими результат. Во-первых, при определении дихроичного отношения необходимо рассчитать площади, ограниченные кривой поглощения [10], что не было сделано этими авторами, а дихроичное отношение рассчитывалось по отношению максимальных значений коэффициентов поглощения или по отношению площадей, ограниченных не полными кривыми поглощения, а их частью. В связи с этим ошибка в определении угла может составить несколько градусов. Свидетельством того, что эта ошибка может играть существенную роль, является тот факт, что при определении дихроичного отношения поглощения излучения кристаллами авторы получили значение 4,2, в то время как максимальное значение величины P, согласно полученному в этой работе соотношению, не может быть больше 4,05.

В настоящей работе была определена ориентация молекул относительно направления оси микротрубки на основании результатов исследования двойного лучепреломления серповидных эритроцитов.

Материал и методика. Для изучения двойного лучепреломления кровь пациентов с серповидной анемией разбавлялась физиологическим раствором в соотношении 1:40, помещалась на предметное стекло, на которое накладывалось покровное. Далее образец помещался в атмосферу, содержащую 95% азота и 5% углекислого газа при температуре 25°. В течение 24 ч процессы деоксигенации и превращения клеток в серповидные завершались*.

Исследование двойного лучепреломления проводилось на поляризационном микроскопе МП-3, который был усовершенствован нами: между поляризатором и объектом вставлялся компенсатор, укрепленный на лимбе, а источником света служила ртутная лампа ДРШ-500, пучок от которой проходил через монохроматор УМ-2. В качестве источника света использовался также гелий-неоновый лазер ЛГ-75 с длиной волны 633 нм.

Величина двойного лучепреломления Δn определялась по соотношению:

$$\Delta n = \frac{\lambda \sin \delta_0 \sin 2(\xi - \xi_0)}{2\pi l}, \quad (8)$$

---

* Образцы для исследования были любезно предоставлены нам Б. Магдофф-Фейрчальд, которой пользуясь случаем, авторы выражают искреннюю признательность.

чадьд, которой пользуясь случаем, авторы выражают искренюю признательность.

где l—толщина анизотропного слоя, ξ и ξ_0—полутеневые азимуты компенсатора в присутствии двулучепреломляющего образца и при его отсутствии соответственно, δ—максимальная разность хода, λ—длина волны.

Результаты и обсуждение. Зависимость максимальной для данной длины волны величины двойного лучепреломления от λ приведена на рисунке.

Следует отметить, что аналогичная зависимость была получена для кристаллов дезоксигемоглобина Перутцем и Митчисоном [9]. Двойное лучепреломление всех эритроцитов было отрицательным.

В связи с высокой концентрацией белка в жидкокристаллической фазе (около 35%) [6], плотной упаковкой надмолекулярных структур и малой асимметрией формы белковых молекул оптической анизотропией формы можно пренебречь и считать, что величина двойного лучепреломления обусловлена собственной оптической анизотропией отдельных белковых молекул.

Величина двойного лучепреломления Δn связана с анизотропией поляризуемости молекул соотношением [1]:

$$\Delta n = \frac{2\pi N}{n}\left(\frac{n^2+2}{3}\right)^2(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y), \qquad (9)$$

где N—число анизотропных молекул в единице объема, n—показатель преломления среды, $\bar{\alpha}_x$ и $\bar{\alpha}_y$ —средние значения поляризуемости молекулы во взаимно перпендикулярных направлениях и перпендикулярных направлению распространения света соответственно.

Если свет распространяется в направлении, перпендикулярном оси симметрии надмолекулярного образования, в случае с аксиально симметричным эллипсоидом поляризуемости величина $(\alpha_x - \bar{\alpha}_y)$ может быть выражена через главные поляризуемости молекул α_1 и α_2.

$$(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y) = \frac{3}{2}(\alpha_1 - \alpha_2)\left(\overline{\cos^2\Theta} - \frac{1}{3}\right), \qquad (10)$$

где θ—угол между осями симметрии надмолекулярного образования и эллипсоида поляризуемости молекулы.

Подставив $(\bar{\alpha}_x - \bar{\alpha}_y)$ из (10) в (9), можно получить:

$$\Delta n = \frac{2\pi N}{n}\left(\frac{n^2+2}{3}\right)^2(\alpha_1 - \alpha_2)\frac{3\overline{\cos^2\Theta} - 1}{2}. \qquad (11)$$

В связи с тем, что анизотропию оптической поляризуемости невозможно рассчитать, величину $\overline{\cos^2\theta}$ можно определить, сравнив с двойным лучепреломлением кристалла, в котором ориентация молекул известна. В случае с глобулярными белками определение $\overline{\cos^2\theta}$ таким образом правомерно, так как известно, что при переходе из раствора в кристалл молекулы белков не подвергаются большим деформациям, поэтому их анизотропию поляризуемости можно считать неизменной также в кристаллическом и жидкокристаллическом состояниях.

Сравнив соотношения (11), написанные для жидкокристаллического и кристаллического состояний, можно получить:

$$\overline{\cos^2\theta_{жк}} = \frac{1}{3} + \left(\overline{\cos^2\theta_к} - \frac{1}{3}\right)\frac{\Delta n_{жк}\, n_{жк}\, N_к\, (n_к^2+2)^2}{\Delta n_к\, n_к\, N_{жк}\, (n_{жк}^2+2)^2} \qquad (12)$$

Здесь $\Delta n_к$ и $\Delta n_{жк}$ — величины двойного лучепреломления для кристалла и жидкого кристалла соответственно, $N_к$ и $N_{жк}$ — числа молекул в единице объема в кристаллическом и жидкокристаллическом состояниях, $\theta_к$ — угол между осью молекулы гемоглобина и кристаллографической осью, $\theta_{жк}$ — угол между осью χ и осью микротрубки.

Значения $\Delta n_{жк}$ приведены на рисунке.

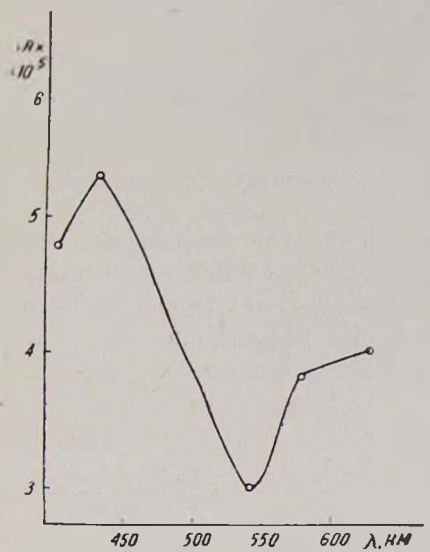

Рис. Зависимость двойного лучепреломления серповидных эритроцитов от длины волны.

Величина $\Delta n_к$ была определена в работе Перутца и Митчисона [9].

Величины $n_к = 1{,}47$, $n_{жк} = 1{,}40$, концентрация белка в кристаллах дезоксигемоглобина равна около 65%, поэтому отношение величины $\frac{N_к}{N_{жк}}$ и равно 2. Величина $\theta_к$ равна 0°. Подстановка этих значений в соотношение (12) дает для величины $\theta_{жк}$ значение $24 \pm 4°$.

Таким образом, исследование двойного лучепреломления серповидных клеток и сравнение полученных результатов с результатами исследования кристаллов дезоксигемоглобина позволяет определить ориентацию молекул гемоглобина в микротрубках. Полученные данные согласуются с результатами, полученными при исследовании агрегатов методом линейного дихроизма. Следует отметить, что метод двойного лучепреломления можно применять при исследовании значительно большего числа объектов, чем линейный дихроизм электронных спектров, который в видимой области поглощает небольшое число объектов, а двойным лучепреломлением обладают практически все.

Ереванский государственный университет
кафедра общей физики и биофизики

Поступило 21.VIII 1980 г.

ՀԵՄՈԳԼՈԲԻՆ–S-ի ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԿՈՂՄՆՈՐՈՇՈՒՄԸ ԱԳՐԵԳԱՏՆԵՐՈՒՄ

Ա. Կ. ԴԱԴԻՎԱՆՅԱՆ, Ա. Ռ. ԾԱՂԻԿՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է մանգաղանման էրիտրոցիտների երկբեկումը տարբեր երկարության լուսային ալիքների դեպքում։

Հեղուկ բյուրեղային փուլում, մանգաղանման էրիտրոցիտների առավելագույն երկբեկման և դեզօքսիհեմոգլոբինի բյուրեղների երկբեկման համեմատությունից, հայտնաբերվել է հեմոգլոբին-S-ի մոլեկուլների կողմնորոշումը։

Յույց է տրված, որ առանցքը, որի ուղղությամբ հեմոգլոբինի մոլեկուլի բևեռացվելիությունը նվազագույն է, «միկրոխողովակի» առանցքի հետ կազմում է 4° անկյուն։

THE ORIENTATION OF HEMOGLOBIN-S MOLECULES IN AGGREGATES

A. K. DADIVANIAN, A. R. TSAGIKIAN

Double refraction in sicklelike erythrocytes at different wave lengths has been studied. The orientation of hemoglobin-S molecules in liquid crystalline phase has been determined. It has been established that the axis of the least hemoglobin molecule polarization makes with the axis of microtube an angle of (24°—4).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я.* Структура макромолекул в растворах. М., 1964.
2. *Hofrichter I., Hendricker D. G., Eaton W. A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *70*, 3604, 1973.
3. *Ingram V. M.* Nature, *180*, 328, 1957.
4. *Levinthal C., Wodak S. J., Kahn P., Dadivanian A. K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *72*, 1330, 1975.
5. *Magdoff-Fairchild B., Swerdlow P. H., Bertles I. F.* Nature, *239*, 217, 1972.
6. *Muirhead H., Cox I., Mazarella L., Perutz M. F.* J. Mol. Biol., *28*, 117, 1968.
7. *Murayama M.* Nature, *204*, 420, 1965.
8. *Murayama M., Olson R. A., Jounings W. H.* Biochim. Biophys. Acta, *91*, 194, 1965.
9. *Perutz M. F., Mitchison I. M.* Nature, *166*, 677, 1950.
10. *Vallance-Jones A., Thesis Ph. D.* Cambridge, 1949.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1157—1164, 1980

УДК 547.963.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛЫ ПОЛИРИБОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

П. П. ЯСЕМ, В. М. АСЛАНЯН, Ю. С. БАБАЯН, Е. Б. ДАЛЯН

Методами КД и УФ-спектрофотометрии исследовано взаимодействие ионов двухвалентных металлов, Mg^{2+}, Cu^{2+} и Mn^{2+}, с полиадениловой кислотой. Выяснено, что ионы Mg^{2+}, связываясь с фосфатными группами, стабилизируют спиральную структуру кислоты. Ионы Cu^{2+} преимущественно взаимодействуют с основаниями полиадениловой кислоты, приводя к сильной дестабилизации и разрушению спиральной структуры. Воздействие ионов Mn^{2+} носит сложный характер: при концентрациях M/P 2 наблюдается стабилизация спиральной структуры, дальнейшее повышение концентрации до M/P=6 сопровождается дестабилизацией спирали.

Ключевые слова: полиадениловая кислота, ионы металлов, стабильность.

Изучению влияния ионов двухвалентных металлов на структуру ДНК посвящен целый ряд работ [1, 7, 11, 14—17]. Проведенные до настоящего времени исследования подтверждают, что специфические взаимодействия нуклеиновая кислота—белок могут происходить лишь в присутствии двухвалентных ионов переходных металлов, а в ряде случаев ими стимулируется протекание ферментативных реакций [19, 22]. Известно также [7, 8, 20, 24], что некоторые ионы двухвалентных металлов (например, Ca^{2+} и Mg^{2+}) стабилизируют структуру двойной спирали ДНК, в то время как другие (Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}) являются сильными дестабилизаторами.

Влияние двухвалентных катионов на структуру и стабильность ДНК во многих случаях существенно зависит от нуклеотидного состава, что является свидетельством избирательного характера взаимодействия ионов с азотистыми основаниями. Весьма информативным в плане выяснения специфичности воздействия двухвалентных катионов на конформационную стабильность ДНК является, очевидно, исследование их взаимодействий с синтетическими полинуклеотидами. В настоящей работе излагаются результаты исследований, посвященных выяснению характера и природы взаимодействий ионов Mg^{2+}, Cu^{2+} и Mn^{2+} с азотистыми основаниями полиадениловой кислоты (поли-А).

Материал и методика. Исследования проводились на промышленном препарате полирибоадениловой кислоты фирмы «Reanal» (Венгрия) в уксусно-ацетатном буфере (ионная сила $[Na^+]=10^{-3}$ М, pH 6,0). Растворы составлялись и хранились в поли-

этиленовой посуде для исключения влияния примесных двухвалентных ионов. Концентрация поли-А в исследуемых растворах ~ 25 γ/мл или 7.10^{-5} М по фосфору. Ионы двухвалентных металлов Mg^{2+}, Cu^{2+} и Mn^{2+} вводились в буферный раствор поли-А в виде хлоридов. Места неспецифического связывания—фосфатные группы молекулы поли-А—были предварительно блокированы ионами Mg^{2+}.

Спектры кругового дихроизма (КД) снимались на дихрографе «Roussel Jouan-II». Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути в 1 см; коэффициент экстинкции $\varepsilon=9686$. Для каждой исследуемой системы предварительно снимался спектр поглощения на спектрофотометре «Specord UV-VIS».

Результаты и обсуждение. Известно, что полиаденциловая кислота в кислых средах существует в форме двойной спирали, в то время как в нейтральной—конформации существенно иные, биспираль практически не реализуется [9, 10]. Вместе с тем в нейтральных средах поли-А обладает выраженной упорядоченностью, характер которой заметно отличается от биспирального порядка. О различии в конформациях поли-А в кислых и нейтральных средах свидетельствуют результаты, полученные методами спектрополяриметрии и оптического кругового дихроизма [2, 12]. Исследования, проведенные методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, свидетельствуют о том, что в нейтральной среде реализуются однонитчатые организованные структуры [13, 23]—электронная плотность на единицу длины оказалась примерно вдвое меньшей, чем в биспиральной форме. Практически та же информация была получена по дифракции рентгеновских лучей на ориентированных пленках поли-А [18]. Изучение растворов олигонуклеотидов [3, 4] убеждает в том, что структурная упорядоченность в условиях, при которых не могут образоваться биспиральные комплексы, проявляется уже на их уровне. В работе [21] для исключения сомнений относительно упорядоченности структуры поли-А в нейтральной среде, наряду с поли-А, были исследованы динуклеотидмонофосфаты и поли-N^6-гидроксиэтиладениловая кислота (присутствие в последней громоздких замещающих групп препятствует образованию биспиральной конформации). Совместный анализ спектров КД и УФ-поглощения всех трех соединений свидетельствует о реальности существования однонитчатой спиральной конформации. Естественно, что такие структуры скорее всего стабилизируются межплоскостными взаимодействиями азотистых оснований.

Теоретические и экспериментальные изыскания [5, 6] привели авторов к следующему заключению о геометрии однонитчатой спирали для олигонуклеотидов адениловой кислоты: основания лежат в параллельных плоскостях, перпендикулярных оси спирали; угол между основаниями равен 36°; расстояние между основаниями составляет 3,4 А°.

В полном согласии с изложенными соображениями находятся и наши данные о температурном плавлении растворов поли-А при нейтральных pH методами УФ-спектрофотометрии и КД. С повышением температуры наблюдается гипохромность (29,5%) основной полосы поглощения поли-А с одновременным уменьшением по абсолютному зна-

чению положительной и отрицательной полос спектров кругового дихроизма при неизменности пересечения с базисной линией, что может быть обусловлено только переходом упорядоченной структуры в беспорядочный клубок.

Перейдем теперь к изложению результатов исследований, посвященных выяснению характера воздействия бизарядных катионов Mg^{2+}, Cu^{2+} и Mn^{2+} на упорядоченную структуру молекул поли-А в буферных растворах с pH 7.

Влияние ионов Mg^{2+} на конформацию и стабильность молекулы поли-А. При добавлении Mg^{2+} к раствору поли-А возможно образование комплексов между ними, что должно приводить к изменению КД-спектров. В присутствии Mg^{2+} спектр КД поли-А претерпевает определенные изменения ($\Delta\varepsilon_{263}$—уменьшается, а $\Delta\varepsilon_{245}$—увеличивается по абсолютному значению). Одновременно с увеличением концентрации Mg^{2+} увеличивается гипохромность поли-А (в буфере $\Delta H=29{,}5\%$, а для раствора, содержащего $2\cdot10^{-4}$ М $MgCl_2$, $\Delta H=32\%$), что, по-видимому, указывает на увеличение спиральности полимера в присутствии Mg^{2+}. Увеличение спиральности скорее всего обусловлено тем, что ионы Mg^{2+} в основном взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами, экранируя их взаимное отталкивание. Эффективность экранировки определяется отношением M/P. Это предположение согласуется с УФ-спектрофотометрическими данными, которые показывают, что при относительно малых концентрациях Mg^{2+} ($M/P \leqslant 10$) сдвиг в максимуме полосы поглощения поли-А не наблюдается. Ослабление взаимного отталкивания фосфатных групп сопровождается стабилизацией спиральной структуры. При этом равновесие между двумя формами смещается в сторону спиральной, что, естественно, должно сопровождаться увеличением степени спиральности. Уменьшение $\Delta\varepsilon_{263}$ и увеличение гипохромности можно связать именно с этим эффектом. При концентрации Mg^{2+} $M/P=0{,}5$ происходит резкое увеличение амплитуды полосы $|\varepsilon\Delta_{245}|$, которое с повышением концентрации Mg^{2+} до $M/P=10$ не сопровождается существенным изменением пространственной организации комплексов. Это значит, что экранировка отрицательно заряженных фосфатных групп достигает насыщения при наличии в системе одного катиона Mg^{2+} на две фосфатные группы.

С увеличением температуры наблюдается деспирализация поли-А—уменьшаются $\Delta\varepsilon_{263}$ и $|\Delta\varepsilon_{245}|$ и увеличивается поглощение растворов поли-А (рис. 1). В присутствии ионов Mg^{2+} нагревание сопровождается освобождением части этих ионов, связанных с фосфатными группами. Эти ионы могут связываться за счет ион-дипольных взаимодействий с азотистыми основаниями и приводить к образованию комплексов и агрегатов. Последние при определенных концентрациях осаждаются. Это явление подробно изучено в работах [14, 16]. Термостабильность комплексов поли-А с Mg^{2+} зависит от M/P. При $M/P \leqslant 1$ комплексы более термостабильны, чем поли-А, при $M/P \geqslant 3$ термостабильность комплексов уменьшается, что скорее всего обусловлено связыванием ионов Mg^{2+} с азотистыми основаниями.

Влияние ионов Cu^{2+} на конформацию и стабильность поли-А. Добавление небольших количеств ионов Cu^{2+} (10^{-5} — 10^{-4} М) сопровождается значительным изменением конформации поли-А. В этом интервале концентраций, сходным с концентрацией фосфора ($7 \cdot 10^{-5}$ М), конформационный переход спираль—клубок происходит при комнатной температуре.

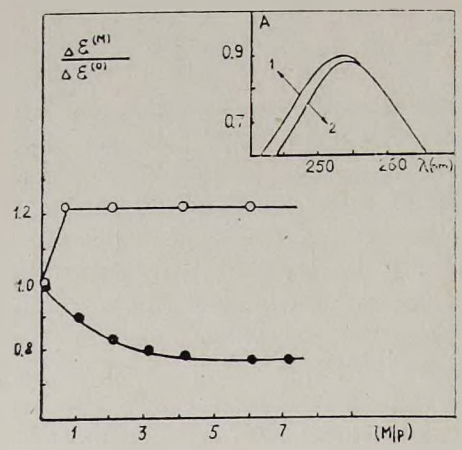

Рис. 1. Зависимость отношения $\frac{\Delta\varepsilon_{min}(M)}{\Delta\varepsilon_{min}(0)}$ (○) и $\frac{\Delta\varepsilon_{max}(M)}{\Delta\varepsilon_{max}(0)}$ (●) от концентрации ионов Mg^{2+}. В квадрате даны спектры УФ-поглощения (1)—поли-А и (2)—поли-А + $+ Mg^{2+}$.

Как видно из спектров УФ-поглощения комплекса поли-А с Cu^{2+} с возрастанием концентрации последнего (до $3 \cdot 10^{-5}$ М) наблюдаются увеличение максимума полосы поглощения (максимальный гипохромный эффект $\sim 24\%$ при концентрации M/P = 1,5 Cu^{2+}) и сдвиг всей кривой на ~ 3 нм в сторону длинных волн. Этот сдвиг можно объяснить взаимодействием Cu^{+2} с аденином.

На рис. 2 показаны относительные изменения $|\Delta\varepsilon_{min}|$ спектров КД комплексов поли-А с Cu^{2+} (кр. 1) и поли-А с Cu^{2+} в присутствии Mg^{2+} (M/P = 0,5). Небольшое увеличение анизотропии молекулы в пределах концентраций $10^{-5} \div 3 \cdot 10^{-5}$ М указывает на некоторую стабилизацию спиральной структуры комплекса поли-А с Cu^{2+}, которая обусловлена взаимодействием ионов меди с отрицательно заряженными фосфатными группами. При дальнейшем увеличении концентрации Cu^{2+} до $7 \cdot 10^{-5}$ М происходит кооперативное разрушение спиральной структуры (переход спираль—клубок). Начиная с концентрации M/P = 1 происходит стабилизация изменений конформации комплекса. Поэтому можно предположить, что уже при M/P = 1 все спиральные участки молекулы поли-А разрушены.

В том случае (кр. 2), когда фосфатные группы предварительно блокируются ионами Mg^{2+} (M/P = 0,5), первоначального увеличения $\Delta\varepsilon_{min}|$ не наблюдается, т. е. происходит непосредственное связывание Cu^{2+} с азотистым основанием. Дальнейший ход кривой подобен кривой для поли-А + Cu^{2+} без ионов Mg^{2+}. Где-то в районе концентрации M/P = 1 наступает насыщение. Процесс разрушения спиральных участков молекулы поли-А можно считать оконченным, когда на каждое

азотистое основание садится по одному иону меди. Можно предположить, что на аденине имеется одно посадочное место для ионов Cu^{2+}, при заполнении которого происходит разрушение стэкинг-взаимодействия между основаниями, что ведет к расплетанию имеющихся спиральных участков.

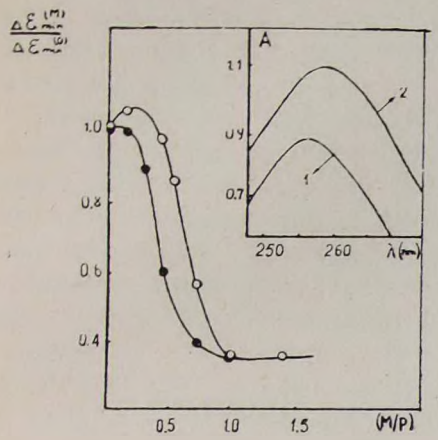

Рис. 2.

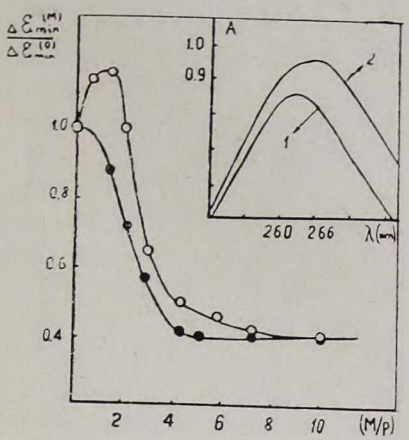

Рис. 3.

Рис. 2. Зависимость относительного изменения $\frac{\Delta\varepsilon_{min}(M)}{\Delta\varepsilon_{min}(0)}$ от концентрации ионов Cu^{2+}. (○)-поли-А + Cu^{2+}; (●)-поли-А + Cu^{2+} + 0,5 M/P Mg^{2+}. В квадрате даны спектры УФ-поглощения (1)-поли-А + 0,5 M/P Mg^{2+}, (2)-поли-А+0,5 M/P Mg^{2+} + 1,5 M/P Cu^{2+}.

Рис. 3. Зависимость относительного изменения $\frac{\Delta\varepsilon_{min}(M)}{\Delta\varepsilon_{min}(0)}$ от концентрации ионов Mn^{2+}. (○)-поли-А + Mn^{2+}; (●)-поли-А + Mn^{2+} + 0,5 M/P Mg^{2+}. В квадрате даны спектры УФ-поглощения (1)-поли-А + 0,5 M/P Mg^{2+}, (2)-поли-А + 0,5 M/P Mg^{2+} + 10 M/P Mn^{2+}.

Интересно также, что величина гипохромного эффекта для комплекса поли-А+Cu^{2+} (M/P=1,5) в присутствии Mg^{2+} (M/P=0,5) составляет ~23,5%, т. е. практически столько же, сколько без Mg^{2+}. Сдвиг максимума кривой поглощения также не изменяется при наличии ионов Mg^{2+}. Это еще раз подтверждает, что ионы Cu^{2+} предпочтительнее связываются с основаниями поли-А при этих концентрациях.

Влияние ионов Mn^{2+} на конформацию и стабильность поли-А. Добавление небольших количеств Mn^{2+} ($5\cdot10^{-5} \div 2\cdot10^{-4}$ M) приводит к незначительному уменьшению величины максимума в УФ-поглощении. В области концентраций Mn^{2+} M/P=2 УФ-поглощение уменьшается, т. е. Mn^{2+} взаимодействует с фосфатными группами поли-А. Это взаимодействие приводит к небольшой стабилизации спиральной структуры. С дальнейшим повышением концентрации Mn^{2+} наблюдается гипохромный эффект (~5%) в узких пределах концентраций Mn^{2+} ($2\cdot10^{-4} - 5\cdot10^{-4}$). Интересно, что для Cu^{2+} гипохромный эффект зна-

ՀԱՅԿ.ԱՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՍԵՓԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԳՐԱԴԱՐԱՆ

чительно выше (24%) эффекта Mn^{2+}. Увеличение поглощения сопровождается сдвигом положения максимума на 4 нм в сторону длинных волн. Это, по всей видимости, говорит о том, что произошло взаимодействие Mn^{2+} с аденином поли-А, с последующей дестабилизацией спиральных участков, о чем свидетельствует гипохромный эффект.

На рис. 3 (кр. 1) даны относительные изменения $|\Delta\varepsilon_{min}|$ спектров КД поли-А в присутствии ионов Mn^{2+}. Видно, что вплоть до концентраций Mn^{2+} $M/P \leqslant 2$ наблюдается увеличение анизотропии молекулы поли-А ($|\Delta\varepsilon_{min}|$ увеличивается). Это еще раз подтверждает, что при низких концентрациях (до $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ М) ионы Mn^{2+} взаимодействуют с фосфатными группами, стабилизируя спиральную структуру поли-А, причем достаточно двух ионов Mn^{2+} на одну фосфатную группу, чтобы экранировать весь отрицательный заряд фосфора. Дальнейшее увеличение концентрации до $M/P=6$ приводит к резкому уменьшению анизотропии молекулы поли-А, обусловленному расплетанием спиральных участков ($\Delta\varepsilon_{max}$ и $|\Delta\varepsilon_{min}|$ уменьшаются), происходящим вследствие взаимодействия ионов с аденином. Дальнейший рост концентраций вплоть до 10^{-3} М не меняет существенным образом хода кривой, т. е. при $M/P=6$ процесс разрушения спиральной структуры достигает насыщения.

Как видно из рис. 3 (кр. 2), предварительная экранировка фосфатных групп ионами Mg^{2+} ($M/P=0{,}5$) приводит к тому, что Mn^{2+} сразу начинает взаимодействовать с аденином, что сопровождается значительным изменением конформации полученного комплекса. Процесс стабилизации изменений структуры в этом случае начинается с $M/P=4$. Это значит, что необходимо минимум четыре иона Mn^{2+} для того, чтобы полностью разрушить стэкинг-взаимодействия между основаниями и деспирализовать структуру поли-А, тогда как в случае с Cu^{2+} достаточно одного иона Cu^{2+} на одно основание. Можно предположить, что для Mn^{2+} в отличие от Cu^{2+} на аденине имеется четыре посадочных места. Это предположение поддерживается тем фактом, что на аденине имеются четыре отрицательно заряженные группы. Возможно, что константы связывания этих отрицательно заряженных групп с ионами Mn^{2+} имеют одинаково высокие значения, тогда как для Cu^{2+} константа связывания с одной из них сильно превалирует над остальными.

Ереванский государственный университет,
кафедра молекулярной физики и биофизики

Поступило 12.VIII 1980 г.

ԵՐԿՎԱԼԵՆՏ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԱՋԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊՈԼԻԱԴԵՆԻԼԱՅԻՆ ԹԹՎԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԻ ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻՈՆ ՎԻՃԱԿԻ ՎՐԱ

Պ. Պ. ՅԱՍԵՄ, Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, ՅԱ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ

Օպտիկական շրջանային դիխրոիզմի և գերմանուշիշակազույն սպեկտրոֆոտոմետրայի մեթոդներով ուսումնասիրվել են երկվալենտ մետաղների իոնների Mg^{2+}, Cu^{2+} և Mn^{2+} փոխազդեցությունը պոլիադենիլային թթվի

(պոլի-Ա) հետ։ Պարզվել է, որ Mg^{2+}-ի իոնները կապվելով ֆոսֆատային խմբերի հետ, կայունացնում են պոլի-Ա-ի պարուրաձև կառուցվածքը։ Ընդ որում պոլի-Ա+Mg^{2+} կոմպլեքսի կայունացումը դիտվում է Mg^{2+}-ի M/P$\geqslant$0,5 կոնցենտրացիաների դեպքում։

Cu^{2+}-ի իոնները առավելապես փոխազդում են պոլի-Ա-ի հիմքերի հետ, հանդեցնելով ուժեղ ապակայունացման և պարուրաձև կառուցվածքի քանդման։ Էֆեկտը հասնում է հագեցման, երբ մեկ հիմքին համապատասխանում է Cu^{2+}-ի մեկ իոն։

Mn^{2+}-ի ազդեցությունը պոլի-Ա-ի վրա ունի բարդ բնույթ։ M/P$\leqslant$2 կոնցենտրացիաների դեպքում դիտվում է պարուրաձև կառուցվածքի կայունացում։ Mn^{2+}-ի կոնցենտրացիայի հետագա բարձրացումը մինչև M/P=6 ուղեկցվում է պարուրի ապակայունացմամբ, որը պայմանավորված է Mn^{2+}-ի փոխազդեցությամբ պոլի-Ա-ի հիմքերի վրա։

Ապակայունացումը հասնում է հագեցման, երբ մեկ հիմքին համապատասխանում է Mn^{2+}-ի չորս իոն։

THE INFLUENCE OF DIVALENT METAL IONS ON CONFORMATIONAL STATE OF POLYRIBOADENILIC ACID MOLECULE

P. P. YASEM, V. M. ASLANIAN, Yu. S. BABAIAN, E. B. DALIAN

The interaction of divalent metal Mg^{2+}, Cu^{2+} and Mn^{2+} ions with polyadenil acid (Poly-A) has been investigated by CD and UV—absorption methods. It is, revealed, that the Mg^{2+} ions binding with phosphate groups stabilize the helix structure of Poly-A. The effect of Poly-A+ +Mg complex stabilization is observed at Mg^{2+} concentrations M/P$\geqslant$0,5. Ions of Cu^{2+} interact mainly with bases of Poly-A, bringing to an intense destabilization and destruction of helix structure (the effect comes to saturation when one Cu^{2+} ion corresponds to one base). The influence of Mn^{2+} ions on Poly-A has a complex character. At concentrations M/P$\leqslant$2 a stablization of helix stucture is observed. The further increase of Mn^{2+} concentration to M/P=6 is accompanied with helix destabilization, due to Mn^{2+} interaction with Poly-A bases. The destabilization effect comes to saturation when four Mn^{2+} ions correspond to one base.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А., Хоменко С. А., Гладченко Г. О.* Молекулярная биология, *11*, вып. 4, 748, 1977.
2. *Brahms J.* Nature, *202*, 797, 1964.
3. *Brahms J., Maurizet J., Michelson A. M.* J. Mol. Biol , *15*, 497, 1961.
4. *Brahms J., Michelson A. M., Van-Holde K. S.* J. Mol. Biol., *15*, 497, 1966.
5. *Bush C. A., Brahms J.* J. Chem. Phys., *46*, 79, 1967.
6. *Bush C. A., Tinoco I.* J. Mol. Biol., *23*, 601, 1967.
7. *Eichhorn G. L., Shin Y. A.* J. Amer. Chem. Soc., *90*, 21, 7323, 1968.

8. *Förster, Bauer E., Schutz H., Berg H., Akimenko M., Minchenkova L. E., Evdokimov Yu. M., Varshavsky Ya. M.* Biopolymers, *18*, 625, 1979.
9. *Fresco J. R., Klempeter E.* Ann. N-Y Acad. Sci., *81*, 730, 1959.
10. *Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P.* Nature, *188*, 98, 1960.
11. *Hanlon S., Chan A., Berman S.* Biochem. Biophys. Acta, *519*, 526, 1978.
12. *Holcomb D. N., Tinoco I.* Biopolymers, *3*, 121, 1965.
13. *Luzzati V., Mathis A., Masson F., Witz J.* J. Mol. Biol., *10*, 28, 1964.
14. *Lyons J. W., Kotin L.* J. Amer. Chem. Soc., *87*, 1781, 1965.
15. *Mathieson A. R., Olayemi J. Y.* Arch. Biochem. Biophys., *169*, 237, 1975.
16. *Ott G. S., Ziegler E., Bauer W.* Biochemistry, *14*, 3431, 1975.
17. *Record M. Th., Jr.* Biopolymers, *13*, 425, 1975.
18. *Rich A., Davies D. E., Crick F. H. C., Watson E. D.* J. Mol. Biol., *3*, 1961.
19. *Slater J. P., Mildvan A. S., Loeb L. A.* Biochem. Biophys. Res. Commun, *44*, 37 1971.
20. *Shin Y. A.* Biopolymers, *12*, 2459, 1973.
21. *Van-Holde K. C., Brahms J., Michelson A. M.* J. Mol. Biol., *12*, 726, 1965.
22. *Vocel S. V., Slepneva I. A., Backer J. M.* Biopolymers. *14*, 2445, 1975.
23. *Witz J., Luzzati V.* J. Mol. Biol., *11*, 620, 1965.
24. *Zimmer Ch., Luck G., Triebel H.* Biopolymers, *13*, 425, 1974.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1165—1170, 1980

УДК [557.12:616—006]:59

ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ НА ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Г. А. ПАНОСЯН, А. В. НЕРКАРАРЯН

Исследовано действие гидрокортизона и инсулина на изоферментный спектр и общую активность лактатдегидрогеназы печени мышей. Оба препарата снижают общую активность фермента и содержание гомотетрамеров H_4 и M_4, содержание гетеротетрамеров резко увеличивается.

Гормоны ослабляют действие клеток асцитной карциномы Эрлиха на изоферментный спектр лактатдегидрогеназы печени.

Ключевые слова: изоферменты ЛДГ, опухолеобразование, гидрокортизон, инсулин.

При исследовании изоферментных спектров лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в отдаленных от опухоли тканях при развитии асцитной карциномы Эрлиха у мышей [5] и карциносаркомы Уокера у крыс [6] нами были обнаружены изменения, указывающие на нарушение генетической регуляции синтеза ЛДГ печени.

С точки зрения выяснения механизмов возникновения нарушений большой интерес представляет исследование изоферментного спектра ЛДГ печени после введения опухолевых клеток в условиях измененного гормонального статуса организма. В настоящее время считается доказанным, что гормоны в комплексе с белками-рецепторами участвуют в процессах внутриклеточной регуляции синтеза белка. Так, например, гидрокортизон и инсулин увеличивают Mg^{2+} - и Mn^{2+} -зависимую РНК-полимеразу в ядрах печени крыс [4, 10], изменяют изоферментный состав пируваткиназы и ЛДГ [1, 3, 7] и т. д. С другой стороны, гидрокортизон является активным противоопухолевым препаратом, физиологические концентрации которого замедляют рост опухоли [8, 9, 11], и, что особенно важно, действие его максимально проявляется на начальной стадии развития опухоли [2].

Настоящая работа посвящена изучению изоферментного спектра ЛДГ печени мышей после введения клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях измененного гормонального статуса организма.

Материал и методика. Опыты проводились на белых беспородных мышах массой 20—25 г. Были использованы растворы гидрокортизона фирмы «Рихтер» и инсулина отечественного производства. Животным вводили по 10^7 клеток асцитной карциномы Эрлиха и гормоны за час до введения опухолевых клеток: гидрокортизон—подкожно по 50 мг/кг, инсулин—внутрибрюшинно по 10 ед./кг веса. Через 30 мин после инсулина вводили по 0,5 мл 40%-ного раствора глюкозы. Животных забивали через 12 ч после введения опухолевых клеток.

При инкубации клеток с гормонами in vitro использовали три дозы каждого гормона, рассчитанные на 10^7 клеток опухоли: гидрокортизон—1, 0,1, 0,01 мг; инсулин—0,2, 0,02, 0,002 ед.

Опухолевые клетки инкубировали в физиологическом растворе и с гормонами при 37° в течение часа, промывали физиологическим раствором, суспензировали в нем и вводили внутрибрюшинно по 10^7 клеток.

Мышей забивали через 12 часов.

Перевивку опухоли, получение ЛДГ-активных тканевых экстрактов, электрофоретическое разделение изоферментов и определение активности ЛДГ (А) проводили методами, описанными ранее [5].

Для определения степени изменений в изоферментном спектре ЛДГ печени при введении опухолевых клеток, наряду с предложенным ранее коэффициентом Х [5], мы использовали еще один показатель—К, рассчитываемый по формуле

$$K = \frac{a_1 \cdot A_1}{a_0 \cdot A_0}, \text{ а } X = \frac{a_1}{a_0},$$

где a_0 и a_1—процентное содержание Н-субъединиц в контроле и в опыте, A_0 и A_1—общая активность ЛДГ в контроле и в опыте соответственно.

При использовании коэффициента К наблюдаемый эффект должен выявляться резче, так как при этом учитывается и изменение общей активности ЛДГ.

Результаты и обсуждение. Исследование изоферментного спектра ЛДГ печени мышей при развитии асцитной карциномы Эрлиха выявило изменения, возможной причиной которых являются нарушения на уровне генома, выражающиеся в изменении величины отношения активностей генов А и В, отношения их генопродукта М:Н, увеличении общей активности ЛДГ и содержания Н-субъединиц [5].

Необходимо было выяснить, изменяется ли реакция организма на введение опухолевых клеток при воздействии такими биологически активными веществами, как гормоны. С этой целью был определен изоферментный состав ЛДГ печени мышей после инъекции гидрокортизона и инсулина до введения опухолевых клеток. Контрольным группам животных вводили гидрокортизон и инсулин без опухолевых клеток.

Результаты экспериментов представлены в табл. 1, из данных которой видно, что инсулин приводит к увеличению содержания Н-субъединиц, введение опухолевых клеток через час после гормона практически не изменяет этой картины. Возможно, инсулин нарушает равновесие между диссоциацией и ассоциацией М- и Н-субъединиц, стабилизирует гетеротетрамеры, не затрагивая генетической регуляции синтеза субъединиц.

Введение гидрокортизона также приводит к значительным изменениям в изоферментном спектре. Увеличивается содержание Н-субъединиц, резко повышается содержание гетеротетрамеров: ЛДГ-2 (почти в 2 раза), ЛДГ-3 и ЛДГ-4 (почти в 3 раза). Содержание ЛДГ-5 уменьшается в 2 раза, а ЛДГ-1—практически не меняется. Опухолевые клетки, введенные через час после гидрокортизона, увеличивали содержание Н-субъединиц до 25,5%. По-видимому, гормон уменьшает, но полностью не снимает действия опухолевых клеток на печень мышей.

Таблица 1

Изоферментный спектр ЛДГ печени при введении гормонов и опухолевых клеток, M±m

Серии	H_4	H_3M_1	H_2M_2	H_1M_3	M_4	H, %
Н	0,9±0,1	1,8±0,3	5,6±0,8	11,1±1,0	80,6±2,2	7,8
О	6,1±0,5	12,3±1,5	17,4±0.7	28,2±1,8	36,0±1,5	31,1
И	0	3,0±0.1	12,7±0,5	21,5±0,9	62,8±1.4	14,0
И+О	0	3,9±0,1	12,3±0,6	21,4±1,2	62,4±1,7	14,4
ГК	0,5	3,7±0.2	18,0±0,9	29,6±1,1	48,2±1,2	19,7
ГК+О	2,5±0,1	9,4±0,5	15,3±0,8	33,1±1.4	39,7±1,1	25,5

Н—норма, О—после введения опухолевых клеток, И—инсулина, И+О—инсулина и опухолевых клеток, ГК—гидрокортизона, ГК+О—гидрокортизона и опухолевых клеток, Н, %—процентное содержание Н-субъединиц.

Было исследовано также действие гормонов на опухолевые клетки в опытах in vitro. Клетки асцитной карциномы Эрлиха вводили мышам после инкубации с гидрокортизоном и инсулином (табл. 2). Инкубированные опухолевые клетки вводили также контрольным группам

Таблица 2

Изоферментный спектр ЛДГ после введения инкубированных с гормонами опухолевых клеток, M±m

Варианты		H_4	H_3M_1	H_2M_2	H_1M_3	M_4	H, %
А		4,2±0,3	9,7±0,5	12,8±0,9	25,6±1,2	47,7±1,5	24,3
Б	I	0,1	1,8±0,1	8,9±0,6	13,5±0.7	75,7±2,1	9,3
	II	0	0	9,5±0,3	15,0±1,1	75,5±1,9	8,5
	III	0,1	2,0±0,2	12,5±0,8	18,8±1,4	66,6±2,2	12,6
В	I	0	1,1±0,1	7,7±0.4	12,8±0,8	78,4±2,4	7,9
	II	0,2	2,4±0,3	10,8±0,7	12,5±0,6	74,1±1,9	10,5
	III	0,3	3,0±0,1	12,3±0,5	19,5±0,9	64,9±2,1	13,6

А—после введения инкубированных в физиологическом растворе опухолевых клеток, Б—инкубированных с инсулином (I—0,2, II—0,02, III—0,002 ед./10^7 кл.), В—инкубированных с гидрокортизоном (I, II—0,1, III—0,01 мг/10^7 кл.).

мышей, которых оставляли для определения прививаемости опухоли. В контрольных группах опухоль прививалась только в случае инкубирования опухолевых клеток с гидрокортизоном в дозе 0,001 мг/10^7 клеток и с инсулином в дозе 0,002 ед./10^7 клеток. Однако рост опухоли задерживался и первые признаки ее появления отмечались через 17—20 дней; введение неинкубированных опухолевых клеток вызывало появление этих признаков через 5—6 дней.

Как видно из табл. 2, инкубация опухолевых клеток в физиологическом растворе в течение часа при 37° приводит к некоторому ослаблению их действия на изоферментный спектр ЛДГ печени мышей. Если неинкубированные опухолевые клетки увеличивали содержание Н-субъединиц до 31,1, то инкубированные—до 24,3%.

Предварительное инкубирование in vitro опухолевых клеток с большими дозами гидрокортизона и инсулина полностью снимало активи-

рующее действие опухолевых клеток (I и II варианты экспериментов). Малые дозы гормонов слабее действуют на клетки асцитной карциномы Эрлиха и последние почти в 2 раза увеличивают содержание Н-субъединиц.

Таким образом, результаты, представленные в табл. 2, дают возможность предположить, что фактор, оказывающий дестабилизирующее действие на регуляцию активности генов, направляющих синтез Н- и М-субъединиц ЛДГ, чувствителен к действию гидрокортизона и инсулина.

По-видимому, изменение изоферментного спектра ЛДГ печени после введения инсулина и опухолевых клеток (И+О в табл. 1) отражает лишь влияние гормона на печень, и доза 10 ед./кг полностью снимает действие опухолевых клеток.

Одновременно с изоферментным спектром ЛДГ определялась и общая активность фермента. Как инсулин, так и гидрокортизон уменьшают общую активность ЛДГ. На основании данных, полученных при определении общей активности и изоферментного спектра ЛДГ, мы рассчитали величины изменений, вызываемых гормонами и опухолевыми клетками.

Таблица 3

Действие гормонов на опухолевые клетки и печень мышей in vivo и in vitro

Серии	А, %	Н, %	Х	К
Норма	100	7,8	1,0	1,0
Опухолевые клетки	176	31,1	4,0	7,0
Опухолевые клетки, и. ф*	128	24,3	3,0	3,8
Гидрокортизон in vivo	95	19,7	2,5	2,4
Гидрокортизон + опухолевые клетки	94	25,5	3,2	3,0
Гидрокортизон in vitro				
1 мг/10^7 кл.	102	7,9	1,0	1,0
0,1 мг/10^7 кл.	112	10,5	1,3	1,4
0,01 мг/10^7 кл.	114	13,6	1,7	1,9
Инсулин in vivo	93	14,0	1,8	1,6
Инсулин + опухолевые клетки	109	14,4	1,8	1,8
Инсулин in vitro	98	9,3	1,1	1,1
0,2 ед./10^7 кл.	110	8,5	1,1	1,2
0,002 ед./10^8 кл.	115	12,6	1,6	1,8

и. ф.*—опухолевые клетки, инкубированные в физиологическом растворе.

Как видно из табл. 3, нативные опухолевые клетки увеличивают синтез Н-субъединиц (Х) в 4 раза, а инкубированные в физиологическом растворе—в 3 раза. Гидрокортизон и инсулин также увеличивают содержание Н-субъединиц, но общая активность при этом уменьшается, величина К достигает лишь 2,4 и 1,6 соответственно. Так как печень является тканью с анаэробным метаболизмом и в ней преобладают М-формы ЛДГ, общая активность последней фактически отражает содержание М-субъединиц. Следовательно, уменьшение общей активности фермента, наблюдаемое при действии гормонов, указывает на

уменьшение синтеза М-субъединиц, за счет чего и увеличивается процентное содержание Н-субъединиц в изоферментном спектре ЛДГ. Возможно также, что наряду с угнетением синтеза М-субъединиц гормоны активируют синтез Н-субъединиц.

Об угнетении синтеза М-субъединиц и уменьшении общей активности ЛДГ печени и красных скелетных мышц при введении гидрокортизона имеются данные в литературе [7].

Значительное увеличение коэффициента К, по-видимому, характерно для опухолевых клеток, по величине К можно судить, вероятно, о том, вызваны ли изменения в изоферментном спектре и общей активности ЛДГ действием опухолевых клеток или они являются результатом влияния других факторов, в частности гормонов, на клетки печени.

Подтверждением этого предположения являются результаты анализа величин К, рассчитанных для изоферментных спектров ЛДГ печени при введении инкубированных с гормонами опухолевых клеток.

Таким образом, полученные результаты дают возможность предположить, что фактор (или факторы), вызывающий нарушения регуляции на уровне генома, чувствителен к гидрокортизону и инсулину, и введение гормонов приводит к значительному уменьшению либо полному ингибированию действия опухолевых клеток на изоферментный спектр ЛДГ печени мышей.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 7.V 1980 г.

ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԿՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԼԱԿՏԱՏԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ ԷՐԼԻԽԻ ԱՍՑԻՏԱՅԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄԱՅԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՆԵՐԱՐԿՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՆԵՐԿԱՐԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է հիդրոկորտիզոնի և ինսուլինի ազդեցությունը մկների լյարդի լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴՀ) իզոֆերմենտային կազմի և ընդհանուր ակտիվության վրա։ Հիդրոկորտիզոնը և ինսուլինը փոքրացնում են ԼԴՀ-ի ընդհանուր ակտիվությունը, ինչպես նաև՝ H_4 և M_4 հոմոտետրամերների պարունակությունը։ Դիտվում է հետերոտետրամերների պարունակության կրկնակի ավելացում։ Հորմոնները թուլացնում են էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի բջիջների ազդեցությունը լյարդի ԼԴՀ-ի իզոֆերմենտային կազմի վրա։

THE EFFECT OF HORMONES ON MICE LACTATEDEHYDROGENASE ISOENZYME PATTERN UNDER INJECTION OF EHRLICH ASCITES TUMOR CELLS

G. H. PANOSYAN, A. V. NERKARARIAN

The effect of cortisol and insulin on mice liver lactatedehydrogenase (LDH) isoenzyme pattern and total LDH activity, influence of hor-

mone injection on the effect of Ehrlich ascites tumor cells on the LDH isoenzyme pattern of liver have been investigated. Cortisol and insulin decrease the total activity of LDH and content of homotetramers H_4 and M_4, the content of heterotetramers increases sharply. Hormones weaken the effect of Ehrlich ascites tumor cells on liver LDH isoenzyme pattern.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Калиман П. А., Амири А. А.* Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. 62—68, Киев, 1979.
2. *Кильдема Л. А.* Вопр. мед. химии, *25,* 1, 36—41, 1979.
3. *Кожевникова К. А.* Вопр. мед. химии, *25,* 2, 171—176, 1979.
4. *Маковоз Р. К., Зильберман С. Ц.* Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. 86—88, Киев, 1979.
5. *Неркарарян А. В., Паносян Г. А.* Биолог. ж. Армении, *32,* 4, 337—345, 1979.
6. *Неркарарян А. В., Паносян Г. А.* Биолог. ж. Армении, *32,* 11, 1098—1103, 1979.
7. *Цапко Л. И., Усатенко М. С.* Биохимия, *38,* 1, 156—160, 1973.
8. *De Loecker W., Leyman A. M., Wever F.* Biochem. Soc. Trans., *6,* 6, 1237—1238, 1978.
9. *Gambarini A. G., Funck S. T. S., Armelin H. A.* Rev. brasil. biol., *39,* 3, 671—676, 1979.
10. *Martin H., Martin R., Walther S.* Vth. Eur. Symp. Basic Res. Gerontol. Weimar, 1976, Erlangen, 606—613, 1977.
11. *Milholland R. J., Margot M., Rosen F.* Biochem. Biophys. Res. Commun, *88,* 3, 993—997, 1679.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1171—1175, 1980

УДК 577.352.4

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ N-ЭТИЛМАЛЕИНИМИДА НА УАБАИН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОТОКИ ИОНОВ В МЫШЦАХ ЛЯГУШКИ

Г. Г. МАРИКЯН, С. Я. АДАМЯН, Ц. М. АВАКЯН

Изучалось влияние N-этилмалеинимида на мембранный потенциал, уабаин-нечувствительные потоки ионов натрия и калия, концентрации АТФ, АДФ и неорганического фосфата в мышцах лягушки при добавлении в раствор протекторов SN-групп. Показано, что N-этилмалеинимид действует как на конформацию энзима, обеспечивающего противоградиентную транслокацию ионов Na, так и на мембранный потенциал. Цистеамин и цистеин препятствуют действию N-этилмалеинимида, связанного с ингибированием SH-групп.

Ключевые слова: мышца лягушки, потоки Na и K, уабаин, ингибитор и протектор SH-групп.

Ранее было показано, что уабаин-нечувствительные потоки натрия в мышцах увеличиваются при добавлении ряда веществ [1, 3], в частности N-этилмалеинимида (НЭМ). Использование протекторов SH-групп позволит выяснить, связано ли влияние НЭМа на ионные потоки с ингибированием SH-групп или в основе его действия лежит другой механизм.

Материал и методика. Опыты проводились на портняжных мышцах озерной лягушки, обогащенных натрием. Определялись разностные потоки Na и K в мышцах, инкубированных в бескалиевом растворе Рингера с уабаином в концентрации 10^{-4} М. Предполагается, что в этих условиях Na:K насос максимально заторможен. Подробное описание методики приводилось ранее [2]. НЭМ использовался в концентрации 5.10^{-5} М. В качестве протекторов SH-групп были выбраны цистеамин и цистеин (10^{-4} М), эффективно защищающие клетки от радиационного поражения. В ряде опытов использовались растворы, где 90 мМ NaCl были заменены осмотически эквивалентным количеством $MgCl_2$.

Определение концентраций АТФ и АДФ проводилось энзиматическим методом в безбелковом мышечном экстракте [4, 7], а неорганический фосфат—колориметрическим [8].

Мембранный потенциал (МП) измерялся пирексовыми микроэлектродами, заполненными 3 М KCl, с потенциалом кончика—3—4 мв. Все опыты проводились строго на парных мышцах.

Результаты и обсуждение. Изменения уабаин-нечувствительных разностных потоков ($\bar{I}$) Na и K при действии НЭМа представлены в таблице (гр. 1). Наблюдаемая разница в потоках K обусловлена изменением МП мышечных волокон, а разница в потоках Na связана с влиянием НЭМа на недиффузионный компонент натриевого потока [3].

Таблица

Влияние протекторов SH-групп на потоки ионов Na и K и МП портняжной мышцы лягушки

№ графы	Условия опыта	$\bar{\Delta J}$ Na пкМ/см² сек	$\bar{\Delta J}$ K пкМ/см² сек	Δ МП мв
1	$\frac{\text{уабаин}}{\text{уабаин + НЭМ}}$	−8,0*	+3,4*	−42*
2	$\frac{\text{уабаин + НЭМ}}{\text{уабаин + НЭМ + цистеамин}}$	+4,0*	−1,5	+28*
3	$\frac{\text{уабаин + НЭМ}}{\text{уабаин + НЭМ + цистеин}}$	+5,3*	−3,8	+22*
4	$\frac{\text{уабаин}}{\text{уабаин + цистеамин}}$	−0,2	+0,5	− 1
5	$\frac{\text{уабаин}}{\text{уабаин + цистеин}}$	+1,6	+0,2	− 8
6	$\frac{\text{уабаин}}{\text{уабаин + НЭМ + цистеамин}}$	+0,7	+1,4	− 2
7	$\frac{\text{уабаин}}{\text{уабаин + НЭМ + цистеин}}$	−1,0	+0,7	− 3

Примечание: 1) Δ—Разность между результатами, приведенными в верхней и нижней строчке каждой графы.

2) В каждой серии опытов использовалось от 6 до 16 мышц.

3) Звездочкой помечена статистически достоверная разница.

Следующая серия опытов была посвящена выяснению действия цистеамина и цистеина на ионные потоки (табл., гр. 2, 3). Результаты опытов показали, что протекторы SH-групп препятствуют действию НЭМа, это сказывается как на величине МП, так и на концентрации макроэргических веществ в мышце.

При приложении НЭМа концентрация АТФ в мышце снижается с 3,0±0,2 до 2,1±0,3 мМ/кг сырого веса мышцы, а при добавлении цистеина к инкубационному раствору, содержащему НЭМ, такого снижения не происходит: концентрация АТФ равняется 2,9±0,3 мМ/кг (n=4) (n—количество мышц, использованных в опыте). Соответственно концентрации неорганического фосфата составляют 5,7±0,2 и 5,3±0,1 мМ/кг сырого веса (n=10). Однако концентрация АДФ не меняется—0,28±0,03 и 0,32±0,03 мМ/кг сырого веса (n=16)—что, вероятно, связано с аденилаткиназной активностью мышцы.

Измерение МП мышц, инкубированных в растворах с НЭМом в присутствии протекторов SH-групп, не избавляет от трудностей, обычно наблюдаемых при отведении МП в растворах с НЭМом: электрод с трудом прокалывает мышечную мембрану, при отведении МП от глубоко лежащих волокон возможна поломка электрода и т. п. Это означает, что цистеамин не вызывает нейтрализацию НЭМа в растворе, как пред-

полагал Бридж [5], а наблюдаемый эффект связан непосредственно с действием изучаемых веществ на мембрану.

Измерение МП мышечных волокон, инкубированных в бескалиевом растворе, обнаруживает существенную разницу между МП поверхностно расположенных волокон, и волокон, лежащих в глубине. Разница эта достигает 7—8 мв и статистически достоверна.

Приложение НЭМа вызывает быстрое и сильное изменение МП на поверхностно расположенных волокнах (с—134 до—40 мв) и меньшее на глубоко расположенных (до—98 мв). Возможно, это связано с тем, что диффузия гидрофобных веществ в водном растворе межклетников происходит медленнее, чем диффузия через липидную часть мембраны поверхностных волокон.

Для расчета изменения концентраций ионов согласно измеренному МП следует учитывать МП волокон по всей толще мышцы. В связи с этим были проведены следующие расчеты: средняя толщина портняжной мышцы—0,7 мм, средний диаметр волокна—100 мк. Учитывается, что наряду с толстыми волокнами, до 120—150 мк, имеются и тонкие волокна, 20—30 мк, и средние, 70—80 мк. В мышце приблизительно 7 слоев волокон: поверхностные по обе стороны мышцы с более низким МП и 5 глубинных слоев. При сопоставлении ионных потоков с изменениями МП использовался усредненный потенциал.

Были проведены контрольные опыты, выявляющие действие цистеамина и цистеина на уабаин-нечувствительные потоки Na и K и МП. Результаты опытов, представленные в таблице (гр. 4, 5), показали, что потоки ионов и МП не меняются.

Так как цистеамин и цистеин препятствуют действию НЭМа, то ионный состав мышц, инкубированных в растворе НЭМ+уабаин+протектор, не должен отличаться от такового мышцы, инкубированной в растворе с уабаином. Обычно вызываемое НЭМом изменение МП не наблюдается при совместном действии НЭМа с протекторами. Результаты этой серии опытов также представлены в таблице (гр. 6, 7).

Сравнение МП мышц, инкубированных в растворе с протектором и в растворе протектор+НЭМ, показало, что на фоне протектора НЭМ незначительно изменяет МП мышечных волокон: от—118 до—112 в растворе с цистеамином и от —112 до—106 мв при приложении цистеина.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что действие НЭМа на уабаин-нечувствительные потоки Na связано с ингибированием SH-групп белка, ответственного за противоградиентную транслокацию ионов натрия.

Этот вывод согласуется с данными, полученными на микросомной фракции почки, согласно которым НЭМ и олигомицин затрудняют связывание фосфорилированного энзима с уабаином. Однако при наличии в среде ионов Mg НЭМ не оказывает влияния на связывание [6].

В связи с вышесказанным была предпринята попытка выяснить действие НЭМа на ионные потоки при инкубации мышц в растворах, где 90 мМ NaCl были заменены эквивалентным количеством $MgCl_2$. Добав-

ление НЭМа в магниевый раствор с уабаином практически не меняет концентрации Na в мышце в течение 1 часа инкубации: $Na_{вн}=42\pm3$ и 44 ± 3 мМ соответственно. Наблюдаемая разница в концентрациях K^+ ($K_{вн}=111\pm1$ и 105 ± 1 соответственно) целиком обусловлена изменением МП на 50 мв при приложении НЭМа (-132 ± 1 и -83 ± 2 мв), т. е. действие НЭМа на переносе Na не сказывается в присутствии ионов Mg, но влияние на МП не меняется.

Таким образом, НЭМ оказывает двоякое действие на мышечное волокно: во-первых, меняет конформацию энзима, обеспечивающего противоградиентную транслокацию Na, и, во-вторых, изменяет МП плазматической мембраны. Как в том, так и в другом случае действие НЭМа связано с ингибированием SH-групп, ибо при добавлении в раствор с НЭМом цистеамина или цистеина не наблюдается характерных для действия НЭМа изменений МП, ионных потоков и концентраций макроэргических соединений.

Разумеется, процессы, протекающие в такой сложно организованной клетке, как мышечная, не подлежат однозначной трактовке. Но поскольку полученные результаты не противоречат высказанным предположениям, то имеются достаточно веские основания считать представленные выводы вполне корректными.

Ереванский физический институт ГКИАЭ

Поступило 14.VII 1980 г.

ԳՈՐՏԻ ՄԿԱՆՆԵՐՈՒՄ ԻՈՆՆԵՐԻ ՈՒԱԲԱՅԻՆ-ՌԵԶԻՍՏԵՆՏԱՅԻՆ ՀՈՍՔԵՐԻ ՎՐԱ N-ԷԹԻԼՄԱԼԵԻՆԻՄԻԴԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՄԱՍԻՆ

Գ. Դ. ՄԱՐԻԿՅԱՆ, Ս. Յա. ԱԴԱՄՅԱՆ, Ց. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է N-էթիլմալեինիմիդի ազդեցությունը գորտի մկաններում թաղանթի պոտենցիալի, նատրիումի և կալիումի իոնների ուաբայինռեզիստենտային հոսքերի, ադենոզինեռֆոսֆատի, ադենոզիներկֆոսֆատի և անօրգանական ֆոսֆատի կոնցենտրացիաների վրա լուծույթին սուլֆհիդրիլային խմբերի պրոտեկտորների ավելացման դեպքում։

Յույց է տրվում, որ N-էթիլմալեինիմիդը ազդում է ինչպես էնդիմի կոնֆորմացիայի վրա, որը իրականացնում է նատրիումի իոնների հակագրադիենտային տեղափոխումը, այնպես էլ թաղանթի պոտենցիալի վրա։

Ցիստեամինը և ցիստեինը խոչընդոտում են N-էթիլմալեինիմիդի ազդեցությունը՝ կապված սուլֆհիդրիլային խմբերի արգելակման հետ։

ON THE MECHANISM OF N-ETHYLMALEINIMID EFFECT ON OUABAIN–RESISTANT ION FLUXES IN FROG MUSCLES

G. G. MARIKIAN, S. Ya. ADAMIAN, Ts. M. AVAKIAN

The effect of N-ethylmaleinimid (NEM) on membrane potentia ouabain-resistant sodium and potassium fluxes, ATP, as well as ADP

and inorganic phosphate concentration has been studied under the presence of sulfhydryl group protectors in solution.

It has been shown that NEM effects as on conformation of enzyme, which provides sodium antigradient translocation as well as on membrane potential. Cysteamine and cystein inhibit NEM effect connected with sulfhydhryl group inhibition.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адамян С. Я., Джанджугазян К. Н., Симонян А. Л.* Сб. Биофизика мембран, 20, Каунас, 1973.
2. *Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марикян Г. Г.* Биофизика, *25*, 6, 1037, 1980.
3. *Марикян Г. Г., Адамян С. Я., Симонян А. Л.* Биолог. ж. Армении, *32*, 11, 1158, 1979.
4. *Bergmeyer H.* Methods of enzymatic analysis. N.—Y. L., 266, 1963.
5. *Bridges B. A.* J. Gen. Microbiol., *26*, 467, 1961.
6. *Hegyvary C.* BBA, *422*, 365, 1976,
7. *Lamprecht W., Trauschold J. M.* Methods of enzymatic analysis, N—Y. L., 543, 1963.
8. *Stanton M. G.* Anal. Biochem., *22*, 27, 1968.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1176—1179, 1980

УДК 577.3.08+539.16.04

ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ КИСЛОРОДА ПРИ СИНХРОТРОННОМ ОБЛУЧЕНИИ СЕМЯН NICOTIANA TABACUM L.

Ц. М. АВАКЯН, А. С. КАРАГЕЗЯН, С. Г. ГЕВОРКЯН

Нестабильное состояние хромосомного аппарата, вызываемое понизирующим излучением в результате воздействия кислородом, переходит в повреждение. Этот феномен получен при воздействии синхротронного излучения разной энергии, причем наибольший эффект выявлен при облучении немонохроматизированным синхротронным излучением.

Ключевые слова: синхротронное излучение, кислород, хромосомные аберрации.

Впервые пострадиационное действие кислорода на белки исследовалось Эйдусом [7], Калдекоттом и Шапиро [4, 6] на растениях. В дальнейшем многими авторами на разных объектах было получено подтверждение этого явления. Во всех случаях облучение материала проводилось на традиционных рентгеновских установках. Однако известно, что для изучения радиобиологической реакции желательна монохроматизация, так как коэффициент поглощения, квантовый выход и состав образующихся продуктов, несомненно, зависят от длины волны источника облучения. Современные гигантские ускорители и накопители электронов, являющиеся мощными источниками синхротронного излучения (СИ) [2, 4], дают возможность проводить облучение в широком диапазоне волн, начиная от жесткого рентгена до вакуумного ультрафиолета [1, 4, 5, 10, 11].

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения последействия O_2 на выход хромосомных аберраций клеток табака при облучении немонохроматизированным («белый спектр») и монохроматизированным СИ.

Материал и методика. В работе Алиханяна и др. [2] приведены параметры синхротронного пучка Ереванского кольцевого ускорителя электронов. Согласно данным авторов, при энергии 4,5 Гэв электронов в кольце максимум длин волн СИ в рентгеновской области лежит в пределах 0,7—3,5 А°. Пучок СИ с помощью вакуумного пучкопровода [7] длиной 35 м от орбиты ускорителя, транспортируется через бериллиевое окно [6] на коллиматор [2] и спектрометрическую установку, позволяющую выделить заданную длину волны [3]. Размер коллимирующей щели—10×10 мм². Установка угла осуществлялась с помощью гониометра ГУР-5 с использованием идеального кристалла кварца, срезанного параллельно плоскости (1̄10—1). Облучение семян в газовой камере с двусторонним майларовым окном проводили при длинах волн $\lambda=0{,}77$ и $\lambda=1{,}54$ А°. Для сравнения проводилось также облучение на традиционном рентгеновском аппарате РУП-200 при анодном напряжении 248 Кв, что соответство-

вало краю спектра характеристического излучения 0,05 А°. При облучении семян пучком СИ и с помощью аппарата РУП-200 отмечались одинаковые показания дозиметра RF 27012 (ГДР), у которого порог чувствительности датчика начинается с 5 Кэв. Режим работы ускорителя Е=4,5 Гэв, I=4 ма. После облучения дозой 1 крад семена смачивались в течение 2 ч в дистиллированной воде (при 0°), содержащей кислород и гелий. После этого они проращивались на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при t=25°. Корешки фиксировались начиная с третьих суток в смеси спирт—уксусная кислота (3:1) и приготовлялись давленые ацетокарминовые препараты. Подсчет проводили в ана- и телофазах. Были использованы семена табака сорта Самсун-36 урожая 1978 г., полученные из Арм. НИИТиМ. Кроме цитологических исследований были проведены и рекогностировочные измерения парамагнитных центров (ПЦ). Спектры ЭПР при комнатной температуре регистрировались на серийном радиоспектрометре трехсантиметрового диапазона (тип ЭПР-2) при значении тока СВ1-1 ма. Спектры ЭПР регистрировались через 15 мин после облучения.

Результаты и обсуждение. Для лучевого воздействия характерно последействие физико-химической природы. Латентный период лучевой болезни свидетельствует о наличии потенциальных повреждений в клетках. Хотя пострадиационное действие кислорода обнаружено и на гигантских структурах клеток, однако до сих пор не известно, за счет какой компоненты нуклеопротеидов это происходит [7]. Эксперименты по вакуумной УФ [11] и рентгеновской области длин волн [8, 10] говорят, что посредством монохроматизации СИ можно достичь результатов, которые показали бы роль структур, ответственных за лучевое поражение при действии данного спектра излучения (рис. 1, 2).

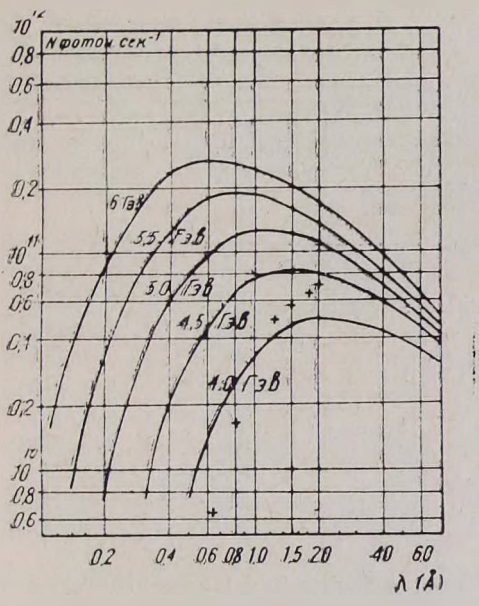

Рис. 1.

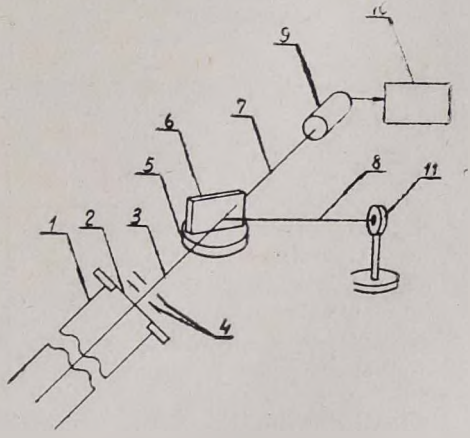

Рис. 2.

Рис. 1. Спектры СИ при разных энергиях электронов в орбите ускорителя.
Рис. 2. Схема экспериментальной установки. (1) вакуумный пучкопровод, (2) бериллиевое окно, (3) пучок СИ, (4), коллиматор, (5) гониометр, (ГУР-5), (6) кварц, (7) прошедший пучок, (8) монохроматизированный СИ, (9) ионизационная камера, (10) дозиметр, (11) контейнер для облучения.

Цитологическое исследование меристематических клеток табака (таблица) показало, что по своему действию СИ сплошным немонохроматизированным спектром резко отличается от облучения с помощью рентгеновских трубок и монохроматизированным СИ, хотя во всех слу-

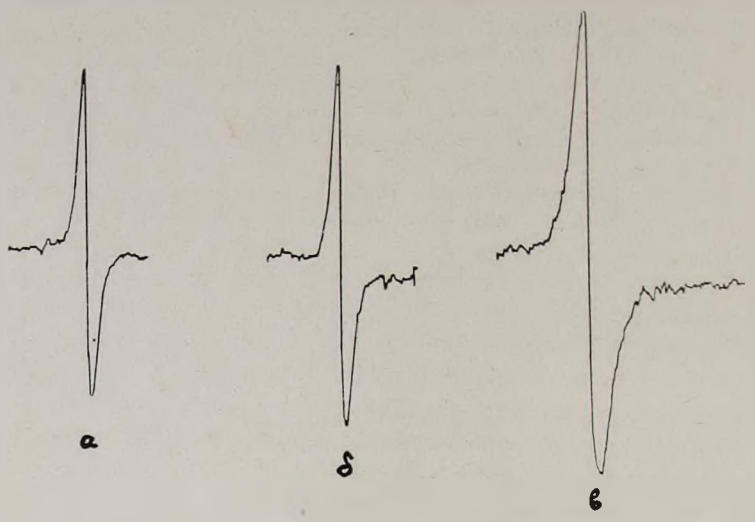

Рис. 3 Спектры ЭПР: а) сухих семян табака, б) последействие Х-лучей, в) последействие СИ.

Таблица

Частота возникновения хромосомных нарушений при облучении рентгеновскими лучами, немонохроматизированным и монохроматизированным СИ семян табака, %

Показатели	Газовая среда при смачивании семян после облучения	Число просмотренных клеток в ана- и телофазе	Число аберрантных клеток, %
Контроль	He	300	0,7 ±0,1
	O_2	3 0	0,5 ±0,2
Облучение (1 крад) Х-лучами E = 180 Кэв λ = 0,05	He	300	2,75±0,1
	O_2	300	6,5 ±0,62
Облучение СИ λ = 0,77 Å E = 17,28 Кэв	He	300	3,0 ±0,4
	O_2	300	4,5 ±0,1
Облучение СИ λ = 1,54 Å E = 8,14 Кэв	He	300	4,6 ±0,1
	O_2	300	6,8 ±0,1
Облучение немонохроматизированным СИ	He	300	5,8 ±0,2
	O_2	300	16±0,5

чаях заметно последействие кислорода. Однако при воздействии сплошным спектром СИ оно во много раз больше. Так, при облучении рентгеновским источником и монохроматическим СИ при действии спектров λ=0,77 и 1,54 А° и дозе 1 крад, хромосомные нарушения составляют 3,0—6,8%, в то время как при действии сплошного спектра СИ и той же дозе они достигают 16%. Это показывает, что, во-первых, при действии сложного спектра проявляющиеся в клетке нарушения имеют большой

диапазон, во-вторых, появление большого количества парамагнитных центров (рис. 3) по сравнению с таковым при рентгеновском излучении (около 36%) говорит о возникновении неспаренных электронов в таком же количестве, и дальнейшая реализация их кислородом может быть причиной сравнительно большого количества хромосомных нарушений.

Ереванский физический институт ГКИАЭ,
Ереванский государственный университет

Поступило 14.VII 1980 г.

ԹԹՎԱՅՆԻ ՀԵՏԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ NICOTIANA TABACUM L.-Ի ՍԵՐՄԵՐԸ ՍԻՆԽՐՈՏՐՈՆԱՅԻՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ց. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ա. Ս. ԿԱՐԱԳԵՈՒԶՅԱՆ, Ս. Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Քրոմոսոմային ապարատի ոչ կայուն պայմաններում, որը առաջացնում է ճառագայթահարումը թթվածնի հետազդեցության դեպքում, ստացվում են քրոմոսոմային խաթարումներ։ Այս երևույթը նկատվել է, երբ ծխախոտի սերմերը ճառագայթահարվել են սինխրոտրոնային ոչ մոնոխրոմատիզացված և մոնոխրոմատիզացված ճառագայթներով։ Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ մաքսիմալ քրոմոսոմային խաթարումները ստացվել են ոչ մոնոխրոմատիզացված սինխրոտրոնային ճառագայթահարման ժամանակ։

THE AFTEREFFECT OF OXYGEN UNDER IRRADIATION OF *NICOTIANA TABACUM L.* SEEDS WITH SYNCHROTRON RADIATION

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

A nonstabile state in the chromosome apparatus provoked by polarized radiation as a result of oxygen effect may lead to damage. This phenomenon has been found after the action of synchrotron radiation (SR) of very high energy on tobacco seeds. The maximal effect has been recorded at nonchromatized SR.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авакян Ц. М., Геворкян С. Г., Карагезян А. С., Корхмазян М. М.* Биолог. ж. Армении, *27*, 11, 1053—1063, 1979.
2. *Алиханян А. И., Авакян Ц. М., Безирганян П. А., Карабеков И. П.* ПТЭ, *3*, 39—41, 1974.
3. *Минасян М. А., Авакян Ц. М., Семерджян С. П.* Радиобиология, *18*, 5, 1978.
4. *Ханзел Р., Кунц* Синхротронное излучение в исследованиях твердых тел. М., (Сборник статей), 1970.
5. *Холендер А.* В кн.: Радиобиология. Перевод с англ. под редакцией Г. М. Франка, 324, М., 1956.
6. *Шапиро Н. И., Бочорова Е. М., Белицина Н. В.* Докл. АН СССР, *126*, 191, 1959.
7. *Эйдус Л. Х.* Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучения. М., 1979.
8. *Adams G. E.* Prosedings of the Davesbury Lab., 27—28, january, 20—31, 1979.
9. *Atayan R. R., Gabriellan J. Y.* Environmental and Experimental Botany, *18*, 9, 17, Pergamon Press (G. B.), 1978.
10. *Avakian Ts. M., Karageusian A. S.* VII International Congress on Photobiology Rome, Italy, 1976.
11. *Avakian Ts., M., Karageusian A. S., Danielian A. Ch.* Studia biophysica. Berlin, *72*, Heft 3, 5, 207—212, 1978.
12. *Caldecott R. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *43*, 11, 975, 1957.
13. *Ito T.* Photochem. Photobiol., *25*, 47, 1977.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1180—1184, 1980

УДК 577.151.5.05

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА НЕКОТОРЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПРИ ОБРАБОТКЕ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ ЗЕЛЕНЫМ ПРОЧНЫМ

С. Г. ТИРАЦУЯН, Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Показано, что обработка изолированных зародышей пшеницы $5 \cdot 10^{-4}$ % раствором зеленого прочного приводит к сильному изменению активности ряда дегидрогеназ. Активность изоцитрат- и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназ возрастает, а малат- и алкогольдегидрогеназ снижается, что отражается также на изоферментном спектре. Полученные результаты подтверждают высокую биологическую активность зеленого прочного.

Ключевые слова: зеленый прочный, дегидрогеназы, активность, изоферменты.

Проведенные ранее на кафедре биофизики эксперименты показали, что предпосевная обработка семян красителем зеленым прочным приводит к повышению урожайности многих сельскохозяйственных культур [3]. Изучение механизма этого эффекта представляется чрезвычайно важным как с теоретической, так и с практической точек зрения. Известно, что красители сходной структуры не только токсичны, но и вызывают сенсибилизированную инактивацию ряда ферментов. Следовательно, биологическая активность красителей, в частности зеленого прочного, может быть связана с их прямым или опосредованным влиянием как на активность отдельных ферментов, так и ряд важнейших ферментативных систем и циклов посредством выключения их отдельных звеньев.

Кроме того, зеленый прочный, являясь витальным анионным красителем трифенилового ряда с большим отрицательным зарядом (трех SO_3-групп), может образовывать прочные комплексы с основными белками вообще и с гистонами в частности. Взаимодействуя с гистонами, он частично нейтрализует их положительные заряды, тем самым ослабляя их связь с ДНК, что может привести к увеличению матричной активности хроматина, в свою очередь вызывающему повышение активности некоторых ферментов или ферментативных систем.

Целью наших экспериментов было исследование изменения активности ряда ферментативных систем при обработке изолированных зародышей пшеницы зеленым прочным. Была исследована активность глюкозо-6-фосфата, изоцитрата, малат- и алкогольдегидрогеназ, играющих важнейшую роль в пентозофосфатном шунте, а также в циклах Кребса и спиртового гликолиза.

Материал и методика. В экспериментах использованы следующие реактивы: глюкозо-6-фосфорная кислота, динатриевая соль, НАД, НАДФ, l-цистеин солянокислый, набор реактивов для электрофореза (все фирмы Reanal), фенозин метасульфат (Sigma), нитротетразолиевый синий (Chemapol), а также зеленый прочный (Michrom). Эксперименты проводили на пшенице сорта Безостая 1 репродукции 1978 г.

Зародыши пшеницы изолировали и проверяли на жизнеспособность по методу Джонстона и Штерна [7], а также окрашиванием жизненно важных участков зародышей 1%-ным водным раствором хлористого тетразолия [5]. Обработку проводили в 5.10^{-4} % растворе зеленого прочного, помещая в раствор семена на 16, 20 и 24 часа соответственно.

Для определения активности и изоферментного состава дегидрогеназ зародыши растирали на холоду в ступке с фарфоровым пестиком в среде для экстрагирования, содержащей 0,1 М трис-глициновый буфер, pH 8,3, 15%-ную сахарозу, 0,1%-ный цистеин и 0,1%-ную аскорбиновую кислоту. Экстракцию проводили в малом объеме на магнитной мешалке в течение 45 мин при 4°. Экстракт просветляли центрифугированием в течение 20 мин при 30000 g, после чего определяли активность ферментов в супернатанте измерением изменения оптической плотности восстановленных НАД и НАДФ при 340 нм на спектрофотометре СФ-4А при 22°, используя различные инкубационные среды [1, 6].

Ферментативную активность препаратов рассчитывали по формуле

$$A = \frac{D}{t \cdot 2{,}07 \cdot C},$$

где А—активность, D—изменение оптической плотности за время t в мин, а С—концентрация белка в мг. Концентрацию белка определяли по Лоури [8].

Электрофоретическое разделение изоферментов дегидрогеназ проводили по методу Сафроновых [4] в 7%-ном разделяющем геле, pH 8,9, и 2,5%-ном концентрирующем геле, pH 6,7, с использованием три-глицинового электродного буфера, pH 8,3. Разгонку белков проводили от анода к катоду при силе тока 5 ма на трубку и напряжении 500—600 вольт. В качестве метки использовали бромтимоловый синий.

Гели с изоферментами дегидрогеназ проявляли помещая в специальные инкубационные среды на 1,5 ч при 37° [1, 2], а денситометрирование проводили на сконструированном в лаборатории денситометре. Результаты изменения активности ферментов статистически обработаны.

Результаты и обсуждение. Как показали наблюдения, в первые 16 ч происходит увеличение активности алкогольдегидрогеназы, а в последующие 8 ч резкое снижение ее в изолированных зародышах пшеницы. В дальнейшем скорость падения активности фермента уменьшается и через 48 ч составляет 60% от начальной, или 45% от максимальной активности.

Необходимо отметить, что хотя кинетика изменения активности алкогольдегидрогеназы обработанных зародышей и не отличается от таковой контроля, однако падает она на большую величину, 48% от исходной активности и 39% от максимальной (вместо 60 и 45% у контроля соответственно).

Электрофорез показывает (рис. 1), что если в свежевыделенных зародышах обнаруживаются 4 изофермента алкогольдегидрогеназы, то в прорастающих наблюдается не только повышение активности фермента, но и увеличение количества изоферментов. После 16-часового проращивания активность алкогольдегидрогеназы достигает максимума, а количество изоферментов увеличивается до 6 (до 7 в контроле).

Сходная картина наблюдается также в изменении активности ма-

латдегидрогеназы. В первые 16 ч проращивания активность фермента возрастает более чем в три раза по сравнению с активностью в свежевыделенных зародышах. Однако начиная с 20-го часа активность малатдегидрогеназы начинает падать и через 48 ч снижается до уровня, превышающего уровень активности фермента в свежевыделенных зародышах только в 1,6 раз. Обработка зародышей зеленым прочным приводит к двукратному падению активности фермента по сравнению с контролем при 16—24-часовой обработке. В дальнейшем активность фермента в контрольных зародышах начинает интенсивно падать, а в обработанных—стабилизируется. Электрофорез показывает, что при прорастании количество изоферментов малатдегидрогеназы возрастает (рис. 2). Однако, если в контроле оно увеличивается на 3, то в обработанных зародышах одна из этих фракций (четвертая) практически отсутствует, а две остальные менее выражены.

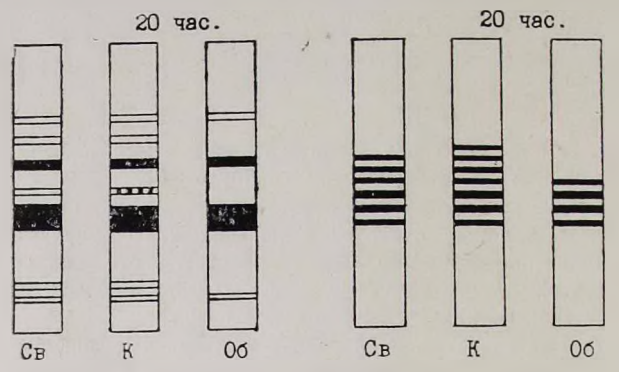

Рис. 1.

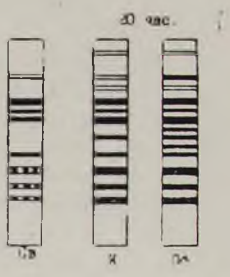

Рис. 2.

Рис. 1. Электрофореграммы изоферментов алкоголь- и малатдегидрогеназ в свежевыделенных, а также проращиваемых в течение 20 ч зародышах пшеницы. I—алкогольдегидрогеназа; II—малатдегидрогеназа; Св, К и Об—свежевыделенные, контрольные и обработанные зародыши пшеницы соответственно.

Рис. 2. Электрофореграммы изоферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в свежевыделенных, а также проращиваемых в течение 20 ч зародышах пшеницы. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Несколько иная картина наблюдается в изменении активности изоцитратдегидрогеназы. В процессе прорастания в первые 16 ч отмечается интенсивное падение активности фермента и в дальнейшем она практически не меняется. Однако суммарный эффект оказывается довольно значительным, поскольку активность изоцитратдегидрогеназы при прорастании уменьшается примерно в 5 раз по сравнению с таковой в свежевыделенных зародышах. Обработка зародышей зеленым прочным также сопровождается падением активности изоцитратдегидрогеназы, но с меньшей скоростью, а кинетика изменения активности становится практически линейной.

Через 48 ч проращивания активность изоцитратдегидрогеназы снижается до уровня, составляющего около 40% от активности в свежевыделенных зародышах, что примерно в 2 раза выше, чем в контроле. Ес-

ли через 16 ч активность изоцитратдегидрогеназы составляет 13, а через 48 ч—22% от активности в свежевыделенных зародышах, то после обработки зеленым прочным—76 и 40% соответственно.

В качестве ключевого фермента пентозофосфатного шунта представлялось интересным исследование изменения активности и изоферментного состава глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В первые 16 ч прорастания зародышей наблюдается увеличение активности фермента до 2 раз по сравнению с исходной. В интервале от 16 до 24 ч активность фермента не меняется, а после 24-часового прорастания она медленно падает, через 48 ч превышая уровень активности в свежевыделенных зародышах только на 20%. При обработке зеленым прочным в первые 16 ч активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы возрастает в 2,5 раза, в последующие 8 ч она продолжает возрастать, однако с меньшей скоростью. В дальнейшем наблюдается падение активности, которая через 48 ч составляет всего 170% от исходной. Необходимо отметить, что соотношение активностей фермента в обработанных зародышах и в контроле остается практически постоянным и варьирует в пределах 20—30%.

Итак, обработка зародышей зеленым прочным приводит либо к увеличению активности (или стабилизации), либо к частичному de novo синтезу фермента. Данное предположение подтверждается результатами электрофореза (рис. 2). Если в контрольных зародышах при прорастании появляются новые фракции, а количество наиболее подвижных изоферментов увеличивается, то в обработанных появляется 5 новых фракций и возрастает интенсивность окрашивания четырех других.

Таким образом, обработка зародышей зеленым прочным сильно отражается как на активности, так и на изоферментном составе дегидрогеназ. В одних случаях активность ферментов обработанных зародышей оказывается выше (изоцитрат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), а в других—ниже (малат- и алкогольдегидрогеназы), чем в контроле. Возрастание активности сопровождается появлением новых фракций изоэнзимов, а уменьшение—исчезновением некоторых фракций.

Полученные результаты подтверждают высокую биологическую активность зеленого прочного.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 29.X 1979 г.

ԿԱՆԱՉ ԱՄՈՒՐՈՎ ՄՇԱԿՄԱՆ ՀԵՏԵՎԱՆՔՈՎ ՑՈՐԵՆԻ ՍԱՂՄՈՒՄ ՈՐՈՇ ԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒՄԸ

Ս. Գ. ՏԻՐԱՑՈՒՅԱՆ, Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Հոդվածում ցույց է տրվում, որ ցորենի առանձնացված սաղմի մշակումը կանաչ ամուրի $5 \cdot 10^{-4}$% լուծույթով հանգեցնում է մի շարք դեհիդրոգենազների ակտիվությունների փոփոխման։ Իզոցիտրատ- և գլյուկոզա-6-ֆոսֆատ

դեհիդրոգենազների ակտիվություններն աճում են ցորենի սաղմը մշակելուց հետո, իսկ մալաթ և ալկոհոլդեհիդրոգենազների ակտիվություններն ընկնում են։ Ֆերմենտների ակտիվությունների աճը և նվազումը ուղեկցվում են համապատասխան ֆերմենտների իզոֆերմենտների քանակի ավելացումով և պակասումով։ Ստացված տվյալներն ապացուցում են կանաչ ամուրի բարձր կենսաբանական ակտիվության փաստը։

CHANGES OF THE ACTIVITY AND ISOENZYME PATTERNS OF SOME DEHYDROGENASES AFTER TREATMENT OF ISOLATED WHEAT GERMS WITH FAST GREEN

S. G. TIRATSUYAN, R. R. VARDAPETYAN, G. H. PANOSYAN

It has been shown, that the treatment of isolated wheat germs with $5 \cdot 10^{-4}$ % solution of the fast green leads to considerable changes of the activity of some dehydrogenases. The isocitrate and glucoso-phosphate dehydrogenase activities are increasing, while the alcohol and malate dehydrogenase activities of the treated germs are decreasing. The increase and decrease of the activities are accompanied with the appearance and disappearance of some isoenzyme dehydrogenase patterns. Results obtained prove a high biological activity of fast green.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красноок Н. П., Моргунова Е. А., Вишнякова И. А., Поварова Р. И.* Физиол. раст., *23*, 8, 1976.
2. *Паносян Г. А., Тамразян Е. Е.* Биолог. ж. Армении, *24*, 12, 1971.
3. *Сафонов В. И., Сафонова М. П.* Физиол. раст., *16*, 2, 1969.
4. *Тирацуян С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А.* Биолог. ж. Армении, *33*, 1980.
5. *Фирсова М. К.* В кн. Жизнеспособность семян, М, 1978.
6. *Шутова Е. А., Баллод З. И., Анрод А. И., Кретович В. Л.* Прикладная биохимия и микробиология, *9*, 2, 1973.
7. *Gaspar T., Khan A. A., Fries D.* Plant Physiol., *51*, 145—149, 1973.
8. *Gaspar T. Xhaufflaire.* Planta, *72*, 252—257, 1967.
9. *Jonston F. B., Stern H.* Nature (Lond), *179*, 160—161, 1959.
10. *Lowry O. U., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem, *193*, 265—275, 1951.
11. *Singh R., Singh D.* Biochem. Physiol. Pflanzen, *166*, 5, 233—237, 1974.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1185—1188, 1980

УДК 612.014.547.915.5

ЛИПИДНАЯ ПЕРОКСИДАЦИЯ И НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, Л. М. МЕЖЛУМЯН, Р. А. СААКЯН

Исследовалось содержание липидных перекисей, α-токоферола и активности супероксиддисмутазы в гомогенатах печени крыс в различные сроки после воздействия электростатического поля, которое приводит к повышению содержания липидных перекисей, незначительному повышению активности супероксиддисмутазы и понижению содержания α-токоферола. Глубина указанных изменений зависит от сроков исследований.

Ключевые слова: липидная пероксидация, электростатическое поле.

Рядом исследователей показано, что воздействие электростатического поля (ЭСП) приводит к увеличению снабжения тканей кислородом [11, 17, 18]. Ранее нами было установлено, что ЭСП тормозит скорость переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий без существенного нарушения их АТФ-синтезирующей функции [9]. В работах [2, 8] приводятся данные о снижении активности ферментов и интермедиаторов дыхательной цепи митохондрий на участке комплекса II, III и уменьшении концентрации свободных радикалов в митохондриях после воздействия ЭСП. Эти данные свидетельствуют о подавляющем влиянии ЭСП на митохондриальное дыхание. Таким образом, при воздействии ЭСП в тканях создается избыток кислорода благодаря увеличенному снабжению их и вялости дыхания митохондрий. Логично предположить, что избыточный кислород будет интенсивно утилизироваться в нефосфорилирующих путях окисления. В работах [4, 5] была показана весьма важная роль систем нефосфорилирующего окисления в процессе утилизации кислорода клеткой. Одной из основных систем в этом процессе является липидная пероксидация.

Целью данной работы явилось исследование уровня липидной пероксидации и основных факторов его регуляции в гомогенатах печени животных, подвергшихся воздействию ЭСП.

Материал и методика. Объектом исследования служили гомогенаты печени белых беспородных крыс-самцов, массой 120—150 г, подвергшихся воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см, длительностью 24 часа. ЭСП создавалось при помощи установки, описанной нами ранее в работе [1]. Сразу после воздействия и через 1, 4, 7 и 14 суток производился забой животных. Исследовались содержание липидных перекисей, концентрация α-токоферола и активность супероксиддисмутазы (СОД). Параллельно ставились контрольные опыты. Во избежание влияния циркадных ритмов все эксперименты ставились в одно и то же время суток.

Содержание липидных перекисей определяли по уровню одного из конечных продуктов перекисного окисления—малонового диальдегида [13]. активность СОД—по ингибированию генерации супероксидных анионов в модели феназинметасульфат-$НАДН_2$—нитратетразолий синий [16]. Содержание α-токоферола определяли по флоуритмическому методу Дуггана [14]. Спектрофотометрические изменения производились на спектрофотометре марки Specol Karl Zeiss, ГДР, флуориметрические—на спектрофотофлуориметре марки MPF-4, Япония. Полученные данные обрабатывались статистически с применением критерия достоверности Фишера-Стьюдента. Результаты исследований представлены в процентах по отношению к контролю.

Результаты и обсуждение. Воздействие ЭСП приводит к повышению уровня липидных перекисей (табл.). Однако, если сразу после воздействия количество липидных перекисей увеличивается на 50,89%,

Таблица

Изменение содержания липидных перекисей, α-токоферола и активности СОД после воздействия ЭСП

Время после воздействия	% увеличения перекисей липидов	% увеличения активности супероксиддисмутазы	% уменьшения α-токоферола
0	50,89±7,80 n=10	7,10±2,0 n=20	31,37±1,92 n=13
1	21,66±7,77 n=10	5,33±2,04 n=20	25,60±1,67 n=13
4	18,23±9,10 n=10	6,87±1,30 n=20	29,07±3,40 n=13
7	41,84±7,26 n=10	4,84±1,28 n=20	42,91±1,99 n=13
14	0,12±6,04 n=10	0,03±0,84 n=18	20,37±1,42 n=13

то через сутки эта величина равняется 21,66%, такое же увеличение имеется на 4-е сутки после воздействия. На 7-е сутки количество липидных перекисей вновь достигает уровня, наблюдаемого непосредственно после воздействия. На 14-е сутки уровень их не отличается от контрольного. Волнообразность изменения содержания липидных перекисей, по всей видимости, обусловлена неоднородной по времени ответной реакцией организма на данное воздействие. Аналогичная цикличность восстановительного периода отмечалась нами [2, 3, 8, 9].

В клетке кроме систем и соединений, непосредственно участвующих в цепи реакций перекисного окисления, не меньшую роль в определении стационарной концентрации перекисных продуктов играют факторы, непосредственно не принадлежащие к этим системам. Среди них особое значение имеют активность СОД и содержание α-токоферола. Установлено, что СОД, катализируя реакцию $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, ингибирует тем самым перекисное окисление липидов на стадии активации кислорода [10, 15] и выполняет функцию защиты клетки от окислительного повреждения. α-Токоферол является одним из основных природных антиоксидантов в антиокислительной системе, защищающей клетку от повреждающего действия липидных перекисей.

Полученные нами данные (табл.) показывают, что воздействие ЭСП приводит к незначительному повышению активности СОД, что, возможно, является защитной реакцией на избыточное снабжение тканей кислородом и интенсификацию липидной пероксидации. Динамика этого повышения частично совпадает с изменениями количества липидных перекисей, однако повышение активности СОД незначительное и, по всей видимости, не может компенсировать резкий выброс липидных перекисей.

Как видно из таблицы, после воздействия ЭСП наблюдается понижение концентрации α-токоферола. Возможно, это следствие его потребления при ингибировании липидной пероксидации. Динамика и степень изменения содержания α-токоферола соответствуют изменениям в содержании липидных перекисей. Эти данные свидетельствуют о том, что в нейтрализации интенсификации липидной пероксидации после воздействия ЭСП превалирующей является антиокислительная система. Надо отметить, что даже когда концентрация липидных перекисей и активность СОД приходят в норму, концентрация α-токоферола остается ниже контроля. Можно предположить, что и на 14-е сутки после воздействия имеет место увеличение содержания липидных перекисей, которое ингибируется α-токоферолом.

Таким образом, тканевая гипероксия после воздействия ЭСП приводит к интенсификации липидной пероксидации, которая, возможно, не полностью компенсирует избыточный кислород, и в процессе утилизации кислорода принимают участие другие пути нефосфорилирующего окисления.

Известно, что интенсификация липидной пероксидации является общей неспецифической реакцией организма на различные воздействия. Однако в свете некоторых работ [11, 17, 18] можно сказать, что повышение уровня липидных перекисей после воздействия ЭСП вызвано увеличением концентрации кислорода в тканях и в данном случае является специфической реакцией.

Известно, что усиление перекисного окисления может привести к нарушению нативности биологических мембран, появлению дефицита антиоксидантов, витаминов, гормонов и различных тиоловых соединений, что в свою очередь может привести к истощению защитных систем организма. Возможно, такое истощение защитных систем в сочетании с иммунодепрессивным эффектом ЭСП [12] и приводит к повышению уровня заболеваемости у лиц, находящихся долгое время в сфере действия ЭСП [6, 7].

Ереванский медицинский институт, ЦНИЛ,
лаборатория биофизики и молекулярной биологии,
отдел биохимии

Поступило 7.VIII 1979 г.

ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՂ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԸ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ԱՐՏՐՈՒՆԻ, Լ. Մ. ՄԵՇԼՈՒՄՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍԱԱԿՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է լիպիդային պերօքսիդների, α-տոկոֆերոլի քանակությունը, ինչպես նաև սուպերօքսիդդիսմուտազային ակտիվությունը առնետների լյարդում, որոնք ենթարկվել են 2000 վ/սմ լարվածություն ունեցող էլեկտրաստատիկ դաշտի 24 ժամյա ազդեցությանը։ Ցույց է տրվում, որ տվյալ ազդեցությունը հանգեցնում է լիպիդային պերօքսիդների պարունակության բարձրացմանը, α-տոկոֆերոլի՝ իջեցմանը։ Միաժամանակ դիտվել է սուպերօքսիդդիսմուտազայի ակտիվության աննշան բարձրացում։

Վերոհիշյալ տեղաշարժերի խորությունը կախված է դաշտի ազդեցությունից հետո կատարված ուսումնասիրման ժամկետից։

LIPID PEROXIDATION AND ITS REGULATION FACTORS AFTER AN ELECTRPOSTATIC FIELD EFFECT

G. G. ARTSRUNI, L. M. MESHLUMIAN, R. A. SAAKIAN

The lipid peroxides, α-tocopherol content and superoxiddismutase activity in rat liver homogenate after 24 hour exposition to electrostatic field have been studied. This effect results in lipid peroxide content increase, insignificant activation of superoxiddismutase and in decrease of α-tocopherol content.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арцруни Г. Г.* Мат-лы научн. конф. молодых ученых, посвящ. XXV съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.
2. *Арцруни Г. Г., Мкртчян С. А.* Биолог. ж. Армении, *32*, 2, 1064, 1979.
3. *Арцруни Г. Г., Тер-Маркосян А. С.* Биолог ж. Армении, *31*, 7, 739, 1975.
4. *Арчаков А. И.* В кн.: Микросомальное окисление. М., 59, 1975.
5. *Арчаков А. И., Канева И. П., Князев Т. А., Кузнецов Т. А.* В сб.: Митохондрии. М., 199, 1973.
6. *Гольдштейн И. И., Синельщиков М. П., Ханцберг И. А.* В кн.: Проблемы клинической биофизики, 51, Рига, 1972.
7. *Минх А. А., Непомнящий П. Н., Портнов Ф. Г.* Гигиена труда, *6*, 51, 1978.
8. *Мкртчян С. Л.* Биолог. ж. Армении, *32*, 2, 157, 1979.
9. *Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г.* Биолог. ж. Армении, *31*, 7, 750, 1978.
10. *Рубин Б. А., Мерзляк М. Н., Юферова С. Г., Соболев А. С.* Свободно-радикальное окисление липидов в норме и патологии. Мат-лы симпозиума, 164, М., 1976.
11. *Пирузян Л. А., Арцруни Г. Г., Романов Г. В., Кутузов А. Д.* Известия АН СССР. Серия биолог., *5*, 430, 1874.
12. *Товмасян В. С., Геворкян М. И., Арцруни Г. Г.* Ж. клинич. и экспер. медицины, *5*, 42, 1976.
13. *Bieri I., Anderson A.* Arch. Biochem. Biophys., *90*, 105, 1960.
14. *Duggan D. E.* Apch. Biochem. Biophys., *84*, 112, 1959.
15. *MeCord F., Fredowich F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *68*, 1024, 1971.
16. *Morimitus Nichimi, N. Appaji Rao, Kunio Ioji.* Biochem. Biophys. Res. Commun. *46*, 2, 849, 1972.
17. *Möse J. R.* Arch. Hyg., *154*, 6, 549, 1971.
18. *Schreinike A.* Zechr. gen. Hyg., *16*, 17, 1970.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1189—1194, 1980

УДК 577.161.3

ЛИПОСОМЫ—МОДЕЛЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН И НОВЫЕ АСПЕКТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

С. А. БАДЖИНЯН

Рассматриваются литературные и собственные данные, касающиеся новейших моделей биологических мембран—липосом, эффективно использующихся при изучении различных мембранных процессов, что раскрывает новые возможности и для исследования их механизмов при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: липосомы, мембраны биологические

В настоящее время не вызывает сомнения, что клеточные мембраны являются структурной и функциональной основой ряда важнейших процессов, происходящих в клетке [3—5]. Исследование структуры и функции биологических мембран имеет фундаментальное, общебиологическое значение. Вместе с тем необходимо подчеркнуть особую актуальность таких работ для решения задач современной медицины. С исследованием биологических мембран непосредственно связано решение проблем тканевой несовместимости и пересадки органов. Особо следует подчеркнуть, что выяснение механизмов взаимодействия мембран с различными веществами создает принципиально новую основу для фармакологии [7].

Для изучения мембранных процессов на молекулярном уровне часто необходимо работать с изолированными мембранами определенного типа. Сравнивая свойства искусственных мембран со свойствами биологических, можно получить представление о строении и функции последних [6, 8].

В настоящее время наиболее совершенной моделью клеточных мембран являются бислойные мембраны из естественных и синтетических фосфолипидов. Искусственные липидные бислойные мембраны позволяют по-новому оценить существующие представления об организации и функционировании биологических мембран. К таким модельным системам относятся липосомы [12, 14].

Липосомы являются наиболее простой, удобной и перспективной моделью липидного бислоя, эффективно использующейся для изучения различных мембранных процессов: диффузии, ионной проницаемости, связывания различных веществ с компонентами мембраны. Широкое применение этой модели для изучения биологических мембран связано с тем, что липосомы можно формировать из смеси липидов с заданным составом. Следовательно, они являются незаменимыми мо-

делями для изучения поведения различных липидов, входящих в состав нативных мембран [2, 14, 15].

Идея, положенная в основу этой модели, чрезвычайно проста. Уже давно известно, что липиды в большом количестве воды спонтанно набухают, образуя жидкокристаллические структуры [14]. Исследование этих жидких кристаллов с помощью рентгеновских лучей, электронных и оптических (поляризационных) микроскопов и другими физическими методами показало, что большая часть представляет собой замкнутые частицы сферической формы, состоящие из ряда концентрических бимолекулярных липидных слоев, разделенных водным пространством. Расстояние между слоями равно 15—20 А°. Толщина липидных слоев составляет в зависимости от природы липидов 65—75 А°, диаметр колеблется в пределах 1—7 мкм [14, 15]. Более простые структуры, замкнутые частицы в виде маленьких пузырьков, состоящие из одного бимолекулярного липидного слоя, размер которых может варьировать в зависимости от условий их получения, природы липидов и pH раствора, образуются, если в процессе набухания водно-липидную смесь подвергать действию ультразвука. Обычно получают пузырьки диаметром 250—300 А°, т. е. сходные по размеру с субклеточными частицами. Если соблюдать определенные технологические условия приготовления, можно получать липосомы различных размеров.

Наиболее привлекательное свойство липосом состоит в том, что они замкнуты. Поэтому липосомы можно «начинять» различными веществами и исследовать проницаемость бимолекулярных слоев для ионов и молекул. Для получения «начиненных» липосом процесс набухания липидов проводят не в чистой воде, а в растворе с «начинкой», захватываемой при этом липосомой. Например, если проводить мембранное набухание липидов в растворе глюкозы, а затем отмыть липосомы от незахваченной глюкозы и поместить их в раствор хлористого калия, то получают систему из двух растворов (глюкозы внутри липосом и хлористого калия — снаружи), разделенную липидной мембраной. Следя за изменением концентрации глюкозы и ионов калия во внутреннем и наружном растворе, можно количественно исследовать проницаемость липидной мембраны.

Для понимания структуры и функционирования мебран очень важно выяснение роли холестерина в клеточной мембране. В опытах, проведенных на однослойных липосомах, было получено большое количество данных, свидетельствующих о выполнении холестерином функции регулятора степени подвижности молекул в бислое и поддержании определенного состояния мембраны [24]. Выяснено также влияние холестерина на коэффициент проницаемости липидного бислоя для ионов калия, натрия, хлора и глюкозы, а также на электрические свойства бислоя.

Ценное качество липосом заключается также в том, что они могут быть использованы как модели для изучения действия многих лекарственных веществ, витаминов, гормонов, антибиотиков и т. д. Так, например, с их помощью были получены очень важные данные о действии

анестезирующих веществ на мембраны [23]. Исследования, проведенные методом магнитного резонанса, показали, что анестетики общего действия, например хлороформ, уже при ничтожно малых концентрациях уменьшают упорядоченность углеводородных цепей мембран [23].

Липосомы являются самой удобной из созданных в настоящее время моделей для изучения ионной проницаемости липидного бислоя. Получены данные об изменении ее уровня под влиянием фармакологических агентов [24]. Исследование таких систем, как липосомы, механизмов взаимодействия фармакологических агентов с мембраной дает возможность выявлять функцию локальных областей такого сложного гетерогенного объекта, как мембрана.

Круг исследований, в которых липосомы используются в качестве модели липидного бислоя мембраны, чрезвычайно широк. Применение липосом открывает широкие возможности для изучения структурных и функциональных взаимодействий между липидными и белковыми компонентами мембраны.

В нашей лаборатории липосомы использовали для исследования влияния липидного состава модельных мембран на структурную лабильность таких представителей класса липидов, как гликолипиды (ганглиозиды и цереброзиды) и простагландины $ПГЕ_1$, которые в последнее время привлекают внимание мембранологов. Был использован метод флуоресцентных зондов, дающий возможность изучать интимные механизмы функционирования мембран. При обработке фосфолипидных липосом ганглиозидами и цереброзидами встраивание последних в липидный бислой приводило к значительной модификации мембран липосом. Наблюдалось изменение константы связывания анионного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната ($АНС^-$), что свидетельствует о конформационных изменениях поверхностных слоев мембраны (рис. 1). Анализ изменений квантового выхода зонда и максимума его флуоресценции показал, что под воздействием гликолипидов происходит увеличение жесткости и гидрофобности поверхностных слоев мембраны липосом. Применение нейтрального зонда пирена дало возможность изучить влияние гликолипидов на глубокие слои липидных мембран. Молекулы пирена дифундируют в мембране, сталкиваются, образуя эксимеры. Таким образом, отношение эксимеров к мономерам пирена дает информацию о скорости его диффузии в мембране, а следовательно, и о вязкости ее. Ганглиозиды и цереброзиды вызывают уменьшение подвижности пирена в глубоких слоях мембраны (рис. 2), что свидетельствует о повышении ее вязкости [9].

Изучение влияния простагландина $Е_1$ и простациклина на модельную мембрану показало, что $ПГЕ_1$ и $ПГУ_2$, так же как и гликолипиды, вызывают повышение жесткости мембранных структур. Поскольку вязкость мембран, по современным представлениям, играет важную роль в деятельности мембранного ферментативного ансамбля, то проведенные на липосомах исследования позволяют раскрыть биологическую роль гликолипидов и простагландинов.

Применение липосом создает новые возможности и для изучения механизмов мембранных процессов, имеющих большое значение в патологии. Примером тому может служить изучение патогенеза ожоговой болезни, проведенное в нашей лаборатории. После нанесения

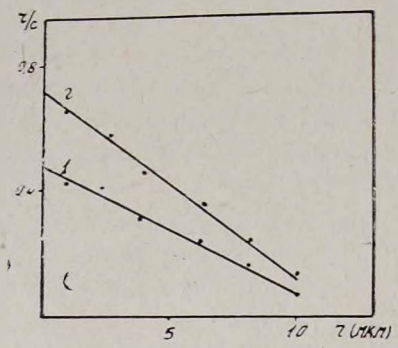

Рис. 1.

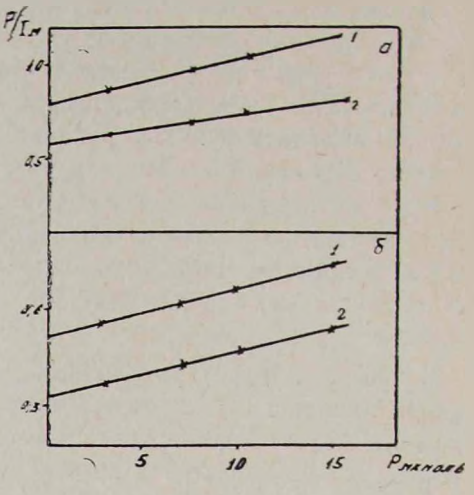

Рис. 2.

Рис. 1. Связывание АНС⁻ с липосомами в отсутствие ганглиозидов (1) и при концентрации их 2×10^{-4} ммоль (2) (график Скетчарда).

Рис. 2. Влияние гликолипидов на диффузию пирена в липосомах: а) 1—контроль, 2—цереброзиды; б) 1—контроль, 2—ганглиозиды.

ожоговой травмы [1] из различных органов крыс (мышцы сердца, легких) выделялись липиды, из которых формировались липосомы. Методом флуоресцентных зондов изучались некоторые параметры модельных мембран, в частности заряд липосом, вязкость липидного бислоя. Как показало исследование связывания зонда АНС⁻ с липосомами, сформированными из фосфолипидов, выделенных из сердца крыс, концентрация центров связывания зондов повышается, что свидетельствует об уменьшении электроотрицательности мембран. С помощью пиренового зонда было обнаружено повышение вязкости мембранной структуры. Повышение вязкости и гидрофобности мембран, возможно, играет важную роль в патогенезе ожоговой болезни. Одновременно изучение липидной пероксидации при ожоговой болезни выявило повышение уровня липидных перекисей после воспроизведения ожоговой травмы, чем и объясняются регистрируемые изменения конформации бислойных мембран.

Очень перспективны липосомы, созданные из липидов с белками. Прежде всего включение белков в липосомальную мембрану даст возможность моделировать поведение природных мембран в различных физиологических условиях. Например, опыты с липидно-белковыми липосомами позволили подойти по-новому к изучению некоторых аспектов иммунологических реакций. Как модель мембраны липосомы широко

применяются в иммунологических исследованиях для изучения взаимодействия между антигеном и антителом, реакции антителообразования, комплементзависимого иммунного повреждения липосом [22].

Что могут дать липосомы для практики? Как известно, в крови содержатся ферменты, расщепляющие белки. Ферменты могут разрушаться прежде чем достигнут места своего назначения, но это можно предотвратить, если включить их в липосомы, которые защищают содержащиеся внутри них ферментные белки и таким образом могут значительно повысить эффективность ферментов. Поэтому липосомы можно использовать для доставки определенных ферментов или лекарственных препаратов в печень или костный мозг [18, 26]. Не исключено, что место доставки липосом может быть записано на их мембране, т. е. меняя липидный состав липосом, можно их направить не только в печень, но и в другие органы.

Исследования ряда авторов показали, что значительная часть липосом проникает через эпителий желудочно-кишечного тракта неповрежденной и оказывается в кровотоке [11, 16, 17].

Широкое применение липосомы получили в практической медицине. Химиотерапия опухолей—важная область применения липосом. Так, Грегориадис с сотр. [20, 21] вводил противоопухолевые соединения в липосомы, которые проникали в опухолевые клетки и эффективнее транспортировали активное вещество. Риман [25] использовала липосомы для лечения больных диабетом и некоторых заболеваний печени. Остером [23] они были применены при лечении некоторых сердечных заболеваний. Успешно применяют липосомы в кардиологических исследованиях Всесоюзного кардиологического научного центра Академии медицинских наук СССР в лаборатории В. П. Торчилина [10].

Использование липосом как капсул для лекарственных препаратов имеет ряд преимуществ перед другими микрокапсулами: они являются нейтральным материалом, который организм может легко утилизировать; состав их можно изменять в зависимости от поставленной задачи, что открывает новые возможности для более направленного введения лекарств в определенные органы и ткани.

Ереванский институт усовершенствования врачей
Минздрава СССР

Поступило 11.VIII 1980 г.

ԼԻՊՈՍՈՄՆԵՐԸ ՈՐՊԵՍ ԲՋՋԱԹԱՂԱՆԹԻ ՄՈԴԵԼ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՆՈՐ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Ս. Ա. ԲԱՋԻՆՅԱՆ

Քննարկվում են կենսաբանական թաղանթների նորագույն մոդելի—լիպոսոմների վերաբերյալ գրականության տվյալները և մեր ուսումնասիրության արդյունքները։

Լիպոսոմները արդյունավետ օգտագործվում են դանազան թաղանթային պրոցեսների հետազոտման համար՝ իոնական թափանցելիություն, դանազան նյութերի կապվելը թաղանթների բաղադրամասերի հետ։

Լիպոսոմների օգտագործումը բաց է անում թաղանթային պրոցեսների մեխանիզմների հետազոտման նոր հնարավորություններ զանազան ախտաբանական վիճակների ժամանակ։

LIPOSOMES AS A MODEL OF SELL MEMBRANE AND NEW ASPECTS OF THEIR APPLICATION

S. A. BADJINIAN

Literature and own data concerning new models of biological membrane —liposomes are considered. Liposomes are used effectively for study of different membrane processes, ionic permeability, binding of different substances with membrane components. The use of membranes gives new possibilities for the membrane process mechanism study of different pathological states.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агаджанов М. И., Баджинян С. А., Карагезян К. Г., Мхитарян В. Г.* Докл. АН СССР, *244*, 6, 1496, 1979.
2. *Андриадзе Л. И., Штейн-Марголина В. А., Серебровская К. Б., Опарин А. И.* Журн. эвол. биох. и физиол., *11*, 4, 333, 1975.
3. *Боровягин Б. Л.* Цитология, *9*, 505, 1967.
4. *Бродский В. Я.* Трофика клетки. М., 1966
5. *Васильев Ю. М., Маленков А. Г.* Клеточная поверхность и реакция клетки. Л., 1968.
6. *Лев А. А., Бужинский Э. П.* Цитология, *9*, 102, 1967.
7. *Лев А. А.* Моделирование ионной избирательности клеточных мембран. Л., 1976.
8. *Маркин В. С., Либерман Е. А.* Докл. АН СССР, *201*, 975, 1971.
9. *Мхеян Э. Е., Секоян Э. С., Баджинян С. А., Соцкий О. П., Акопов С. Э.* Биолог. ж. Армении, *31*, 7, 758, 1978.
10. *Торчилин В. П., Бак-Ан-Ко, Бердичевский В. Р., Локс В. Р., Смирнов В. Н., Хабер Э. Г., Чазов Е. И* Докл. АН СССР, *246*, 3, 746, 1979.
11. *Adams D., Joyce G., Ricardson V., Ryman B., Wisniewski H.* J. Neurol. Sci., *31*, 173, 1977.
12. *Bangham A. D., Hornel R. W.* J. Mol. Biol., *8*, 660, 1964.
13. *Bangham A. D., Standish M. M., Miller N.* Nature, *208*, 1295, 1965.
14. *Bangham A. D., Dawson R. H.* J. Biochem., *75*, 133, 1968.
15. *Bangham A. D.* Nort-Holland Publ. Comp., *195*, 206, 1970.
16. *Bouma S., Drislane F., Hucstis W.* J. Bioch. Chem., *272*, 6759, 1977.
17. *Deshmukh D., Bear W., Wisniewski H.* Bioch. Bioph. Res. Comm., *82*, 328, 1978.
18. *Heath T. D., Edwards D., Ryman B.* Bioch. Soc. Transc., *3*, 129, 1977.
19. *Huang R. T.* Naturforsch., *32*, 7, 656, 1977.
20. *Gregoriodis G., Ryman B.* Eur. J. Bioch., *24*, 485, 1972.
21. *Gregoriadis G.* Nature, *265*, 407, 1977.
22. *Kinsky S., Haxby J., Zopf F.* Biochem. (Wach,), *8*, 4149, 1969.
24. *Papahadjopoulos D.* Bioch. Bioph. Acta., *265*, 169, 1972.
25. *Ryman B., Jemkes R., Jeyasing K., Osborne M. et all.* Ann. New., Jork. Acad, Sci., *75*, 282, 1978.
26. *Tyrrel D., Richardson V., Ryman B.* Bioch. et Bioph. Acta, *497*, 469, 1977.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1195—1200, 1980

УДК 615.84

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, Л. А. АВАКЯН, С. Л. МКРТЧЯН

Исследовалась ультраструктура митохондрий печени крыс после действия электростатического поля (ЭСП). Показано, что одночасовое воздействие ЭСП напряженностью 2000 в/см не приводит к ощутимым изменениям ультраструктуры митохондрий, тогда как 24-часовое вызывает значительные структурные перестройки. При длительной экспозиции поля (по 6 часов ежедневно в течение недели) имеет место частичное восстановление ультраструктуры митохондрий.

Ключевые слова: электростатическое поле, митохондрии, электронная микроскопия.

Нами ранее [3, 6, 7] было показано, что воздействие электростатического поля (ЭСП) существенно влияет на функциональное состояние митохондрий. Функциональные сдвиги в их работе могут явиться или причиной, или следствием структурных изменений.

Задачей данной работы явилось электронномикроскопическое исследование структурных изменений в митохондриях печени крыс после воздействия ЭСП.

Материал и методика. ЭСП создавалось при помощи установки конденсаторного типа со строго контролируемыми параметрами поля. Подробное описание установки дано в нашей предыдущей работе [2]. Объектом исследования служили митохондрии печени белых беспородных крыс-самцов массой 130—160 г., подвергшихся воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см. Исследовалось влияние трех экспозиций ЭСП: часовой, суточной и недельной (по 6 ч ежедневно).

Для каждой экспозиции использовалось 6—10 животных, которые забивались непосредственно после воздействия ЭСП. Во избежание влияния циркадных ритмов все забои проводились в одно и то же время суток.

Митохондрии извлекались по известной методике [9], модифицированной Мосоловой с сотр. [5]. Фракция выделенных митохондрий не промывалась. Осадок полученной фракции фиксировался 1%-ным раствором осьмиевой кислоты по Миллонигу [11] 2 ч, затем обезвоживался в этиловом спирте возрастающей концентрации. Полученные кусочки заливали в аралдит и частично в смесь метакрилата. Готовые блоки резались на ультрамикротоме фирмы ЛКБ (Швеция).* Срезы на сетках контрастировались 1—2%-ным водным раствором уранилацетата и солями свинца по методу Рейнольдса [12]. Просмотр и съемка проводились при помощи электронного микроскопа фирмы Tesla BS-613 (ЧССР).

* Приносим глубокую благодарность с. н. с. лаборатории электронной микроскопии Института кардиологии Минздрава Арм. ССР В. Б. Паталовой за предоставленную возможность проводить резку блоков.

Результаты и обсуждение. Как видно из рисунков, выделенная фракция митохондрий содержит ряд субмикроскопических компонентов: микросомы, рибосомы, осьмиефильные тельца и т. д. Митохондрии животных, не подвергшихся воздействию ЭСП (рис. 1), не однородны по своим размерам, форме, расположению крист, электронной плотности матрикса. Часть крист вакуолизирована, матрикс большинства митохондрий электроннoплотный. Хорошо сохранены наружные и внутренние мембраны.

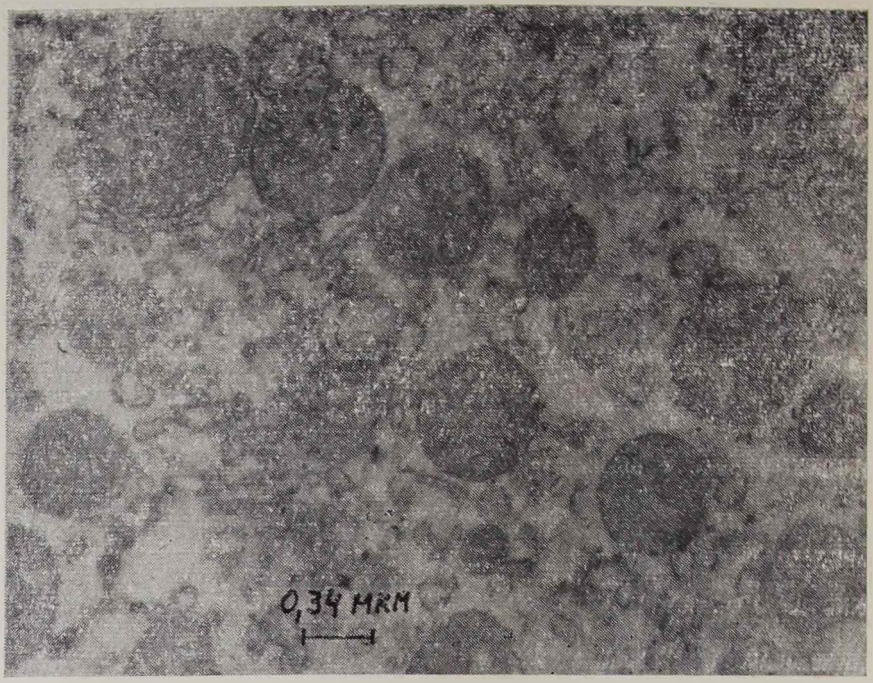

Рис. 1. Митохондрии печени интактных крыс.

Наружная мембрана видна в виде тонкой темной осьмиефильной линии, параллельно которой располагается внутренняя мембрана, от которой берут начало кристы. Между кристами располагается матрикс различной степени осьмиефилии.

Митохондрии животных, подвергшихся одночасовому воздействию ЭСП, по своей ультраструктуре сходны с таковыми контрольных животных (рис. 2).

После 24-часовой экспозиции воздействия ЭСП (рис. 3) митохондрии набухают и значительно увеличиваются в размерах. Наружная мембрана не нарушается, однако кристы почти полностью исчезают, матрикс просветляется. Особенно выявляется гетерогенность в изменениях ультраструктур исследуемых органелл. Часть митохондрий (рис. 3а) сохраняет

внутреннюю мембрану, хорошо ограничивая наружную полость органелл, в них разрушаются выросты внутренней мембраны, остаются единичные кристы и их разрушенные остатки в виде нитей или зерен. Не-

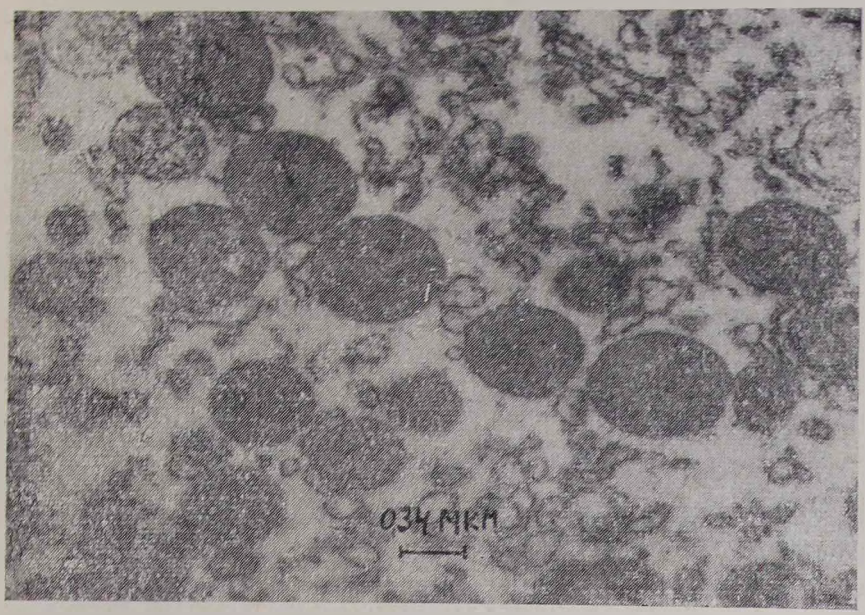

Рис. 2. Митохондрии печени крыс после одночасовой экспозиции ЭСП.

которые митохондрии (рис. 3б), значительно увеличиваясь в размерах, теряют всю внутреннюю мембрану с выростами, имеют более просветленный матрикс, содержат тонкие, еле заметные нити и зерна. Помимо таких изменений митохондрий, во фракции встречаются и хорошо сохранившиеся единичные органеллы, в которых четко выявляются наружная и внутренняя мембрана и кристы.

Интересно отметить, что патологическим изменениям подвергаются и немитохондриальные компоненты фракции, в частности, микросомы сильно набухают.

Митохондрии животных, подвергшихся длительной экспозиции воздействия ЭСП, отличаются сравнительной гомогенностью. Так, практически все митохондрии увеличиваются в размерах, в них происходит просветление, «вымывание» матрикса, появляются кристы, которые частично вакуолизированы. Однако в некоторых органеллах видны разрывы наружной мембраны (рис. 4). Имеет место частичное восстановление ультраструктуры немитохондриальных компонентов, так, например, микросомы восстанавливают свои размеры и форму.

Описанные изменения позволяют объяснить ряд ранее обнаруженных функциональных сдвигов в митохондриях после воздействия ЭСП [6, 7]. Так, резкое угнетение интенсивности дыхания, низкая скорость синтеза АТФ после 24-часового воздействия ЭСП могут быть следствием нарушения структуры ансамблей дыхательных ферментов, локализован-

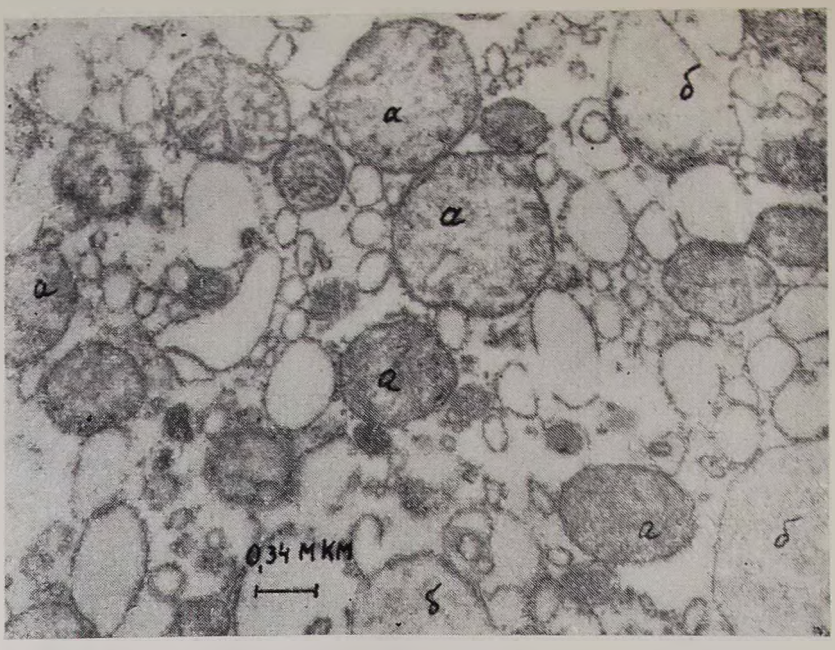

Рис. 3. Митохондрии печени крыс после суточной экспозиции ЭСП.

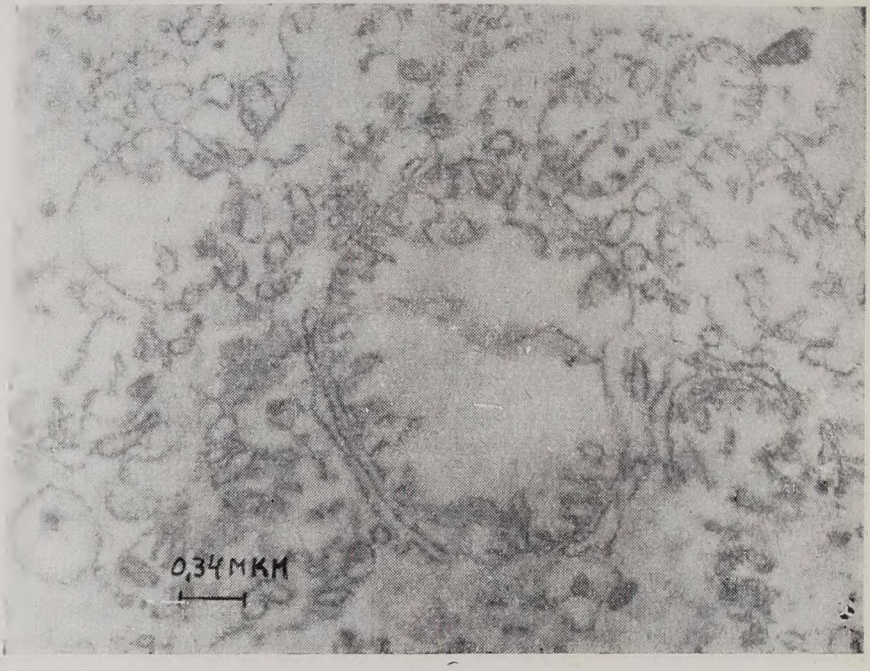

Рис. 4. Митохондрии печени крыс после недельной экспозиции ЭСП.

ных на внутренних мембранах. Причиной подавления активности сукцинатдегидрогеназы и сукцинатцитохром-С-редуктазы при тех же экспозициях воздействия может быть наблюдаемое набухание митохондрий и разрушение крист. Разрушение внутренних мембран может привести к более интенсивному окислению семихинонных форм некоторых переносчиков дыхательной цепи, что и приводит к уменьшению концентрации стабильных свободных радикалов [3]. Итак, одночасовое воздействие не приводит к существенным структурным изменениям, максимальные сдвиги имеют место при 24-часовом воздействии ЭСП. Частичное восстановление ультраструктуры митохондрий при длительных воздействиях, возможно, носит адаптивный характер[6]. Зависимость выявленных структурных изменений от длительности воздействия ЭСП хорошо коррелирует с нашими предыдущими данными о функциональных нарушениях при тех же экспозициях воздействия.

Говорить что-либо о конкретных механизмах воздействия ЭСП на ультраструктуру митохондрий на данном этапе исследования не представляется возможным. Однако, опираясь на литературные данные и на наши предыдущие работы, можно сделать ряд предположений. Как было показано в работах ряда авторов [4, 8, 10], воздействие ЭСП может привести к нарушению нативности биополимеров и изменениям в биомембранах. Подобные сдвиги могут вызвать сдвиги в ультраструктуре митохондрий. Таким образом, наблюдаемые изменения могли быть следствием непосредственного воздействия ЭСП.

Возможно, реализация воздействия ЭСП идет другим путем. Нами было показано, что воздействие ЭСП приводит к увеличению снабжения тканей кислородом [1]. А избыточное количество кислорода должно привести к перестройке ультраструктур митохондрий.

Отмеченные ранее глубокие функциональные изменения митохондрий могут явиться инициаторами структурных изменений. Возможно, что оба предлагаемых механизма действуют одновременно и какой-то из них является превалирующим.

Таким образом, в свете приведенных данных и наших предыдущих работ можно констатировать, что воздействие ЭСП приводит как к функциональным, так и к структурным изменениям митохондрий. Причем степень этих взаимообусловленных изменений находится в прямой зависимости от длительности воздействия ЭСП.

Ереванский медицинский институт, ЦНИЛ, лаборатория биофизики и молекулярной биологии

Поступило 7. VIII 1980 г.

ԱՒՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻ ՈՒԼՏՐԱԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԸ ԷԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԻՑ ՀԵՏՈ

Գ. Գ. ԱՐՄԲՐՈՒՆԻ, Լ. Ս. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ս. Լ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

Հետազոտվել է սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիաների ուլտրակառուցվածքը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո։ Յույց է

տրվում, որ 2000 վ/սմ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի 1 ժամյա ազդեցությունը միտոքոնդրիաների ուլտրակառուցվածքում չի առաջացնում զգալի փոփոխություններ, սակայն 24 ժամյա ազդեցությունից հետո նկատվում են կառուցվածքային նշանակալից վերափոխություններ։

Դաշտի երկարատև տևողության դեպքում (6-ական ժամ ամեն օր շաբաթվա ընթացքում) տեղի է ունենում միտոքոնդրիաների ուլտրակառուցվածքի մասնակի վերականգնում։

RAT LIVER MITOCHONDRION ULTRASTRUCTURE AFTER ELECTROSTATIC FIELD EFFECT

G. G. ARTSRUNI, L. A. AVAKIAN, S. L. MKRTCHIAN

The ultrastructure of rat liver mitochondrions have been investiga ted after the effect of electrostatic field. It has been shown that one hour exposition to electrostatic field (2000 v/sm) results in insignificant changes of mitochondrial ultrastructure. 24 hour influence brings to significant structural changes and after one week exposition to the field, a partial restoration of mitochondria ultrastructure takes place.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арцруни Г. Г., Пирузян Л. А., Романов Г. В., Кутузов А. Д.* Изв. АН СССР, серия биолог., *2*, 320, 1974.
2. *Арцруни Г. Г.* Мат-лы конф. молодых ученых, посвященной XXV съезду КПСС. Ереван, 1975.
3. *Арцруни Г. Г., Мкртчян С. Л.* Биолог. ж. Армении, *32*, 11, 1064, 1979.
4. *Кадников О. К., Кабизкой В. И.* Сб. работ института цитологии АН СССР, *17*, 114, 1977.
5. *Мосолова И. М., Горская И. А., Шольц К. Д., Котельникова А. В.* Методы современной биохимии, 45, М., 1975.
6. *Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г.* Биолог. ж. Армении, *31*, 7, 750, 1978.
7. *Мкртчян С. Л.* Биолог ж. Армении, *32*, 2, 157, 1979.
8. *Bean C., Bennett A.* Biopolymers, *12*, 4, 817, 1973.
9. *Hill T.* Proc. Nat. Acad. Sci USA, *58*, 111, 1938.
10. *May L., Camble A., Acosta T.* J. Membr. Biol., *2*, 192, 1970.
11. *Millonig G.* J. Appl. Physics, *32*, 8, 1637, 1961.
12. *Reynolds E. S.* J. Cell. Biol., *12*, 2, 208, 1963.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1201—1204, 1980

УДК 577.15:616—073.75—001.17

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ И ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ В МОЗГОВОЙ И ПЕЧЕНОЧНОЙ ТКАНЯХ КРЫС ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ И ТЕРМИЧЕСКОГО ОЖОГА

К. Л. АЛЕКСАНЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Изучена динамика изменений активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в различные сроки после комбинированного воздействия рентгеновских лучей и термического ожога.

Выявленные сдвиги свидетельствуют об определенной разнице в активности этих ферментов в мозговой и печеночной тканях. Показано значительное усиление глутатионпероксидазной активности в мозговой ткани и, наоборот, снижение в печеночной.

Экзогенно введенный α-токоферол в определенной степени нормализует исследованные показатели.

Ключевые слова: облучение, ожог, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, α-токоферол.

В настоящее время интенсивно изучаются процессы перекисного окисления липидов, чрезмерная активация которых ведет к деструкции биомембран. Одним из факторов, препятствующих переокислительному превращению полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), является α-токоферол, действующий согласно своей антиоксидантной функции. Однако даже при его дефиците в тканях перекиси ПНЖК не накапливаются. Это явление, не находящее объяснения с точки зрения антиоксидантной теории, связано с участием различных защитных ферментов, нейтрализующих эти соединения. К такого рода защитным ферментам относятся глутатионпероксидаза (ГП) и глутатионредуктаза (ГР). Защитной ролью ГП и ГР и определяется интерес к ним в наших исследованиях, посвященных изучению липидной пероксидации в условиях комбинированного радиационного поражения (КРП), вызванного совместным действием облучения и термического ожога. Установленное нами усиление липидной пероксидации при данной патологии сопровождалось снижением содержания эндогенного α-токоферола и фосфолипидов как в мозговой, так и в печеночной тканях [2, 3, 6]. При изучении ГП и ГР после раздельного воздействия рентгеновскими лучами и ожоговой травмы обнаружена их значительная активация в начальные сроки после действия стрессоров [1, 14]. Однако есть данные, указывающие на возможное снижение активности этого ферментного комплекса при облучении [16].

В наших предыдущих исследованиях установлена нормализация липидной пероксидации и фосфолипидного спектра мозговой и печеноч-

ной ткани при КРП в результате введения экзогенного α-токоферола [2, 3, 6]. В связи с этим становится возможным его применение в качестве лечебного средства при данной патологии. Последнее обуславливает интерес к изучению влияния α-токоферола на активность названных ферментов.

Материал и методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 140—160 г. Рентгеновское облучение в дозе 440 рад осуществляли на установке типа РУМ-11, при мощности дозы 34/р/мин. Ожоги III^{а} и III^{б} степени вызывали методом аппликации медной пластинкой, нагретой до 120°, на предварительно эпилированную кожу спины животного. Подкожная температура составляла 55—60°, площадь ожога—12—15% поверхности тела. Облучение и термический ожог осуществляли последовательно в течение одного часа.

Определение активности ГП и ГР проводили через 1 час, 1, 3, 7, 15 дней после нанесения травмы и осуществляли согласно Пинто и Бартлею [15]. Об активности первого фермента судили по количеству тиоловых групп, окисленных в процессе аэробной инкубации [17]. Активность второго определяли по изменению скорости окисления глутатиона на саморегистрирующем спектрофотометре Specord UV Vis (ГДР) при волновом числе 294000. α-Токоферилацетат вводили в дозе 1 мг на кг массы животного сразу после нанесения травмы, а затем через 1, 3, 7, 12 дней.

Результаты и обсуждение. Исследование динамики изменений активности ГП в мозговой и печеночной тканях выявило определенную разницу в действии этого фермента. В мозговой ткани активность ГП на протяжении всего срока исследования была повышена, хотя и имела место фазовость, проявляющаяся в наибольшей активации фермента в первый час после воздействия КРП и на 7-е сутки. Активность фермента превысила в эти сроки нормальный уровень на 150,73 и 236,25% соответственно. В остальные сроки она была выше на 101,6; 66,6; 73,5%, соответственно через 1, 3, 15 суток. Введение лечебных доз витамина Е этим животным нормализует активность ГП, особенно в сроки, соответствующие максимумам ее у нелеченых животных.

Активность ГП при КРП в печеночной ткани оказывается повышенной лишь в первые часы после нанесения КРП и составляет 142%. В последующем происходит снижение ферментативной активности, носящее все углубляющийся характер (в 1-й день ниже контроля на 27,8, на 7-й—на 29,6, на 15-й—на 39,5%). Как и в мозговой ткани, введение витамина Е в определенной степени нормализовало активность фермента, особенно в сроки максимальной активности его.

Исследование активности ГР в мозговой ткани спустя час после воздействия выявило резкую активацию фермента, на 145,9%. В последующем, падая ниже нормального уровня (на 44,12% в 1-й день и на 16,5% на 3-й), активность фермента восстанавливается к 7-му дню и уже превышает контрольный уровень на 29,4, а к 15-му дню—на 55,88%. Таким образом, налицо фазовое изменение активности ГР с максимальным увеличением в 1-й час и на 7-й и 15-й дни. Введение витамина Е пораженным животным сглаживало как положительные, так и отрицательные сдвиги в активности фермента.

В печеночной ткани активность ГР оказалась пониженной уже в первый час после воздействия на 38,1%. В последующие сроки, имея

все еще низкие показатели (в 1-й день ниже контроля на 40,5%, а на 3-й—на 39,7%), она приобретала тенденцию к нормализации (к 7-му дню была ниже контроля на 29.12%) и к 15-му дню оказалась на 104,76% выше нормы. Под влиянием экзогенного витамина Е активность печеночной ГР нормализовалась.

Низкая активность ГП и ГР в печеночной ткани, возможно, обусловлена уменьшением содержания глутатиона, поскольку при облучении наблюдается радиолиз [11]. Немаловажное значение может иметь и изменение синтеза глутатиона, являющегося субстратом для глутатионпероксидазы в своей восстановленной форме и глутатионредуктазы—в окисленной. Это может быть связано с недостаточностью витамина Е, наблюдаемой нами при КРП, поскольку авитаминоз Е нарушает поступление в ткани метионина, который, участвуя в синтезе серусодержащих соединений, влияет и на синтез глутатиона [8]. С этой точки зрения примечательны исследования, установившие нормализацию активности ГП при введении витамина Е совместно с метионином [7]. Указанные сдвиги могут объясняться и уменьшением количества НАДФН при облучении [5], что связано с понижением активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при действии ионизирующей радиации [4]. Вероятно, под влиянием ионизирующего излучения происходит ослабление связи кофермента с ферментом, образующейся за счет SH-групп. Немаловажно и усиление активности пиридиннуклеотидаз при облучении, способствующее разрушению пиридиннуклеотидов [5].

Нормализация α-токоферолом активности ГП и ГР в наших исследованиях обусловлена, вероятно, рядом причин. Прежде всего α-токоферол как антиоксидант препятствует чрезмерному образованию перекисей липидов, являющихся субстратом ГП. Угнетение липидной пероксидации под влиянием α-токоферола предотвращает разрушение мембранных тиолов и ведет к нормализации активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Способствуя внедрению метионина в ткань, он стимулирует синтез глутатиона, необходимого для нормального функционирования ГП и ГР. Полученные результаты являются еще одним подтверждением целесообразности применения α-токоферола при совместном действии облучения и термического ожога.

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 3.IV 1980 г.

ԳԼՈՒՏԱՏԻՈՆՊԵՐՕՔՍԻԴԱԶԱՅԻ ԵՎ ԳԼՈՒՏԱՏԻՈՆՌԵԴՈՒԿՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԵՎ ՈՒՂԵՂԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ ԵՎ ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԱՅՐՎԱԾՔՆԵՐԻ ՄԻԱՏԵՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ք. Ա. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է գլուտատիոնպերօքսիդազայի և գլուտատիոնռեդուկտազայի ակտիվությունը ռենտգենյան ճառագայթների և այրվածքի միատեղ

ազդեցության ժամանակ դինամիկայում։ Որոշակի տարբերություն կա այդ ֆերմենտների փոփոխությունների մեջ լյարդում և ուղեղում։ Ցույց է տրվում, որ գլուտատիոնպերօքսիդազայի ակտիվությունը զգալիորեն ամում է ուղեղում և նակատակը՝ ցածր է լյարդում։

Էկզոգեն α-տոկսֆերոլը որոշ չափով նորմալացնում է հետազոտված ֆերմենտների ակտիվությունը։

GLUTATHIONPEROXIDASE AND GLUTATIONREDUCTASE ACTIVITY IN RAT LIVER AND BRAIN TISSUE UNDER COMBINED EFFECT OF X-RAY RADIATION AND THERMAL BURN

K. A. ALEXANIAN, V. G. MKHITARIAN

The glutathionperoxidase and glutathionreductase activities have been investigated after the X-ray and burn combind action.

It has been established the signiiicant difference between the above mentioned enzyme activities in brain and liver. Obtained results have shown the increase of glutathionperoxidase activity in brain tissue and the opposite effect in liver tissue.

The injected α-tocoferol reverted all paramietres to their normal statie.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агаджанов М. И.* Журн. эксп. и клин. мед., *19*, 3, 248, 1979.
2. *Алексанян К. А.* Журн. эксп. и клин. мед., *20*, 1, 1980.
3. *Алексанян К. А., Карагезян К. Г., Мхитарян В. Г.* Биолог. ж. Армении, *32*, 12, 1979.
4. *Гильгертова И., Шонке И.* В кн. Пентозный цикл и ионизирующая радиация, под ред. А. Русанова, И. Шонке, Л., 1968.
5. *Гильгертова И., Шонке И., Динстбир З.* В кн. Пентозный цикл и ионизирующая радиация, под ред. А. Русанова, И. Шонке, Л., 1968.
6. *Карагезян К. Г., Алексанян К. А., Мхитарян В. Г.* Журн. эксп. и клин. мед., *20*, 2, 1980.
7. *Кругликова Г. О., Штутман Ц. М.* Укр. биохим. журн., *48*, 6, 739, 1976.
8. *Штутман Ц. М., Сухаревская А. М.* Сб. Витамины. Вып. 8, 87, Киев, 1975.
9. *Cleland W. W.* Biophys. Biochim. Acta, *67*, 104, 1963.
10. *Flohe L.* Klin Wochenshr, *49*, 669, 1971.
11. *Guintiliani M., Badiello R., Tamba M., Gorti G.* Modification Riiosensitivity Biol. syst, 28, Vienna, 1976.
12. *Mills G. C., Randall H. P.* J. Biol. Chem., 232, 1958.
13. *Nacamura W., Hosoda J., Hayashi K.* Biophys. Biochim. Acta, *358*, 251, 1978.
14. *Olinescu R. si S. Nita.* Revue roumaine de biochimie, *11*, 2, 121, 1974.
15. *Pinto R. E., Bortley W.* Biochem. J., *112*, 109, 1969.
16. *Rathgen G. H., Pieper K.* Klin Wochenshr., *47*, 14, 784, 1969.
17. *Sedlak J., Lindsay K. N.* Analit. Biochem., *25*, 182, 1968.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1205—1209, 1980

УДК 599.323:576.312.31:535.37.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ХРОМАТИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ

М. А. ДАВТЯН, Р. Р. КАЗАРЯН

Проведен полный флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени крыс после введения аргинина, а также смеси аминокислот. Аргинин в флуоресцирующих характеристиках хроматина изменений не вызывает, в то время как смеси с различным содержанием аминокислот приводят к изменению флуоресцентной картины.

Глюкоза, введенная вместе с аминокислотами, препятствует индукции катаболических ферментов, предотвращая указанные изменения.

Ключевые слова: хроматин, аминокислоты, флуоресценция, спектрофотометрия.

Ранее нами было показано [3, 4], что введение гидрокортизона крысам приводит к индукции печеночной аргиназы, и при этом улавливаются определенные количественные и качественные сдвиги в флуоресцирующих характеристиках хроматина печеночной клетки [3]. Известно, что у животных не удается выявить субстратную индукцию. Введение аргинина или других аминокислот в отдельности не вызывает индукции соответствующих катаболических ферментов в печени, между тем как смесь аминокислот способствует этому процессу [2, 5—7, 12]. Даже изъятие из смеси той или иной аминокислоты не снимает индукции всех ферментов, и в том числе фермента, обеспечивающего катаболизм изъятой аминокислоты, а присутствие глюкозы, вводимой со смесью аминокислот, полностью снимает ее [5—7].

На основании этих данных было заключено, что, очевидно, у животных взамен субстратной функционирует генерализованный механизм индукции, обеспечивающий контроль биосинтеза катаболических ферментов белковым и углеводным питанием [7, 8].

Перед нами была поставлена задача выяснить степень участия хроматина в этом процессе, а также функцию надпочечников в указанных ситуациях. С этой целью был произведен полный флуоресцентный анализ хроматина, выделенного из печени как интактных, так и адреналэктомированных животных после введения смеси аминокислот.

Материал и методика. В экспериментах использовались белые крысы массой 120—150 г. Хроматин из печени получали по описанной нами методике [3]. Этапы выделения также описаны [3]. Белок определяли по Лоури [14], ДНК—по Дише, РНК—спектрофотометрически, после гидролиза 1 N $HClO_4$. Спектральные характеристики снимали на спектрофотометрах СФ-16. Введение аминокислот проводили как описано

в работе [7]. Полная смесь аминокислот содержала (в%): 5,9—аргинина, 0,7—триптофана, 4,0—гистидина, 12,8—лизина, 5,1—тирозина, 6,6—фенилаланина, 5,7—цистина, 0,8—метионина, 4,2—серина, 5,8—треонина, 12,3—лейцина, 2,6—изолейцина, 5,9—валина, 6,2—аланина, 1,8—глицина, 4,8—пролина, 10,9—аспарагиновой кислоты и 16,5—глутаминовой кислоты, что соответствует составу сывороточного альбумина.

Перед опытом крысы голодали в течение 10—12 ч. Смеси вводили по 1,5 г/кг per os (через трубку в пищевод) трижды в течение суток. Через 5 ч после третьего введения аминокислот животных забивали и выделяли хроматин. Подвергались флуоресцентному анализу также препараты хроматина, полученные после введения аргинина (per os 1,5 г/кг массы в день в течение 5—7 дней), полной смеси аминокислот с глюкозой (глюкозу вводили одновременно с аминокислотами по 2 г/кг), смеси аминокислот без аргинина, а также смеси аминокислот без фенилаланина, триптофана, лейцина, изолейцина, валина, тирозина, метионина и треонина. Спектры возбуждения и эмиссии хроматина регистрировались на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A фирмы «Hitachi» (Япония), а также на люминесцентной установке [1] с монохроматическим возбуждением (линия ртути—296, 280, 270, 240 нм от лампы СВД-120), в кварцевых прямоугольных кюветах, при комнатной температуре, в многократных разбавлениях 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, pH 8.

Надпочечники крыс удаляли под эфирной анестезией. Адреналэктомированные крысы получали вместо питьевой 0,9%-ный NaCl. Для устранения градиента температуры раствор в кювете перемешивали механической стеклянной мешалкой.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов исследовались флуоресцирующие свойства хроматина после трехкратного введения полной смеси аминокислот. Как видно из рис. 1, хроматин, полученный после введения полной смеси аминокислот, имитирующей по соотношению компонентов сывороточный альбумин, обнаруживает мак-

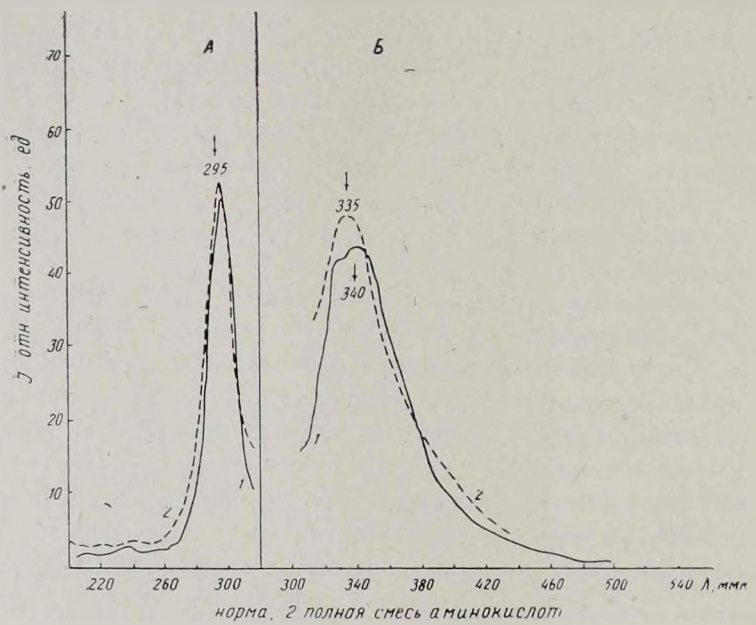

Рис. 1. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного из печени крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения эмиссии—4 нм. 1. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, pH 8. 2. Хроматин, полученный при введении полной смеси аминокислот, разбавленный ×20 в 1×10^{-3} трис-HCl буфере, pH 8.

симум спектра возбуждения при 295 нм и максимум спектра эмиссии при 335 нм, при этом основной флуоресцирующий комплекс его при 340 нм, обусловленный триптофановой флуоресценцией [4], сдвигается в ультрафиолетовую область, не выходя за пределы величин, характерных для триптофанилов. Аналогичный эффект проявлялся при гормональной индукции гидрокортизоном [3], а также при голодании крыс. В то же время флуоресцентный анализ хроматина на всех длинах волн энергии активации показал изменения флуоресцирующих свойств в области длин волн возбуждения 230—270 нм в пределах спектра флуоресценции 330—470 нм, наблюдаемые также у хроматина, подвергнутого гормональной индукции гидрокортизоном [3]. Все это свидетельствует о качественных перестройках флуоресцирующих характеристик структуры хроматина после введения полной смеси аминокислот. Исследование хроматина, выделенного из адреналэктомированных крыс, получавших полную смесь аминокислот, выявило картину, аналогичную наблюдаемой у интактных животных при введении смеси аминокислот.

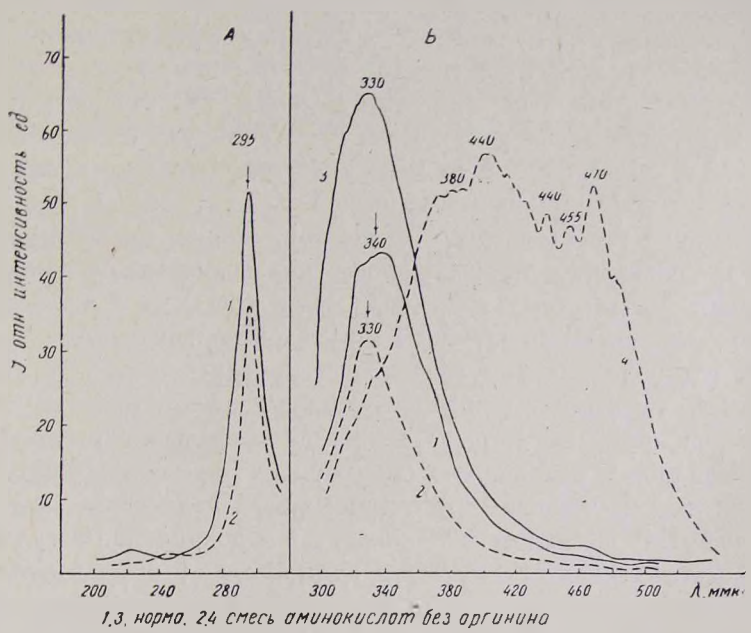

Рис. 2. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) при длине волн возбуждения ExW—295 нм (1,2), ExW—270 нм (3,4) хроматина, выделенного из печени крыс. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии—4 нм (1,2), 6 нм (3,4). 1.3. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, pH 8. 2.4. Хроматин, полученный при введении смеси аминокислот без аргинина, разбавленный ×20 в 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, pH 8.

В следующей серии экспериментов исследовались флуоресцентные характеристики хроматина, выделенного после введения смеси аминокислот без аргинина. Как видно из рис. 2, отсутствие аргинина не сказывается на флуоресцентной картине, так как и в этом случае четко об-

наруживались конформационные изменения структуры хроматина с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в пределах спектра эмиссии 380—470 нм, в области длин волн возбуждения 230—270 нм. Был исследован также эффект введения смеси аминокислот, не содержащей незаменимых аминокислот, кроме аргинина, гистидина и лизина, взятых соответственно в большем количестве, так что в этом случае крысы получали примерно столько же аминоазота, сколько при введении полной смеси. Флуоресцентные характеристики хроматина претерпевали такие же качественные перестройки, какие наблюдались после введения полной смеси аминокислот, при этом адреналэктомия не меняла характера флуоресценции после введения смеси без аргинина и некоторых незаменимых аминокислот.

Следующий этап работы был посвящен исследованию флуоресцирующих свойств хроматина после введения животным только аргинина, а также полной смеси аминокислот, с глюкозой, когда, согласно литературным данным, аргиназа и другие катаболические ферменты не индуцируются [2, 5, 7, 9, 12, 13]. При введении только аргинина или смесей аминокислот с глюкозой новых флуоресцирующих комплексов на всех длинах волн энергии активации не было обнаружено, а четко выявлялся один максимум спектра возбуждения при 295 нм и один максимум спектра эмиссии при 340 нм, т. е. обнаруживались максимумы, характерные для флуоресцирующих спектров нативного хроматина, обусловленных триптофановой флуоресценцией [4].

Суммируя результаты экспериментов, можно заключить, что хроматин претерпевает конформационные изменения лишь при условиях, сопровождающихся индукцией аргиназы и других катаболических ферментов. Даже введение аргинина в высокой концентрации не вызывает сдвигов в флуоресцентных характеристиках хроматина. Примечательно, что адреналэктомия не предотвращала конформационные изменения в структуре хроматина, происходящие после введения смесей аминокислот. Очевидно, в механизме индукции катаболических ферментов при введении смесей аминокислот гормоны коры надпочечников не принимают участия. По-видимому, белковая и эндокринная регуляции биосинтеза катаболических ферментов аминокислот в печени животных достаточно независимы. Это заключение находится в полном соответствии с мнением В. П. Скулачева относительно того, что у животных взамен субстратной индукции выработался генерализованный механизм индукции, вызываемый каким-то продуктом, общим для целой группы субстратов [8]. Очевидно, этот неизвестный промежуточный продукт реализует свой эффект, минуя гормоны коры надпочечников. Подобное свойство генерализованного действия, но в сторону репрессии в наших экспериментах проявила глюкоза, которая, как известно, является в микробиологических объектах катаболическим репрессором.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 6.VII 1979 г.

ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏՈՂ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԽԱՌՆՈՒՐԴԻ ՆԵՐԱՐԿՈՒՄՈՎ

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Ռ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

Կատարված է առնետների լյարդից ստացված քրոմատինի լրիվ ֆլուորեսցենտային անալիզ արգինինի, ինչպես և ամինաթթուների խառնուրդի ներարկումով։ Արգինինի ներարկման ժամանակ քրոմատինի ֆլուորեսցենտող ցուցանիշներում փոփոխություններ չեն դիտվում, այն դեպքում, երբ տարբեր տեսակի ամինաթթուների խառնուրդները առաջ են բերում փոփոխություններ քրոմատինի ֆլուորեսցենտային ցուցանիշներում, որն արտահայտվում է նոր ֆլուորեսցենտային կոմպլեքսներով գրգռման ալիքի 230—270 նմ երկարության շրջանում, էմիսիայի սպեկտրի 330—470 նմ սահմաններում, ընդ որում, այդ փոփոխությունները արտահայտվում են նաև ադրենալէկտոմիայի ֆոնի վրա։

Ամինաթթուների հետ ներարկված գլյուկոզան արգելակում է կատաբոլիկ ֆերմենտների ինդուկցիան և կանխում ֆլուորեսցենտային պատկերի վերոհիշյալ փոփոխությունները։

STUDY OP FLUORESCENTING PROPERTIES OF CHROMATIN UNDER AMINOACID MIXTURE INJECTION

M. A. DAVTIAN, R. R. KASARIAN

Complete fluorescent analysis of chromatin isolated from rat liver under injection of arginin and aminoacid mixture has been carried out. Under arginin injection in fluorescent characteristics of chromatin changes are not observed, while mixtures of different aminoacid content bring to the change of fluorescenting chromatin characteristics with display of new fluorescent complexes in the range of exitation wave lengths 230—270 nm in the limits of 330—470 emission spectrum, these changes also occure on adrenalectomy background.

Glucose, injected with aminoacids hinders the induction of catabolic enzymes and the above mentioned changes of fluorescent picture.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф.* Практикум по общей биофизике, вып. 8, М., 1964.
2. *Вовченко Г. Д.* Арх. биол. наук, *42*, 3, 89, 1936.
3. *Давтян М. А., Казарян Р. Р., Демин Ю. М.* Биолог. ж. Армении, *32*, 1, 1979.
4. *Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тироцуян С. Г., Манвелян А. Г.* Биолог. ж. Армении, *31*, 7, 1978.
5. *Мясоедова К. Н.* Вопр. мед. химии, 9, 1, 1963.
6. *Мясоедова К. Н.* Вопр. мед. химии, *5*, 547, 1964.
7. *Мусоедова К. Н.* Биохимия, *31*, 1, 1966.
8. *Скулачев В. П.* В кн. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
9. *Bach S. J. and Williamson S.* Nature, *150*, 575, 1942.
10. *Chauveau J., Moule Y., Rouiller C.* Exptl. Cell Res., *11*, 317, 1956.
11. *Dishe L.* Microchemie, *8*, 9, 1930.
12. *Edlbacher S. and Zeller A.* Z. Physiol. Chem., *242*, 253, 1936.
13. *Hanter A. and Downs C. E.* J. Biol. Chem., *157*, 427, 1945.
14. *Lowry D., U., Rosenbrough N. J. et al.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1210—1215, 1980

УДК 612.014.4

СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ И ЭЛЕКТРОЛИТОВ В ТКАНЯХ СЕРДЦА КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ РАЗНЫХ ВЫСОТ

А. Б. ЗАХАРЯН, А. Г. САРУХАНЯН

В условиях разных высот методом пламенной фотометрии определено содержание ионов натрия, калия и воды в левом и правом желудочках и предсердиях кроликов. Установлено, что содержание воды и электролитов в ткани разных отделов сердца в условиях малых высот мало подвержено колебаниям и лишь в экстремальных условиях происходит перераспределение ионов натрия и калия.

Ключевые слова: сердце, электролиты, высокогорье.

Установлено, что электролитам мышечной ткани принадлежит важная роль в передаче возбуждения и сокращения мускулатуры и что электролитный состав различных тканей—функционально и структурно дифференцированные системы. Многочисленные исследования показали, что различие в распределении воды и электролитов в отдельных органах и системах зависит не только от деятельности последних, но также и от вида животного [4, 5, 10, 11, 13, 15, 20]. Известно также, что в условиях высокогорья в организме происходит определенная перестройка физиологических функций для приобретения устойчивости, благодаря чему он сохраняет свою жизненную деятельность[7]. Имеются немногочисленные данные о содержании электролитов в общей ткани сердца при недлительном пребывании животных в условиях высокогорья[2, 8]. В литературе мы не встречали работ, посвященных изучению электролитного состава разных отделов сердца в условиях высокогорья, за исключением исследования, выполненного в условиях барокамеры [18]. Поэтому в целях раскрытия механизмов приспособления организма в экстремальных условиях изучался электролитный состав желудочков и предсердий в условиях разных высот.

Материал и методика. Исследования проводились на 34 кролнках-самцах массой 2—3 кг на различной высоте: 960 м над ур. м.—12 кроликов (контроль), 2000—15 и 3250 м—7. На 960 и 2000 м опыты проводились на кроликах, родившихся и выросших на местах, а на высоте 3250 м животных завозили за 4 месяца до эксперимента. Для определения содержания воды и электролитов в миокарде желудочков и предсердий кусочки свежей ткани массой 400—600 мг, предварительно освобожденные от крови и жировых наслоений, высушивали до постоянной массы при температуре около 105° 2—3 суток. По разности сырой и сухой массы определяли содержание общей воды в тканях. Точно взвешенное количество сухого остатка помещали в мерную колбу, заливали 0,75 н раствором азотной кислоты и оставляли на 2—3 суток. По окончании экстракции содержимое колб фильтровали и фотометрировали. Содержание электро-

литов в ткани выражали в мэкв/100 г сухого остатка, а содержание воды—в г/100 г сырой ткани. Определение электролитов проводили по методике Руммеля и Баженовой [9]. Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Как показали исследования (табл. 1), содержание общей воды в ткани миокарда желудочков и предсердий кроликов оказалось примерно одинаковым. Хотя на высотах 2000 и 3250 м наблюдаются незначительные колебания в содержании воды в ту или иную стороны по сравнению с контролем (от +5,2 до —3,5), однако эти

Таблица 1

Содержание воды, г/100 г сырой ткани, и электролитов, мэкв/100 г сухого остатка, в миокарде кроликов, обитающих на разных высотах

Высота над ур. м., М	Отделы сердца	Na	K	Na+K	K/Na	H_2O
960	ПЖ	19,0 1,14	31,8 1,04	50,9 1,32	1,66 0,061	78,8 1,72
	ЛЖ	17,1 1,08	35,5 1,32	52.5 1,87	2,05 0,084	79,1 2,18
	ПП	29,7 1,44	24,9 0,98	54,6 1,18	0.85 0,059	77,6 1,63
	ЛП	27,1 1,56	27,1 1,13	54,2 2,01	1,60 0,093	79,9 1,23
2000	ПЖ	18,8 1,03	31,0 0,99	49,8 0,96	1,64 0,077	77,7 1,48
	ЛЖ	18,7 1,42	37,3 1,66	56,0 1,61	1,99 0,091	79,8 1,16
	ПП	30,8 1,63	31,1+ 0,88	61,9++ 1,47	1,00 0,062	81,6 3,04
	ЛП	28,0 1,47	30,5 1,12	58,5 1,38	1,07 0,066	80,1 1,82
3250	ПЖ	21,5 1,25	26,2++ 0,53	47,8 1,61	1,23++ 0,086	79,0 3,48
	ЛЖ	16,2 0,47	28,2++ 0,96	44,3++ 1,23	1,71+ 0,071	76,5 1,09
	ПП	23,8 0,89	22,5 1,29	46,5 + 1,32	0,95 0,064	75,0 1,17
	ЛП	24,9 0,59	24,1 1,01	49,1+ 1,48	0,98 0,018	77,3 1,37

Примечание: ПЖ, ЛЖ, ПП, ЛП—соответственно правые и левые желудочки и предсердия; + и ++—достоверность различий, соответствующая $P<0,05$ и $P<0,01$.

изменения статистически недостоверны. При определении тканевых электролитов выявлено, что в нормальных условиях содержание калия в желудочках больше, чем натрия, а в предсердиях—одинаково или меньше. В табл. 2 представлены данные о содержании натрия и калия в отделах сердца, полученные различными авторами на разных видах животных и на человеке. Как видим, распределение ионов натрия и калия в тканях миокарда неодинаково. С целью исключения влияния различного рода факторов содержания воды в желудочках и предсердиях на абсолютное содержание натрия и калия в тканях сердца принято вводить коэффициент K/Na. В наших исследованиях отношение K/Na в левом желу-

Таблица 2

Содержание натрия и калия в ткани отделов сердца человека и животных по данным различных авторов

Автор	Объект исследования	Натрий				Калий				Единица измерения
		ПЖ	ЛЖ	ПП	ЛП	ПЖ	ЛЖ	ПП	ЛП	
Семенов Н. Б. [12]	человек	126	99			196	314			мг/100 г вл. ткани
Сальманович В. С. [10]	кролик	45,5	42,3	59,0	56,1	70,0	75,8	58,0	63,7	мэкв/кг сырой ткани
	крыса	44,6	41,6	64,2		79,1	81,2	61,5		мэкв/кг сырой ткани
	собака	39,2	39,0	52,0	50,0	77,0	78,3	59,7	62,3	мэкв/кг сырой ткани
Хант М. М. [14]	человек	145	108	176	173	143	273	128	137	мг%
Яременко М. С. и др. [16]	собака		14,8				44,1			мэкв/100 г сух. ост.
Сальманович В. С. [11]	собака	12,4	12,1	17,0	15,0	38,5	39,0	32,8	35,9	мэкв/100 г сух. ост.
	человек	62,36		77,65		60,97		45,60		мэкв/кг чистой ткани
Шихалеев Б. В. и др. [15]	крыса	53,9	30,4			81,2	71,4			мэкв/кг сыр. ткани
Сотников Ф. Г. [14]	собака	14,2	12,8	19,4	19,4	57,6	59,4	39,3	44,5	мэкв/100 г сух. ост.

дочке больше, чем в правом, и составляет 2,05, а в предсердиях этот коэффициент находится в пределах единицы или меньше.

Определение тканевых электролитов в миокарде желудочков и предсердий показало, что содержание натрия в ткани правого и левого желудочков и предсердий у кроликов на высоте 2000 и 3250 м несколько варьирует, однако эти колебания в основном статистически недостоверны, причем содержание калия претерпевает более заметные сдвиги. Так, на высоте 2000 м содержание калия в правом и левом предсердиях повышается на 8,4 и 12,5% соответственно, а в левом желудочке на 5,1%. На высоте 3250 м отмечалось его снижение во всех отделах сердца, причем в правом и левом желудочках оно оказалось статистически достоверным ($P<0,01$).

Сопоставление суммарных содержаний натрия и калия в ткани желудочков и предсердий с контролем показало, что в условиях высокогорья (3250 м) имеет место отрицательный баланс электролитов ткани сердца.

Расчеты показали, что отношение K/Na в ткани желудочков и предсердий на высоте 2000 м находится в пределах контрольных величин, и лишь на высоте 3250 м наблюдается понижение этого коэффициента в ткани правого и левого желудочков ($P<0.01$, $P<0,02$ соответственно), что связано с уменьшением содержания калия в этих отделах.

Исследованиями Касмалиева[2] показано, что в условиях высокогорья (3250 м) содержание воды и электролитов в ткани меняется в зависимости от срока пребывания. Данные о потере калия и незначительном колебании в содержании натрия и общей воды в ткани миокарда после 60-ти дней пребывания в горах удовлетворительно согласуются с нашими. Увеличение концентрации калия в моче и уменьшение в плазме крови у людей на высоте 3250 м [22] могут свидетельствовать о потере калия организмом в условиях высокогорья. Недельное пребывание на высоте 4300 м приводит к уменьшению количества внутриклеточной жидкости и общей воды [21], в сыворотке крови наблюдается увеличение концентрации калия и магния, а концентрация хлоридов, натрия и кальция не меняется [19]. Исследованиями, проведенными на крысах в условиях барокамеры, показано, что 3-недельное пребывание животных на «высоте» 7200 м приводит к достоверному повышению воды и электролитов в ткани правого желудочка сердца по сравнению с левым [18].

На основании наших и данных других авторов можно заключить, что в условиях высокогорья происходит перераспределение воды и электролитов в крови и тканях организма, причем при сравнительно длительном пребывании обнаруживаются менее выраженные изменения, что, вероятнее всего, можно связывать с приспособлением организма к новым условиям внешней среды. Известно, что при длительном пребывании людей в условиях высокогорья аппарат кровообращения приспосабливается так, чтобы сердце работало в более выгодном и экономном режиме [1]. В этой связи интересно заметить, что при даче нагрузки у животных обнаруживается увеличение содержания калия и уменьшение натрия в

сердце правого и левого желудочков. Уменьшение содержания калия в наших экспериментах после 4-х месяцев пребывания животных на высоте 3250 м может свидетельствовать о том, что сердечная мышца в результате адаптации работает в более спокойном режиме.

По изменению соотношений между различными белковыми фракциями и структурными компонентами миокарда в условиях длительной гипоксии Меерсон [6] предполагает, что метаболизм и сократительная функция миокарда становятся более совершенными. В пользу такого предположения говорят и другие исследования [20] показавшие, что у животных (морские свинки, кролики, собаки), родившихся и выросших на высоте 4300 м, отмечается повышение активности сукцинатдегидрогеназы, а лактатдегидрогеназа не меняется.

Таким образом, на высоте 2000 м каких-либо значительных изменений в составе электролитов не наблюдается, а сравнительно длительное пребывание кроликов в условиях высокогорья (3250 м) приводит к потере калия в ткани желудочков сердца; изменения содержания натрия и общей воды незначительны. По-видимому, такое распределение электролитов в ткани миокарда в условиях высокогорья является ответом организма, дающим основу для устойчивой деятельности сердца в изменившихся условиях среды.

Наблюдаемые изменения наталкивают на необходимость проведения исследований по изучению вне- и внутриклеточных концентраций электролитов, что является задачей дальнейших наших экспериментов.

Ереванский физический институт ГКИАЭ

Поступило 30.VIII 1980 г.

ՋՐԻ ԵՎ ԷԼԵԿՏՐՈԼԻՏՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՃԱԳԱՐՆԵՐԻ ՍՐՏԻ ԲԱԺԻՆՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ՝ ՏԱՐԲԵՐ ԲԱՐՁՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Հ. Բ. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ա. Զ. ՍԱՐՈՒԽԱՆՅԱՆ

Ցույց է տրված նատրիումի և կալիումի իոնների և ջրի քանակությունը ճագարների սրտի ձախ և աջ փորոկներում ու նախախորշներում տարբեր բարձրությունների պայմաններում։

Որոշված է, որ ջրի և էլեկտրոլիտների պարունակությունը սրտի տարբեր բաժիններում, ցածր բարձրությունների պայմաններում, փոփոխությունների ենթակա չեն։ Միայն էքստրեմալ պայմաններում (3250 մ) է, որ տեղի է ունենում նատրիումի և կալիումի իոնների վերաբաշխում՝ սրտի տարբեր բաժիններում։

WATER AND ELECTROLYTE CONTENT IN TISSUES OF RABBIT HEART SECTIONS UNDER DIFFERENT HEIGHT

A. B. ZAKHARYAN, A. Z. SARUKHANIAN

The content of Na and K ions and water in the left and right ventricles and auricles of rabbits has been determined by a flaming photometry method under different heights.

It has been eftablished that water and elrctrolyte content in tissues of different heart sections under low height conditions are insignificantly subjected to oscilation and only at extereme conditions (3250) the redistribution of the Na and K ions takes place.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Захарян А. Б.* Кровообращение. *3*, 5, 64, Ереван, 1974.
2. *Касмалиев Д. К.* III-я научная конф. по водно-солевому обмену и функции почек, 165, Орджоникидзе, 1971.
3. *Комадел Л., Барта Э., Конавец М.* Физиологическое увеличение сердца. Братислава, 1968.
4. *Крыге П. К.* и др. Физиол. ж. СССР, *57*, 1134, 1971.
5. *Махмудов Э. С.* и др. Узб. биолог. ж. *3*, 26, 1978.
6. *Меерсон Ф. З.* и др. Достижение современной кардиологии, 271, М., 1970.
7. *Миррахимов М. М., Слоним А. Д.* Сб. научн. тр. Кирг. мед. ин-та, *110*, 3, 1976.
8. *Мовсесян М. А.* и др. Биолог. ж. Армении, *21*, 6, 34, 1968.
9. *Руммель А. Г., Баженова А. Ф.* Кортикостероидная регуляция водно-сол. гомеостаза, 234, Новосибирск, 1967.
10. *Сальманович В. С.* Бюлл. экспер. биол. и мед., *54*, 11, 58, 1962.
11. *Сальманович В. С.* Физиол. ж. СССР, *55*, вып. 2, 186, 1969.
12. *Семенов Н. В.* Биохим. компоненты и константы жидких сред и тканей человека. М., 1971.
13. *Ситдиков Ф. Г.* Физиол. ж. СССР, *59*, 6, 911, 1973.
14. *Хаит М. М.* Врачебное дело, *8*, 765, 1964.
15. *Шихалеев Б. В.* и др. III-я научная конф. по водно-сол. обмену и функции почек, 187, Орджоникидзе, 1971.
16. *Яременко М. Г.* и др. Физиол. ж. СССР, *52*, 6, 765, 1966.
17. *Condorelli Z. and oth.* Достиж. современной кардиол., 214, М., 1970.
18. *Mc. Lrath J. J. and oth.* Int J. Biometeorol., *21*, 2, 157, 1977.
19. *Hannon J. P. and oth.* J. Appl. Physiol., *31*, 2, 266, 1971.
20. *Harris P. and oth.* Bull. physiol-phatol resp. rat., *8*, 6, 1403, 1972.
21. *Krzwicki H. J. and oth.* J. Appl. Physiol. *30*, 6, 806, 1971.
22. *Malhorta T. and oth.* Aviat. Space and Environ Med., *46*, 4, 1409, 1975.
23. *Mourek J. and oth.* Sborn. lek., *76*, 9, 231, 1974.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1216—1219, 1980

УДК 541.144.7

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОИНДУЦИРОВАННОГО ИЗМЕНЕНИЯ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НЕКОТОРЫХ ХЛОРОФИЛЛСОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМ

ДЖ. М. ДЖАВРШЯН, Н. М. ХАЧАТРЯН

Исследовали термоиндуцированное изменение флуоресценции молекул хлорофилла у некоторых фотосинтетических систем.

Показано, что для каждой хлорофиллсодержащей системы (различной сложности и нативности) характерны свои специфические кривые термоиндуцированного изменения флуоресценции.

Ключевые слова: хлорофиллсодержащие системы, термоиндуцированные изменения.

Изучению термоиндуцированного изменения флуоресценции (ТИФ) хлорофилла in vivo посвящен ряд работ [1—3, 7], данные которых свидетельствуют о том, что интенсивность флуоресценции хлорофилла изменяется как во время температурного воздействия, так и после него. Ход кривых при этом в принципе одинаков [1].

Работы последних лет, касающиеся данного вопроса, свидетельствуют о том, что ход кривых термоиндуцированного изменения флуоресценции во многом зависит от предыстории объекта (температуры и освещенности при росте) и фотосинтетической активности [5].

Мы предполагаем, что исследование ТИФ хлорофилла может служить хорошим тестом для характеристики состояния мембран хлоропластов у функционирующих клеток. Оно может явиться одним из лучших методов изучения конформационных перестроек мембран и одним из подходов к исследованию фотофизических и фотохимических стадий фотосинтеза .

В настоящей работе нами изучены и сопоставлены кривые ТИФ некоторых хлорофиллсодержащих систем.

Материал и методика. Объектом исследований служили фотосинтетические системы различной сложности и нативности: высечки листьев растений (шпината, сахарной свеклы, фасоли, лаврового листа), целые клетки (Chlorella pyrenoidoza, Anacystis nidulans), изолированные хлоропласты, смесь пигментов и нелистовые ткани, содержащие хлоропласты (зеленые клубни картофеля и стебли традесканции). Хлореллу выращивали при комнатной температуре на твердой питательной среде (1%-ном агаре, приготовленном на среде Тамийя), сине-зеленые водоросли—на среде Гомаса, растения—в оранжерейных условиях (исследовались листья трехнедельных проростков). Хлоропласты выделялись с использованием 0,3 М раствора NaCl в 0,6 М фосфатном бу-

фере. pH 6.9. Смесь пигментов получали в ацетоне, эвакуировали с помощью форвакуумного насоса и ресуспендировали в касторовом масле.

Для исследования флуоресценции использовали спектрофлуориметр с двумя монохроматорами, сконструированный в нашей лаборатории Дж. М. Джаваршяном. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу СВД-120А со стабилизированным источником питания. Возбуждающий луч с длиной волны 436 нм выделяли с помощью монохроматора от спектрофотометра СФ-4. Для регистрации флуоресценции использовали монохроматор УМ-2. Излучение образца через монохроматор при длине волны 685 нм направлялось на фотоумножитель ФЭУ-38, сигнал которого усиливался с помощью усилителя постоянного тока и регистрировался на электронном потенциометре КСП-4. Температура образца измерялась при помощи медно-константановой термопары. Регистрация температуры и флуоресценции велась синхронно, что позволяло непрерывно следить за изменениями интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры. Нагрев осуществлялся со скоростью 3° в минуту.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2. Непрерывная запись изменения интенсивности флуоресценции в максимуме (при длине волны 685 нм) под действием постепенного увеличения температуры позволила установить сложный характер кинетической кривой флуоресценции у различных живых фотосинтезирующих объектов.

На рис. 1 представлены кривые термоиндуцированных изменений флуоресценции листьев различных растений, значительно различающиеся по форме.

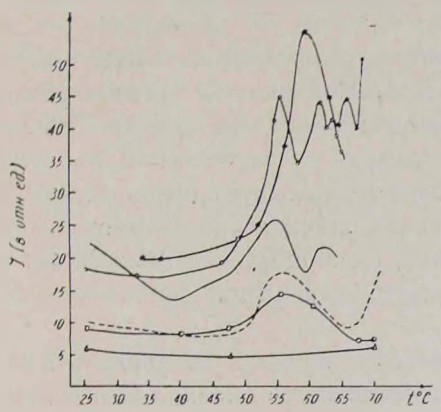

Рис. 1.

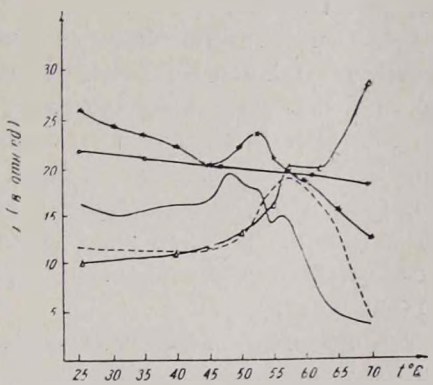

Рис. 2.

Рис. 1. Термоиндуцированное изменение флуоресценции хлорофилла у листовых и нелистовых тканей. ✱—✱ лист шпината, ——-лист фасоли, ○—○ лист сахарной свеклы, Δ--Δ лавровый лист, — — — клубень картофеля, □—□ стебель традесканции.

Рис. 2. Термоиндуцированное изменение флуоресценции хлорофилла в клетках и в растворе —— хлорелла, ✱—✱ хлоропласты, ○—○ смесь пигментов, Δ—Δ Anacystis nidulans (при 16°), — — — Anacystis nidulans (при 27°).

На кривых ТИФ интактных листьев растений в пределах 47—67° обнаруживается увеличение интенсивности флуоресценции в несколько раз по сравнению с первоначальным уровнем ее.

Для каждого вида растений при этой температуре характерно оп-

ределенное количество пиков с определенной интенсивностью и положением относительно оси температур. Кривые ТИФ высушенных листьев (например, лаврового листа) не имеют аналогичных пиков.

Существенно, что кривые ТИФ хлорофиллсодержащих нелистовых тканей (зеленых клубней картофеля и стеблей традесканции) аналогичны кривым нормальных листьев растений, но менее структурированы.

На рис. 2 приведены кривые ТИФ интактных клеток водорослей (Anacystis nidulans, Chlorella pyrenoidoza) изолированных хлоропластов и смеси пигментов, полученной из листьев, ресуспендированных в касторовом масле. Ход кривых ТИФ у водорослей и хлоропластов носит менее структурированный характер по сравнению с таковым у листьев растений.

Кривые ТИФ изолированных хлоропластов в области сравнительно невысоких температур (25—43°) имеют довольно высокую интенсивность флуоресценции, а в районе температурного максимума—неинтенсивный пик. Кривые ТИФ водорослей отличаются от описанных выше кривых и друг от друга. Интересно, что у сине-зеленых водорослей Anacystis nidulans этот показатель сильно изменяется при инкубировании ее клеток при 16°.

Сравнение кривых ТИФ смеси пигментов в касторовом масле с кривыми интактных клеток показало, что кривая ТИФ смеси пигментов не имеет максимума и минимума, а интенсивность с увеличением температуры подавляется.

Таким образом, анализ полученных нами данных свидетельствует о том, что для каждой хлорофиллсодержащей системы (различной сложности и нативности) характерны свои специфические кривые ТИФ.

Интактным функционирующим клеткам свойственны более сложные кривые ТИФ. Наличие нескольких выраженных температурных максимумов на кривых ТИФ фотосинтезирующих объектов, по-видимому, можно объяснить наложением ряда эффектов, вызванных многофазностью термоиндуцированных изменений структуры и функций фотосинтетического аппарата.

Конформационные изменения белков мембран хлоропластов могут вызвать нарушение как электронтранспортной цепи, так и миграции энергии между пигментными системами [6].

Для изолированных из листьев хлоропластов характерна своеобразная кривая ТИФ. При сравнительно небольших температурах уровень флуоресценции довольно высок, что можно объяснить вымыванием ряда переносчиков, вследствие которого нарушается эффективность работы электронтранспортной цепи фотосинтетического аппарата.

О важности нативной конформации белков и мембран в целом для проявления ТИФ хлорофилла говорят опыты с сухими листьями, сине-зеленой водорослью A. nidulans и смесью пигментов.

При высушивании листьев происходит сильное изменение конформации мембран и их компонентов, что приводит к снятию эффекта термоиндуцированного увеличения флуоресценции. При отсутствии нативной

высокоупорядоченной структуры и электронтранспортной цепи в смеси пигментов исчезает температурный максимум на индукционных кривых.

Что касается своеобразных кривых ТИФ A. nidulans при экспозиции 16 °, то это можно объяснить глубокими перестройками в фотосинтетической мембране [4].

Приведенные нами кривые ТИФ хлорофиллсодержащих клубней картофеля и стеблей традесканции свидетельствуют о том, что термоиндуцированное увеличение флуоресценции не может коррелировать с фотосинтезом в целом, а первоначальный подъем может информировать о нарушениях в первичном процессе фотосинтеза.

Обобщая полученные в работе данные, можно сделать заключение, что термоиндуцированные изменения флуоресценции обусловлены конформационными изменениями в мембранах хлоропластов.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 21.V 1980 г.

ՔԼՈՐՈՖԻԼ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՈՐՈՇ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ ԹԵՐՄՈՒՆԴՈՒԿՑՎԱԾ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ԵԼՔԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Ջ. Մ. ՋԱՎՐՇՅԱՆ, Ն. Մ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է քլորոֆիլի մոլեկուլի ֆլուորեսցենցիայի թերմոինդուկցված փոփոխությունը որոշ ֆոտոսինթետիկ համակարգերի մոտ։

Յույց է տրվում, որ ամեն մի քլորոֆիլ պարունակող համակարգին, կախված նրա բարդության աստիճանից և նատիվությունից, բնորոշ է իր ֆլուորեսցենցիայի յուրահատուկ թերմոինդուկցված փոփոխության կորը։

STUDY OF THERMOINDUCED CHANGES OF FLUORESCENCE OF SOME CHLOROPHYLLCONTAINING SYSTEMS

J. M. JAVRSHYAN, N. M. KHACHATRYAN

Thermoinduced changes of fluorescence (TCF) of chlorophyll molecules in some photosynthetic systems have been studied. It has been shown that to every chlorophyll-containing system of different complication degree and activity corresponds its specific TCF curve.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кикнадзе Г. С.* Цитология, *7*, 2, 1965.
2. *Рабинович Е.* Фотосинтез, *2*, М., 1953.
3. *Metzner P.* Lecture before Botanical Society Darmstadt, quoted from Frey-Wyssling, Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas, 1938.
4. *Peschek G. A., Schmetterer G.* FEMS-Microbiol Lett, *3*, 5, 295—297, 1978.
5. *Schreiber U., Berry G.* Annual Report of the Director Department of Plant Biology, Carnegie istitution, 323—327, 1977.
6. *Schreiber Ulrich, Armond Paul A.* Annual Report of the Director Department of Plant Biology, Carnegile istitution, 341—346, 1977.
7. *Leybold A., Egle K.* Botan. Arch., *41*, 578, 1940.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11. 1220—1223. 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ГЕМОГЛОБИНА НА МИНИМАЛЬНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ ОБРАЗОВАНИЯ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ФАЗЫ

А. К. ДАДИВАНЯН, А. Р. ЦАГИКЯН

Ключевые слова: гемоглобин-S, жидкокристаллическая фаза.

В гемоглобине-S шестой аминокислотный остаток β-цепи глутамил заменен на валил [5], в результате чего в определенных условиях дезоксигемоглобин-S агрегирует с образованием микротрубок и дальнейшим переходом в жидкокристаллическую фазу [6].

Образование агрегатов в эритроцитах является причиной серповидно-клеточной анемии. Ясно, что для лечения болезни необходимо знание межмолекулярных контактов при агрегации.

Поиск наиболее вероятных участков контакта значительно облегчится, если выяснить, один или оба участка, включающие шестой аминокислотный остаток β-цепи, входят в область контакта.

Покажем, что изучение зависимости минимальной концентрации образования жидкокристаллической фазы от состава гемоглобина позволяет ответить на этот вопрос.

Пусть минимальные концентрации белка, при которых происходит образование жидкокристаллической фазы при данном составе белка и в случае, когда в растворе имеется только гемоглобин-S, равны соответственно C_g и C_g^0, молярная доля гемоглобина-S во всем гемоглобине составляет φ_s, а другого гемоглобина— $(1-\varphi_s)$.

Известно, что при физиологических условиях раствора гемоглобина имеются как тетрамеры, так и димеры, в которые входят одна α- и одна β-цепи [4]. Это приводит к тому, что в растворе смеси гемоглобинов могут существовать наряду с исходными молекулами и гибридные. Если величины энергии взаимодействия между димерами в различных гемоглобинах не различаются, т. е. не различаются области контактов между димерами, концентрации гемоглобина-S, другого гемоглобина и гибридного будут соответственно равны $C_g\varphi_s^2$, $C_g(1-\varphi_s)$ и $2C_g\varphi_s(1-\varphi_s)$. Если же области контактов различаются сильно, то концентрации исходных гемоглобинов будут равны $C_g\varphi_s$ и $C_g(1-\varphi_s)$, а гибридного гемоглобина в растворе не будет.

Очевидно, что минимальная концентрация белка, при которой происходит образование жидкокристаллической фазы C_g, будет по-разному зависеть от величины φ_s в случаях, когда в агрегаты входят все молекулы, только молекулы гемоглобина-S, гемоглобина-S и гибридные.

Предполагая, что минимальная концентрация образования жидкокристаллической фазы определяется концентрацией молекул, которые могут войти в агрегаты, можно получить зависимости от φ_s для перечисленных выше случаев.

1. Все молекулы входят в агрегаты:

$$C_g = C_g^0, \tag{1}$$

т. е. C_g не зависит от φ_s и равна минимальной концентрации белка, при которой образуется жидкокристаллическая фаза в растворе гемоглобина-S.

2. Гибриды не образуются, в агрегаты входят только молекулы гемоглобина-S:

$$C_g = \frac{C_g^0}{\varphi_s}. \tag{2}$$

3. Гибриды образуются, в агрегаты входят молекулы гемоглобина-S и гибридные:

$$C_g = \frac{C_g^0}{\varphi_s^2 + 2\varphi_s(1-\varphi_s)}. \tag{3}$$

4. Гибриды образуются, в агрегаты входят только молекулы гемоглобина-S:

$$C_g = \frac{C_g^0}{\varphi_g^2}. \tag{4}$$

Отметим, что аналогичные соотношения были получены в работе Чектама и др. [3], однако авторы ввели в полученные соотношения ряд параметров, смысл которых не ясен, кроме того, в полученные ими соотношения входит не молярная доля, а весовая, что не правильно. Отметим также, что авторами не ставится вопрос, один или два участка молекулы, включающие аминокислотный остаток β_6, входят в область контакта.

На рисунке приведены кривые, изображающие зависимости 1—4, а также даны зависимости минимальной концентрации гемоглобина, при которой происходит образование жидкокристаллической фазы, от величины $(1-\varphi_s)$ для смесей гемоглобина-S с рядом гемоглобинов: гемоглобином-А, гемоглобином-С Гарлем, в β-цепях которого имеются две мутации—шестой аминокислотный остаток заменен валилом, а семьдесят третий—аспартил-аспарагинилом, гемоглобином Корле-Бу (семьдесят третий аминокислотный остаток β-цепи заменен аспарагинилом), гемоглобином-О Аравия (сто двадцать первый остаток β-цепи (глутамил) заменен лизилом), гемоглобином-Д Лос-Анджелес (сто двадцать первый аминокислотный остаток β-цепи заменен глутамини-

лом) и гемоглобином-F, в цепях которого имеется около 40 мутаций. Эти данные взяты из работ [1, 2, 7], в которых авторы пытались выяснить, входит тот или иной участок молекулы в область контакта.

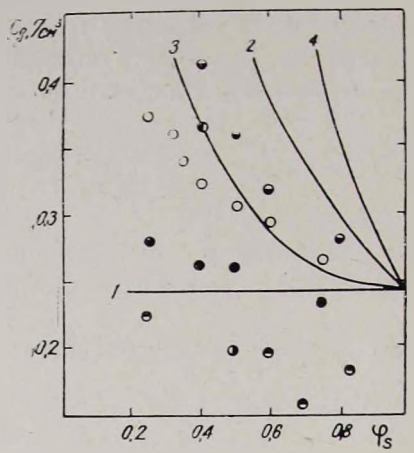

Рис. Зависимость минимальной концентрации белка, необходимой для образования жидкокристаллической фазы систем, содержащих смеси гемоглобинов, от молярной доли гемоглобина-S. Системы: ◒ —гемоглобин-S—гемоглобин-F, ● —гемоглобин-S—гемоглобин-С Гарлем, ○ —гемоглобин-S—гемоглобин-А, ◐ —гемоглобин-S—гемоглобин Корле-Бу, ◓ —гемоглобин-S—гемоглобин-О Аравия, ◑ —гемоглобин-S—гемоглобин-Д Лос-Анджелес.

Как видно из рисунка, в случае смесей гемоглобина-S с гемоглобином-А и гемоглобином Корле-Бу точки ложатся вблизи кривой 3; в агрегат входят как молекулы гемоглобина-S, так и гибридные. В случае смесей, содержащих гемоглобин-F, точки ложатся между кривыми 3 и 2. Последняя получена в предположении, что гибриды не образуются, и в агрегаты входят только молекулы гемоглобина-S. Этот результат не является неожиданным, так как при замещении в гемоглобине-F β-цепи γ-цепью, которая отличается от β-цепи на 40 аминокислотных остатков, вероятность образования гибридов меньше, чем в случае других гемоглобинов. В случае гемоглобина-С Гарлем величина C_g меняется в зависимости от φ_s незначительно, что означает, что в этом случае молекулы всех типов входят в агрегаты. Это согласуется с данными, согласно которым растворы гемоглобина-С Гарлем переходят в жидкокристалличеокую фазу и в отсутствие гемоглобина-S [7]. Следует обратить внимание на пониженные величины C_g при добавлении в растворы гемоглобина-S гемоглобина-О Аравия и гемоглобина-Д Лос-Анджелес. По-видимому, это означает, что сто двадцать первый аминокислотный остаток β-цепи, который в этих мутантах отличается от остатка в гемоглобине-S, находится в области контакта с соседней молекулой в агрегате.

Следует отметить, что при меньших концентрациях белка различие между теоретическими кривыми и экспериментальными данными меньше, чем при больших концентрациях. Это можно объяснить, предположив, что при больших концентрациях белка на образование жидкокристаллической фазы влияют и молекулы, не входящие в агрегат.

Ереванский государственный университет,
кафедра общей физики и биофизики

Поступило 28.VIII 1980 г.

ՀԵՄՈԳԼՈԲԻՆԻ ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ԱՋՏԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԵՂՈՒԿ ԲՅՈՒՐԵՂԱՅԻՆ ՓՈՒԼԻ ԱՌԱՋԱՑՄԱՆ ՄԻՆԻՄԱԼ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻ ՎՐԱ

Ա. Կ. ԴԱՎԻԹԱՆՅԱՆ, Ա. Ռ. ԾԱՂԻԿՅԱՆ

Ստացված են արտահայտություններ սպիտակուցային բաղադրությունից հեղուկ բյուրեղային փուլի առաջացման մինիմալ կոնցենտրացիայի կախման համար, երբ հեղուկ բյուրեղային փուլի մեջ մտնում են.

ա) միայն հեմոգլոբին S-ի մոլեկուլներ, բ) հեմոգլոբին S-ի և հիբրիդային մոլեկուլներ, գ) հեմոգլոբինի բոլոր մոլեկուլները։

Փորձառական տվյալների համեմատություններից պարզվեց, որ միջմոլեկուլյար հպումների մեջ մտնում է հեմոգլոբինի β_6 ամինաթթվային մնացորդ պարունակող միայն մեկ հատված։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bookchin R. M., Nagel R. L.* J. Mol. Biol., *60*, 263, 1971.
2. *Bookchin R. M., Nagel R. L., Ranney H. H.* Biochim. Biophys. Acta, *221*, 373, 1970.
3. *Checlham R. C., Huehns E. R., Rosewmeyer H. A.* J. Mol. Biol., *129*, 45, 1979,
4. *Guidotti G., Konigsberg W., Craig B. C.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, *50*, 774, 1964.
5. *Ingram V. M.* Nature, *180*, 328, 1957.
6. *Magdoff-Fairchild B., Swerdlow P. H., Bertles I. F.* Nature, *239*, 217, 1972.
7. *Ranney H. M.* Biochemie, *54*, 633, 1972.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1224—1226, 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.314

ЗАВИСИМОСТЬ ПОТЕНЦИАЛА РАЗРЫВА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ОТ СКОРОСТИ ПОДАВАЕМОГО НАПРЯЖЕНИЯ

Л. Г. МИКАЕЛЯН, С. А. АДЖЯН

Ключевые слова: плоские липидные мембраны, устойчивость, потенциал разрыва.

Устойчивость бислойных липидных мембран (БЛМ) к электрическому полю часто характеризуется потенциалом разрыва (V_p), который, согласно Тьену [5], представляет собой трансмембранную разность потенциалов, при которой мембрана разрушается. Величина V_p БЛМ варьирует в пределах 100—550 мВ и зависит от химического состава водного и липидного растворов [2, 4], а также от температуры [3]. Недавно было показано [1], что величина разрывающего напряжения зависит также от процедуры измерения. Используя импульсный метод определения электрической прочности диэлектриков, при котором устанавливается зависимость $\tau = f(\varphi)$, где τ—время жизни БЛМ при напряжении φ, авторы показали, что с увеличением напряжения τ БЛМ уменьшается. Устойчивость мембран к электрическому полю можно исследовать также путем подачи линейно-возрастающего напряжения с постоянной скоростью. В этом случае устанавливается зависимость $V^p = \beta\tau$, где $\beta = \frac{dV}{dt}$ —скорость линейного напряжения (СЛН), τ—время достижения разрывного значения напряжения. В литературе [5] имеются сведения о том, что V_p БЛМ зависит от скорости развития напряжения на мембране, однако систематически этот вопрос не исследовался. Учитывая важность изучения зависимости $V_p = \beta\tau$ для теории электрического пробоя мембран, нами были проведены эксперименты.

Материал и методика. БЛМ формировали из суммарной фракции липидов хлороформ-метанольного экстракта мозга быка, растворенных в н-алканах. Экспериментальная камера из тефлона покоилась на стальной плите массой 100 кг, подвешенной на стальном блоке с помощью нейлоновых тросов для предотвращения вибрации. Измерения начинали после полного почернения мембран, которое контролировали визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС-2. Электрическим критерием окончания формирования бислоя служило установление стационарного уровня проводимости мембраны, измеренной с помощью операционного усилителя «Кейтли 301». Напряжение на БЛМ подавали с помощью хлорсеребряных электродов от генератора ориги-

тальной конструкции, генерирующего одиночные импульсы линейного напряжения амплитудой 1,2 или 2,0 вольта с различной скоростью. Разрыв БЛМ регистрировали на осциллографе с памятью марки С8-11.

Результаты и обсуждение. На рисунке представлены зависимости V_p БЛМ от β. Видно, что с увеличением СЛН V_p возрастает по кривой, близкой к полулогарифмической. В области низких значений β при десятикратном увеличении последней V_p БЛМ возрастает на 75 мВ. При значениях β, больших 1000 В/сек, наклон кривой составляет 125 мВ. Сравнение кривых 1 и 2 на рисунке показывает, что изменение химического состава БЛМ (замена растворителя) не влияет на характер кривой и отражается только на абсолютных значениях V_p БЛМ. Полученные

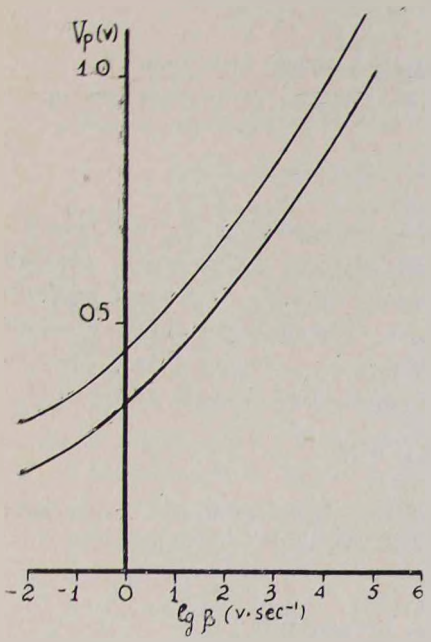

Рис. Зависимость V_p БЛМ от логарифма β. Кривые: 1—БЛМ-декан, 2—БЛМ-гептан. Водный раствор содержит 0,1 М NaCl. Температура раствора 22°. Каждая точка на кривых соответствует среднему из 40—170 измерений.

результаты хорошо согласуются с данными, полученными в работе Абидора и др. [1] и указывают на то, что величина V_p БЛМ при данной СЛН может служить критерием устойчивости БЛМ в электрическом поле, так же как и среднее время жизни БЛМ при данном потенциале. Более сильная зависимость V_p от β в области высоких значений последней может быть объяснена на основе представлений о механизме разрыва БЛМ в электрическом поле, развитых в теории электрического пробоя мембран [1]. Согласно этой теории, в основе разрушения мембран в электрическом поле лежат локальные дефекты типа сквозных пор, возникающих в структуре мембраны. Процесс разрушения БЛМ происходит постадийно—рождение дефекта, его рост до критических размеров и собственно разрушение БЛМ. Лимитирующей стадией в этом процессе является вторая—появление дефекта с критическим радиусом. Из теории следует, что критический радиус дефекта быстро уменьшается с ростом напряжения. Это значит, что при высоких потенциалах время

жизни БЛМ будет стремиться к постоянному значению, определяемому временем рождения дефекта. Из сказанного следует, что при СЛН, больших, чем «скорость» рождения дефекта, будет наблюдаться более быстрый рост V_p, чем при низких ее значениях. Наблюдаемое «ускорение» роста V_p от β имеет место при СЛН, равной 10^4 В/сек. Это значит, что время рождения дефекта в экстремальных условиях составляет приблизительно 100 мксек.

Полученные результаты показывают, что изучение указанной зависимости $V_p \sim f(\beta)$ может дать дополнительную информацию о процессе разрыва БЛМ в электрическом поле.

Ереванский физический институт ГКАЭ

Поступило 22.VIII 1980 г.

ԵՐԿՇԵՐՏ ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ԽԶՄԱՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՏԱՅԻՆ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԼԱՐՄԱՆ ԱՐԱԳՈՒԹՅՈՒՆԻՑ

Լ. Գ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Ս. Ա. ՀԱՅԻՆԱՆ

Ուսումնասիրվել է երկշերտ լիպիդային մեմբրանների խզման պոտենցիալի կախվածությունը մեմբրանին տրվող գծային էլեկտրական լարման արագությունից $1{,}5\times10^{-2}$—$3{,}0\times10^{6}$ վոլտ/վրկ. տիրույթում։ Յույց է տրվում, որ գծային էլեկտրական լարման արագության մեծացմանը զուգընթաց աճում է իզման պոտենցիալի արժեքը։ Կախվածության կորի տեսքը մոտ է կիսալոգարիթմականի և չի փոփոխվում մեմբրանի քիմիական կազմի փոփոխումից։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф., Тарасевич М. Р., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А.* ДАН СССР, *240*, 3, 733, 1978.
2. *Микаелян Л. Г., Аджян С. А.* Биолог. ж. Армении, *32*, 11, 1979.
3. *Микаелян Л. Г., Аджян С. А.* Биофизика, 6, 1980.
4. *Tien H. T., Diana A. L.* J. Coll. Interface Sci., 24, 287, 1967.
5. *Tien H. T.* in „Bilayer Lipid Membranes", Theory and practice, Marcel Dekker inc. N-Y—London, 1973, p. 159.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1227—1230, 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.4

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ДИФФУЗИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ИОНОВ НАТРИЯ ОТ ИХ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОТОКОВ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН

Ключевые слова: диффузионная проницаемость, математический метод.

Экспериментальные данные, полученные при изучении концентрационных зависимостей диффузионной проницаемости ионов натрия, свидетельствуют о том, что при увеличении концентрации ионов натрия может уменьшаться проницаемость мембраны для этих ионов [1—3]. Общепринятая прямолинейная зависимость диффузионного потока ионов натрия от концентрации этого иона представляется некорректной. Экспериментально очень трудно выделить чистый диффузионный поток на клетках. Для этого необходимо ингибировать все другие системы, транспортирующие ионы, но использование ингибиторов может влиять и на диффузионные потоки. Поэтому до сих пор нет достаточно надежных экспериментальных данных о функциональной зависимости диффузионной проницаемости, а, следовательно и диффузионного потока от концентрации иона. Однако знание такой зависимости необходимо при изучении потоков ионов, состоящих из диффузионных и недиффузионных компонентов: $J_{эксп} = J_д + J_{нед}$.

Обрабатываемые в данной работе экспериментальные данные были получены на портняжных мышцах лягушки Rana ridibunda. Изучалась зависимость разностных потоков ионов натрия от концентрации натрия в наружной среде Na_0 в бескалиевом растворе Рингера с уабаином, где NaCl заменялся эквивалентным количеством $MgCl_2$ при комнатной температуре. Подробно методика эксперимента дана в работе Адамян и др. [4].

Целью данной работы было разделение экспериментального потока ионов натрия на диффузионный и недиффузионный и выяснение характера зависимости диффузионного потока ионов натрия или диффузионной проницаемости от наружной концентрации натрия.

В работе Амбарцумян [5] предлагалось функциональное уравнение, с помощью которого можно описать экспериментальный разностный поток ионов натрия:

$$f_1(Na_0) + af_1(kNa_0) = \psi_1(Na_0). \qquad (1)$$

Здесь $f_1(Na_0)$ — диффузионный поток ионов натрия;

$af_1(kNa_0)$ — недиффузионный поток тех же ионов;

a — переменный коэффициент, зависящий от наружной концентрации Na_0, включающий функциональное различие между диффузионным и недиффузионным потоками;

k — переменный коэффициент, зависящий от Na_0; принимается, что $Na_i = kNa_0$.

$\psi_1(Na_0)$ — экспериментальный разностный поток ионов натрия.

Наблюдения показали, что опыты, проведенные в разное время года (осень—I сезон, весна—II сезон), дают неодинаковые результаты (табл. 1). Эти сезонные различия, по всей видимости, связаны с гормональными перестройками организма в период размножения. Экспери-

Таблица 1

Экспериментальный поток Na_i и внутриклеточная концентрация Na в зависимости от Na_0

Na_0, мМ	I сезон		II сезон	
	Na_i, мМ	$J_{эксп}$, пМ/см² сек	Na_i, мМ	$J_{эксп}$, пМ/см² сек
2	40	−2,3	40	−1,72
10	40	−0,3	40	−1,63
30	45	0,82	45	−0,64
40	50	0,8	45	−0,5
50	50	0,56	45	−0,4
60	50	0,7	50	−0,4
70	55	0,68	50	−0,47
80	55	1,4	50	−0,2
90	55	2,2	50	0,3
100	60	2,7	50	1,5
110	60	3,1	55	1,5
120	60	3,4	55	1,96

ментальные потоки во II сезоне можно описать уравнением такого же типа, как (1).

$$f_2(Na_0) + af_2(kNa_0) = \psi_2(Na_0). \qquad (2)$$

Фигурирующие здесь новые функции имеют тот же смысл, что и в уравнении (1).

Функциональный вид диффузионного потока известен:

$$J_д = \frac{VF}{RT} P(Na_0) \frac{Na_0 - Na_i e^{-VF/RT}}{1 - e^{-VF/RT}}.$$

Здесь V=0,127В, F, R, T — имеют обычные значения.

Нами вводится предположение, что $P_1(Na_0) - P_2(Na_0) = \Delta P = Const$. Это означает, что хотя проницаемость ионов натрия в каждом сезоне является величиной переменной, зависящей от Na_0, разница этих проницаемостей — постоянна, иными словами характер изменения проницаемости от Na_0 не зависит от сезона.

Тогда можно записать:

$$f_1(Na_0) - f_2(Na_0) = \frac{VF}{RT} \Delta P \frac{Na_0}{1 - e^{-VF/RT}} = ANa_0, \qquad (3)$$

предполагая, что член $Na_i e^{-VF/RT}$ — пренебрежимо мал по сравнению с Na_0.

Соответственно

$$f_1(kNa_0) - f_2(kNa_0) = \frac{VF}{RT}\Delta P \frac{kNa_0}{1-e^{-VF/RT}} = AkNa_0. \quad (4)$$

Имея систему уравнений (1—4), получим решение относительно $f_1(Na_0)$

$$f_1(Na_0)\,AkNa_0 + f_1(kNa_0)(\psi_2 + ANa_0 - \psi_1) = -\psi_1 AkNa_0. \quad (5)$$

Если подставить в (5) численные значения, взятые из эксперимента Амбарцумян и др. [6] и приведенные в табл. 1, то получим систему уравнений, каждое из которых будет соответствовать определенной концентрации Na_0.

Экспериментально получено численное значение диффузионной проницаемости ионов натрия при концентрации $Na_0 = 120$ мМ [6]:

$P_1 = 1{,}3\ 10^{-8}$ см/сек для I сезона,

$P_2 = 0{,}9\ 10^{-8}$ см/сек для II сезона.

Тогда $\Delta P = 0{,}4\ 10^{-8}$ см/сек, это значение и подставляется в (5).

Из табл. 1 видно, что имеется точка, в данном случае $Na_i = 50$ мМ, где Na_0 и $Na_i = kNa_0$ совпадают. Эта точка является отправной для вычислений всех значений

$$f_1(Na_0),\ f_1(kNa_0),\ f_2(Na_0) \text{ и } f_2(kNa_0)$$

последовательными подстановками. Результаты вычислений приводятся в табл. 2. Через вычисленные точки можно провести кривую зави-

Таблица 2

Расчеты и диффузионный и недиффузионный потоки Na в зависимости от Na_0

Na_0, мМ	$f_i(Na_0)$, пМ/см²сек	$af_1(kNa_0)$ пМ/см² сек	$f_2(Na_0)$, пМ/см² сек	$af_2(kNa_0)$ пМ/см² сек
2	0,01	—2,3	0,001	—1,72
10	0,05	—0,25	0,1	—1,73
30	0,85	—0,03	0,25	—0,85
40	1,2	—0,4	0,4	—0,9
50	1,7	—1,14	0,7	—1,1
60	2,07	—1,37	0,87	—1,27
70	2,21	—1,53	0,89	—1,36
80	2,64	—1,24	1,04	—1,24
90	3,0	—0,8	1,2	—0,9
100	3,7	—1,0	1,54	—0,54
110	4,9	—1,8	2,3	—0,8
120	4,9	—1,5	2,3	—0,34

симости диффузионных потоков от концентрации Na_0 для обоих сезонов. Как видно из табл. 2, диффузионный поток изменяется почти линейно в довольно широком интервале изменения Na_0 (от 0 до 100 мМ). При более высокой концентрации диффузионный поток теряет линейность. Это, очевидно, связано с тем, что в этой области концентраций проницаемость ионов снижается.

Таким образом, предложенный способ обработки экспериментальных результатов позволяет вычленить диффузионный компонент из экспериментального потока и выявляет нелинейный характер зависимости диффузионного потока натрия от его концентрации.

Ереванский физический институт ГКИАЭ

Поступило 22.VIII 1980 г.

ԷՔՍՊԵՐԻՄԵՆՏԱԼ ՀՈՍՔԵՐԻ ՄԱԹԵՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ԲԱԺԱՆՄԱՆ ՄԵԹՈԴՈՎ ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԴԻՖՈՒԶԻՈՆ ԹԱՓԱՆՑԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՐԱՆՑ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՑԻԱՅԻՑ

Տ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ

Նատրիումի իոնների արտաքին կոնցենտրացիայի փոփոխության ժամանակ թաղանթի դիֆուզիոն թափանցելիության փոփոխությանը անտեղյակ լինելը բարդացնում է էքսպերիմենտալ հոսքերի բաժանումը դիֆուզիոն և ոչ-դիֆուզիոն հոսքերի։ Տվյալ հոդվածում առաջարկվում է նման բաժանման մաթեմատիկական մոտեցում։ Այդ բաժանման արդյունքները ցույց են տալիս, որ դիֆուզիոն հոսքը, կախված իոնի կոնցենտրացիայից, փոփոխվում է ոչ գծային ձևով։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абраменко Ю. М.* Цитология, *14*, 1972.
2. *Абраменко Ю. М.* Цитология, *15*, 1973.
3. *Абраменко Ю. М.* Цитология, *15*, 1973.
4. *Адамян С. Я., Амбарцумян Т. Г., Марикян Г. Г.* Биофизка, *24*, 6, 1979.
5. *Амбарцумян Т. Г.* Биолог. ж. Армении, *32*, 11, 1979.
6. *Амбарцумян Т. Г., Марикян Г. Г., Адамян С. Я.* Биофизика, *25*, 1980.

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1231—1233, 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.11

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

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

Ключевые слова: ядерные мембраны, фосфолипиды.

Известно, что внутренняя мембрана ядерно-мембранной оболочки частично связана с хроматином, что предполагает возможное участие белков и фосфолипидов ядерной мембраны в изменении функциональной активности генома. Для рассмотрения этого вопроса необходимо выделение чистых препаратов основных компонентов ядерных мембран и их фракционирование. Данные об изучении фосфолипидов изолированных ядер и ядерных мембран клеток печени крыс приведены в ряде работ [1, 2, 8, 9, 10, 14], однако они довольно разноречивы, что, по-видимому, обусловлено различиями в методах их выделения и фракционирования. Качественный и количественный анализ фосфолипидного состава, наряду с другими характеристиками (химический анализ и процентное содержание основных компонентов, определение активности ряда маркерных ферментов и др.), может служить хорошим показателем чистоты выделенных препаратов ядерных мембран, степени их возможной загрязненности.

Настоящее сообщение посвящено изучению качественного и количественного состава фосфолипидов ядерных мембран печени крыс для оценки применяемого нами метода выделения с обработкой ДНК-азой, а также для четкого выявления всех основных и минорных фракций фосфолипидов с целью дальнейшего исследования их роли в регуляции генетической активности.

Материал и методика. Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола. Ядра выделяли по методу Блобела и Потера [4], ядерные мембраны—по методу Березнея и др. [3]. Белок определяли по методу Лоури и др. [11], ДНК и РНК—спектрофотометрически по методу Шмидта и Танхаузера [12]. Фосфолипиды экстрагировали согласно методу Фолча и др. [6], их количественное определение проводили по методу Фиске и Суббароу [5], фракционирование фосфолипидов—методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем КСК (толщина силикагеля—0,25 мм). На пластинку (12×20 см) наносили 15 мкг (по фосфору) фосфолипида. В качестве разделяющей смеси брали хлороформ, метанол и концентрированную NH_4OH в соотношении 65:35:4 соответственно. Фракции фосфолипидов после разделения проявляли парами йода. Для количественного определения соскабливали пятна

фосфолипидов в пробирки, сжигали в присутствии 70%-ной $HClO_4$ и 1%-ного раствора молибдата аммония, определяли количество P_2O_5 по методу Фиске и Суббароу [5]. Для качественного анализа использовали стандартные фосфолипиды—фосфатидилхолин и кардиолипин (оба фирмы «Sigma», США). Холинсодержащие фосфолипиды выявляли реагентом Драгендорфа [15], а фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин—нингидриновым реагентом [13].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 суммированы результаты химического анализа препаратов ядерных мембран, выделенных нами с применением ДНК-азы. Соотношение основных компонентов ядерных мем-

Таблица 1

Процентное содержание и соотношение основных компонентов препаратов ядерных мембран клеток печени крыс

Процентное соотношение				Соотношение компонентов			
белок	ДНК	РНК	фосфолипиды	ДНК / белок	РНК / белок	фосфолипид / белок	ДНК / фосфолипид
64,7∓ 2,81	7,7∓ 0,73	6,21∓ 0,68	21,3∓ 2,54	0,12∓ 0,01	0,10∓ 0,01	0,35∓ 0,07	0,39∓ 0,04

бран свидетельствует о том, что выделенные препараты обладают достаточной чистотой. Полученные ощутимые количества нуклеиновых кислот в препаратах согласуются с литературными данными, в частности с работами Харриса [7], показавшего, что при обработке ДНК-азой и гипотоническим шоком удается выделить ядерномембранные препараты с сохранившейся морфологией ядерной оболочки, и содержание ДНК в этих препаратах достигает 8%.

Качественный анализ фосфолипидов в препаратах ядерных мембран выявил девять фракций разной интенсивности и подвижности на силикагеле. С помощью применения стандартных фосфолипидов, а также обработки пластинок нингидриновым реагентом и реагентом Драгендорфа и сопоставляя полученные результаты с имеющимся в литературе, удалось идентифицировать все девять фосфолипидных фракций (табл. 2).

Таблица 2

Состав фосфолипидов ядерной мембраны печени крыс (средние значения от трех серий опытов)

Фракции	Фосфолипиды	Процентное содержание	Фракции	Фосфолипиды	Процентное содержание
1	Фосфатидилхолин	41,5	6	Сфингомиелин	4,7
2	Фосфатидилэтаноламин	21,7	7	Кардиолипин	4,5
3	Фосфатидилсерин	7,2	8	Фосфатидовая кислота	4,5
4	Фосфатидилинозит	6,9	9	Лизофосфатидовая кислота	4,3
5	Лизофосфатидилхолин	4,7			

Количественный анализ показал, что примерно 65% тотального количества фосфолипидов составляют основные два фосфолипида ядерных мембран—фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, что согласуется

с литературными данными [2, 8, 9]. Остальные семь фракций—минорные компоненты фосфолипидов—представлены примерно в равных количествах (табл. 2). Обращает на себя внимание наличие в составе фосфолипидов ядерных мембран небольших количеств кардиолипина (4,5%) и сфингомиелина (4,7%), известных как маркерные фосфолипиды митохондрий и плазматических мембран [2, 8, 9, 14]. На наличие этих фосфолипидов в препаратах ядерных мембран, выделенных разными методами, указывается также в ряде работ [2, 8—10, 14], согласно которым процентное содержание кардиолипина в препаратах колеблется в пределах 2,1—4,3, а сфингомиелина—2—9%.

Таким образом, фосфолипидный спектр ядерных мембран, выделенных с применением обработки ДНК-азой, свидетельствует о незначительной загрязненности препаратов и может служить четким контролем для дальнейшего исследования роли отдельных фосфолипидов в регуляции генетической активности.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 28.VIII 1980 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԿՈՐԻԶԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆԻ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ

Է. Ս. ԴԱՎՈՐՅԱՆ, Ժ. Վ. ՅՈՎՐՈՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Սիլիկագելային շերտում քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով հետազոտվել է առնետների լյարդի բջիջներից անջատված կորիզային մեմբրանի ֆոսֆոլիպիդային կազմը։ Յուց է տրվում, որ այն բաղկացած է ինը ֆոսֆոլիպիդներից, որոնցից երկուսը՝ ֆոսֆատիդիլխոլինը և ֆոսֆատիդիլէթանոլամինը կազմում են ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների մոտ 2/3-ը։

Արդյունքները վկայում են կորիզային մեմբրանի բավարար մաքրության մասին։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алесенко А. В., Бойков П. Я., Бурлакова Е. Б., Красильников В. А., Сидоренко Л. Н., Тодоров И. Н.* Биохимия, *43*, 1966, 1978.
2. *Лемеховская А. Ф., Коен Я. М., Перевощикова К. А., Збарский И. Б., Дятловская Э. Я., Бергельсон Л. Д.* Биохимия, *41*, 1000, 1976.
3. *Berezney R., Funk L. K., Crane F. L.* Bioch. Bioph. Acta, *203*, 531, 1970.
4. *Blobel G., Potter V. R.* Science, *154*, 76, 1966.
5. *Fiske C. H., Subbarow J. J. J.* Biol. Chem., *65*, 375, 1925.
6. *Folch J., Lees M., Sloane S. G. H.* J. Biol. Chem. *226*, 497, 1957.
7. *Harris J. R.* Bioch. Bioph. Acta, *515*, 55, 1978.
8. *Keenan T. W., Berezney R., Funk L. K., Crane F. L.* Bioch. Bioph. Acta, *203*, 517, 1970.
9. *Kleining H.* J. Cell Biol., *46*, 396, 1970.
10. *Kleining H., Zentgraf H., Comes P., Stadler J.* J. Biol. Chem., *246*, 2996, 1971.
11. *Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr A. K., Randall R. J.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
12. *Schmidt G., Tannhauser J.* J. Biol. Chem., *161*, 83, 1945.
13. *Skipsi V. P., Peterson R. F. Barclay M.* J. Lipid Res., *3*, 467, 1967,
14. *Virtanen J., Brotherus J., Renkonen O., Wartiovaara J.* Bioch. Bioph. Res. Comm., *76*, 142, 1977.
15. *Wagner H., Hörhammer L., Wolff P.* Biochem. Z., *334*, 175, 1961.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 11, 1234—1236, 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 615.917+577.158

ВЛИЯНИЕ КАМПОЗАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМА Р-450, МАРГАНЦА В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ КРЫС И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

А. Х. АВАКЯН

Ключевые слова: кампозан, липиды, перекисное окисление.

Детоксикация чужеродных соединений в организме осуществляется при помощи локализованного в микросомах печени цитохрома Р-450 [1]. Чужеродные соединения могут влиять на содержание цитохрома Р-450, они часто повышают уровень липидной пероксидации, что контролируется микросомальной окисляющей системой. Поэтому изучение влияния различных токсических соединений на компоненты гидроксилирующей системы микросом и, в частности на цитохром Р-450, а также на уровень липидной пероксидации является актуальной задачей.

В работе приведены результаты изучения влияния кампозана (2-хлорэтилфосфоновая кислота в водном растворе медного купороса), являющегося регулятором роста растений, на спектры ЭПР микросом печени крыс и на содержание перекиси липидов в этой ткани.

Материал и методика. В экспериментах использовали 60 белых беспородных крыс обоих полов массой 200—250 г, содержащихся на стандартном рационе в обычных условиях вивария. Животным опытной группы вводили перорально кампозан в одном случае в дозе 680 мг/кг (соответствующей 1/5 среднесмертельной дозы) в течение 7 дней, а в другом—340 мг/кг (соответствующей 1/10 среднесмертельной дозы) в течение 14 дней. За сутки перед декапитацией животных лишали пищи и давали только воду.

Печень крыс перфузировали 0,15 М NaCl, pH 7,4, гомогенизировали в 2-х объемах 0,25 М сахарозы в течение одной минуты в гомогенизаторе Дауниса с тефлоновым пестиком и центрифугировали при 10000 g 20 мин для удаления митохондрий, ядер и неразрушенных клеток. Осадки повторно суспендировали в небольшом объеме среды и вновь центрифугировали при тех же условиях. Для получения микросомальной фракции надосадочные жидкости, полученные после двух осаждений, объединяли и вновь центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч. Экстракцию липидов из печени проводили по методу Блая и Дайера [2]. Скорость перекисного окисления липидов определяли по методу, основанному на реакции малонового диальдегида и тиобарбитуровой кислоты [3]. Хемилюминесценцию, позволяющую регистрировать реакцию диспропорционирования перекисных радикалов, изучали на квантометрической установке на основе фотоумножителя ФЭУ-85 при 37°. Спектры ЭПР регистрировали на приборе

«Varian E-4» при частоте 9.16 Гги, мощности 10 мв, постоянной времени 0,3 сек при —180°.

Результаты и обсуждение. Нами обнаружено, что при действии кампозана в дозе 340 мг/кг содержание цитохрома Р-450 в микросомах печени крыс уменьшается (рис. 1). Из рис. видно также, что наряду с уменьшением концентрации цитохрома Р-450, наблюдается падение интенсивности свободнорадикального сигнала (g—фактор 2,00), вероятно, принадлежащего к флавинам, которые также как и цитохром Р-450 являются компонентом микросомальной гидроксилирующей системы.

Введение животным кампозана в дозе 680 мк/кг приводит к резкому увеличению двухвалентного марганца в микросомах печени (рис. 2), одновременно повышается уровень липидной пероксидации. На это ука-

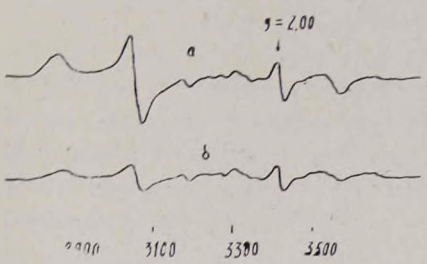

Рис. 1.

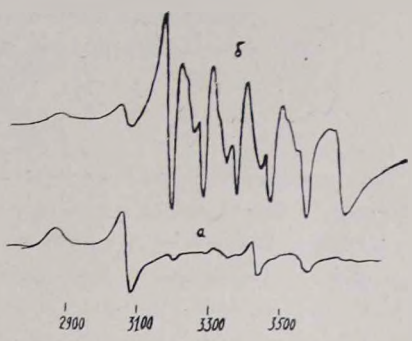

Рис. 2.

Рис. 1. Спектры ЭПР микросомального цитохрома Р-450 печени крыс а) в норме, б) при действии кампозана в дозе 340 мг/кг.

Рис. 2. Спектры ЭПР микросомального цитохрома Р-450 печени крыс а) в норме, б) при действии кампозана в дозе 680 мг/кг.

зывает увеличение интенсивности хемилюминесценции фосфолипдов в печени крыс, получивших кампозан в дозе 680 мг/кг, по сравнению с контрольной группой примерно в 2 раза. Кроме того, реакция с тиобарбитуровой кислотой выявляет увеличение перекисей в гомогенате печени опытной группы животных примерно на 50%.

Таким образом, под влиянием кампозана наблюдается увеличение содержания двухвалентного марганца, уменьшение содержания цитохрома Р-450 и флавинового свободного радикала, а также повышение липидной пероксидации.

До настоящего времени нам не встречалось сообщений о содержании и роли марганца в микросомах. Наблюдающийся факт увеличения концентрации двухвалентного марганца под влиянием кампозана может быть связан либо с восстановлением трехвалентного марганца, либо с изменением окружения входящего в состав микросомальных белков двухвалентного марганца, не обнаруживающего, однако, сигнала ЭПР в нативном состоянии.

Уменьшение содержания цитохрома Р-450 под влиянием кампозана свидетельствует о том, что токсическое действие этого препарата яв-

ляется необратимым, поскольку снижение его уровня приводит также к снижению детоксифицирующей способности печени [1]. Об этом, вероятно, свидетельствует также уменьшение флавинового сигнала ЭПР. Повышение липидной пероксидации под влиянием кампозана означает, что препарат также разрушающе влияет на мембранные структуры. Таким образом, кампозан в больших дозах оказывает весьма сложный токсический эффект. Дальнейшее изучение действия этого препарата, вероятно, позволит установить те концентрации его, которые не имеют столь сильного токсического эффекта.

Армянский филиал ВНИИГИНТОКСа Поступило 30.VIII 1980 г.

ԿԱՄՊՈԶԱՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻԿՐՈՍՈՄՆԵՐԻ ՑԻՏՈԽՐՈՄ P-450 ՈՒ ՄԱՆԳԱՆԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Հ. Խ. ԱՎԱԴՅԱՆ

Հայտնաբերել ենք, որ բույսերի աճի խթանիչ կամպոզանը 680 մգ/կգ դոզայով կենդանիների ստամոքս ներմուծելու հետևանքով տեղի է ունենում երկվալենտ մանգանի պարունակության ավելացում, P-450 ցիտոխրոմի ու ֆլավինային ռադիկալի նվազում և լիպիդների պերօքսիդացիայի ուժեղացում։ Ստացված տվյալները բացահայտում են պրեպարատի թունավոր ազդեցության մեխանիզմի որոշ կողմեր։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арчаков А. И.* Микросомальное окисление. М., 1975.
2. *Blight F. G., Dyer W. J.* Canad. J. Biochem. Physiol., *37*, 911—915, 1959.
3. *Tappel A. L., Zalkin H.* Arch. Biochem. and Biophys., *80*, 326—332, 1959.

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1237—1239, 1980

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 633.11:631.531.173.4:(664.38+547.963.3)

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ДЖ. О. ОГАНЕСЯН, А. П. АСМАЕВА, Г. А. АРУТЮНЯН, Л. С. МХИТАРЯН, ДЖ. В. ЕПРЕМЯН, Ю. П. МОЖАРОВ, С. П. СЕМЕРДЖЯН

Ключевые слова: ионизирующая радиация, радиостимуляционный эффект, ДНК, РНК, белок.

Под действием ионизирующей радиации в растительных клетках и тканях протекают сложные процессы, вследствие чего возникают не только разнообразные морфологические, но и биохимические изменения, приводящие к лучевому поражению организма. Эти изменения часто затрагивают также важные соединения, какими являются белки и нуклеиновые кислоты.

Установлено, что при действии стимулирующей дозы облучения увеличивается синтез белков и нуклеиновых кислот [4, 5]. Согласно структурно-метаболической гипотезе Кузина [4, 6], под влиянием облучения семян стимулирующими дозами деблокируются гены, усиливается синтез иРНК, несущей информацию для синтеза ферментов, необходимых на данной стадии развития. При облучении радиостимуляционной дозой ускоряется реализация потенциальной генетической информации, что ведет к тем или иным изменениям в содержании белков, нуклеиновых кислот и других биологически важных соединений.

С целью выяснения роли белков и нуклеиновых кислот в механизме радиостимуляционного эффекта нами проводились количественные цитохимические исследования для определения содержания этих соединений в клетках меристемы. Биохимическим методом исследовался также выход белков и нуклеиновых кислот из облученных семян при их намачивании.

Материал и методика. Семена озимой пшеницы сортов Кангун 20 и Безостая 1 облучались на рентгеновской установке РУМ-11 дозами 0,5; 1,5; 2,0; 5,0; 10,0 кр. Режим облучения: напряжение—185 кВ, сила тока—13мА, мощность дозы—600 р/мин, без фильтра. Контролем служили необлученные семена. Выбранные нами дозы обеспечивали широкий спектр воздействия: слабое (почти нерегистрирующее), стимулирующее и ингибирующее [7]. Анализировались семена, проращиваемые через месяц после облучения, так как максимальный радиостимуляционный эффект наблюдается при месячном сроке хранения облученных семян [2, 3, 7].

Для определения экстрагированных из семян белков и нуклеиновых кислот семена в течение 48 ч намачивались в дистиллированной воде. Общий азот определялся по Къелдалю, белковый—по Барнштейну, нуклеиновые кислоты—по Шнейдеру [1].

Содержание ДНК и РНК определялось в меристематических клетках корешков пшеницы цитохимическим методом. Корешки длиной 4—5 мм фиксировались в жидкости Карнуа, после чего приготовлялись постоянные препараты толщиной 7 мк. Для выявления ДНК часть препаратов окрашивалась по Фельгену, остальная, для выявления РНК,— метиловым зеленым и пиронином. Окрашенные препараты фотографировались на микроскопе МБИ—6, фотопленки фотометрировались на установке НРД в Институте физики АрмССР.

Результаты и обсуждение. Анализы показали, что при 48-часовом намачивании часть изучаемых соединений из семян экстрагировалась во внешнюю среду (табл. 1). Наиболее подвижным соединением ока-

Таблица 1

Выход веществ из семян при их 48-часовом намачивании

Дозы облучения, кр	Процент выходящих веществ			
	сырой протеин	белок	РНК	ДНК
	Кангун 20			
0	3,59	2,81	48,6	следы
0,5	3,80	2,74	57,2	следы
2,0	3,25	2,31	44,0	следы
10,0	3,46	2,50	48,5	следы
	Безостая 1			
0	2,38	1,76	60,7	3,52
0,5	2,29	1,76	55,7	3,0
21,0	1,95	1,87	46,2	4,88
10,0	2,07	1,75	59,9	4,95

залась РНК, выход которой из необлученных семян сорта Безостая 1 составил более 60% от общего количества. Выход сырого протеина, белков и ДНК не превышал 5%. Необходимо отметить, что у сорта Кангун 20 в водной среде были обнаружены только следы ДНК. Обращает на себя внимание тот факт, что выход сырого протеина и ДНК находятся в обратной корреляционной связи. Облучение способствует снижению количества экстрагированной во внешнюю среду РНК. Это особенно заметно при радиостимуляционной дозе (2 кр) у сорта Безостая 1. По-видимому, при намачивании семян уменьшение выхода РНК является одной из возможных причин проявления радиостимуляционного эффекта.

Это предположение подтверждается результатами цитохимического анализа. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что под действием облучения в диапазоне доз 1,5—2,0 кр содержание РНК в клетках меристемы увеличивается. По-видимому, под влиянием стимулирующих доз облучения на ранних этапах роста растений усиливается синтез РНК, что способствует более интенсивному синтезу белков.

Таблица 2

Влияние облучения на содержание ДНК и РНК в меристематических клетках пшеницы

Дозы облучения, кр	Оптическая плотность		Дозы облучения, кр	Оптическая плотность	
	ДНК	РНК		ДНК	РНК
	Кангун 20			Безостая 1	
0	0,319±0,004	0,313±0,008	0	0,300±0,009	0,340±0,00
1,5	0,336±0,005	0,330±0,010	1,5	0,410±0.018	0,380±0,00
2,0	0,227±0,030	0,363±0,007	2,0	0,302±0,045	0,350±0,004
5,0	0,217±0,008	0,275±0,010	5,0	0,226±0,012	0,258±0,003

Облучение влияет также на содержание ДНК. При оптимальной радиостимуляционной дозе (2 кр) оно достоверно снижено.

Таким образом, одним из возможных механизмов проявления радиостимуляционного эффекта при предпосевном облучении является уменьшение выхода РНК во внешнюю среду при намачивании семян, а также усиление ее синтеза в меристематических клетках.

Институт земледелия
МСХ Арм ССР

Поступило 28.VIII 1980 г

ՅՈՐՆՆԻ ՍԵՐՄԵՐԻ ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԵՎ ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ջ. Հ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Պ. ՂԱՄԱՕՎԱ, Հ. Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ,
Լ. Ս. ՄԱՒԹՈՍՅԱՆ, Ջ. Վ. ՍՓՐՅՄՅԱՆ, Յու. Պ. ՄՈՒԱՐՈՎ, Ս. Պ. ՍԱՄԲՈՐՋՅԱՆ

Ներկայացվում է, որ սերմերի նախացանքային ճառագայթման դեպքում երևան եկող ռադիոխթանիչ էֆեկտի հնարավոր մեխանիզմներից մեկը կարող է հանդիսանալ սերմերի թրջման ժամանակ սերմերից ՌՆԹ-ի ելքի նվազումը, ինչպես նաև՝ մերիստեմատիկ բջիջներում վերջինիս սինթեզի ուժգնացումը։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Асатиани В. С.* Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965.
2. *Березина И. М.* Предпосевное облучение семян с.-х. растений. М., 1964.
3. *Дедуль Ф. А., Березина И. М.* Труды НИИ земледелия МСХ ГрузССР, 15, 1968.
4. *Кузин А. М.* и др. Предпосевное гамма-облучение семян с.-х. культур. М., 1976.
5. *Кузин А. М.* и др. Радиобиология, 15, *5*, 747, 1975.
6. *Кузин А. М.* Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. М., 1970.
7. *Оганесян Дж. О., Епремян Дж. В.* и др. Труды серии «Пшеница», *2*, 1978.

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1240, 1980

РЕФЕРАТ

УДК 582.992./479.242+479.23/

CAMPANULA RAPUNCULOIDES И CAMPANULA GLOMERATA L. В ЮЖНОМ ЗАКАВКАЗЬЕ

М. Э. ОГАНЕСЯН

На территории Южного Закавказья из видов Campanula rapunculoides L. и C. glomerata L. различными авторами выделено множество разновидностей и видов. По последним сводкам, в этом регионе произрастают три вида ряда Rapunculoideae Charadze: C. rapunculoides L., C. cordifolia C. Koch и C. grossheimii Charadze, и два вида ряда Glomeratae Charadze: C. oblongifolia (C. Koch) Charadze и C. trautvetteri Grossh. ex Fedor. Эти виды изучены нами в природе и на материале гербариев БИН АН СССР (LE), Институтов ботаники АН Арм. ССР (ERE), АН ГрузССР (TBI), АН АзербССР (BAK) и Государственного музея Грузии (TGM). Исследования показали, что все диагностические признаки указанных видов варьируют в широких пределах и без корреляции с географическим распространением. C. cordifolia и C. grossheimii являются безареальными экологическими формами широко распространенного полиморфного вида C. rapunculoides, C. oblongifolia и C. trautvetteri — безареальными экологическими формами широко распространенного полиморфного вида C. glomerata. Между формами наблюдаются все переходы. C. cordifolia C. Koch и C. grossheimii Charadze отнесены в синонимы вида C. rapunculoides L. а C. oblongifolia (C. Koch) Charadze и C. trautvetteri Grossh. ex Fedor. — в синонимы вида C. glomerata L.

13 с., библиогр. 18 назв.

Институт ботаники АН АрмССР

Поступило 14.V 1980 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1241—1242, 1980

РЕФЕРАТ

УДК 581.1:634.21(479.25)

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЗИРОВАННОЙ ОБРЕЗКИ НА ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АБРИКОСА

Т. С. НЕРСЕСЯН

Нами изучалось влияние механизированной обрезки на изменение содержания воды, интенсивность зимней транспирации и зимостойкость почек однолетних побегов на сортах Ереванн, Сатени. Контролем служили деревья, подвергшиеся ручной обрезке с укорачиванием длины побегов на 15—20%.

Механизированная обрезка заключается в массовом укорачивании длины побегов на 35—40% с помощью обрезочной машины типа ОКМ-4,5. При машинной обрезке деревьев, по сравнению с контролем, ростовые процессы продолжаются дольше, способствуя удержанию большего количества воды и накоплению пластических веществ.

Результаты первого года исследований показали, что при температуре воздуха в январе 9 —10° и относительной влажности 72—74% в однолетних побегах обоих сортов абрикоса при механизированной обрезке зимняя транспирация протекает менее интенсивно по сравнению с контролем. В сортовом разрезе зимняя транспирация более интенсивно выражена в однолетних побегах сорта Ереванн.

Интенсивность зимней транспирации зависит и от климатических условий. При более низком значении максимальной температуры в январе (+3°С) и высокой относительной влажности воздуха 78% у обоих сортов во всех вариантах опыта она проявилась слабее.

Потеря воды тканями однолетних побегов в зимний период происходит в меньшей степени в деревьях, подвергшихся механизированной обрезке, по сравнению с контролем. Слабее происходит это у сорта Сатени.

В наших исследованиях отмечен высокий индекс относительного содержания связанной воды с большей водоудерживающей способностью в тканях однолетних побегов деревьев абрикоса при механизированной обрезке. Причем этот показатель выше у сорта Сатени, чем у Ереванн. Низкая интенсивность зимней транспирации однолетних побегов и высокий индекс относительного содержания связанной воды в тканях однолетних побегов деревьев с механизированной обрезкой согласовывается с данными по зимостойкости почек деревьев как контрольных, так и опытных вариантов.

Изучение зимостойкости абрикоса при применении машинной обрезки показывает, что машинная обрезка, помимо повышения производительности труда, положительно влияет и на зимостойкость деревьев, что, видимо, объясняется более продолжительным периодом роста до августа и усиленным накоплением и оттоком из листьев в побеги питательных веществ.

11 с., табл. 2, пл. 2, библиогр. 14 назв.

Армянский ордена «Знак Почета» научно-исследовательский институт виноградарства, виноделия и плодоводства МСХ Арм. ССР

Поступило 18.XI 1979 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1243, 1980

РЕФЕРАТ

УДК 612.466.1

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О СПЕКТРОГРАФИИ ПЛОТНОГО ОСАДКА МОЧИ, СЫВОРОТКИ, ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ И КАМНЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

В. О. БАРСЕГЯН

Проведено сравнительное изучение элементного состава камней из мочевыводящих путей у жителей Армянской ССР, Алжирской народно-демократической республики с целью установления разницы в микроэлементном составе камней у больных мочекаменной болезнью в двух континентах, а также установления роли микроэлементов в сложном камнеобразовательном процессе.

Исследовано 150 камней, удаленных операционным путем из верхних мочевых путей, 10—из мочевой системы у оперированных в Алжире и, для сравнения подобной локализации,—10 камней у жителей Армянской ССР. Параллельно у 20 больных, кроме спектрального анализа камней исследовались также моча, сыворотка и форменные элементы крови.

Материал обработан на спектрографе СП-30 в центральной лаборатории Управления геологии Совета Министров АрмССР.

В результате исследования плотного осадка мочи обнаружено 24 элемента менделеевской таблицы в различных химических соотношениях. При анализе форменных элементов крови и сывороток по сравнению с мочой дополнительно найдены Ag, Sr, Zr.

Микроэлементный состав камней разных локализаций и местностей в основном оказался одинаковым.

В камнях обнаружено в 3—5 раз больше элементов, чем в моче, сыворотке или форменных элементах крови.

Меди в моче в 5—10 раз меньше, чем в форменных элементах крови, а кальция и магнезия больше в 3—5 раз.

В изученных камнях элементный состав почти во всех случаях повторяется, как правило в них содержатся: Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na, T, Mn, Cu или Cr, V, St, P, Li.

Калий не определялся, так как спектрограмма калия сливалась со спектрограммой натрия.

8 с., табл. 1, библиогр. 6 назв.

Ер ГИДУВ

Поступило 15.VII 1980 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXIII, 11, 1244—1246, 1980

ХРОНИКА

К 70-ЛЕТИЮ МАРГАРИТЫ ЕРВАНДОВНЫ ТЕР-МИНАСЯН

Исполнилось 70 лет со дня рождения одного из ведущих советских энтомологов, доктора биологических наук, профессора Маргариты Ервандовны Тер-Минасян.

В 1930 году М. Е. Тер-Минасян окончила биологическое отделение педагогического факультета Ереванского государственного университета. Еще в студенческие годы она начала работать на кафедре зоологии, которую организовал и долгие годы возглавлял профессор А. Г. Тер-Погосян, широко образованный зоолог и прекрасный педагог.

Маргарита Ервандовна избрала специальностью систематику жесткокрылых и была командирована в Зоологический институт АН СССР в Ленинград. В 1932 году она поступила в аспирантуру Зоологического института АН СССР и стала выполнять тему по жукам-долгоносикам Армении под руководством А. Н. Рейхардта. Большое влияние на научное развитие начинающего энтомолога оказали выдающиеся ученые А. П. Семенов-Тян-Шанский, Н. Я. Кузнецов, А. В. Мартынов, Д. А. Оглоблин, Ф. К. Лукьянович, С. И. Медведев.

В 1935 году, окончив аспирантуру, Маргарита Ервандовна защитила кандидатскую диссертацию на тему: «Опыт зоогеографической характеристики степей и полупустынь Армянской ССР и Нахичеванской АССР на основании распространения жуков-долгоносиков». После окончания аспирантуры она была зачислена в штат Зоологического института АН СССР, где работала в должности научного сотрудника у А. П. Семенова-Тян-Шанского в течение 3-х лет. В конце 1938 года Маргарита Ервандовна переехала в Ереван и была принята на работу в сектор зоологии Биологического института Армянского филиала АН СССР, куда позднее перешел на работу и ее муж А. А. Рихтер—крупный колеоптеролог.

Переход на работу в Ереван дал возможность приложить все силы, знания и организационные способности к развитию своей специальности—зоологии в Армянском филиале АН СССР, в котором в эти годы уже имелись для этого возможности и авторитетный коллектив.

М. Е. Тер-Минасян, безусловно, обладала большими организационными способностями, поэтому не случайно, что в Армении она работала сначала ученым секретарем, затем зав. сектором зоологии Биологического института, а в 1943 году была назначена первым директором—организатором Зоологического института. В этой должности она прора-

ботала до объединения Зоологического института с Институтом защиты растений (до 1949 года). Одновременно Маргарита Ервандовна читала курсы зоологии беспозвоночных и зоогеографии в Ереванском университете.

За эти годы, кроме ряда научных статей, Маргарита Ервандовна Тер-Минасян составила определитель жуков-долгоносиков Армении и закончила монографию по жукам-трубковертам, которая была защищена ею в 1944 году в Ереване в качестве докторской диссертации. Позднее эта работа была опубликована в серии «Фауна СССР», издаваемой Зоологическим институтом АН СССР. В 1949 году Маргарита Ервандовна была утверждена в ученом звании профессора. За время работы в Армении Маргарите Ервандовне удалось привлечь способную молодежь к работе в Зоологическом институте и многие сейчас уже старшие научные работники—сотрудники Института зоологии—начинали работу при ней.

С 1950 года М. Е. Тер-Минасян работает в Зоологическом институте АН СССР в Ленинграде, вначале в должности ученого секретаря, затем старшего научного сотрудника отделения систематики жесткокрылых. В этой должности она работает и в настоящее время.

Область научных интересов Маргариты Ервандовны, как уже отмечалось, систематика жесткокрылых. В этом обширном отряде насекомых она избрала узкой специальностью группы жуков фитофагов—долгоносиков, трубковертов и зерновок, среди которых имеется целый ряд вредителей сельскохозяйственных и лесных культур. Маргаритой Ервандовной написано свыше 120 работ, посвященных систематике, биологии, географическому распространению и хозяйственному значению этих насекомых. Наиболее крупные ее монографии переведены на английский язык и изданы в Англии (1971) и США (1978). Маргарита Ервандовна принадлежит к числу тех людей, продуктивность работы которых с годами не снижается, а возрастает.

Маргарита Ервандовна уделяет большое внимание подготовке кадров энтомологов как для ЗИН АН СССР, так и для других научных учреждений областей и республик (Сев. Кавказ, Грузия, Таджикистан, Сибирь, Дальний Восток) страны. По вопросам определения материала к ней обращаются также из научных учреждений ряда зарубежных стран.

Неистощимая энергия и большие организационные способности сделали М. Е. Тер-Минасян одним из ведущих советских энтомологов. Много лет Маргарита Ервандовна состоит членом Совета и Президиума Всесоюзного энтомологического общества при АН СССР, членом редколлегии «Энтомологического обозрения», редакционного совета «Биологического журнала Армении». Она является членом Ученого совета и РИСО института, долгие годы руководит научным семинаром лаборатории систематики насекомых.

М. Е. Тер-Минасян не порывает связи с Арменией. Она ежегодно приезжает в Ереван и, если представляется возможность, выезжает в районы для сбора и изучения насекомых в наиболее интересных пунк-

тах Араратской равнины. У Маргариты Ервандовны особая любовь к этому региону. Она интересуется работами армянских энтомологов, тематикой лаборатории энтомологии Института зоологии АН АрмССР, всегда старается помочь своим опытом и советами.

За заслуги в развитии советской науки и в связи с 250-летием Академии наук СССР Маргарита Ервандовна Тер-Минасян Указом Президиума Верховного Совета СССР была награждена орденом «Знак Почета».

Поздравляем дорогую Маргариту Ервандовну с юбилеем, желаем ей крепкого здоровья и долгих лет плодотворной научной работы.

А. Е. ТЕРТЕРЯН
Председатель Армянского отделения ВЭО