

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года

Այստանի քենսբանական անդես,

выходит 12 раз в год

на армянском и русском языках

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

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Դ. Ն. Բաբայան, Ս. Ա. Բակունց, Ա. Լ. Բախտաշյան, Պ. Ա. Խուրշուդյան, Ս. Կ. Կարապետյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղազարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չալախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Ե. 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, С. О. Монсесян

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. Н. Акрамовский, Э. К. Африкян (пред. совета), Д. Н. Бабаян, С. А. Бакуни, 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.

**ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԱՊԵՏ**

Հիմնադրվել է 1946 թ. Հաստատվում է տարեկան 12 անգամ

Հատոր XXXVI, № 7 Երևան Հունիս, 1983 թ.

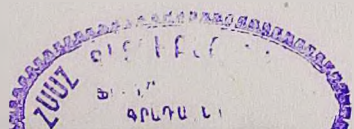
Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

Փորձառական

Հովհաննեսյան Ա. Ս., Ավագյան Մ. Մ., Շանինյան Ա. Ա., Միխայլյան Լ. Գ., Մինասյան Կ. Խ. Միտկարդի ինֆարկտի դեպքում բնտա-բլոկատորների պաշտպանիչ ազդեցության ֆիզիկա-քիմիական ասպեկտները	545
Առաքելյան Վ. Բ., Առաքելյան Ս. Բ. Դիպոլային մոլեկուլների էներգետիկ պրոֆիլը երկու ֆազերի բաժանման սահմանի վրա	553
Տիկունով Բ. Ա. Ակտին-միոզինային փոխհարաբերության կալցիումական կարգավորման առանձնահատկությունները արագ և դանդաղ կմախքային մկաններում	559
Միխայլյան Լ. Գ., Կարապետյան Հ. Կ., Կուրգին Ե. Ի. Տեղային անզգայացուցիչների ազդեցությունը հարթ ֆոսֆորիլիդային մեմբրանների վրա	566
Ասատուրյան Ռ. Ա. Մովսիսյան Էֆեկտը C ₁₂ (II)-ՑՇԱ կոմպլեքսներում	570
Սիմոնյան Ա. Լ., Թաթևյան Ս. Շ., Խաչատրյան Գ. Է., Ավագյան Մ. Մ. Անալիտիկ սիստեմ լուծույթներում գլյուկոզայի կոնցենտրացիայի որոշման համար	575
Սիմոնյան Ա. Լ., Թաթևյան Ս. Շ., Խաչատրյան Գ. Է., Գասպարյան Տ. Ա., Այվազյան Գ. Ի. Գլյուկոզաօքսիդազայի իմմոբիլիզացիան սիլիկատների վրա	579
Մելիքյան Մ. Մ., Մխիթարյան Վ. Գ., Մելիք-Աղաև Ե. Ա., Ռուֆյան Ա. Ա. Լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսը և ռ-տոկոֆերոլի մակարդակը սպիտակ առնետների հյուսվածքներում ակուստիկ ստրեսի պայմաններում	582
Տիրացույան Ս. Գ., Փանոսյան Գ. Հ. Ֆերմենտների փոփոխությունները ցորենի մեկուսացված սաղմերի ծլման և տարբեր մշակումների ընթացքում	588
Օդոլյանյան Ա. Ա., Մանվելյան Ե. Վ. Դիֆթերիայի և պրկախտի դեմ կրկնապատվաստումից հետո իմուն պատասխանի մոդելի կառուցումը	592
Մեծովյան Ա. Ա., Գաստվա Բ. Գ. Ազնոուհիպոֆիզի կառուցվածքի և ցիտոքրամի փոփոխությունները պրոպերինի և էֆեդրինի ներմուծման դեպքում	596
Պետրոսյան Հ. Պ., Սանակյան Ռ. Գ. Ածխաջրերի պարունակությունը խաղողի վազի օրգաններում՝ կախված մեխորացված աղուտ-ալկալի հոդի կլանված նատրիումի քանակից	601

Համառոտ հաղորդումներ

Ղառնյան Ա. Ա. Կալիումի իոնների ելքը բակտերիաներից և այդ պրոցեսը բնորոշող գործոնները	605
Մաչատրյան Գ. Ռ. Երկշերտ լիպիդային մեմբրանի հաղորդականության կախումը նրա մակերևույթից	609
Լսազարյան Պ. Ա., Սիմալուրյան Պ. Ս., Գեորգյան Գ. Ա. Ֆոսֆորիլիդների բիոսինթեզը լյարդում բրոնխի բորբոքային բրոնխաթոքային պրոցեսի ժամանակ	612
Բացալկանով Ս. Տ., Կառնյան Մ. Ե., Հակոբյան Ռ. Հ. Էներգետիկա-քիմիական փոփոխությունը խոզաբուծական համալիրներում	614
Խալաբյան Ա. Մ., Օհանջանյան Ա. Ա. Հեռատարաբերական մեթոդի կիրառումը ճառագայթված առնետների պերիֆերիկ արյան լիմֆոցիտների կարիոմետրիկ անալիզի ժամանակ	616
Պոստյան Ա. Վ., Մեսրոպյան Ն. Պ., Գասպարյան Է. Տ., Պապոսյան Ռ. Գ., Ալեքսանյան Յու. Թ. Իմուն լիմֆոցիտների ցիտոտոքսիկ ազդեցության պարզեցված մեթոդիկան	619



Ղազարյան Կ. Ա., Թաթյան Մ. Վ., Հակոբյան Ն. Գ., Սիմոնյան Ս. Ա., Ալեքսանյան Յու. Թ.,
 Գասպարյան Է. Տ. Իմունոլոգիական ռեակտիվականության դինամիկայի ուսումնա-
 սիրությունը ուռուցքակիր մկենների մոտ 61

Ջաֆարյան Հ. Գ. Բջջային պրոլիֆերացիայի կինետիկական բաղաժայռի խթանված յինական
 համաստեղի անընդհատ պատվաստելի բջիջների ստացիոնար կուլտուրայում . . . 62

Սիմոնյան Ա. Ա., Բաղալյան Ռ. Բ., Բուտնազյան Լ. Բ. Հավերի լյարդի միսոքոնդրիանների
 ներքին մեմբրանների Mg^{2+} — ATP-ազայի և մալատդեհիդրոգենազայի ակտի-
 վության փոփոխությունը օնտոգենեզում 63

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

Основан в 1946 году

Выходит 12 раз в год

Том XXXVI, № 7

ЕРЕВАН

Июль, 1983 г.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Экспериментальные

<i>Оганесян С. С., Авакян Ц. М., Шагинян А. А., Микаелян Л. Г., Минасянц М. Х.</i>	
Физико-химические аспекты защитного действия бета-блокаторов при инфаркте миокарда	545
<i>Аракелян В. Б., Аракелян С. Б.</i>	
Энергетический профиль дипольных молекул на границе раздела двух фаз	553
<i>Тикунов Б. А.</i>	
Особенности кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия в быстрых и медленных скелетных мышцах	559
<i>Микаелян Л. Г., Карапетян А. К., Кургин Е. И.</i>	
Действие местных анестетиков на плоские фосфолипидные мембраны	566
<i>Асатурян Р. А.</i>	
Объемный эффект в комплексах $Cu(II)$ -БСА	570
<i>Симонян А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э., Авакян Ц. М.</i>	
Аналитическая система для определения концентрации глюкозы в растворах	575
<i>Симонян А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э., Гаспарян Т. А., Айвазян Г. И.</i>	
Иммобилизация глюкозооксидазы на силикагелях	579
<i>Мелконян М. М., Мхитарян В. Г., Мелик-Агаева Е. А., Рухкян А. А.</i>	
Процесс липидной пероксидации и уровень α -токоферола в тканях белых крыс в условиях акустического стресса	582
<i>Тиращуян С. Г., Паносян Г. А.</i>	
Изменения в ферментах при прорастании и различных обработках изолированных зародышей пшеницы	588
<i>Срдуханян А. А., Манаселян Е. В.</i>	
Построение модели иммунного ответа после ревакцинации к дифтерии и столбняку	592
<i>Межлумян А. А., Гусова Б. Д.</i>	
Изменения структуры и цитогаммы аденогипофиза при введении прозерина и эфедрина	596
<i>Петросян Г. П., Саакян Р. Г.</i>	
Содержание углеводов в органах виноградной лозы в зависимости от количества поглощенного натрия в мелиорированном солонце-солончаке	601

Краткие сообщения

<i>Трчунян А. А.</i>	
Выход ионов калия из бактерий и факторы, определяющие этот процесс	605
<i>Хачатрян Г. Р.</i>	
Зависимость проводимости бислойной липидной мембраны от ее площади	609
<i>Казарян П. А., Симаворян П. С., Геворкян Г. А.</i>	
Биосинтез фосфолипидов в печени при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе	612
<i>Мнацаканов С. Т., Коцинян М. Е., Акопян Р. Г.</i>	
Циркуляция энтеробактерий в свиноводческих комплексах	614
<i>Даллакян А. М., Оганджян А. А.</i>	
Применение телевизионного метода при карнометрическом анализе лимфоцитов периферической крови облученных крыс	616
<i>Мовсисян А. В., Месропян Н. П., Гаспарян Э. Т., Погосян Р. Г., Алексанян Ю. Т.</i>	
Упрощенная методика цитотоксического действия иммунных лимфоцитов	618

- Казарян К. А., Татьян М. В., Акопян Н. Г., Симонян С. А., Алексанян Ю. Т.,
Гаспарян Э. Т. Динамика иммунологической реактивности у мышей-опу-
холеносителей
- Закарян Г. Г. Кинетика клеточной пролиферации в стационарной культуре пере-
живаемых клеток китайского хомячка, стимулированной к размножению
- Симонян А. А., Бадалян Р. Б., Бурназян Л. Б. Изменение активности Mg^{+2}
—АТФазы и малатдегидрогеназы внутренних мембран митохондрий печени
у кур в онтогенезе

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR

BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Volume XXXVI, № 7

YEREVAN

July, 1983

CONTENTS

Experimental

<i>Oganessyan S. S., Avakyan Ts. M., Schahinyan A. A., Mykaelyan L. G., Mynasyantz M. Ch.</i> Physico-Chemical Aspects of the Beta-Blockers Protective Action During the Myocardial Infarkts	545
<i>Arakelian V. B., Arakelian S. B.</i> Energetic Profile of Dipole Molecules on the Border of Separation of Two Phases	553
<i>Tikunov B. A.</i> Peculiarities of Calcium Regulation of Actin-Myosin Interaction in Fast and Slow Skeletal Muscles	559
<i>Mikaelian L. G., Carapetian H. C., Kurgin E. I.</i> The Action of Local Anaesthetics on the Plane Phospholipid Membranes	566
<i>Asaturian R. A.</i> Volume Effect in Cu (II)—BSA Complexes	570
<i>Simonian A. L., Tatikian S. Sh., Khachatryan G. E., Avakian Ts. M.</i> Analytical System for Determination of Glucose Concentration in Solutions	575
<i>Simonian A. L., Tatikian S. Sh., Khachatryan G. E., Gasparian T. A., Alva-zian G. I.</i> Immobilization of Glucose Oxidase on Silicagels	579
<i>Melkonian M. M., Mkhitarian V. G., Melik-Agaeva E. A., Rukhkian A. A.</i> The Process of Lipid Peroxidation and α -Tocopherol Level in the White Rats Tissues Under Conditions of the Acoustic Stress	582
<i>Tiratsuyan S. G., Panosyan G. H.</i> Changes of Enzymes During Germination and Different Treatments of Isolated Wheat Embryos	588
<i>Ordukhanian A. A., Manvelian E. V.</i> Construction of the Immune Response Mathematical Model after Revaccination to Diphtheria and Tetanus	592
<i>Mejlumian A. A., Gusova B. D.</i> The Changes of the Structure and Cytogram of Adenohypophysis after Proserine and Ephedrine Introduction	596
<i>Petrosian G. P., Saakian R. G.</i> The Content of Carbo-Hydrate in the Organs of Grape-Vine Depending on the Amount of Absorbed Natrium in Mello-rated Salted-Alkaline Soils	601

Short Communications

<i>Trchunian A. A.</i> Production of Potassium Ions from Bacteria and Factors, Determinating that Process	605
<i>Khachatryan G. R.</i> Dependence of Conduction of Bilayer Lipid Membrane on Its Area	609
<i>Kazarian P. A., Simavorian P. S., Gevorkian G. A.</i> Biosynthesis of Phospholipids in Liver During Chronic Inflammatory Bronchopulmonary Process	612
<i>Mnatzakanov S. T., Kotzinian M. E., Akobian R. H.</i> Circulation of Enterobacteria in Pig-Breeding Complexes	614
<i>Dallakian A. M., Ohanjanian A. A.</i> Use of Televistion Method During Karyometric Analysis of Peripheric Blood Lymphocytes of Irradiated Rats	616
<i>Mousesian A. V., Mesropian N. P., Gasparian E. T., Pogosian R. G., Alexanian J. T.</i> Simplified Methodics of the Cytotoxic Action of Immune Lymphocytes	618

<i>Kazarian K. A., Tatlian M. V., Akopian N. G., Simonian A. A., Alexaulian Ju, T., Gasparian E. T.</i> Analysis of Immunological Reactivity Dynamics in Tumour-Bearing Mice	620
<i>Zakaryan H. G.</i> Kinetics of Cell Proliferation in the Stationary Culture of the Chinese Hamster Continuously Injected Cells, Stimulated to Reproduction	623
<i>Simonian A. A., Badalian R. B., Burnazian L. B.</i> The Change of the Activity of Hens Liver Inner Membranes Mitochondrias Mg^{2+} —ATPase and Malatdehydrogenase in Ontogenesis	625

УДК 577.352

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕТА-БЛОКАТОРОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

С. С. ОГАНЕСЯН, Ц. М. АВАКЯН, А. А. ШАГИНЯН,
Л. Г. МИКАЕЛЯН, М. Х. МИНАСЯНЦ

В статье обсуждаются полученные в последние годы экспериментальные данные (при совместных исследованиях Ин-та кардиологии Мин. здрав. АрмССР, ЕрФИ, ЕрГУ и СКВ НКГСПС АН АрмССР) о взаимодействии катехоламинов, Са-антагонистов и тропонин-тропомозинового комплекса с модельными липидными мембранами и кардиомиоцитами. На основании этих данных делается вывод, что бета-блокаторы, антиритмики и Са-антагонисты при сочетанном применении в целях профилактики и ограничения размеров инфаркта миокарда оказывают значительное влияние на упорядоченность структуры липидов в биомембранах.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, бета-блокаторы, фосфолипидные мембраны.

Рост сердечно-сосудистых заболеваний обусловил большой интерес к кардиоактивным бета-блокаторам и антагонистам Са-потока кардиомиоцитов, которые оказались способными предупреждать инфарктное поражение при ишемической болезни сердца [16, 17, 24, 25]. С тех пор как в 1964 г. Причард [23] предложил применять указанные средства для лечения гипертонии, накопилось много сведений об их влиянии на функцию Са-каналов и стабильность мембран, чем и объясняется их защитное действие при инфаркте миокарда [8, 21, 29]. Подобная точка зрения основана на представлении, что катехоламины, в больших концентрациях вызывающие повреждение миокарда, могут индуцировать нарушения в липидных структурах мембран кардиомиоцитов [1, 26], тогда как бета-блокаторы повышают стабильность клеточных мембран [11, 13]. Однако механизм защитного действия бета-блокаторов остается недостаточно ясным. Не решен ряд вопросов о локализации их эффекта на миокардиальной клетке.

Разработка указанных вопросов требует также уточнения внутриклеточных первичных нарушений, ведущих к повреждению миокарда. Наиболее распространенным в настоящее время является представление, согласно которому первичными могут быть изменения проницаемости цитоплазматических мембран. Естественно, что изменениям могут подвергаться как интегративные мембранные белки, так и липидные структуры. Во всяком случае, эти сдвиги могут привести не только к нарушениям энергообразовательных реакций, но и к так называемой Са-перегрузке миокардиальной клетки, вследствие проникновения катиона через мембраны с нарушенной проницаемостью. Са²⁺ ведет уже к активированию фосфолипаз и нейтральных протеаз, которые «завершают» разрушение ультраструктур. В этой связи привлекают внимание полученные недавно данные о стабилизирующем действии бета-блокаторов на белковые компоненты клеточных мембран и об отсутствии подобного влияния (пропраналол) на липосомы [28].

Перед нами стояла задача выяснения возможности бета-блокаторов реагировать с белками, которые в мембранах могут участвовать в переносе ионов Са. Такими белками служат мышечные, так называемые регуляторные, белки, в частности тропонин-тропомиозиновый комплекс (ТН—ТМ), принадлежащий к семейству Са-связывающих белков, широко представленных в различных клеточных структурах [9, 10, 22] в виде регуляторных компонентов ряда мембранных и цитоплазматических ферментов, осуществляющих действие ионов Са на их каталитическую активность [5, 27, 30].

В последние годы сотрудниками лаборатории кардиологии НИИ кардиологии МЗ АрмССР удалось показать, что тропонин реагирует с катехоламинами по типу рецептор—активатор и претерпевает при этом конформационные изменения. Наблюдается повышение интенсивности УФ-флуоресценции, «голубое смещение» максимума квантовой эмиссии, изменение величины УФ-светопоглощения. Характерно, что такое взаимодействие имеет место в препаратах только Са-связывающих белков миофибрилл миокарда, а именно тропонина и легких полипептидных цепей сократительного белка миозина. Что касается очищенных препаратов миозина и тропомиозина, а также бычьего альбумина, то у них такие свойства не были обнаружены [4, 18, 19].

Было также показано [20], что бета-блокаторы и катехоламины вызывают изменения в физико-химических свойствах Са-связывающих белков, сходные с теми, которые индуцируются Ca^{2+} . По-видимому, они взаимодействуют с низкочувствительными Са-связывающими участками на тропонине и на легких цепях миозина с $K_d \sim 10^{-5}$ М. На основании полученных данных было сделано заключение [18, 19], что Са-связывающие белки одновременно являются адренорецепторами, способными также связывать альфа- и бета-блокаторы. Это заключение недавно было подтверждено другими авторами в опытах с применением радиолиганд на Са-переносящих каналах клеточных мембран [12]. С другой стороны, было установлено, что Са-антагонист C^{14} -фелодипин связывается с тропонином, а также с другим Са-регуляторным белком—кальмодулином именно на низкочувствительном участке связывания Ca^{2+} [25]. С помощью ЯМР-спектроскопии авторам удалось выявить изменение конформации кальмодулина в результате этого взаимодействия. Таким образом, по-видимому, белки мембран, ответственные за медленный компонент Са-потока, являются чувствительными к адренергическим агонистам и антагонистам и могут играть определенную роль в механизме защитного действия бета-блокаторов при инфарктном повреждении миокарда. В связи с этим представляло большой интерес создание белково-липидных моделей мембран с использованием этих белков при анализе механизма действия бета-блокаторов.

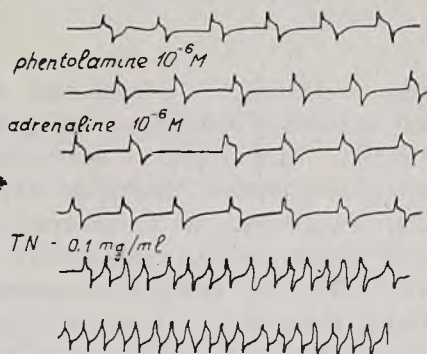
Отметим, что в специальных сериях экспериментов [20] удалось показать возможность включения тропонина, а также тропонин-тропомиозинового комплекса в мембраны кардиомиоцитов. На рис. 1 [20] видно, что после замедления частоты сокращения клеток в культуре миокардиальной ткани, вызванного внесением в среду блокато-

ров адренорецепторов и Са-антагонистов, последнюю можно восстановить внесением в среду тропонина. При этом восстанавливаются хромотропные эффекты катехоламинов и ионов Са. Недавно Бариян и Оганесян показали сходное действие тропонина на сокращения изолированного волокна полоски миокарда, используя метод микромеханографии.

Каким же образом Са-связывающие белки восстанавливают эффект катехоламинов? Могут ли они быстро встраиваться в мембрану и служить там дополнительными адренорецепторами или одновременно создавать новые адреночувствительные Са-каналы? Все эти вопросы весьма важны для дальнейшего исследования действия бета-блокаторов.

В лаборатории радиационной биофизики Ереванского физического института было изучено взаимодействие тропонин-тропомиозинового комплекса с искусственными бислойными мембранами (БЛМ). Мембранообразующий раствор состоял из 2%-ного общего липида мозга быка в смеси гептана с деканом. Конечная концентрация белка составляла $1,8 \times 10^{-7}$ М, рН 7,25. Методом фиксации потенциала было показано, что внесение в среду белка приводит к образованию

Рис. 1. Фотоэлектрическая регистрация автоматических сокращений клеток в культуре эмбрионального миокарда. Снятие эффекта альфа-блокатора фентоламина и восстановление положительного хронотропного действия адреналина при внесении в среду Са-связывающего белка мышц — тропонина [20].



ионнеспецифических каналов, осуществляющих перенос ионов Са. Наблюдаемые скачки тока в этих условиях составляют от 1 до 3×10^{-12} а, а длительность их существования достигала минуты и больше.

Из полученных результатов нетрудно заключить, что ТН-ТМ взаимодействует с бислойной мембраной, способствуя трансмембранному переносу ионов Са и других ионов, способных замещать его на Са-связывающих центрах. Характерно, что тропомиозин, который не может связывать Ca^{2+} , как и в модельных опытах на культуре клеток миокарда, не влияет на ионную проницаемость БЛМ.

В свете современных представлений о каналоформерах и роли ионифоров в функционировании клеточных мембран весьма важно было получить информацию о молекулярно-структурных аспектах взаимодействия Са-связывающих белков с липидными компонентами.

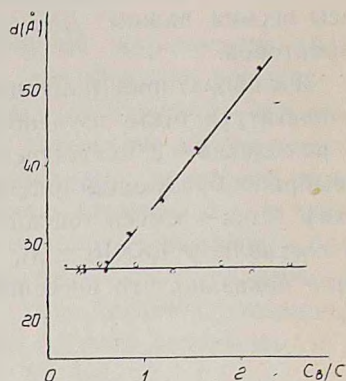
Шагиняном с сотр. [6] было исследовано влияние ТН-ТМ, полученного в НИИ кардиологии МЗ АрмССР, на структуру бимолекулярных слоев модельного липидоподобного вещества — пентадецилсульфоната натрия, а также лецитина в жидкокристаллической фазе. С этой

целью был использован метод дифракции рентгеновских лучей под малыми углами.

Известно, что в высококонцентрированных водных растворах амфифильных веществ, в том числе и полярных липидов, из-за гидрофобно-гидрофильных взаимодействий реализуются различные жидкокристаллические фазы: ламеллярная и гексагональная [31].

На рис. 2 представлены кривые зависимости межплоскостного расстояния ламеллярной фазы от отношения концентрации воды к концентрации вещества, образующего жидкий кристалл. Кривые расчи-

Рис. 2. Зависимость межплоскостного расстояния от отношения концентрации воды (C) к концентрации ПДСН+добавка (C_0). Пентадецилсульфонат+вода (1). Пентадецилсульфонат+вода+тропонин-тропомиозиновый комплекс мышц (2) [6].



таны на основании полученных дифракционных картин. Концентрацию белкового комплекса ТН-ТМ в системе варьировали в пределах 0—1,2%. Максимальная интенсивность рефлексов ламеллярной фазы мономолекулярной толщины наблюдалась при концентрации белка 1,1%. Увеличение же концентрации воды в системе в присутствии белка не изменяло межплоскостного расстояния, находящегося в пределах 27 Å°. Это явление возможно при предположении, что молекулы ТН-ТМ комплекса, внедряясь в пространства между БЛМ, как бы мешают молекулам воды проникнуть туда, приводя к «сшиванию» БЛМ. Такой эффект не наблюдается при действии глобулярного белка — сывороточного альбумина. Лишь в больших концентрациях, выше 5%, этот белок начинает влиять на надмолекулярную структуру жидкокристаллической системы липид—вода. Нужно полагать, что действие Са-связывающего комплекса ТН-ТМ характеризуется гидрофобным взаимодействием с липидной фазой и ведет к усилению контакта между соседними БЛМ.

Таким образом, на основании полученных данных можно допустить, что, несмотря на полианионный характер тропонина и ему подобных Са-связывающих белков, он достаточно сильно взаимодействует с липидами, стимулируя процесс переноса Ca^{2+} и сходных с ним катионов через клеточные мембраны. Учитывая их способность служить рецепторами катехоламинов и бета-блокаторов, а также рецепторами фармакологических ингибиторов медленного компонента входящего тока Ca^{2+} в миокардиальные клетки, можно допустить, что в фармакологическом и профилактическом эффекте бета-блокаторов Са-связывающие белки мембран играют ключевую роль. Однако остается неясным удельное значение этих белков в механизме их действия, ибо такое заключе-

ние не исключает предположения о прямом влиянии бета-блокаторов на липидные компоненты мембран миокардиальных клеток.

В литературе имеются указания на то, что ингибирование автоматических сокращений клеток в миокардиальной культуре скорее зависит от липофильности данного бета-блокатора, чем от вызванного им уменьшения внутриклеточной концентрации цАМФ [15]. Сравнение двух из них, атенолола и пропраналола, показало, что более эффективным является пропраналол, который почти в 1000 раз липофильнее [14]. Однако влияние указанных веществ на упорядоченность молекулярной структуры и ионную проницаемость липидных слоев изучено весьма недостаточно. Фактически направление исследований в этой области диктуется ставшим традиционным представлением, что влияние бета-блокаторов осуществляется главным образом через адренорецепторные молекулы мембран, в частности, через аденилатциклазу цАМФ.

С целью изучения вероятности непосредственного взаимодействия катехоламинов и их антагонистов на липидные мембраны было испытано влияние α -адреналина, α -норадреналина и dL-пропраналола на электрические характеристики мембран и на молекулярную организацию лиотропных жидких кристаллов.

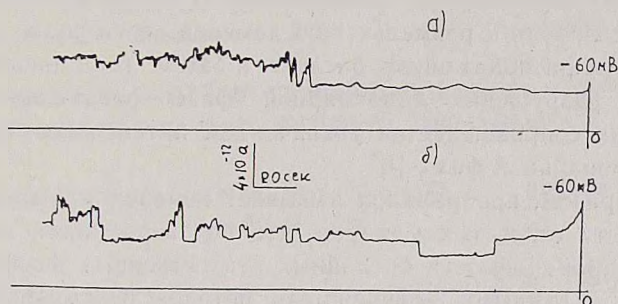


Рис. 3. Запись тока через БЛМ в присутствии $1,6 \times 10^{-5}$ М а) пропраналола и б) лидокаина. Видны спонтанные переходы уровней проводимости БЛМ и флуктуации тока.

Из рис. 3 видно, что бета-блокатор пропраналол ($1,6 \times 10^{-5}$ М) в бислоиных искусственных мембранах индуцирует образование короткоживущих ионных каналов, флуктуирующих в течение нескольких секунд. Величина скачка тока при этом составляет около $2-5 \times 10^{-13}$ а. С другой стороны, пропраналол уменьшает длительность жизни открытых каналов (одноканальное проведение) и удлиняет время жизни двух проводимых каналов. Более высокие дозы пропраналола вызывают четкое снижение омического сопротивления липидных бислоев.

Весьма характерно, что сами катехоламины в тех же концентрациях не оказывают значительного влияния на электрические характеристики искусственных фосфолипидных мембран в сходных условиях измерений.

Следовательно, можно было утверждать, что бета-блокаторы не только способны индуцировать конформационные изменения в ионтран-

каином в структуре БЛМ, делают их более чувствительными к электрическому полю. В зависимости от концентрации они могут как стабилизировать, так и дестабилизировать структуру мембраны. Влияние их на физико-химические свойства липидных мембран проявляется уже при очень низких концентрациях. Механизм их стабилизирующего действия на БЛМ требует дальнейших исследований.

Резюмируя полученные экспериментальные данные, можно заключить, что бета-блокаторы, антиритмики и Са-антагонисты (ингибиторы медленного входа тока Ca^{2+}) при сочетанном применении как для профилактики, так и в целях ограничения размеров инфаркта миокарда оказывают значительное влияние на упорядоченность структуры липидных слоев биомембран. Вызывая определенные изменения в их структуре, они также влияют на чувствительность мембран к различным ионам. В частности, определенную роль может играть их влияние на состояние Са-связывающих белков, которые, являясь адренорецепторами, по-видимому, в то же время представляют собой структурные компоненты Na- и Са-каналов в мембранах миокардиальной клетки.

Авторы благодарны Акопу Азаряну за большую помощь в работе.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,
Ереванский физический институт, ГКИАЭ СССР,
СКБ НКГСПС АН Армянской ССР,
Ереванский государственный университет

Поступило 12.V 1983 г.

ՄԻՈԿԱՐԴԻ ԻՆՖԱՐԿՏԻ ԴԵՊՐԵՍԻՄ ԲԵՏԱ-ԲԼՈԿԱՏՈՐՆԵՐԻ ՊԱՇՏՊԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Ս. Ս. ՂՈՎԱՆԵՍՅԱՆ, Ծ. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ, Ա. Ա. ՇԱՀԻՅԱՆ, Լ. Գ. ՄԻԿԱԵԼՅԱՆ,
Մ. Խ. ՄԻՆԱՍՅԱՆՑ

Ուսումնասիրվել է բետա-բլոկատորների ադդեցությունը Са-ին կապող սպիտակուցների, ճարպերի և ֆոսֆոլիպիդային արհեստական երկշերտ թաղանթների հատկությունների, ինչպես նաև վերամոնոլային կառուցվածքի վրա: Ծարպային թաղանթների էլեկտրահաղորդականությունը, իոնական թափանցելիությունը և ունեղնյան ճառագայթների փոքր անկյան տակ դիֆրակցիայի ունակությունը կրում են զգալի փոփոխություններ բետա-բլոկատորների ներկայության հետևանքով: Այսպիսով, բետա-բլոկատորները ցուցաբերում են ճարպային թաղանթների վիճակի վրա ազդելու ունակություն, ձևափոխելով նրանց: Այս փաստը մեծ դեր է խաղում նման կարգիտակտիվ միացությունների ներգործության մեխանիզմում:

PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS OF THE BETA-BLOCKERS PROTECTIVE ACTION DURING THE MYOCARDIAL INFARKTS

S. S. OGANESSYAN, Ts. M. AVAKYAN, A. A. SCHAHYNYAN,
L. G. MYKAELIAN, M. Ch. MYNASYANTZ

The influence of beta-blockers on the properties of Ca-tying proteins, fats, phospholipid artificial bilayer membranes and also on overmolecule structure has been investigated. Beta-blockers have significant effect on electric conduction, ion penetration and x-ray diffraction

ability of fatty membranes. Thus, beta-blockers can influence on fatty membranes and change their regularity, which plays a great role in the mechanism of action of such cardioactive combinations.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амелин Д. В., Анжелевич И. В. Архив патол., 25, 25—30, 1963.
2. Баринян С. Б., Кайфаджян М. А., Тикунов Б. А. Тез. I Всесоюзн. биофиз. съезда, 2, 1982.
3. Микаелян Л. Г., Аджян С. А. Тез. III респ. научн. сессии по вопросам биофизики, 1982.
4. Оганесян С. С., Баринян С. Б., Давтян Ж. С. Всесоюзн. конф. «Физиол. и биохим. медиаторных процессов». 196, М., 1976.
5. Перцова М. Н. Успехи совр. биологии, 93, 382—396, 1982.
6. Саркисян А. Г., Минасянц М. Х., Шагинян А. А., Оганесян С. С. Биофизика, 26, 375, 1981.
7. Boström S. L., Ljung B. et al. Nature, 292, 777—778, 1981.
8. Bush L., Vogel W. et al. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 1, 12, 1979.
9. Cheung W. Y. Science, 207, 19—27, 1980.
10. Collins J. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 301—308, 1974.
11. Fitzgerald J. D. Acta Cardiol. Suppl., 15, 199—216, 1972.
12. Frelin C., Vigna P., Lanzauskas M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 106, 967—973, 1982.
13. Godin T., Au T., Garnett M. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 261—274, 1979.
14. Hansch C., Fujita T. J. Amer. Chem. Soc., 86, 1616—1624, 1964.
15. Higgins T. C., Allsop D., Bailey P. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 101—107, 1979.
16. Jasmok G. J., Warltier D. C., Gross C. et al. Basic Resear. Cardiol., 73, 559—570, 1978.
17. Lossnitzer K. Symposium Advances in Cardiovascular Care, 17, London, 1981.
18. Oganessyan S. S., Barinyan S. B. et al. J. Molec. Cell. Cardiol., 10, 1, 71, 1978.
19. Oganessyan S. S., Barinyan S. B. et al. Ibid., 12, 1, 115, 1980.
20. Oganessyan S. S., Barinyan S. B., Gevorgyan R. A. et al. Advances in Myocardiology, 3, 439—454, N. Y., 1982.
21. Opie L. H. J. Molec. Cell. Cardiol., 11, 1073—1094, 1979.
22. Pechère J., Capony I., Ryden L. Europ. J. Biochem., 23, 421—430, 1971.
23. Prichard B. N. Brit. Med. J., 1, 1227—1228, 1964.
24. Prichard B. N. Betablocker; Betadrenol Symposium, 126—146, Frankfurt, 1977.
25. Reimer K. R., Rasmussen M., Jennings R. B. Amer. J. Cardiol., 37, 500—527, 1976.
26. Rona G., Chappel C. et al. Arch. Pathol., 67, 443—450, 1959.
27. Seamon K. S., Daly J. W. Life Science, 30, 1457—1464, 1982.
28. Surewič K., Fijałkowska I., Leyko W. Biochem. Pharm., 30, 839—842, 1981.
29. Tomotke H., Ross I., Franklin D. Amer. J. Cardiol., 41, 689—696, 1978.
30. Wetaker R., Klinger R., Cumme G. et al. Biochem. Intern., 4, 385—390, 1982.
31. Zuzzati V., Mistacchi H., Skoulios A. Nature, 180, 600—602, 1967.

УДК 577.352

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ДИПОЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ДВУХ ФАЗ

В. Б. АРАКЕЛЯН, С. Б. АРАКЕЛЯН

В работе вычислен потенциал диполя, расположенного на границе раздела двух фаз. Показано, что устойчивым положением диполя является положение, когда его ось перпендикулярна границе раздела. Вычислена свободная энергия переноса дипольной молекулы из одной фазы в другую. Рассчитан энергетический профиль дипольной молекулы на границе раздела двух фаз. Для молекул воды проведено сопоставление теоретических формул с экспериментальными данными.

Ключевые слова: мембрана, диполь, диффузия.

Имеется большое число работ, посвященных вычислению энергетического профиля ионов на границе раздела фаз и в мембране [1, 9, 10]. Подобные работы для диполей практически отсутствуют, за исключением работы Пастушенко и др. [4], в которой была поставлена и решена задача для фаз с сильно различающимися диэлектрическими постоянными. Очевидно, что без детального теоретического исследования поведения дипольной молекулы на границе раздела фаз и в мембране трудно интерпретировать данные о транспорте дипольных молекул через модельные и биологические мембраны, а также анализировать возможные ориентации молекулы в мембране. Заметим также, что несмотря на большое число работ, посвященных транспорту воды через мембраны [5, 6, 8, 11], все еще нет полной ясности в механизме переноса. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы для анализа поведения молекул воды в мембранах. Следует отметить, что взаимодействие дипольной молекулы с мембраной носит сложный характер, зависящий от конкретных свойств как молекулы, так и мембранного материала. В данной статье мы ограничимся лишь учетом электростатических эффектов.

Взаимодействие дипольной молекулы со своим изображением.

Предположим, что молекула, имеющая дипольный момент $\vec{d}_1$, расположена в фазе с диэлектрической проницаемостью ϵ_m . Его изображение $\vec{d}_2$ находится в фазе с диэлектрической проницаемостью ϵ_v . На рис. 1 показано расположение диполя—оригинала $\vec{d}_1$ и его изображения $\vec{d}_2$. Ось x перпендикулярна границе раздела. Диполь $\vec{d}_1$ составляет угол θ с осью x . Граница раздела проходит по плоскости $x=0$. Обозначим расстояние от диполя $\vec{d}_1$ до границы раздела фаз через x . Для вычисления силы взаимодействия диполя со своим изображением определим потенциал, созданный диполем $\vec{d}_1$ в фазах 1 и 2. Используя симметрию задачи, представим потенциалы в фазах 1 и 2 в виде

$$\varphi_1 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\vec{d}_3 \cdot \vec{r}_3}{\epsilon_B r_3^3}, \quad x < 0 \quad (1)$$

$$\varphi_2 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\vec{d}_1 \cdot \vec{r}_1}{\epsilon_M r_1^3} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\vec{d}_2 \cdot \vec{r}_2}{\epsilon_M r_2^3}, \quad x > 0. \quad (2)$$

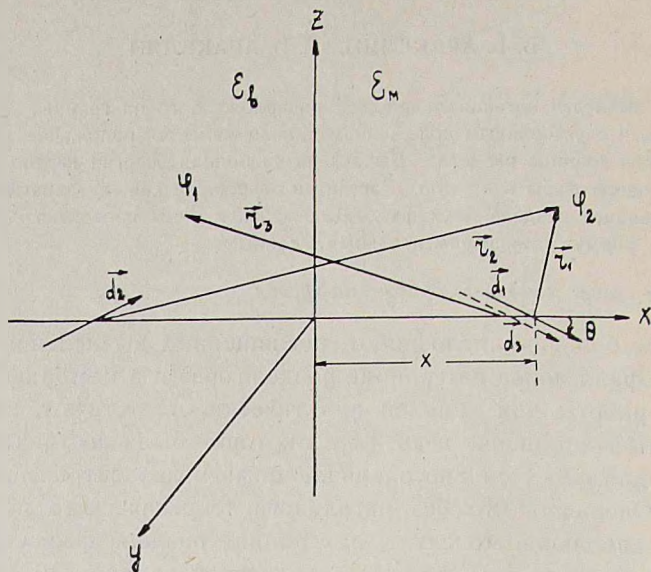


Рис. 1. Схема расположения диполя—оригинала $\vec{d}_1$ и его изображения на границе раздела фаз. Диполи $\vec{d}_1$ и $\vec{d}_3$ находятся в одной точке, но для наглядности на рисунке они изображены раздельно.

Абсолютные величины $|\vec{d}_2|$ и $|\vec{d}_3|$ определим из следующих граничных условий

$$\varphi_1(0) = \varphi_2(0) \quad (3)$$

$$\epsilon_B \left. \frac{\partial \varphi_1}{\partial x} \right|_{x=0} = \epsilon_M \left. \frac{\partial \varphi_2}{\partial x} \right|_{x=0}. \quad (4)$$

Подставив (1) и (2) в (3) и (4) и решив соответствующую систему уравнений, получаем

$$d_2 = \frac{\epsilon_B - \epsilon_M}{\epsilon_B + \epsilon_M} d_1, \quad (5)$$

$$d_3 = \frac{2\epsilon_B}{\epsilon_B + \epsilon_M} d_1. \quad (6)$$

Сила взаимодействия между диполем $\vec{d}_1$ и изображением $\vec{d}_2$ определяется по формуле

$$\vec{F} = \frac{3}{4\pi\epsilon_0\epsilon_M r^4} \{ [(\vec{d}_1 \cdot \vec{d}_2) - 5(\vec{d}_1 \cdot \vec{n})(\vec{d}_2 \cdot \vec{n})] \vec{n} + [(\vec{d}_2 \cdot \vec{n}) \vec{d}_1 + (\vec{d}_1 \cdot \vec{n}) \vec{d}_2] \}. \quad (7)$$

Учитывая симметрию задачи из (7), имеем

$$F(x) = - \frac{3 \lambda d_1^2}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon_M (2x)^4} (1 + \cos^2 \theta), \quad (8)$$

где $\lambda = \frac{\epsilon_n - \epsilon_M}{\epsilon_n + \epsilon_M}$. Заметим, что знак силы F зависит от знака λ . Так, например, если диполь находится в фазе, имеющей меньшую диэлектрическую постоянную, т. е. $\epsilon_M < \epsilon_n$, то $\lambda > 0$, тогда, согласно формуле (8), сила отрицательна, что означает притяжение оригинала к своему изображению. Рассмотренный нами вариант соответствует случаю, когда дипольная молекула находится в мембране, так как для границы раздела вода-мембрана имеем $\epsilon_M \simeq 2$, $\epsilon_n \simeq 78,5$. Следовательно, концентрация диполей на границе должна быть выше, чем в глубине мембранной фазы.

Энергию взаимодействия диполя со своим изображением вычислим по формуле

$$\omega(x, \theta) = \int_x^\infty F(x) dx. \quad (9)$$

Заметим, что мы принимаем $\omega = 0$ при $x = \infty$. Подставив (8) в (9), получим

$$\omega(x, \theta) = - \frac{\lambda d_1^2}{8 \pi \epsilon_0 \epsilon_M (2x)^3} (1 + \cos^2 \theta). \quad (10)$$

Анализ выражения (10) показывает, что имеются два положения равновесия $\theta = 0$ и $\theta = \frac{\pi}{2}$, причем положение, при котором ось диполя перпендикулярна границе раздела фаз, т. е. $\theta = 0$, является устойчивым. Однако тепловые флуктуации постоянно сбивают диполь с этого положения. Поэтому следует вычислить среднюю энергию взаимодействия диполя со своим изображением.

Выражение (10) позволяет оценить область x , в которой оси диполей расположены перпендикулярно границе раздела фаз. Приравняв разность $\omega(x, 0) - \omega\left(x, \frac{\pi}{2}\right)$ тепловой энергии kT , где k — постоянная Больцмана, T — температура, получаем уравнение относительно x . Нетрудно показать, что

$$x \simeq \left(\frac{\lambda d_1^2}{64 \pi \epsilon_0 \epsilon_M kT} \right)^{1/3}. \quad (11)$$

Из (11) следует, что размер области, в которой диполи ориентированы перпендикулярно границе раздела, существенно зависит от дипольного момента d_1 и температуры T , причем с увеличением d_1 область x растет, а с увеличением температуры x уменьшается. Применим формулу (11) для случая с молекулами воды в мембране на границе с водой. Подставив в (11) $\epsilon_n = 78,5$, $\epsilon_M = 2$, $d_1 = 1,85 \text{ D}$, получим $x \simeq 2 \text{ \AA}$. Поскольку размер молекулы воды $\sim 1,35 \text{ \AA}$, то следует, что за счет сил изображения ориентируется один монослой воды.

Вычисление энергетического профиля. Среднюю энергию взаимодействия вычислим обычным способом [3].

$$\bar{\omega}(x) = -kT \ln \int_0^{\pi/2} \exp(-\omega(x, \theta)/kT) \sin \theta d\theta = -kT \ln z(x), \quad (12)$$

где

$$z(x) = \int_0^{\pi/2} \exp(-\omega(x, \theta)/kT) \sin \theta d\theta.$$

Средняя сила взаимодействия определяется по формуле

$$\bar{F}(x) = kT \frac{\partial}{\partial x} (\ln z(x)) = -\frac{\partial \bar{\omega}}{\partial x}. \quad (13)$$

Энергию будем отсчитывать от его значения в глубине фазы 1. Для этого нужно вычислить энергию W_{12} переноса дипольной молекулы из глубины фазы 1 в глубину фазы 2. Воспользуемся результатом работы Кирквуда [7], где было показано, что изменение свободной энергии переноса дипольной молекулы, имеющей дипольный момент d и эффективные размеры a , из вакуума в фазу с диэлектрической проницаемостью ϵ равна

$$W = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{(\epsilon - 1)d^2}{(2\epsilon + 1)a^3}. \quad (14)$$

Применив метод термодинамических циклов Борна—Хабера и используя результат (14), получим следующее выражение для энергии переноса

$$W_{12} = \frac{3d_1^2(\epsilon_B - \epsilon_M)}{4\pi\epsilon_0 a^3 (2\epsilon_B + 1)(2\epsilon_M + 1)}. \quad (15)$$

Учитывая (15) и (11), имеем окончательное выражение для энергетического профиля дипольной молекулы в фазе 2 (в единицах kT)

$$\begin{aligned} \bar{W}(x) &= \frac{3d_1^2(\epsilon_B - \epsilon_M)}{4\pi\epsilon_0 a^3 kT (2\epsilon_a + 1)(2\epsilon_M + 1)} - \\ &- \ln \int_0^1 \exp\left(\frac{\lambda d_1^2}{8\pi\epsilon_0 \epsilon_M (2x)^3 kT} (1 + t^2)\right) dt. \end{aligned} \quad (16)$$

График зависимости (16) представлен на рис. 2 (кр. 1). Для практических целей формула (16) не удобна, поскольку содержит интеграл. Из нее легко получить приближенную формулу:

$$\bar{W}(x) \approx \frac{3d_1^2(\epsilon_B - \epsilon_M)}{4\pi\epsilon_0 a^3 kT (2\epsilon_B + 1)(2\epsilon_M + 1)} - \frac{\lambda d_1^2}{6\pi\epsilon_0 \epsilon_M (2x)^3 kT} \quad (17)$$

Зависимость (17) представлена на рис. 2 (кр. 2), из которого видно, что кривые 1 и 2 практически совпадают. Таким образом, для оценок можно использовать более удобную и простую формулу (17).

Среднее значение силы взаимодействия диполя со своим изображением вычислим по формуле (13), подставив вместо $\bar{\omega}(x)$ выражение (17).

$$\bar{F}(x) = - \frac{\lambda d_0^2}{\pi \epsilon_0 \epsilon_M (2x)^2}. \quad (18)$$

Как и следовало ожидать, среднее значение силы $\bar{F}$ лежит между максимальным ($\theta=0$) и минимальным ($\theta=\frac{\pi}{2}$) значениями (как это видно из формулы (8)).

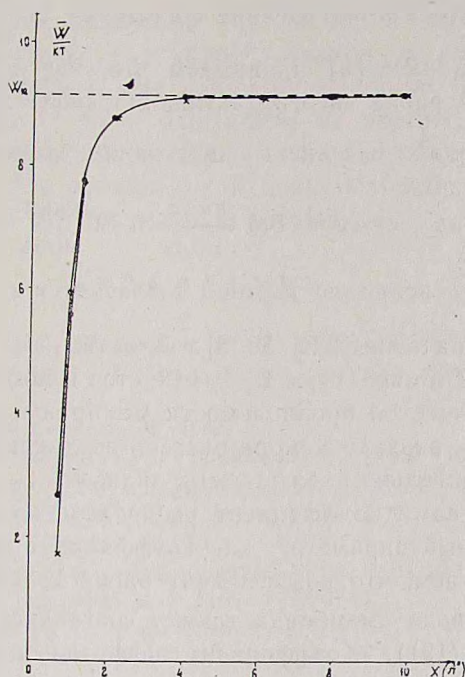


Рис. 2. Энергетический профиль дипольной молекулы (H_2O) на границе раздела фаз с диэлектрическими проницаемостями 78,5 и 2. W_{12} —свободная энергия переноса диполя между фазами (15). $d_1=1,85 \text{ D}$; $a=1,35 \text{ \AA}$ $T=300 \text{ K}$.

Полученные нами формулы позволяют количественно проанализировать данные о транспорте дипольных молекул через биологические и бислойные липидные мембраны (БЛМ). Поскольку в литературе имеется большой экспериментальный материал о транспорте воды, сравнение теоретических формул с экспериментальными данными мы проведем для молекулы воды*.

Принимая, что основной вклад в свободную энергию переноса молекулы воды из водной фазы в *n*-гексадекан дает электростатический эффект для коэффициента распределения K , с учетом (15), мы имеем

$$K = \exp(-W_{12}/kT). \quad (19)$$

* Поскольку в литературе отсутствуют некоторые данные для системы вода—бислой, в расчетах использованы данные для системы вода—*n*-гексадекан. Диэлектрические постоянные БЛМ и *n*-гексадекана близки и $\epsilon \sim 2$.

Подставив в (19) $\varepsilon_0 = 78,5$, $\varepsilon_m = 2$, $d_1 = 1,85 D$, $a = 1,35 \text{ \AA}$, $T = 300$, получаем для $K \sim 9,6 \cdot 10^{-5}$. Эта величина согласуется с литературными данными ($4,2 \cdot 10^{-5}$ [2]).

Из рис. 2 видно, что для молекул воды энергия диполя на глубине $6 \text{ \AA}$ практически совпадает с W_{12} . Так как толщина БЛМ обычно $\sim 50 \text{ \AA}$, то W_{12} можно интерпретировать как энергию активации переноса молекулы воды из воды в мембрану. Учитывая, что диэлектрическая проницаемость мембраны $\varepsilon_m \simeq 2$, имеем для $W_{12} = 5,5 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$. Энергия активации

диффузии воды в н-гексадекане составляет $11 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$ [5]. Согласно

литературным данным, [5] принимаем, что энергия активации диффузии воды в БЛМ равна энергии активации диффузии воды в н-гексадекане, $11 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$. Полная энергия активации транспорта воды через

мембраны E_a равна сумме $5,5 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$ и $11 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$, что составляет

$E_a = 16,5 \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$. Эта величина хорошо согласуется с эксперименталь-

но наблюдаемыми значениями E_a [5, 8]. Заметим, что в зависимости от состава мембраны и температуры E_a изменяется в широком интервале. Вариация диэлектрической проницаемости мембраны, а также учет заряженности границы раздела мембра-раствор позволяют объяснить весь диапазон экспериментально наблюдаемых значений E_a .

Вычисленный нами коэффициент распределения (19) позволяет оценить такой важный параметр, как коэффициент диффузии воды в мембране. Принимаем, что коэффициент распределения для молекул воды на границе вода—мембрана также составляет $\sim 9,6 \cdot 10^{-5}$ (см. оценку по формуле (19)). Коэффициент диффузии оценим по формуле $D = \frac{P \cdot h}{K}$ [5], где P —проницаемость мембраны, а h —ее толщина. Под-

ставив в формулу значения $P = 22 \cdot 10^{-4} \frac{\text{см}}{\text{с}}$ [2] (для лецитиновых мем-

бран) $h \sim 50 \text{ \AA}$, а $K \sim 9,6 \cdot 10^{-5}$, получаем для $D \sim 1,1 \cdot 10^{-5} \frac{\text{см}^2}{\text{с}}$. Как

и следовало ожидать, эта величина близка к коэффициенту диффузии воды в н-гексадекане, $4,16 \cdot 10^{-5} \frac{\text{см}^2}{\text{с}}$ [5].

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР, ВПЭКТИ
лаборатория радиационной биофизики

Поступило 24.I 1983 г.

ԴԻՊՈԼԱՅԻՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԷՆԵՐԳԵՏԻԿ ՊՐՈՖԻԼԸ ԵՐԿՈՒ ՖԱԶԵՐԻ
ԲԱԺԱՆՄԱՆ ՍԱՀՄԱՆԻ ՎՐԱ

Վ. Բ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ, Ս. Բ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ

Հոդվածում ներկայացված է երկու ֆազերի բաժանման սահմանի վրա տեղադրված դիպոլի պոտենցիալը, ջույց է տրված, որ դիպոլի կայուն դիրքն

այն է, երբ դիպոլի առանցքն ուղղահայաց է բաժանման սահմանին: Հաշված է դիպոլային մոլեկուլի մի ֆազից մյուսին անցնելու ազատ էներգիան: Գտնրված է դիպոլային մոլեկուլի էներգետիկ պրոֆիլը երկու ֆազերի բաժանման սահմանում: Զրի մոլեկուլի համար կատարված է տեսական բանաձևի համեմատում էքսպերիմենտալ տվյալների հետ:

ENERGETIC PROFILE OF DIPOLE MOLECULES ON THE BORDER OF SEPARATION OF TWO PHASES

V. B. ARAKELIAN, S. B. ARAKELIAN

The dipole potential, located on the border of separation of two phases, has been calculated. The dipole position is stable when the dipole axis is perpendicular to the border of separation. The free energy of dipole molecule transfer from one phase to another, as well as the energetic profile of dipole molecules on the border of separation of two phases are measured. The comparison of theoretical formulae and experimental data is carried out for water molecules.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айтьян С. Х., Духин С. С., Чизмаджев Ю. А. Электрохимия, 13, 779—783, 1977.
2. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
3. Кубо Р. Статистическая механика. М., 1967.
4. Пастушенко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Бисфизика, 24, 3, 458—463, 1981.
5. Fettiplace R., Haydon D. A. Physiological Review, 60, 2, 510—550, 1980.
6. Fettiplace R. Biochim. et biophys. acta., 513, 1, 1—10, 1978.
7. Kirkwood J. G. J. chem. Phys., 2, 51, 1934.
8. Lawaczeck R. Ann. Meet. Dtsch. Ges. Biophys., Abstr. Poster. Present. Berlin, 1979.
9. Neumcke B., Lüger P. Biophys., J., 9, 1160—1170, 1969.
10. Parsegian V. A. Annals N. Y., Acad. Sciences, 264, 161—174, 1975.
11. Tien H. T. Bilayer Lipid Membranes Dekker., N. Y., 1974.

«Биолог. ж. Армении», т. XXVI, № 7, 1983

УДК 612.014.4:612.73./74

ОСОБЕННОСТИ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

Б. А. ТИКУНОВ

Изучены флуоресцентные свойства и реакция суперпреципитации нативного и десенсиitizedированного актомиозина из разных типов скелетных мышц белых крыс. Выявлены существенные различия в кинетике суперпреципитации, а также в характере модуляции ее скорости и максимума собственной флуоресценции актомиозина быстро- и медленносокращающихся мышц ионами Са. Предполагается, что в актомиозине

медленных мышц, в отличие от быстрых, помимо тропонин-тропомиозинового комплекса, в регуляцию актин-миозинового взаимодействия в присутствии ионов Ca^{2+} включаются также ДНБ-чувствительные цепи миозина.

Ключевые слова: скелетные мышцы, актин-миозиновое взаимодействие, Ca^{2+} -регуляция.

Согласно современным представлениям, взаимодействие актина (А) с миозином (М) в мышцах опосредованно регулируется ионами Ca^{2+} через регуляторные белковые компоненты. Ингибиторный эффект тропонина (ТН) или легких цепей миозина (ЛЦ) снимается в результате связывания Ca^{2+} , и становится возможным непосредственный контакт А с М [14]. В зависимости от того, как осуществляется модулирующее действие Ca^{2+} -через ТН или ЛЦ миозина, различают соответственно актиновый и миозиновый типы регуляции.

Актиновый тип регуляции предполагает индуцирование конформационных переходов в ТН ионами Ca^{2+} в концентрациях выше 10^{-7} М [15], индуктивно-резонансную передачу конформационной волны на тропомиозин (ТМ) и деблокировку М-связывающих центров А. Подобная схема считается классической и представляется как основной механизм контроля функциональной активности сократительного белкового аппарата скелетных мышц позвоночных [7, 10].

Миозиновая регуляция, протекающая с участием ЛЦ, обнаружена у моллюсков и в гладкой мускулатуре высших животных, однако роль Ca^{2+} -чувствительных ДНБ-ЛЦ миозина в скелетных мышцах окончательно не выяснена [2]. Так, большинство авторов придерживается мнения, согласно которому этот механизм регуляции в поперечно-полосатых мышцах либо отсутствует вообще, либо очень слабо представлен [1]. Вместе с тем имеются данные, подчеркивающие отнюдь не второстепенную роль последней, даже в присутствии тропонин-тропомиозинового (ТН-ТМ) комплекса [13].

Однако в этих работах не предполагалось сравнительного изучения удельной роли ЛЦ-регуляции в мышцах различного функционального профиля, хотя известно, что набор ЛЦ миозина обнаруживает типовые различия как в отношении свойств самих ЛЦ, так и в их стехиометрии [8, 21]. Более того, различная филогенетическая принадлежность красных и белых мышц наводит на мысль о неодинаковой значимости миозинового типа регуляции в этих мышцах.

В настоящей работе были изучены особенности взаимодействия А и М красных и белых мышц крыс, вызываемого добавлением АТФ в белковый раствор при физиологических значениях ионной силы (реакция суперпреципитации—СПП), а также изменение флуоресцентных свойств препаратов актомиозина в зависимости от концентрации Ca^{2+} в среде.

Материал и методика. Эксперименты проводили на белых крысах линии «Вистар». Были исследованы медленносокращающиеся красные скелетные мышцы КМ и МГТМ (камбаловидная и медиальная головка трехглавой мышцы) и быстрые белые мышцы ДРП и ПЛМ (длинный разгибатель пальцев и плечеглавая мышца).

Нативный актомиозин (НАМ) получали по методу [19] с последующим ультрацентрифугированием при 20000 g. Путем многократного щелочного промывания суспензии НАМ получали Ca^{2+} -нечувствительный десенсиitizedированный актомиозин (ДАМ), лишенный ТН—ТМ комплекса [18].

Чистоту белковых препаратов проверяли электрофоретически на ПААГ [22] и по спектрам УФ-светопоглощения. Концентрацию белка в растворе определяли по методу Лоури и спектрофотометрически, по калибровочным кривым, построенным на сухих препаратах белков.

Кинетические кривые реакции суперпреципитации регистрировали по изменению мутности белковой суспензии после добавления АТФ. Скорость процесса определяли как тангенс угла наклона прямолинейного участка кривой СПП.

Непрерывные спектры собственной флуоресценции белковых препаратов записывали на однолучевом УФ-спектрофлуориметре «Fagrand», марки МК-1 (США).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кинетические кривые СПП НАМ белых и красных мышц. В момент добавления субстрата (Mg^{2+} -АТФ) происходит быстрое уменьшение мутности белкового раствора (фаза просветления), более сильно выраженное на препаратах НАМ белых мышц. Предполагается, что фаза просветле-

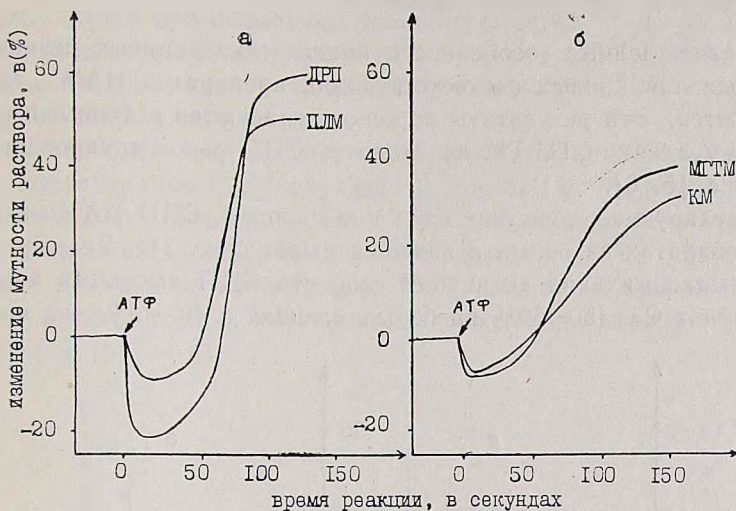


Рис. 1. Кинетические кривые реакции СПП НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крыс. Инкубационная смесь: 0,15 М КСl, 2 мМ Трис-НСl, β -меркаптоэтанол, 0,1 мМ Ca^{2+} -ЭГТА буфер, 0,5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ АТФ, рН 7,4; $C_{НАМ}=0,5$ мг/мл. Условия эксперимента: $\lambda_{рег.}=660$ нм, $t=25^\circ C$.

ния является результатом диссоциации АМ комплекса при связывании АТФ и необходима для дальнейшего протекания СПП, так как при этом происходит переход М в конформационно-активное состояние [11]. По мере гидролиза АТФ увеличивается количество неорганического фосфата и АДФ в среде, что стимулирует наступление следующей стадии—собственно СПП (восходящий участок кривых), при котором происходит образование комплекса актин-миозин.

Как следует из таблицы, скорость СПП НАМ быстросокращающихся мышц ПЛМ и ДРП значительно выше таковой, рассчитанной для препаратов белка, выделенных из медленных мышц КМ и МГТМ. Кинетические кривые СПП НАМ красных мышц как бы «вытянуты» в меридиональном направлении и завершение процесса обозначено менее четко (рис. 1 б).

После удаления регуляторного ТН-ТМ комплекса несколько укорачивается фаза просветления и повышается скорость СПП (см. табл.),

Таблица

Значения скорости СПП НАМ и ДАМ разных типов скелетных мышц крыс

Тип мышцы	Белок	Скорость СПП (абс. ед.)	n	p
ДРП	НАМ	24,5±1,12	5	p<0,01
	ДАМ	27,0±0,70	6	
ПЛМ	НАМ	20,1±1,31	6	p<0,001
	ДАМ	25,5±1,00	7	
МГТМ	НАМ	5,5±0,56	6	p<0,001
	ДАМ	8,0±0,45	7	
КМ	НАМ	4,5±0,32	5	p<0,001
	ДАМ	6,0±0,22	6	

Инкубационная смесь и условия экспериментов те же, что к рис. 1. n—число опытов, M±m, p—достоверность различий.

однако качественные особенности кинетических кривых реакции, характерные для кривых соответствующих препаратов НАМ, при этом сохраняются. Эти результаты хорошо согласуются с данными об ингибирующем влиянии ТН-ТМ на скорость СПП реконструированного актомиозина [5, 6].

Модулирующее действие Ca^{2+} на скорость СПП НАМ неодинаково в препаратах из белых и красных мышц (рис. 2). Различна также степень максимальной активации скорости СПП высокими концентрациями ионов Са (50—60% на белых мышцах и 40—45% —на красных).

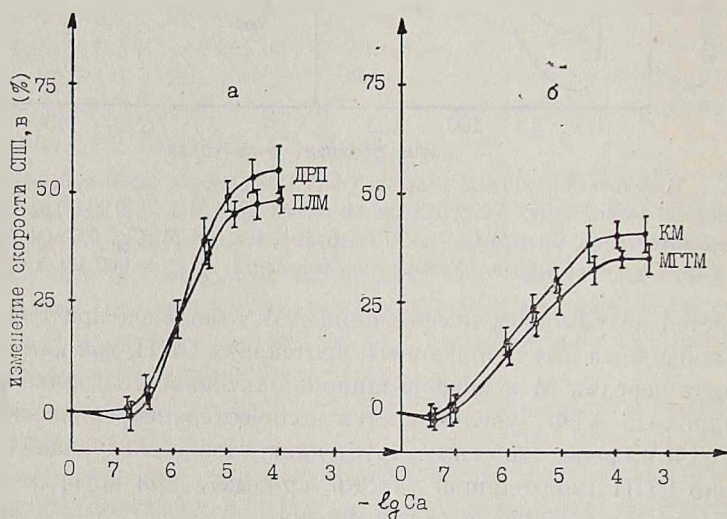


Рис. 2. Зависимость скорости СПП НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крыс от концентрации Ca^{2+} в среде. Инкубационная смесь и условия эксперимента те же, что к рис. 1.

Особого внимания заслуживает тот факт, что интервал наиболее эффективно действующих концентраций Ca^{2+} гораздо уже для препаратов НАМ из ДРП и ПЛМ (pCa 7,0÷5,5), чем для КМ и МГТМ (pCa 8,5÷4,0). При этом заметное увеличение скорости СПП НАМ быстрых мышц начинается при больших, а выход на плато завершается при

меньших, чем в случае медленных мышц, концентрациях Ca^{2+} . Возможно это в какой-то степени отражает реальное поведение сократительного белкового аппарата мышц в условиях «in vivo», так как качественно аналогичные кривые зависимости величины максимума изометрического сокращения от концентрации Ca^{2+} в том же диапазоне были получены на скинированных (лишенных мембран) волокнах из ДРП и КМ [17]. Не исключается также связь с более низкой скоростью ресеквестрации Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом красных мышц по сравнению с таковой белых [16, 24].

Как уже отмечалось выше, при связывании Ca^{2+} тропонином индуцируемые конформационные изменения приводят к увеличению интенсивности собственной флуоресценции белка [20]. Поскольку кривые, отражающие изменение максимума собственной флуоресценции НАМ белых мышц при повышении концентрации Ca^{2+} в среде, схожи с соответствующими кривыми изменения скорости СПП (см. рис. 2 а и 3 а), можно предположить, что активация скорости СПП ионами Ca опосредуется ТН-ТМ комплексом.

Несколько иначе обстоит дело с препаратами из красных мышц. Уже при концентрации Ca^{2+} порядка $10^{-5} \div 5 \times 10^{-5} \text{ М}$ рост максимума собственной флуоресценции НАМ красных мышц прекращается, в то время как скорость СПП продолжает расти (рис. 2 б). Более того, дальнейшее повышение концентрации Ca^{2+} вызывает нисходящий ход концевых участков кривых изменения максимума собственной флуоресценции белка (рис. 3 б).

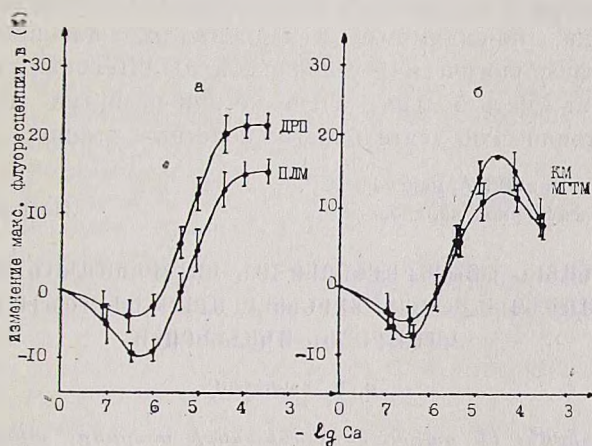


Рис. 3. Зависимость величины максимума собственной флуоресценции НАМ белых (а) и красных (б) скелетных мышц крыс от концентрации Ca^{2+} в среде. Инкубационная смесь: 0,6 М КСI, 2 мМ Трис-НСI, β -меркаптоэтанол, 0,1 мМ Ca^{2+} -ЭГТА буфер, рН 6,8; $C_{\text{НАМ}} = 0,5 \text{ мг/мл}$. Условия эксперимента: $\lambda_{\text{возб.}} = 275 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег.}} = 330 \text{ нм}$, $t = 25^\circ\text{C}$.

Таким образом, в случае НАМ красных мышц, в отличие от препаратов белых мышц, помимо восходящего участка кривых зависимости максимума флуоресценции от концентрации Ca^{2+} , обусловленного, по-видимому, конформационными изменениями в ТН-ТМ комплексе, появляется также нисходящий участок, свидетельствующий о частичном тушении собственной флуоресценции белка.

Этот феномен может быть обусловлен взаимодействием Ca^{2+} с ДТНБ-ЛЦ миозина, ион-связывающие центры которых характеризуются константами диссоциации выше 10^{-5} М [3, 11]. Действительно, способность высоких концентраций ионов Са тушить триптофановую флуоресценцию ДТНБ-ЛЦ в растворе [4, 23] может привести к частичному уменьшению интегральной интенсивности собственной флуоресценции НАМ, в состав которого ЛЦ входят в молярном соотношении 2:1.

Подтверждением высказанного предположения может служить отмечаемое снижение максимума собственной флуоресценции ДАМ в области высоких концентраций Ca^{2+} , достоверно выраженное только в препаратах красных мышц. В то же время небольшая активация скорости СПП ДАМ при этих же концентрациях Ca^{2+} является прямым указанием на нетропониновую природу наблюдаемых явлений.

Таким образом, можно допустить наличие «двухступенчатого» механизма активации скорости СПП НАМ медленносокращающихся красных мышц. При концентрации Ca^{2+} в среде не выше 5×10^{-5} М активирующий эффект ионов осуществляется так же, как и в препаратах быстрых мышц—через ТН-ТМ регуляторный комплекс. Однако дальнейшее повышение содержания Ca^{2+} , очевидно, приводит к дополнительному включению ЛЦ миозина, что, с одной стороны, проявляется в частичном тушении собственной флуоресценции НАМ, а с другой—в дальнейшей активации скорости СПП.

В заключение хочется отметить, что существование подобного механизма регуляции функциональной активности сократительных белков не исключено и на уровне целой мышцы, причем наиболее четко он представлен, по-видимому, в медленносокращающихся скелетных мышцах. В физиологических условиях дополнительная активация ЛЦ миозина может иметь большое значение при развитии длительных сокращений и тонической деятельности скелетных мышц.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 12.V 1983 г.

ԱԿՏԻՆ-ՄԻՈԶԻՆԱՅԻՆ ՓՈԽՆԱՐԱՐԵՐՈՒԹՅԱՆ ԿԱԼԻԹՈՒՄԱԿԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ,
ԱՌՆԱԶՆԱՆԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱՐԱԳ ԵՎ ԴԱՆԴԱՂ
ԿՄԱԽՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐՈՒՄ

Բ. Ա. ՏԻԿՈՒՆՈՎ

Ուսումնասիրվել են սպիտակ առնետների տարբեր տիպի կմախքային մկանների ակտիվ և դաննսիտիզացված ակտոմիոզինի լուսածորման հատկությունները և սուպերպրեցիպիտացիայի (ՍՊՊ) ռեակցիան: Պարզաբանվել են էական տարբերությունները ՍՊՊ-ի կինետիկայում, ինչպես նաև ՍՊՊ-ի մոդուլացիոն արագության և Са-ի իոններով արագ և դանդաղ կծկվող մկանների ակտոմիոզինի լուսածորման ինտենսիվության մաքսիմումի բնույթում: Ենթադրվում է, որ ի տարբերություն արագ կծկվող մկանների, դանդաղ կծկվող մկանների ակտոմիոզինում, բացի տրոպոնին-տրոպոմիոզինային կոմպլեքսից, ակտին-միոզին փոխհարաբերության կարգավորմանը Са-ի իոնների ներկայությամբ ներգրավում են նաև միոզինի ԴՏՆԲ-զգայուն թեթև շղթաները:

PECULIARITIES OF CALCIUM REGULATION OF ACTIN-MYOSIN INTERACTION IN FAST AND SLOW SKELETAL MUSCLES

B. A. TIKUNOV

The fluorescent properties and superprecipitation reaction of native and desensitized skeletal muscles actomyosin of the white rats have been investigated. Differences of kinetic parameters of SPP and in SPP modulation speed and also of the maximal fluorescence of actomyosins of fast- and slow-shortening muscles by Ca ions have been observed.

The obtained results have shown, that in actomyosin of slow skeletal muscles (in distinction from that of fast muscles) in the presence of Ca^{2+} , the regulation of actin-myosin interaction may be realized not only by troponin-tropomyosin complex, but also by means of the DTNB-sensitive light chains of myosin.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гегели Дж. В сб. Метаболизм миокарда. М., 107—118, 1979.
2. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. В кн. Миозин и биологическая подвижность. М., 66—70, 1980.
3. Тищенко В. М. 3-я Всесоюз. конф. по биохимии мышц. М., 175, 1974.
4. Caffein S. L., Werber M. M., Oplatka A. 9-th Int. Congr. Biochem. Stockholm, 116, 1973.
5. Ebashi S. E., Nonomura Y., Toyooka T. and Katayama E. In: Calcium in biological systems. № 30, 1976.
6. Ebashi S., Ebashi F. J. Biochem., 55, 443—450, 1964.
7. Gyorgyi A. G. J. Mol. Biol., 104, 747—775, 1976.
8. Hoh J. F. Y. Febs. Letters., 98, 267—270, 1979.
9. Hundley R. F. Wynn J. Arch. Biochem. and Biophys., 179, 432—443, 1977.
10. Huxley H. F. In: Molecular Basis of Motility., 26 Colloquium Mosbach, 1975, Berlin-Heidelberg Springes, Werlag.
11. Komtzn D. R. Biochemistry, 9, 1792—1797, 1970.
12. Morimoto K., Harrington W. F. J. Mol. Biol., 88, 633—709, 1974.
13. Pemrick S. J. Biol. Chem., 255, 8826—8841, 1980.
14. Perry S. V. Biochem. Soc. Trans., 7, 593—617, 1979.
15. Potter J. D., Gergely J. J. Biol. Chem., 250, 4628—4633, 1975.
16. Sreter F. A., Gergely J. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 438—443, 1970.
17. Stephenson D. G., Forrest G. G. Biochem. et Biophys. Acta, 589, 358—362, 1980.
18. Stewart J. M., Levy H. M. J. Biol. Chem., 245, 5764—5772, 1970.
19. Straub M. C., Perry G. Biochem. J., 93, 115, 1969.
20. Van Eerd J. and Kawasaki Y. In: Calcium binding protein. Warszawa—Amsterdam, 153—178, 1974.
21. Waser P. G. Biochim. et Biophys. Acta, 410, 267—270, 1979.
22. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406—4412, 1969.
23. Werber M. M., Caffein S. L. and Oplatka A. Mechanochem. Cell. Motility., 1, 91—96, 1972.
24. Yamamoto T., Takayi M., Nagai T. J. Physiol., 20, 424—432, 1970.

УДК 577.352

ДЕЙСТВИЕ МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ НА ПЛОСКИЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Л. Г. МИКАЕЛЯН, А. К. КАРАПЕТЯН, Е. И. КУРГИН

Изучено влияние местных анестетиков дибукаина, пропраналола, лидокаина на устойчивость в электрическом поле и проводимость бислойных липидных мембран. Показано, что все три анестетика увеличивают среднее время жизни мембран в 1,6—2,2 раза. Значение тангенса угла наклона зависимости плотности вероятности от времени жизни БЛМ на малых временах в логарифмических координатах равно 1,82, что указывает на появление второго энергетического барьера. Направление изменения проводимости мембран при аппликации местных анестетиков зависит от их концентрации, величины и длительности приложенного напряжения.

Изученные анестетики оказывают стабилизирующее влияние на структуру липидных мембран, однако в определенных условиях способны индуцировать в бислое потенциалзависимые каналы проводимости.

Ключевые слова: местные анестетики, фосфолипидные мембраны, электрическая проводимость.

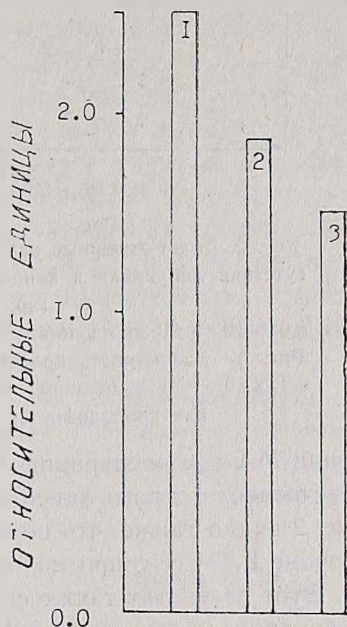
Известно, что местные анестетики (МА) оказывают стабилизирующее влияние на биологические мембраны, блокируя проведение нервного импульса и увеличивая осмотическую резистентность эритроцитов. С целью установления роли липидного матрикса биомембран в анестетическом эффекте во многих работах исследовалось взаимодействие МА с молекулами липидов на различных системах (монослоях, бислоях, везикулах и др.). Подробное обсуждение этих экспериментальных данных можно найти в работах Ландау [4] и Файнштейна [6]. Здесь отметим только наиболее характерные стороны действия МА на эти системы: конденсация монослоев, увеличение подвижности алифатических цепей молекул липидов и их дипольного момента, а также уменьшение отрицательного поверхностного заряда. На плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ) действие МА изучено недостаточно. В работе Гринфельда и Нарушевичуса [2] было обнаружено ступенчатое уменьшение сопротивления во времени БЛМ из яичного лецитина при одностороннем добавлении МА в водный раствор. Аналогичные данные были получены ранее Гуткнехтом и Тостесоном [8]. Необходимо отметить, что указанными авторами были использованы клинические концентрации МА.

В связи с малоизученностью вопроса о влиянии МА на плоские БЛМ, а также отсутствием данных об их действии на устойчивость этой липидной системы нами были предприняты настоящие эксперименты.

Материал и методика. Суммарные фосфолипиды мозга быка или крысы экстрагировались согласно Мюллеру с соавт. [9]. БЛМ формировали на отверстии диаметром 1 или 2 мм в перегородке тefлоновой камеры на границе двух водных растворов. Использовали 2%-ные растворы фосфолипидов в смеси растворителей *n*-декана и *n*-геп-

тана, взятых в соотношении 1:1 по объему. Небуферные водные растворы содержали 0,1 М хлорид натрия. В экспериментах использовали аптечные препараты МА, предназначенные для инъекций. Устойчивость БЛМ оценивали по среднему времени жизни τ при данном потенциале. Методика этих экспериментов, а также основы теории электрического разрушения БЛМ подробно изложены в работе Чизмаджева с соавт. [3]. Время жизни БЛМ τ регистрировали на запоминающем осциллографе С8-11. Напряжение на БЛМ подавали от генератора прямоугольных импульсов оригинальной конструкции, созданного в нашей лаборатории. Ток измеряли с помощью операционного усилителя «Кейтлы 301» в режиме фиксации напряжения и записывали на самопишущем приборе И37 с использованием усилителя И37. Время установления стрелки самописца—1 сек. В целях предотвращения влияния вибраций на электрические измерения экспериментальная камера вместе с экранирующим блоком была установлена на стальной плите массой 100 кг, подвешенной на стальной балке с помощью нейлоновых троссов согласно методической рекомендации Фиттиплейса и др. [7]. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Для получения данных об τ измеряли τ не менее 100 БЛМ.

Результаты и обсуждение. Исходя из специфики измерений τ БЛМ, последние формировали при наличии в водном растворе МА. Измерения начинали после полного почернения мембран, время которого составляло 5—15 минут. На гистограмме (рис. 1) представлены τ БЛМ относительно контроля, который был равен 85 мсек при потенциале 400 мВ. Из рис. 1 видно, что в присутствии МА τ БЛМ увеличивается в 1,6—2,2 раза. По эффекту стабилизации МА располагаются в следующем убывающем порядке: дибукаин, пропраналол, лидокаин. Таким образом, дибукаин и пропраналол, содержащие в своей структуре нафтильное кольцо, оказались наиболее эффективными стабилизаторами структуры БЛМ. Из этих данных следует также, что МА проявляют известное стабилизирующее действие и на БЛМ, не содержащие каких-либо специфических белковых молекул. Здесь важно отметить, что стабилизирующий эффект МА на БЛМ наблюдается при низких концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М.



Каким же образом МА стабилизируют структуру БЛМ? Точный механизм этого эффекта нам неизвестен, однако анализ функции распределения τ показал, что в присутствии МА эта функция на малых временах не является экспоненциальной—характерной для одностадийного процесса разрушения БЛМ в электрическом поле [1], но описывается параболой. Это указывает на появление второго энергетического барьера, преодолеваемого дефектом. Двухбарьерный процесс разрушения БЛМ в электрическом поле в наших экспериментах четко обнаруживается из значения тангенса угла наклона на кривой зависимо-

Рис. 1. Средние времена жизни БЛМ в присутствии 10^{-5} М а) дибукаина, б) пропраналола, в) лидокаина.

сти плотности вероятности от τ БЛМ в логарифмических координатах, близкого к 2. Таким образом, одним из факторов стабилизирующего действия МА на структуру БЛМ является появление второго энергетического барьера, природу которого предстоит выяснить.

МА оказывают влияние также и на проводимость БЛМ (данные по проводимости на остальных рисунках относятся только к дибукаину, однако качественно сходные результаты получены и для двух других МА). На рис. 2 представлены вольт-амперные характеристики (ВАХ) БЛМ в контроле (кр. 3) и при добавлении в один или оба отсека камеры дибукаина (кр. 1, 2, 4). ВАХ снимались после полного почернения мембран, а также через 20 мин после добавления МА. Как видно из рис. 2, ВАХ БЛМ как в контроле (3), так и при одностороннем добав-

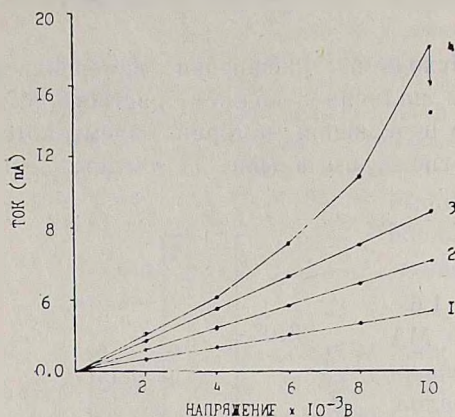


Рис. 2.

Рис. 2. Вольт-амперные характеристики БЛМ в контроле (кр. 3) и в присутствии дибукаина в концентрациях $1,66 \times 10^{-6}$ М (кр. 2), $3,32 \times 10^{-6}$ М (кр. 1), $6,64 \times 10^{-6}$ М (кр. 4).

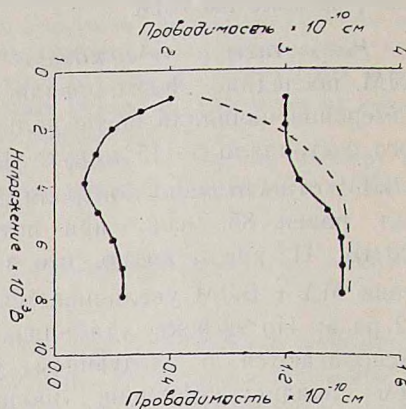


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость проводимости БЛМ от напряжения в присутствии $6,64 \times 10^{-6}$ М дибукаина, 1—максимальная проводимость, 2—минимальная проводимость, 3—дифференциальная проводимость.

лении МА в концентрации $1,66 \times 10^{-6}$ М, $3,32 \times 10^{-6}$ М (кр. 2 и 1 соответственно) строго линейны в пределах напряжений 0—100 мВ. Из рис. 2 видно также, что по мере увеличения концентрации МА на одной стороне БЛМ ее сопротивление увеличивается соответственно в 2 и 4 раза. Этот результат также свидетельствует о стабилизирующем действии дибукаина на структуру БЛМ. Иная картина наблюдается при выравнивании концентраций дибукаина по обе стороны от БЛМ (кр. 4). ВАХ мембраны становится нелинейной и проводимость ее резко возрастает, особенно при высоких напряжениях. На кр. 4 видно, однако, что при напряжении 100 мВ наблюдается резкий скачок проводимости БЛМ в сторону ее уменьшения (указано стрелкой). Если длительно измерять ток через БЛМ при этом напряжении, то проводимость БЛМ будет флуктуировать между двумя дискретными значениями. Этот результат указывает на то, что при данной концентрации дибукаина и данном напряжении в бислое происходят некие структурные изменения, которые обуславливают два значения проводимости. Эксперименты пока-

зали, что они носят необратимый характер. Это подтверждается тем, что если с БЛМ снять напряжение и повторно измерить ВАХ, то указанные флуктуации тока будут наблюдаться уже при более низких напряжениях ~ 40 мВ. При более высоких концентрациях дибукаина, $6,64 \times 10^{-6}$ М, внесенных в водный раствор симметрично к БЛМ, ток имеет сложный характер. На рис. 3 представлены зависимости максимальной, минимальной и дифференциальной проводимости (кр. 2, 1 и 3 соответственно) от напряжения. Видно, что дифференциальная проводимость резко возрастает с увеличением напряжения до 40 мВ и незначительно изменяется при дальнейшем повышении его. Напротив, базовая минимальная проводимость с ростом напряжения до 40 мВ резко уменьшается, а затем несколько увеличивается. Полученные данные указывают на то, что при взаимодействии достаточно низких концентраций МА с БЛМ протекают два процесса—уменьшение базовой проводимости и формирование структур, обеспечивающих высокую проводимость. Эти структуры являются, по-видимому, каналами, параметры которых существенно зависят от величины напряжения на БЛМ.

Уменьшение базовой проводимости БЛМ, по всей вероятности, является результатом конденсации монослоев, обусловленной уменьшением сил электростатического отталкивания между молекулами фосфолипидов в результате нейтрализации катионной формой анестетиков отрицательного поверхностного заряда. Другой процесс—формирование каналоподобных структур—может быть результатом «компартиментализации» нейтральных молекул МА, внедрившихся в бислои, и усиления фазового разделения липидов. Такое предположение не лишено основания, поскольку известно, что в липидных мембранах имеются участки сильного и слабого связывания молекул МА [5]. Если учесть, что БЛМ в наших экспериментах формировались из материала с гетерогенным фосфолипидным составом, то допущение о «компартиментализации» молекул МА станет более обоснованным.

На основании полученных данных можно сделать следующее заключение: МА оказывают стабилизирующее действие на структуру БЛМ; при низких концентрациях и в симметричных условиях они способны индуцировать каналоподобные структуры, параметры которых существенно зависят от напряжения на БЛМ.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

ՏԵԴԱՅԻՆ ԱՆՁԳԱՅԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ԱԶԻԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՐԹ ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Լ. Գ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Հ. Կ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ե. Ի. ԿՈՐԳԻՆ

Ուսումնասիրվել է տեղային անդալագուցիչների (ՏԱ)՝ դիբուկաինի, լիդոկաինի և պրոպարանոլի ազդեցությունը երկչերտ լիպիդային մեմբրանների (ԵԼՄ) էլեկտրական դաշտում կայունության և հաղորդականության վրա:

Ցույց է տրվել, որ ուսումնասիրված ՏԱ-ները 1.6—2.2 անգամ մեծացնում են ԵԼՄ-ի կյանքի միջին տևողությունը: ՏԱ-ի առկայության դեպքում առաջանում է երկրորդ էներգետիկական պատճենը: ԵԼՄ-ի հաղորդականության փոփոխման ուղղությունը կախված է ՏԱ-ի խտությունից, ինչպես նաև լարման

մեծությունից և տեղությունից: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ SL -ները կայունացնում են BL -ի կառուցվածքը, սակայն որոշակի պայմաններում երկշերտում առաջացնում են կառուցվածքային փոփոխություններ, որոնք էլ հանգեցնում են իոնային ուղիների առաջացման, իսկ վերջիններիս հաղորդականությունը կախված է պոտենցիալից:

THE ACTION OF LOCAL ANAESTHETICS ON THE PLANE PHOSPHOLIPID MEMBRANES

L. G. MIKAELIAN, H. C. CARAPETIAN, E. I. KURGIN

The influence of local anaesthetics (LA) dibucaine, lidocaine and propranolol on the BLM electrical conduction and stability in the electric field has been studied. It has been shown that all the three anaesthetics increase the average lifetime of BLM by 1,6—2,2 times. The value of tangent of dip angle of the dependence of density of probability on the lifetime of BLM in logarithmic coordinates is equal to 1,82, thus indicating the appearance of the second energetic barrier. The direction of BLM conduction change in case of LA application depends on their concentration, the magnitude and duration of the applied potential. The obtained data lead to the conclusion that LA stabilize the BLM structure, whereas under certain conditions they induce structural changes of bilayer, leading to the formation of ion canals, conduction of which is potential-dependent.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аракелян В. Б. Автореф. канд. дисс., М., 1980.
2. Гринфельдт А. Э., Нарушевичус Э. В. Сб. Биофизика мембран. Мат-лы симп., 2, Каунас, 1972.
3. Итоги науки и техники ВИНТИ. Биофизика мембран, 2, 161, 1981.
4. Ландау М. А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. М., 1981.
5. Boulanger Y., Schreier Sh., Leitch L., Smith L. Canad. J. Biochem., 58, 986, 1980.
6. Feinstein M. B. J. Gen. Physiol., 49, 1043, 1966 (b).
7. Fettiplace et al. In Methods in Membrane biology, N.—Y., 1975.
8. Gutknecht J., Tosteson D. C. J. Gen. Physiol., 55, 359, 1970.
9. Mueller P., Rudin D. In Laboratory Techniques in Membrane Biophysics, Berlin, 1969.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 578.088:547.963.4

ОБЪЕМНЫЙ ЭФФЕКТ В КОМПЛЕКСАХ $Cu(II)$ -БСА

Р. А. АСАТУРЯН

Объемный эффект, возникающий при взаимодействии $Cu(II)$ с бычьим сывороточным альбумином, изучен методом ЯМР (60 МГц). Наблюдаемая зависимость формы спектров ЯМР комплексов $Cu(II)$ —альбумин от концентрации $Cu(II)$ свидетельствует о конформационных изменениях белковой глобулы.

Ключевые слова: контактное взаимодействие, неспаренный электрон, время релаксации.

При интоксикации живого организма металлами в результате превышения физиологических значений важно понимание механизма их взаимодействия с плазмой крови, основным транспортным белком ее — сывороточным альбумином.

В работе Катца с сотр. [5] микрокардиологическим методом был обнаружен объемный эффект при взаимодействии Cu(II) с глобулярными белками — овалбумином и бычьим сывороточным альбумином (БСА): при увеличении концентрации Cu(II) наблюдалось увеличение объема БСА. Авторы выдвинули предположение, что наблюдаемый эффект может быть вызван конформационными изменениями БСА, однако никаких экспериментальных доказательств не было представлено.

Цель нашей работы состояла в подтверждении указанного предположения. Для этого нами был применен метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Материал и методика. Использовались лиофильно высушенный препарат БСА Олайнского завода химреактивов и соль $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ марки «чфа».

Комплексы Cu(II) -БСА готовились по методике, описанной в работе Бреслоу [4]. Ионная сила составляла 0,16 М KCl в 99,8% D_2O . Концентрация БСА — $1,6 \cdot 10^{-3}$ М. Значения pD раствора измеряли на рН-метре «рН-673». Буферные растворы нами не использовались во избежание образования тройных комплексов: Cu(II) —БСА—буфер [4]. Спектры ЯМР комплексов Cu(II) —БСА регистрировались при $34 \pm 1^\circ$ на ЯМР-спектрометре (60 МГц) фирмы «Varian» (США) типа «Т-60».

В качестве внешнего стандарта использовали ТМС (тетраметилсилан).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены спектры ЯМР БСА («а») и его комплексов с Cu(II) при стехиометрии моль Cu(II) :

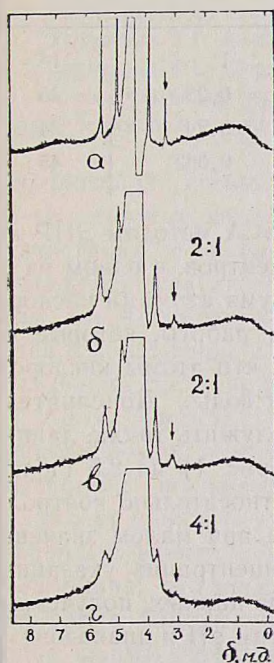


Рис. 1. Спектры ЯМР БСА и его комплексов с Cu(II) в 0,16 М KCl 99,8% D_2O при 34° : а — контроль (БСА), $\text{pD}=7,58$; б — комплексы Cu(II) —БСА состава 2:1, $\text{pD}=7,83$; в — комплексы Cu(II) —БСА состава 2:1, $\text{pD}=7,12$; г — комплексы Cu(II) —БСА состава 4:1, $\text{pD}=7,48$. Стрелки указывают на положение пика боковой полосы сигнала ЯМР от протонов NOD.

моль БСА, равной 2:1 («б») и («в») и 4:1 («г»). В спектре «а» можно выделить две части, одну, связанную с растворителем, другую — с белком. Спектр БСА, связанный с водой, представляет собой центральную

линию от протонов НОД при значении химического сдвига δ около 4,5 м. д. В связи с вращением образца (для усреднения неоднородности поля) по обе стороны этого сигнала наблюдаются его боковые полосы, интенсивность которых изменяется по мере добавления Cu(II) . В спектре «б» при $pD=7,83$ и отношении концентрации Cu(II) к БСА, равном 2:1, относительная интенсивность пика, отмеченного стрелкой, уменьшается примерно в 4 раза по сравнению с контрольным спектром «а». Такое же уменьшение наблюдается в спектре «в» при $pD=7,12$ той же стехиометрии. Увеличение этого отношения до 4:1 приводит к дальнейшему уменьшению интенсивности этого пика в 16 раз по сравнению с контролем.

Эти изменения спектров ЯМР наряду со смещением вправо центра спектра ЯМР этих комплексов относительно контроля и уширением сигнала с увеличением концентрации Cu(II) (табл.) могут быть обусловлены, на наш взгляд, контактным взаимодействием между магнитным моментом неспаренного электрона атома Cu(II) и протонами молекул НОД, приводящим к укорочению времен релаксации протонов молекул НОД [2, 3, 6].

Таблица

Зависимость параметров центральной части спектров ЯМР комплексов Cu(II) —БСА от концентрации Cu(II) в области нейтральных значений pD

Исследуемый образец в 0,16М КСl, 99,8% D_2O	Значение pD	Моль Cu(II) : Моль БСА	Смещение центра спектра ЯМР относительно контро- ля, Гц	Относительная интенсивность боковой ком- поненты от протонов НОД	Ширина центральной части спек- тра ЯМР, Г
БСА — контроль	7,50	0:1	0	1	14
Комплекс Cu(II) — БСА	7,83	2:1	2,5	0,23	35
Комплекс Cu(II) — БСА	7,12	2:1	5,3	0,24	34,6
Комплекс Cu(II) — БСА	7,48	4:1	7,5	0,062	45

Ранее при исследовании комплексов Cu(II) —БСА методом ЭПР нами были обнаружены два типа связывающихся центров, в одном из которых Cu(II) связан с двумя атомами азота и двумя атомами кислорода [1]. Основываясь на результатах настоящей работы, которые дополняют эти данные, можно однозначно считать, что атомы кислорода в этом типе комплексов принадлежат молекулам воды. Дополнительным основанием для такого утверждения могут служить также данные (табл.) о смещении вправо центра спектра «б» (рис. 1) на 2,5 Гц при $pD=7,83$ и спектра «в» на 5,3 Гц при $pD=7,12$ относительно контрольного спектра «а». Увеличение смещения спектра при малом значении pD можно объяснить тем, что относительная концентрация указанных комплексов, связанных с водой, как это следует из данных, полученных методом ЭПР [1], монотонно уменьшается с ростом pH в диапазоне от 6,5 до примерно 9,5. В связи с этим увеличение значения этого смещения вправо в спектрах ЯМР с понижением pD указывает на повышение концентрации этих комплексов.

На рис. 2 представлены спектры ЯМР БСА и его комплексов с Cu(II) , не связанных с растворителем, выделенные из рис. 1.

В области поглощения протонов ароматических аминокислот гистидина, тирозина, фенилаланина и триптофана от 6,6 до 7,6 м. д. наблюдаются некоторые изменения при добавлении Cu(II) относительно контроля. На этом же рисунке стрелками показаны области поглоще-

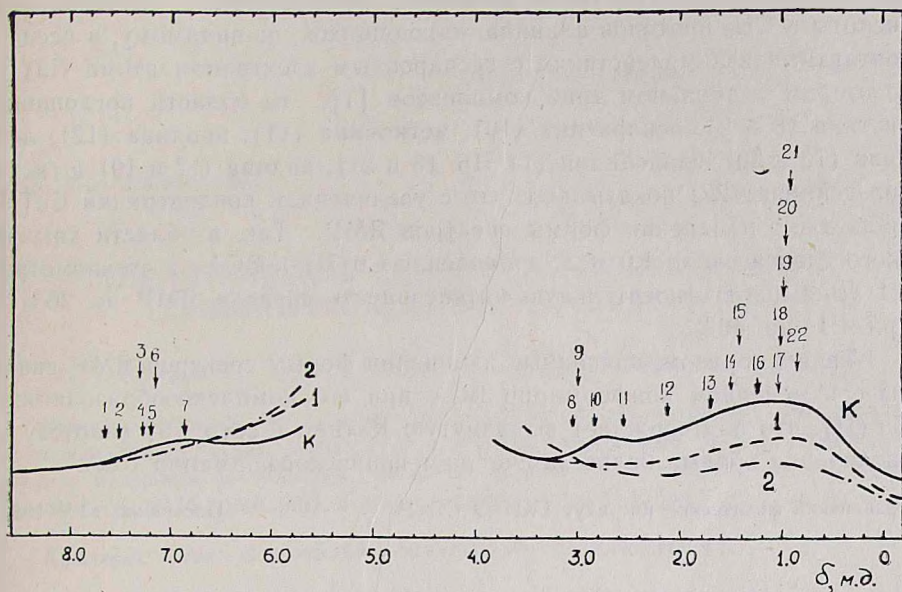


Рис. 2. Спектры ЯМР из рис. 1, наложенные друг на друга, без центральной части, связанной с протонами HOD : к—контрольный спектр ЯМР БСА, $\text{pD}=7,58$; 1—спектр комплексов Cu(II) —БСА при $\text{pD}=7,83$ и стехиометрии 2:1; 2—спектр комплексов Cu(II) —БСА при $\text{pD}=7,48$ и стехиометрии 4:1. Стрелками показаны положения химических сдвигов протонов отдельных групп различных аминокислот, не находящихся в контактных и псевдоконтактных взаимодействиях с неспаренным электроном Cu(II) .

ния протонов ароматического кольца триптофана (1—5) и тирозина (6—7), которые не находятся в контактных и псевдоконтактных взаимодействиях с неспаренным электроном атома Cu(II) [6]. Области поглощения, связанные с гистидином и фенилаланином, нами не показаны, так как атом азота N(3) имидазольного кольца гистидина находится в контактном взаимодействии с Cu(II) как в первом типе центра связывания, так и во втором [1].

Ароматическое кольцо фенилаланина, занимая положение 19 в аминокислотной последовательности белка (БСА), находится рядом с гистидином (положение 18), связанным с Cu(II) [8]. Это, по-видимому, может привести к псевдоконтактному взаимодействию [2] между неспаренным электроном Cu(II) и протонами ароматического кольца фенилаланина, что проявится в уширении линий при значениях поглощения фенилаланина около 7,4 м. д. В связи с этим наблюдаемые изменения формы спектров ЯМР в области химических сдвигов от 6,6 до 7,6 м. д. должны быть обусловлены изменением конформации БСА при добавлении Cu(II) вблизи триптофанных и тирозиновых аминокислот.

Рассмотрим область поглощения аминокислот БСА при значениях химических сдвигов от 0,9 до 3,0 м.д. Если исключить области поглощения CH_2 протонов гистидина и аспарагиновой кислоты, CH_3 протонов треонина, с которыми атомы Cu(II) непосредственно образуют стабильные комплексы [7], CH_2 групп лизина, находящегося вблизи центрального атома Cu(II) в этом же типе комплексов [8], а также области поглощения CH_2 групп аргинина, фенилаланина, глутаминовой кислоты и CH_3 протонов аланина, находящихся, по-видимому, в псевдо-контактных взаимодействиях с неспаренным электроном атома Cu(II) во втором лабильном типе комплексов [1], то области поглощения цистина (8 и 9), аспарагина (10), метионина (11), пролина (12), лейцина (13 и 20), изолейцина (14—16, 18 и 21), валина (17 и 19) и гистидил-лейцина (22) показывают, что с увеличением концентрации Cu(II) происходят изменения формы спектров ЯМР. Так, в области химического сдвига около 1,0 м.д. добавление Cu(II) к БСА в стехиометрии 2:1 уменьшает относительную интенсивность сигнала ЯМР на 26%, а при 4:1—на 46%.

Таким образом, описанные изменения формы спектров ЯМР связаны с изменением конформации БСА при его комплексообразовании с Cu(II) , что подтверждает выдвинутую Катцем с сотр. [5] гипотезу об увеличении объема белка за счет изменения конформации БСА.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

ՄԱՎԱԼԱՅԻՆ ԷՖԵԿՏԸ Cu(II) -ՑՇԱ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐՈՒՄ

Ռ. Ա. ԱՍԱՏՈՒՐՅԱՆ

Cu(II) -ի և ցլի շիճուկի ալբումինի (ՑՇԱ) փոխազդեցության ժամանակ առաջացող ծավալային էֆեկտն ուսումնասիրվել է ՄՄՌ-ի մեթոդով (60 ՄՀց) Cu(II) —ՑՇԱ կոմպլեքսների ՄՄՌ-ի սպեկտրների ձևի նկատվող կախվածությունը Cu(II) -ի խտությունից վկայում է սպիտակուցային գլոբուլայի կոնֆորմացիոն փոփոխությունների մասին:

VOLUME EFFECT IN Cu(II) — BSA COMPLEXES

R. A. ASATURIAN

The volume effect arising during the interaction of Cu(II) with bovine serum albumin has been studied by the NMR (60 MHz) method. The observed dependence of the NMR spectra shape of Cu(II) — albumin complexes on the Cu(II) concentration testifies to conformation changes of the protein globule.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асатурян Р. А. Тез. I Всесоюзн. биофиз. съезда, 4, 3, М., 1982.
2. Итон Д. Р., Филиппс В. Д. Ж. структ. химии, 9, 153—183, 1968.

3. Тиеззи Е., Валенсин Д. Биофизика, 21, 401—408, 1976.
4. Breslow E. J. Biol. Chem., 239, 3252—3259, 1964.
5. Katz S., Shinaberry S. G., Heck E. Z., Squire W. Biochem., 19, 3805—3813, 1980.
6. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736—3742, 1963.
7. Peters T. Jr., Blumenstock F. A. J. Biol. Chem., 242, 1574—1578, 1967.
8. Shearer W. T., Bradshaw R. A., Gurd F. R. N. J. Biol. Chem., 242, 5451—5459, 1967.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 616—073:577.15.087

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В РАСТВОРАХ

А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН, Ц. М. АВАКЯН

Описана аналитическая система для определения концентрации β -D-глюкозы в различных биологических растворах с отдельным электронным блоком. Воспроизводимость измерений не ниже 5%, линейный диапазон определяемых концентраций—10—400 мг% (0,55÷22,0 мМ), время отклика— не более 40 сек.

Ключевые слова: глюкоза, иммобилизованная глюкозооксидаза.

Глюкоза является самым универсальным источником углерода и энергии для живых организмов. Нарушение ее концентрации в крови обычно свидетельствует о патологическом состоянии организма. Она является также важнейшим компонентом питательных сред при ферментации микроорганизмов. Количество глюкозы в ряде сельскохозяйственных культур влияет на качество изготавливаемых пищевых продуктов. Поэтому понятно, что быстрое и точное определение концентрации глюкозы в биологических растворах крайне актуально. Применяемые в широкой аналитической практике методы ее определения в полной мере не отвечают требованиям быстроты, точности и, что очень важно, специфичности определений, предъявляемых в настоящее время при решении многих задач. Единственным методом, отвечающим требованиям высокой специфичности и точности измерений, является ферментативный метод определения концентрации глюкозы [1]. Однако широкому распространению его до недавнего времени препятствовала неэкономичность проводимого анализа, связанная с невозможностью многократного использования фермента.

Методы иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях, разработанные в последние два десятилетия, позволили преодолеть эти трудности. Были созданы аналитические системы для полуавтоматического и автоматического определения концентрации глюкозы [3—5]. Использование различных ферментов в таких системах позволяет определять концентрации целого ряда органических веществ в многокомпо-

нентных растворах. Результаты исследований в этой области приведены в монографиях [2, 3].

Цель настоящей работы состояла в разработке аналитической системы, способной специфично и быстро определять концентрацию β -D-глюкозы в различных биологических жидкостях.

Материал и методика. В работе использовался фермент глюкозооксидаза (ГОД) (КФ 1.1.3.4.) производства Олайнского объединения «Биохимпрепарат». Имобилизацию ГОД осуществляли на силиохроме С-120 производства Ставропольского завода химреактивов и люминофоров и силикагелях производства ЕрОНеМ ВНИИ ИРЕА по методике Робинсона [9]. Кислородный электрод изготовлялся по методике Ли и Цао [8], в качестве электродной пары применяли пару платина—серебро, корпус электрода изготовляли из органического стекла. В качестве мембраны использовали мембрану марки «ФТ» толщиной 10 мк. Элюцию проводили либо фосфатным буфером с рН 6,5, либо дистиллированной водой. Калибровочные растворы глюкозы приготавливались из 40%-ного стерильного раствора глюкозы. Регистрацию сигнала кислородного электрода осуществляли с помощью полярографа LP-60 или используя специально разработанный для этой цели электронный блок, имеющий выход на цифровой вольтметр или самописец.

Результаты и обсуждение. Амперометрическая аналитическая система для определения концентрации глюкозы представляет собой конструктивно объединенный в одно целое иммобилизованный ферментный препарат и ионселективный электрохимический датчик, регистрирующий изменение концентрации электрохимически активного продукта ферментативной реакции. Конструкция и особенности работы аналитической системы зависят от конкретных целей, для достижения которых создается система, и могут быть реализованы либо в виде погружаемого ферментного электрода, в котором фермент иммобилизован прямо на электрохимическом датчике, либо в виде проточного реактора с вытеснением. Мы использовали реактор с вытеснением, представляющий собой колонку из оргстекла длиной 110 мм и внутренним диаметром 4 мм. Колонку заполняли носителем с иммобилизованной ГОД и через нее с постоянной скоростью 5 мл/мин прокачивался либо стандартный буферный раствор, либо дистиллированная вода. На выходе камеры помещался кислородный мембранный электрод. Исследуемый образец инжестрировался в нижней части камеры через устройство для ввода образца.

Рассмотрим наиболее существенные моменты в работе такой аналитической системы. Важнейшим в работе устройств подобного типа является ввод образца в систему. Во-первых, количество вводимого образца должно быть строго стандартизировано, так как от этого существенным образом зависит воспроизводимость результатов измерений. Этого можно достичь использованием автоматизированных пипеток, которые обеспечивают ввод точно отмеренного количества исследуемой пробы. Во-вторых, очень важны выбор метода введения образца в колонку и способ разделения образцов. Ряд авторов [6, 7] предлагают отделять образцы друг от друга и вводить их в систему с помощью перистальтического насоса, который сегментирует воздухом поток жидкости, отделяя образцы, и засасывает необходимое количество субстрата. Однако исследования последних лет [10] показали, что наиболее

надежно инжектирование образца вдвигающийся несегментированный воздухом проток реакционной смеси. Именно поэтому и мы применили инжектирование образца в нижней части колонки через отверстие, закрываемое упругой резиновой перегородкой.

Другим важным моментом является устройство камеры детектирования, в которой прореагировавшая смесь поступает к чувствительному элементу.

Нам удалось сконструировать камеру детектирования, в которой обеспечивается как равномерная подача раствора к измерительному электроду, так и предварительное перемешивание раствора. Это позволило добиться хорошей воспроизводимости результатов измерений, важным условием которой является равномерное перемешивание образца с буферным раствором до того, как образец достигнет иммобилизованного фермента. Как уже отмечалось, инжектирование образца в проток дает достаточно хорошие результаты. Перемешивание в этом случае осуществляется за счет турбулентности потока. В результате воспроизводимость измерений в нашей системе не ниже 5%.

Калибровочный график для модельных растворов приведен на рис., из которого видно, что линейность определяемых концентраций на-

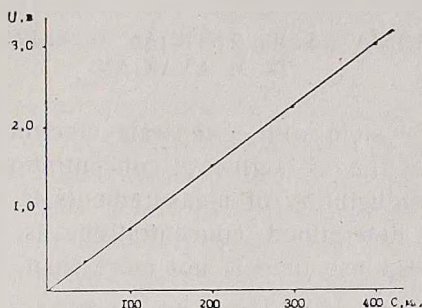


Рис. Калибровочная кривая по стандартным растворам глюкозы. По оси ординат отложена величина сигнала на выходе электронного блока, по оси абсцисс—концентрация—Д-глюкозы в калибровочных растворах.

ходится в пределах 10—400 мг% (0,55—22,0 мМ). Время отклика системы зависит от скорости потока, объема реактора, не занятого ферментом, времени отклика кислородного электрода. В нашей системе время отклика—30—40 сек, время полного анализа образца 1,5—4 мин. Оба эти параметра варьируют в зависимости от концентрации субстрата.

Испытания на специфичность аналитической системы показали, что она реагирует только на β-D-глюкозу, в то время как α-D-глюкоза, мальтоза, фруктоза, глюкозо-6-фосфат, сахароза практически не дают отклика.

Предварительные испытания показали принципиальную возможность применения данной системы для анализа культуральной жидко-

сти, определения концентрации глюкозы в плазме крови, моче и других жидких средах.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 13.V 1983 г.

ԱՆԱԼԻՏԻԿ ՍԻՍՏԵՄ ԼՈՒՄԻՆՅՈՒՆԵՐՈՒՄ ԳԼՅՈՒԿՈԶԱՅԻ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՅԻԱՅԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ա. Լ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ս. Շ. ԹԱԹԻԿՅԱՆ, Գ. Է. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Մ. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ

Նկարագրված է տարբեր կենսաբանական լուծույթներում β -D-գլյուկոզայի կոնցենտրացիայի որոշման համար նախատեսված առանձին էլեկտրոնային բլոկով անալիտիկ սխեմա: Չափումների վերարտադրողականությունն է 5%-ից ոչ պակաս, որոշվող կոնցենտրացիաների գծային տիրույթը 10—400 մգ % է ($0,55 \pm 22,0$ մՄ), արձագանքման ժամանակը ազելի չէ 40 վրկ-ից:

ANALYTICAL SYSTEM FOR DETERMINATION OF GLUCOSE CONCENTRATION IN SOLUTIONS

A. L. SIMONIAN, S. Sh. TATIKIAN, G. E. KHACHATRIAN,
Ts. M. AVAKIAN

An analytical system with a separate electron unit is described for the determination of the β -D-glucose concentration in various biological solutions. The reproducibility of measurements is in terms of 5%, the linear range of the determined concentrations is 10—400 mg% ($0,55 \pm 16,5$ mM), the response time is not more than 40 seconds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Достижения в клинической ферментативной диагностике. М., 1977.
2. Имобилизованные ферменты. М., 1976.
3. Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс, 1981.
4. Ралис Э. В., Кулис Ю. Ю., Краняускас В. И., Швирмицкас Г. С. Методы определения ферментативной активности и их унификация. Вып. 4, Вильнюс, 1979.
5. Bauman E. K., Goodson L. H. Anal. Chem., 37, 11, 1965.
6. Campbell J., Chang T. M. S. Biochem. Biophys. Acta, 397, 1975.
7. Guilbault G. G. In: Comprehensive Anal. Chem., Amsterdam, 8, 1977.
8. Lee Y. H., Tsao G. T. Adv. Biochem. Eng., 13, 35, 1977.
9. Robinson P. J., Dunill P., Lilly M. D. Biochem. Biophys. Acta, 242, 659, 1979.
10. Wolff Ch.-M., Motolla H. A. Anal. Chem., 50, 1, 1978.

УДК 577.151.01

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА СИЛИКАГЕЛЯХ

А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН,
Т. А. ГАСПАРЯН, Г. И. АЙВАЗЯН

Исследована пригодность ряда новых силикагелей для иммобилизации глюкозооксидазы. Сделан вывод о возможности их использования в проточных аналитических системах.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, иммобилизация на силикагелях.

Методы иммобилизации ферментов в последнее время получили широкое распространение в связи с тем, что при иммобилизации существенно повышаются стабильность действия ферментов во времени, термоустойчивость, устойчивость к микробным атакам, появляется возможность их многократного использования [3]. Это практически позволяет использовать ферменты для биологической трансформации одних органических соединений в другие, а также применять их в аналитических системах.

В зависимости от назначения иммобилизованных ферментов к носителям предъявляются те или иные требования. В частности, носители, используемые в проточных аналитических системах, должны обладать следующими свойствами: иметь достаточно развитую поверхность, обладать определенной механической прочностью, быть гидрофильным, устойчивым к разрушению бактериями, в случае пористых носителей поры должны иметь достаточные размеры для обеспечения наиболее эффективного связывания фермента и свободного доступа субстрата к ферменту. Кроме того, существенное значение имеют гидродинамические свойства носителей. Наиболее полно, по-видимому, всем перечисленным требованиям удовлетворяют силикатные носители [2]. Несмотря на большое число работ, посвященных методам иммобилизации широкого набора ферментов на различных носителях [4, 5], выбор оптимальных условий иммобилизации во многом еще остается эмпирическим, а результат труднопредсказуемым. Поэтому при работе как с новым носителем, так и с новым ферментом требуется тщательная отработка всех условий иммобилизации.

Целью настоящей работы явилось исследование оптимальных условий иммобилизации глюкозооксидазы (ГОД) (КФ 1.1.3.4.) для применения в проточной аналитической системе.

Материал и методика. В работе использовались силикагели, разработанные в ЕрОНем ВНИИ ИРЕА. Характеристики использованных носителей приведены в табл. 1. Модификацию носителя осуществляли по методу Робинсона [6]. Навеску силикагеля обрабатывали 5%-ным раствором γ -аминопропилтриэтоксисилана (АГМ-9) в ацетоне. Излишек раствора сливали и силикагель выдерживали в термостате 24 ч при температуре 45°. Затем тщательно отмывали его ацетоном и водой. С целью

активации носителя силикагель обрабатывали 2,5%-ным раствором бифункционального реагента—глутаровым диальдегидом—в течение 45 мин при перемешивании. Несвязавшийся диальдегид отмывали большим количеством дистиллята. Иммунизацию ГОД проводили в 0,01 М фосфатном буфере, pH 6,4, при комнатной температуре. Количество связанного фермента оценивали, измеряя несвязавшийся белок по методу Лоури. Об активности связавшегося фермента судили по количеству образовавшейся перекиси водорода, определяемой модифицированным пероксидазным методом [1]. Стабильность иммобилизованного фермента во времени изучали в проточном реакторе с использованием мембранного кислородного электрода Кларка.

Результаты и обсуждение. Существенным фактором при иммобилизации ферментов является количество реакционноспособных групп на поверхности носителя. При модификации силикагеля с помощью АГМ-9 на поверхности носителя образуются аминокгруппы. Понятно, что их количество будет существенным образом влиять на процесс иммобилизации. Поэтому количество аминокгрупп оценивалось с помощью пиридоксальфосфата (ПЛФ). ПЛФ, образуя Шиффовы основания, эквимольно связывается с аминокгруппами на поверхности носителя. Определяя спектрофотометрически убыль ПЛФ в растворе при 387,5 нм, можно оценить количество аминокгрупп. Для этого носитель, помещенный в 0,01 М раствор ПЛФ в натрийацетатном буфере с pH 6,5, инкубировали в темноте в течение 2 часов. Наибольшее число аминокгрупп было обнаружено на силикагеле № 7 (200 мкмоль на 1 г).

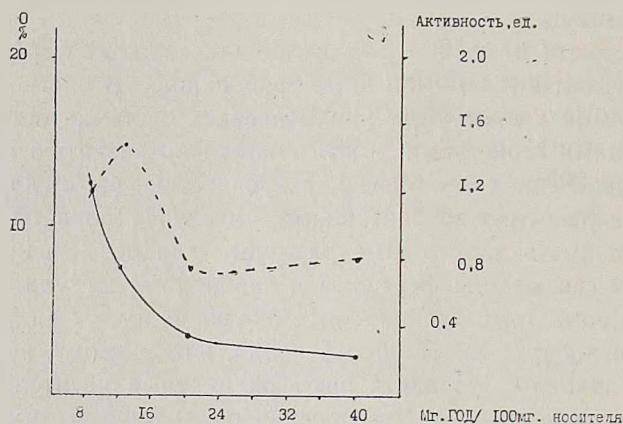


Рис. Активность иммобилизованных препаратов при разных соотношениях фермент/носитель. — процент сохранения активности при иммобилизации; — — — активность препаратов на 1 мг носителя.

Для нахождения наилучших условий иммобилизации необходимо было выяснить оптимальное соотношение количества фермента и носителя. Полученные результаты приведены в табл. 2, из которой видно, что при всех соотношениях фермент/носитель ГОД лучше всего связывается с силикагелем № 7, поэтому все дальнейшие исследования проводились с использованием этого силикагеля. Необходимо особо отметить, что при применении иммобилизованного фермента важно не только количество связавшегося белка, но и высокий процент сохранения активности. На рис. приведены данные, подтверждающие это положение. Видно, что при повышении соотношения фермент/носитель

процент сохранения активности падает, а активность на 1 мг носителя достигает максимума при соотношении 12/100. Поэтому нецелесообразно работать при более высоких соотношениях.

Как уже упоминалось выше, одной из важнейших характеристик работы иммобилизованного фермента является его стабильность во времени. Измерения активности проводились в проточном аналитическом реакторе, причем следует отметить, что исследуемый препарат постоянно хранился при комнатной температуре в рабочем реакторе и ежедневно проводилось в среднем около двадцати измерений различных образцов, содержащих глюкозу. Как показали измерения, 80% активности фермента сохраняется в течение более чем 2-х месяцев, что не уступает результатам работ других авторов [2].

Таблица 1
Основные характеристики силикагелей производства ЕрОНеМ ВНИИ ИРЕА

№ марки	Средний размер пор, А	Удельная поверхность, м ² /г	Плотность, г/см ³
1	1000	72	0, 0
3	450	170	0,22
7	230	320	0,23

Таблица 2
Связывание глюкозооксидазы на силикагелях № 3, 7 при разных соотношениях фермент/носитель, мг/100 мг

№ марки силикагеля	Соотношение Е/носитель	Связывание, %	Количество связавшегося Е, мг
3	4	37,5	1,5
7	4	62,5	2,5
3	8	55,0	4,4
7	8	70,0	5,5
3	16	25,3	4,2
7	16	53,8	8,6
3	20	27,5	5,5
7	20	59,0	11,6

Таким образом, из приведенных данных видно, что силикагель № 7 обладает достаточно удовлетворительными характеристиками, позволяющими использовать его в качестве носителя в проточных аналитических системах.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР,
лаборатория радиационной биофизики

Поступило 13.V 1983 г.

ԳԼՅՈՒԿՈՋՕՔՍԻԴԱԶՅԻ ԻՄՄՈԲԻԼԻԶԱՑԻԱՆ ՍԻԼԻԿԱԳԵԼԵՐԻ ՎՐԱ

Ա. Լ. ՄԻՄՈՆՅԱՆ, Ս. Շ. ԹԱԹԻՎՅԱՆ, Գ. Է. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ, Տ. Ա. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ,
Գ. Ի. ԱՅՎԱԶՅԱՆ

Հետազոտված է Երևանի անօրգանական նյութերի բաժնի կողմից մշակված մի շարք նոր սիլիկագելերի պիտանիությունը գլյուկոզօքսիդազայի իմմոբիլիզացիայի համար: Ցույց է տրված, որ №7 սիլիկագելն ըստ իր բնութա-

գրերի ամենահարմար կրիչն է հոսուն անալիտիկ համակարգերում կիրառման համար: Որոշված է իմմոբիլիզացիայի պայմանների ազդեցությունը պրեպարատի ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ 2 ամսվա ընթացքում պահպանվում է սկզբնական ակտիվության 80%-ը

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON SILICAGELS

A. L. SIMONIAN, S. Sh. TATIKIAN, G. E. KHACHATRIAN,
T. A. GASPARIAN, G. I. AIVAZIAN

The use of a number of new silicagels developed at the Yerevan Department of Inorganic Materials of the All-Union Institute of Reagents for the immobilization of glucose oxidase has been investigated. It has been shown that the silicagel original preparation (№ 7) is the most convenient carrier for the use in flowing analytical systems. The influence of the immobilization conditions on the preparation activity has been determined. The preparation preserves the 80% of its initial activity for two months.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Достижения в клинической ферментативной диагностике, М., 1977.
2. Жагат Р. А., Карсакевич А. С. Успехи биологической химии. М., 1977.
3. Иммуобилизованные ферменты. М., 1976.
4. Dinnel D. Hindustan Antibiotics Bulletin., 20, 3—4, 1978.
5. Muronetz V. J., Zueva V. S., Nagradova N. K. FEBS Letters, 107, 2, 1979.
6. Robinson P. J., Dinnill P., Lilly M. D. Biochem. Biophys. Acta, 242, 659, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 616.45—001.1/3:612.397.2+577.161.3

ПРОЦЕСС ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И УРОВЕНЬ α-ТОКОФЕРОЛА В ТКАНЯХ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АКУСТИЧЕСКОГО СТРЕССА

М. М. МЕЛКОНЯН, В. Г. МХИТАРЯН, Е. А. МЕЛИК-АГАЕВА, А. А. РУХКЯН

В условиях акустического стресса наблюдается изменение интенсивности ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов и содержания α-токоферола в гомогенатах мозга, печени, сердца, а также в эритроцитарных мембранах и плазме крови белых крыс. Интенсивность сдвигов зависит как от вида исследуемой ткани, так и сроков воздействия. Изменения наиболее выражены в сердце. Наблюдается определенная зависимость между уровнем перекисного окисления липидов и содержанием α-токоферола в исследуемых тканях.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, α-токоферол, акустический стресс.

В эпоху научно-технической революции, которую переживает человечество, трудно переоценить влияние шума, сопровождающего человека повсеместно.

Морфологические, физиологические, гистохимические, клинические исследования [1, 7] свидетельствуют о значительном повреждающем действии акустического стресса. В связи с этим большое значение приобретает изучение общепатологических реакций, связанных с воздействием этого фактора. В последнее время процессам свободнорадикального окисления, которые непрерывно протекают в норме во всех тканях живых организмов и при их низкой интенсивности, являются одним из типов нормальных неспецифических метаболических процессов, отводится особая роль [3]. В обычных условиях этот процесс строго лимитирован. Однако избыточное перекисное окисление липидов (ПОЛ) разрушительно действует на клеточные мембраны, вследствие особенностей их химического строения, приводя к изменению проницаемости, меняя активность целого ряда мембраносвязанных ферментов, вызывая дезинтеграцию внутриклеточных структур, окисление и полимеризацию низкомолекулярных внутриклеточных компонентов и макромолекул [3], и поэтому играет важную роль в механизмах клеточного повреждения. Исследованиями ряда авторов показано, что действие различных экстремальных факторов на организм вызывает интенсификацию ПОЛ в тканях [4—6]. В этом аспекте представляет интерес изучение интенсивности ПОЛ и уровня одного из важнейших эндогенных антиоксидантов— α -токоферола в тканях белых крыс в условиях акустического стресса.

Материал и методика. Эксперименты проводились на беспородных белых крысах-самцах массой 180—220 г, содержащихся в обычных условиях вивариума. Подопытные животные подвергались воздействию широкополосного шума с уровнем 97 дБА со сплошным спектром частот 63—12000 гц и максимальной энергией в области средних и высоких частот. Средки воздействия—15 мин, 2 ч, 7, 28, 56 дней ежедневно по 2 часа. Животных забивали декапитацией. Ткани перфузировали ледяным 0,154 М KCl. Все операции проводили на холоду. Эритроцитарные мембраны выделяли по Лимберу [13]. Белок в исследуемом материале определяли по Лоури [14].

Активность систем ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) за 30 мин инкубации, о количестве которого судили по реакции с тиобарбитуровой кислотой. При исследовании неферментативного аскорбатзависимого ПОЛ (АЗП) инкубационная среда объемом 1,2 мл содержала по 0,3 мл 40 мМ трис-HCl, pH 7,4; 0,8 мМ аскорбата, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора. В случае с НАДФ-Н зависимым ПОЛ (НЗП)— $2 \cdot 10^{-4}$ М пирогосфата натрия, $12 \cdot 10^{-6}$ М соли Мора, 1 мМ НАДФ-Н. В обоих случаях 10%-ные гомогенаты тканей и мембраны эритроцитов добавлялись из расчета 1,5—2,0 мг белка на 1 мл инкубационной среды. Содержание липидных перекисей выражали в нМоль МДА на 1 мг белка. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5$ М см⁻¹ [3].

Содержание α -токоферола в исследуемом материале определяли флуорометрически по методу Дуггана с максимумом возбуждения при 295 нм и флуоресценции при 330 нм [10]. Данные приведены в мкг/мг белка.

Уровень ПОЛ и содержание α -токоферола определяли в гомогенатах мозга, печени, сердца, мембранах эритроцитов, плазме крови.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований свидетельствуют о том, что уже через 15 мин от начала воздействия и по истечении 2-х ч наблюдается стойкое снижение содержания α -токоферола в сердце. В мозге кратковременное снижение через 15 мин после воздействия сменяется почти полным возвратом к исходному уровню через 2 ч, тогда как плазма, эритроцитарные мембраны и печень значительно

обогащаются им (рис. 1). АЗП и НЗП при этом подавляются в мозге и эритроцитарных мембранах; в печени, после подавления через 15 мин после воздействия, активируется к 2 часам; в сердце незначительно подавляется АЗП и усиливается НЗП (рис. 2, 3). Наблюдаемые сдви-

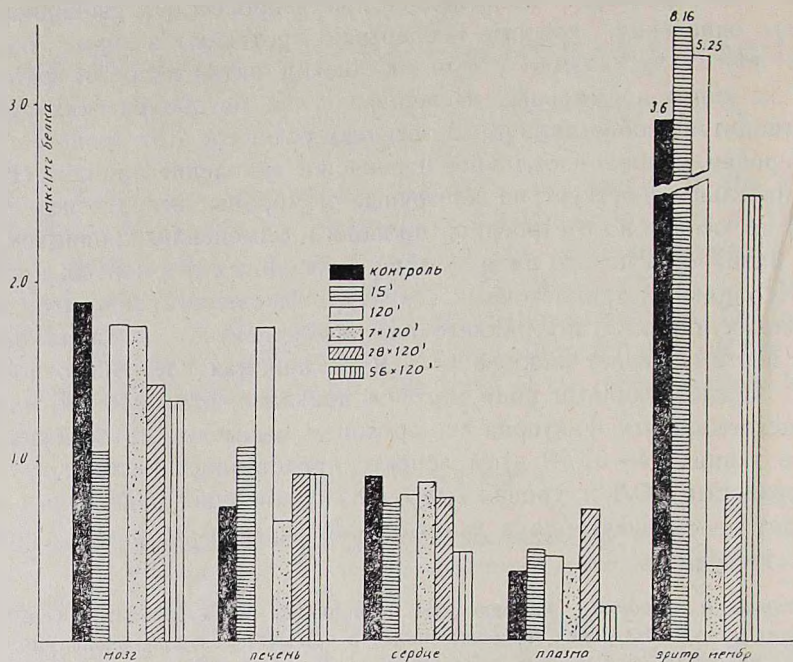


Рис. 1. Уровень α -токоферолa в гомогенатах тканей белых крыс в условиях акустического стресса, $\mu\text{г/мг}$ белка.

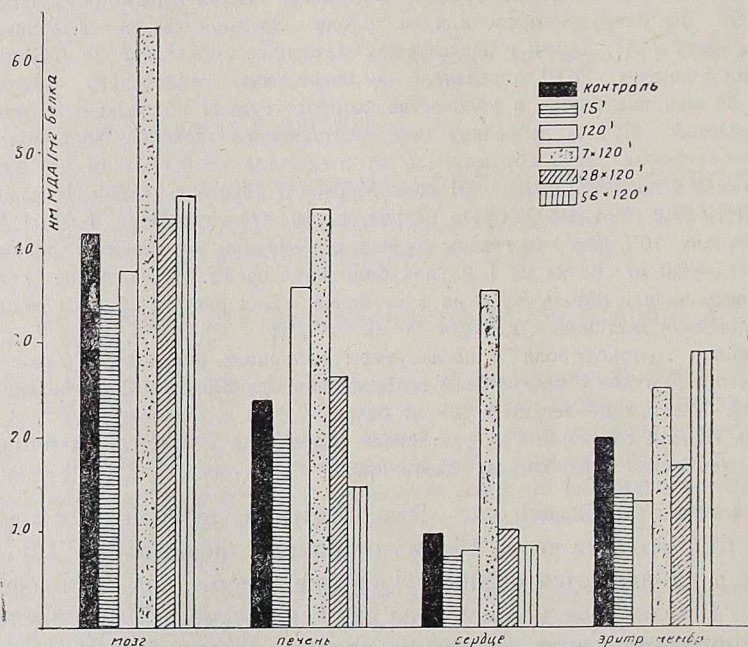


Рис. 2. Уровень неферментативного (аскорбатзависимого ПОИ) в гомогенатах тканей белых крыс в условиях акустического стресса, нМ МДА/мг белка.

ти, на наш взгляд, объясняются как активированием антиоксидантной системы, вовлечением ее в процесс детоксикации продуктов ПОЛ, так и транспортом α -токоферола из наиболее богатой им жировой ткани в кровь [9].

Семиразовое ежедневное воздействие шума приводит к резкой интенсификации ПОЛ во всех исследуемых тканях, за исключением НЗП в эритроцитарных мембранах. При этом наблюдаются значительные сдвиги в уровне α -токоферола: содержание его резко снижается в эри-

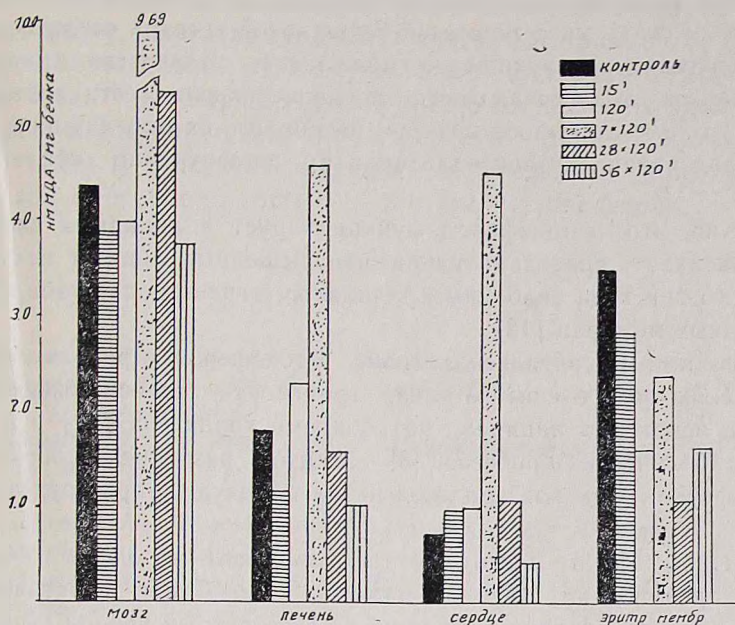


Рис. 3. Уровень ферментативного (НАДФ-Н зависимого) ПОЛ в гомогенатах тканей белых крыс в условиях акустического стресса, нМ МДА/мг белка.

троцитарных мембранах, остается ниже контроля в мозге, печени, сердце, возвращается к контрольному уровню в плазме. При последующем воздействии стрессора (28x2 ч) в сердце, печени и мозге способность к переоислению продолжает оставаться выше контроля, а содержание α -токоферола—ниже. В плазме при этом отмечается максимально высокий уровень α -токоферола, который к 56-разовому воздействию сменяется резким снижением как в плазме, так и во всех исследуемых тканях, за исключением печени. Снижение содержания α -токоферола особенно выражено в сердце. ПОЛ при этом угнетено во всех исследуемых тканях, за исключением печени. На рис. 2 и 3 видна однонаправленность сдвигов НЗП и АЗП в мозге, печени и сердце белых крыс в соответствующие сроки эксперимента, хотя интенсивность их различна.

Весьма интересны сдвиги, наблюдаемые в печени: содержание α -токоферола и интенсивность ПОЛ значительно выше контрольного уровня в отличие от таковых в сердце и мозге, в которых в результате 56-ти (8 недель) ежедневных воздействий шума эти показатели резко снижаются.

Нормально функционирующее сердце по сравнению с печенью и мозгом характеризуется очень низким стационарным уровнем липоперекисления и довольно высоким при этом содержанием α -токоферола. Анализ интенсивности полученных данных свидетельствует о наибольшей метаболической ранимости сердца в условиях акустического стресса.

Значительное снижение уровня ПОЛ в исследуемых тканях через 28 и еще большее через 56 дней воздействия стрессора, по-видимому, обусловлено изменением состава фосфолипидов мембран, их окисляемости; это согласуется с гипотезой Бурлаковой и сотр., согласно которой воздействия, приводящие к уменьшению количества природных антиоксидантов, должны вызывать снижение окисляемости липидов, и наоборот, т. е. состав фосфолипидов мембран, их окисляемость, скорость расходования антиоксидантов и их концентрации сбалансированы [2].

Известно, что α -токоферол функционирует в липидных системах как антиоксидант, предохраняющий ненасыщенные липиды тканей от агрессивного действия свободных радикалов, играет роль стабилизаторов клеточных мембран [12].

Однако, помимо антиоксидантной, α -токоферол играет и важную специфическую роль в синтезе гема, транспорте эссенциальных аминокислот и некоторых липидов, метаболизме коллагена [11] и в ряде других метаболических процессов [8]. Поэтому развитие недостаточности α -токоферола в тканях является неблагоприятным прогностическим фактором.

Полученные данные позволяют предположить, что одним из основных путей реализации патологического воздействия акустического стресса на организм является усиление ПОЛ в острый период стресса с последующим снижением содержания α -токоферола в тканях.

Ереванский медицинский институт, кафедра биохимии

Поступило 21.III 1983 г.

ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԿԵՐՈՔՍԻԴԱՅՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԸ ԵՎ α -ՏՈԿՈՖԵՐՈՒԻ ՄԱԿԱՐԴԱԿԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆՏՆՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԱԿՈՒՍՏԻԿ ՍՏՐԵՍԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ. Մ. ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ, Ե. Ա. ՄԵԼԻՔ-ԱՂԱՅՎԱ, Ա. Ա. ՌՈՒԽՅԱՆ

Ակուստիկ ստրեսի պայմաններում սպիրտակ առնետների մոտ ուսումնասիրվել են լիպիդային գերօքսիդացման ֆերմենտային և ոչ ֆերմենտային պրոցեսի տեղաշարժերը և α -տոկոֆերոլի քանակը լյարդի, սրտամկանի, ուղեղի հմոգենատներում, էրիթրոցիտար թաղանթներում և արյան պլազմայում:

Ցույց է տրվել, որ բացահայտված տեղաշարժերի ինտենսիվությունը կախված է հետազոտվող հյուսվածքի տեսակից և ազդման ժամկետից: Գերօքսիդացման պրոցեսի առավել ուժեղացում դիտվում է փորձի 7-րդ օրը և ավելի արտահայտված է սրտամկանում: Ուսումնասիրված հյուսվածքներում որոշակի կապ գոյություն ունի լիպիդային գերօքսիդացման մակարդակի և α -տոկոֆերոլի քանակի միջև:

THE PROCESS OF LIPID PEROXIDATION AND α -TOCOPHEROL LEVEL IN THE WHITE RATS TISSUES UNDER CONDITIONS OF THE ACOUSTIC STRESS

M. M. MELKONIAN, V. G. MKHITARIAN, E. A. MELIK-AGAEVA,
A. A. RUKHKIAN

The changes of intensity of enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation and α -tocopherol content in the liver, heart, brain homogenates, erythrocyte membranes and blood plasma of white rats have been studied under conditions of acoustic stress. The intensity of the revealed changes depends both on the type of the investigated tissue and the action term. The sharp increase of lipid peroxidation is observed on the 7-th day of the experiment. The changes are more expressed in the heart. There is a definite dependence between the lipid peroxidation level and α -tocopherol content in the investigated tissues.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Артюхин Н. И., Левшина И. П. Бюлл. exper. биол. и мед., 1, 98—100, 1982.
2. Бурлакова Е. Б., Кухтина Е. Н., Хромова Н. Г., Аристархова С. А. Биохимия, 47, 5, 822—829, 1982.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Меерсон Ф. З. Стресс, адаптация и профилактика. М., 1981.
5. Микаелян Э. М., Мелконян М. М., Арапатьян Э. А., Мхитарян В. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 5, 545, 1978.
6. Мхитарян В. Г., Арапатьян Э. А., Микаелян Э. М., Мелконян М. М. Ж. exper. и клин. мед., 17, 5, 13, 1977.
7. Ничков С., Кривицкая Г. Н. Акустический стресс и церебро-висцеральные нарушения. М., 1969.
8. Шатерников В. А. Витамины. 125—150, М., 1974.
9. Carpenter M. P. Ann. N. Y. Akad. sci., 209, 81, 1972.
10. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 84, 116, 1959.
11. Green J. Ann. N. Y. Acad. sci., 203, 29, 1972.
12. Kitabchi A. E. Ann. N. Y. Acad. sci., 203, 123, 1972.
13. Limber G. K., Roy Davis. Seymour Bakerman, Blood, 36, 111, 1970.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. S., Faur A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193 265, 1951.

ИЗМЕНЕНИЯ В ФЕРМЕНТАХ ПРИ ПРОРАСТАНИИ И РАЗЛИЧНЫХ ОБРАБОТКАХ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

С. Г. ТИРАЦУЯН, Г. А. ПАНОСЯН

В процессе прорастания и под действием оптимальных концентраций гиббереллина, 6-бензиламинопурина и зеленого прочного происходит изменение активности малакдегидрогеназы и пероксидазы изолированных зародышей пшеницы. Гиббереллин и 6-бензиламинопурин стимулируют активность обоих ферментов, тогда как зеленый прочный ингибирует активность малакдегидрогеназы. Актиномицин Д и циклогексимид ингибируют ферментативную активность и вызванные обработками зародышей изменения в изоферментном спектре пероксидазы.

Ключевые слова: ферменты, зародыши пшеницы.

Состав ферментных систем, участвующих в дыхании, является важнейшим показателем жизнеспособности семян. Способность семян к прорастанию коррелирует с активностью дегидрогеназных систем, принимающих непосредственное участие в метаболизме их при прорастании [1, 2]. При прорастании и набухании жизнеспособных семян наиболее быстро активируется малакдегидрогеназа (МДГ) и в ее белковом спектре появляются новые множественные молекулярные формы (ММФ). Отмечена также прямая зависимость между жизнеспособностью семян и активацией некоторых оксидаз, в частности, пероксидазы (ПО) [4]. Этими данными и обусловлен выбор ферментных систем, отражающих метаболическое состояние зародышей пшеницы, для исследования действия гиббереллина, 6-бензиламинопурина и стимулятора роста—красителя зеленого прочного.

Все типы фитогормонов (ФГ) вызывают в чувствительных к их действию растительных объектах существенные изменения в ферментном спектре, подавляя активность одних ферментов и индуцируя или стимулируя другие. ФГ влияют также на изоферментный спектр ферментов [14]. В литературе нет достоверных данных о механизмах действия гиббереллина (ГБ) и 6-бензиламинопурина (БАП) на упомянутые ферментные системы. В связи с этим представлялось интересным исследование влияния ГБ, БАП, а также зеленого прочного (ЗП) на их активность и ММФ [3].

Материал и методика. Объектом исследования были изолированные по методу Джонстона и Штерна [11] зародыши пшеницы сорта Безостая [1]. Жизнеспособность зародышей проверяли проращиванием на питательной среде, содержащей 0,9%-ный агар, 1%-ную глюкозу и 0,01%-ный стрептомицин. В качестве контроля служил раствор, содержащий 5 мМ Трис-НСl, pH 7,4, 20 мМ КСl и 20 мкг/мл сахарозы. Для обработки зародышей использовали 10^{-6} М раствор ГБ, $5 \cdot 10^{-4}$ %-ный раствор ЗП, 10^{-4} М раствор актиномицина Д (АД), 2 мг/л раствора БАП, 10 мг/л циклогексимида (ЦГИ) и их различные сочетания. Зародыши проращивали на стерилизованной питательной среде на заранее стерилизованных чашках Петри в термостате при 26° в течение 0—48 ч.

Активность ПО определяли по описанной ранее методике [6], активность МДГ—

по Хоку [9]. Электрофоретическое разделение и проявление ММФ ПО проводили по методам, описанным в литературе [5, 6].

Результаты и обсуждение. В качестве объекта исследования нами были использованы изолированные зародыши пшеницы для исключения опосредованного действия через эндосперм.

В процессе прорастания изолированных зародышей в течение 0—48 ч происходит увеличение общей активности МДГ, связанное с интенсификацией дыхания при прорастании (табл.). Усиление дыхания

Таблица

Активность малатдегидрогеназы при прорастании и обработке изолированных зародышей пшеницы в течение 16 и 48 часов

Время прорастания 16 ч					48 ч			
	Контроль	ГБ	ЗП	БАП	Контроль	ГБ	ЗП	БАП
Буфер	0,086 ±0,001	0,122 ±0,023	0,065 ±0,007	0,144 ±0,028	0,127 ±0,008	0,398 ±0,088	0,082 ±0,006	0,185 ±0,009
АД	0,059 ±0,004	0,071 ±0,004	0,053 ±0,002	0,115 ±0,002	0,097 ±0,002	0,114 ±0,018	0,072 ±0,004	0,105 ±0,009
ЦГИ	0,057 ±0,004	0,067 ±0,001	—	0,070 ±0,0,3	0,083 ±0,002	0,086 ±0,015	—	0,099 ±0,005

является прямым результатом синтеза или активации или как синтеза, так и активации дыхательных ферментов [8]. АД подавляет активность фермента в течение всего периода прорастания. ЦГИ подавляет его активность в той же мере, в какой АД, что свидетельствует о новообразовании ферментного белка МДГ. Результаты наших работ согласуются с литературными данными [13, 15], согласно которым в процессе прорастания семян и на ранних этапах роста проростков изозимы МДГ синтезируются *de novo* в щитке. Накопление в проростках изоферментов МДГ контролируется не только синтезом, но и скоростью распада изоферментов.

ГБ вызывает повышение активности МДГ. АД и ЦГИ снижают ее до уровня ниже контрольного, подтверждая тем самым, что ГБ активирует МДГ за счет синтеза ферментного белка и соответствующих РНК.

БАП также повышает активность фермента, причем в первые сутки больше, чем на вторые, видимо, в результате того, что цитокинины влияют на содержание ферментного белка в растительной клетке, не только активируя его синтез, но и задерживая распад. АД и ЦГИ практически одинаково подавляют активность МДГ зародышей, обработанных БАП. Это показывает, что основная роль в механизме действия БАП принадлежит активации синтеза РНК.

ЗП ингибирует активность МДГ. Прорастание и обработка зародышей ГБ и ЗП сопровождается также возрастанием активности ПО, которое АД подавляет в течение всего периода роста зародышей. Это показывает, что как при прорастании, так и при обработке зародышей ГБ и ЗП необходимо новообразование белка ПО. Наши данные согла-

суются с литературными, согласно которым прорастание жизнеспособных семян пшеницы происходит путем синтеза новых мультимолекулярных форм белка [14].

Надежным показателем жизнеспособности и различных ростовых процессов в семени является изоферментный состав ПО. Изменения ММФ ПО под воздействием ФГ происходят на уровне генома [7]. Как в процессе прорастания, так и под действием ГБ и ЗП число ММФ ПО увеличивается (рис.). Интересно, что при обработке зародышей и тем

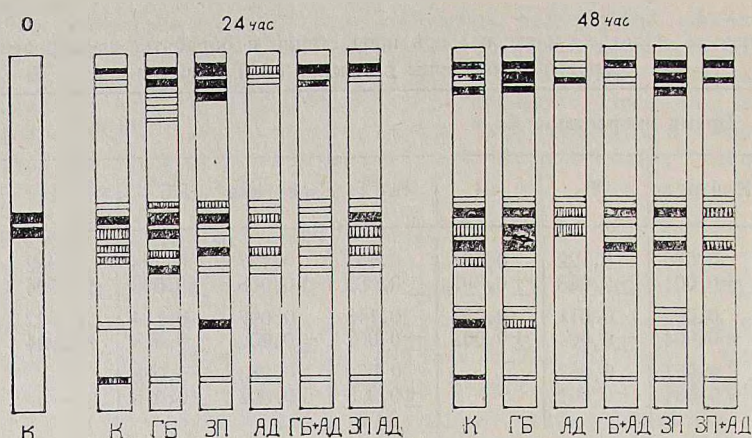


Рис. Электрофореграммы множественных молекулярных форм пероксидазы изолированных зародышей пшеницы: сухих (0), прорастающих в течение 24 и 48 ч, а также обработанных ГБ, ЗП, АД, ГБ+АД, и ЗП+АД одновременно.

и другим биологически активным соединением появляется фракция № 3, которая в контрольных зародышах синтезируется при прорастании в течение 48 ч, т. е. образование ММФ ПО ускоряется. Имеет место также расширение одних и сужение других ферментных полос ПО. Обработка зародышей АД приводит к ослаблению интенсивности окрашивания этих полос. Появление или исчезновение определенных ММФ ПО в течение всего периода роста и развития растений можно объяснить метаболическими требованиями его на той или иной стадии роста от белоксинтезирующего аппарата. Ингибирование актиномицином Д активности ПО и изменение изоферментного состава при прорастании [10] свидетельствуют о *de novo* синтезе белка ПО после ДНК-зависимой транскрипции РНК. Изозимы ПО обладают также органоспецифичностью. Следовательно, появление в обработанных в течение 24 ч эмбрионах фракций ПО, синтезируемых в контрольных эмбрионах на более поздних стадиях развития, свидетельствует о повышении метаболических требований под влиянием ГБ и ЗП и о более раннем прохождении, по крайней мере, первых фаз роста и набухания.

Таким образом, в процессе прорастания изолированных зародышей пшеницы имеет место увеличение активности малатдегидрогеназы и пероксидазы, обусловленное новообразованием соответствующих ферментных белков. ГБ и БАП повышают уровень активности МДГ,

этот эффект снимается обработкой эмбрионов актиномицином Д и ЦГИ, что свидетельствует о действии указанных гормонов на уровне транскрипции.

Зеленый прочный подавляет активность МДГ в обработанных зародышах, однако повышает активность ПО; это возрастание подавляется АД.

В процессе прорастания имеет место увеличение числа ММФ ПО. Как обработка ГБ, так и ЗП вызывает появление фракций ПО, что у контрольных зародышей происходит на более поздних стадиях развития.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 16.III 1983 г.

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՑՈՐԵՆԻ ՄԵԿՈՒՍԱՅՎԱՍ ՍԱՂՄԵՐԻ ԾԼՄԱՆ ԵՎ ՏԱՐՔԵՐ ՄՇԱԿՈՒՄՆԵՐԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Ս. Գ. ՏԻՐԱՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Ծլման պրոցեսում, ինչպես նաև հորմոնների և կանաչ ամուրի օպտիմալ կոնցենտրացիաների ազդեցության սակ փոփոխվում են ցորենի մեկուսացված սաղմերի մալատդեհիդրոգենազայի և զերօքսիդազայի ակտիվությունները: Գիբերելլինը և 6-բենզիլամինոպուրինը խթանում են ֆերմենտների ակտիվությունները, մինչդեռ կանաչ ամուրն արգելակում է մալատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը: Ակտինոմիցին Դ-ն և ցիկլոհեքսիմիդը արգելակում են ակտիվությունները և ճնշում սաղմերի մշակման հետևանքով զերօքսիդազայի իզոֆերմենտային սպեկտրում առաջացած փոփոխությունները:

CHANGES OF ENZYMES DURING GERMINATION AND DIFFERENT TREATMENTS OF ISOLATED WHEAT EMBRYOS

S. G. TIRATSUYAN, G. H. PANOSYAN

The activity of isolated wheat embryos malatdehydrogenase and peroxidase undergoes changes in the process of germination and under the influence of optimal concentrations of hormones and fast green. Gibberellin and 6-benzylaminopurin stimulate the activities of enzymes, whereas the fast green inhibits the malatdehydrogenase activity. Actinomycin D and cycloheximide inhibit activities and suppress the changes of peroxidase enzymatic spectrum, caused by the embryos treatment.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Красноок Н. П., Моргунова Е. А., Бухтиярова Э. Т., Вишнякова Н. А. Физиол. раст., 26, 1, 1979.
2. Моргунова Е. А., Красноок Н. П., Поварова Р. И., Вишнякова Н. А. Прикладная биохимия и микробиология, 11, 5, 1975.

3. Паносян Г. А., Тамразян Е. Е., Биолог. ж. Армении, 24, 12, 27, 1971.
4. Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. Энзимология и биология дыхания растений. 70, М., 1966.
5. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Физиол. раст., 16, 2, 1969.
6. Тираццун С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 33, 11, 1980.
7. Benito C., Peter de la Veda M. Theor. and Appl. Genet., 55, 2, 77, 1979.
8. Filner P., Wray J. L., Varner G. E. Science, NY, 165, 358, 1968.
9. Hock B. Planta (Berl), 110, 329, 1973.
10. Horvath M. M. Acta Bot. Acad. Sci. hung, 77, 32, 3, 1976.
11. Johnston F. B., Stern H. Nature (Lond), 179, 160, 1957.
12. Kern H. Biologia Plantarum (Praha), 17, 4, 309, 1975.
13. Newton K. J., Schwarrtz D. Genetics (USA), 95, 2, 425, 1980.
14. Singh R., Singh D. Biochem. Physiol. Pflanzen., 166, 5, 233, 1974.
15. Yang-Ning Sun BBA, 384, 2, 293, 1975.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 51.001.57—017.1

ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ К ДИФТЕРИИ И СТОЛБНЯКУ

А. А. ОРДУХАНЫАН, Е. В. МАНВЕЛЯН

В работе обосновывается статистическая значимость линейной аппроксимации для построения математической модели, описывающей антитоксический иммунитет к дифтерии и столбняку после ревакцинации.

Ключевые слова: иммунитет, антитоксин, титр, математическая модель.

Модель Готтлиба на сегодняшний день является наиболее общим подходом в моделировании долгосрочного иммунитета против дифтерии и столбняка [4]. Однако, как нами было показано [1, 2], модель не лишена недостатков, которые значительно снижают ее ценность.

В наиболее общем виде модель формулируется следующим образом: иммунный ответ организма, характеризующийся, согласно Готтлибу, отношением $\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}}$, есть некая функция внутренних характеристик организма (пол, группа крови и т. д.) и внешних (доза антигена, сезон вакцинации и т. д.). Одной из основных характеристик модели Готтлиба является величина скачка уровня антител после ревакцинации $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$. Считается, что $\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}} \sim \lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$, причем пропорциональность иллюстрируется лишь графически. Далее предполагается, что $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$, есть весьма сложная функция от $\lg \text{Pre}$, которую авторы не обосновывают статистически.

Предположим, что действительно $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}} = f(\lg \text{Pre})$, но в отличие

от Готтлиба постараемся аппроксимировать неизвестную функцию полиномом, степень которого можно определить из статистической обработки банка по вакцинации, описанного нами ранее [1]. Для этого применяется модель полиномиальной регрессии [3].

$$\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}} = a_0 + a_1 \lg \text{Pre} + a_2 (\lg \text{Pre})^2 + \dots$$

Расчеты производятся с использованием ортогональных полиномов по методу Форсайта [5]. Анализируются полиномы до 5-й степени включительно. Для исключения влияния дозы антигена анализ проводится раздельно для контрольной и уменьшенной доз, а в случае столбняка также и для всего банка данных. В табл. 1 приведены регрессионные коэффициенты (в скобках даны соответствующие t -критерии), остаточные суммы квадратов, соответствующие степени свободы и F -критерий для проверки значимости. Значимость на соответствующем уровне означает необходимость для аппроксимации использования следующей степени. Анализ F -критерия показал, что для статистически значимой аппроксимации достаточно полинома 1-й степени, как для контрольной, так и для уменьшенной доз. Все вычисленные кривые практически совпадают с прямой 1-й степени. Лишь для экстремально малых или больших значений допрививочных титров DPRE и SPRE наблюдались некоторые отклонения от линейности, которые более существенны для столбняка.

При анализе данных, полученных при ревакцинации столбнячным анатоксином, квадратичный член оказался более существенным, чем при ревакцинации дифтерийным. Однако и здесь для общности модели мы решили ограничиться лишь линейным приближением, тем более что множественный коэффициент корреляции при добавлении квадратичного члена растет незначительно (от 0,70 до 0,71 для обеих доз и от 0,71 до 0,73 для уменьшенной дозы). Таким образом, вместо используемой в модели Готтлиба функции $10^{a_0 + a_1 \lg \text{PRE} + a_2 (\lg \text{PRE})^2}$ для построения своей модели мы используем статистически значимую линейную аппроксимацию.

Рассмотрим теперь вопрос о зависимости $\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}}$ от $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$. Поскольку, в соответствии с вышесказанным, $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$ есть линейная функция от $\lg \text{Pre}$, задача сводится к нахождению зависимости $\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}}$ от $\lg \text{Pre}$. В табл. 2 приведены рассчитанные регрессионные уравнения и соответствующие статистические характеристики для всего банка и для уменьшенных доз отдельно. Как видно из таблицы, зависимость $\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}}$ от $\lg \text{Pre}$ достаточно близка к линейной.

Сравним коэффициенты корреляции соответствующих уравнений по дифтерии (уравнения 1—5 и 6—10 из табл. 2). Из таблицы видно, что коэффициенты корреляции соответствующих уравнений по дифтерии, так же как и остальные коэффициенты по дифтерии, меньше нуля, т. е. в среднем с увеличением DPRE относительный титр по дифтерии

Результаты полиномиального сглаживания

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
СТОЛБНЯК	Обе дозы	0,78 (35)	—0,85 (23)				0,297	776	0	113
		0,76 (34)	—0,74 (15)	0,14 (3,5)			0,293	775	1	4,6
		0,75 (30)	—0,75 (14)	0,19 (2,9)	0,03 (0,9)	0,07	0,293	774	2	2,1
		0,75 (30)	—0,65 (9,4)	0,24 (3,4)	0,11 (1,6)	0,07 (2,3)	0,291	773	3	2,7
		0,76 (27)	—0,65 (9,3)	0,21 (1,6)	0,12 (1,6)	0,05 (0,7)	0,291	772	4	0,04
	5 EC	0,72 (24)	—0,89 (18)				0,297	404	0	770,4
		0,69 (22)	—0,74 (11)	0,18 (3,5)			0,288	403	1	5,4
		0,66 (19)	—0,78 (12)	0,32 (3,9)	0,69 (2,1)		0,286	402	2	3,0
		0,66 (19)	—0,64 (6,9)					401	3	2,3
		0,67 (18)	—0,65 (6,9)	0,33 (1,9)	—0,08 (0,8)	0,04 (0,4)	0,01 (0,4)	400	4	0,123
	10 EC	0,85 (27)	—0,81 (15)				0,291	370	0	48,8
		0,84 (25)	—0,75 (11)	0,08 (1,2)			0,290	369	1	2,9
		0,87 (23)	—0,70 (—9)	0,06 (0,6)	0,11 (1,5)		0,289	368	2	3,4
		0,87 (23)	—0,58 (—5)	0,02 (0,2)	0,32 (2,0)	0,13 (1,5)	0,289	367	3	3,9
		0,82 (19)	—0,55 (—5)	0,53 (2)	—0,19 (—1)	—0,01 (2,8)	0,22 (2,4)	366	4	5,6
ДИФТЕРИЯ	5 Lf	1,01 (23)	—0,57 (—7)				0,389	361	0	10,9
		0,98 (20)	—0,47 (—3)	0,25 (1,5)			0,387	360	1	1,7
		0,97 (18)	—0,48 (—3)	0,25 (1,3)	0,03 (0,01)		0,388	359	2	1,5
		0,93 (16)	—0,34 (1,8)	0,96 (2)	—0,18 (0,5)	0,97 (1,7)	0,386	358	3	2,2
		0,96 (15)	—0,10 (0,4)	0,66 (1,3)	1,59 (1,4)	0,70 (1,2)	1,36 (1,3)	357	4	1,6
	30 Lf	0,68 (19)	—0,75 (12)				0,323	409	0	28,3
		0,69 (19)	—0,68 (—7)	0,06 (1,1)			0,322	408	1	1,1
		0,66 (16)	—0,62 (—6)	0,33 (2,0)	0,10 (1,7)		0,322	407	2	1,1
		0,65 (15)	—0,66 (—6)	0,37 (2,1)	0,21 (1,1)	0,03 (0,6)	0,322	406	4	0,2
		0,65 (15)	—0,66 (3,8)	0,38 (1,8)	0,21 (0,6)	0,03 (0,1)	0,001 (0,03)	405	4	0,0009

Примечания: 0—5—коэффициенты a_i уравнений $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}} = \sum_{i=0}^5 a_i (\lg \text{Pre})^i$; в скобках даны t критерии соответствующих коэффициентов;

6—9—остаточные суммы квадратов степени свободы, степени полинома и значение F критериев соответственно.

Регрессионные уравнения связи относительных титров с довакцинальным уровнем

Доза	Titer	N	a	b	n	R	Titer	σ
5Lf и 30Lf обе дозы	D015	1	-0,710	0,193	867	-0,426	1,013	0,685
	D06	2	-0,823	0,462	867	-0,573	0,120	0,598
	D 1	3	-0,818	0,107	867	-0,645	0,361	0,522
	D 2	4	-0,847	0,096	867	-0,680	0,167	0,513
	D 3	5	-0,886	-0,175	867	-0,704	0,100	0,518
5Lf	D015	6	-0,755	0,680	411	-0,501	0,945	0,656
	D06	7	-0,852	0,410	402	-0,623	0,718	0,589
	D 1	8	-0,861	0,084	372	-0,700	0,396	0,544
	D 2	9	-0,904	-0,187	357	-0,779	0,159	0,573
	D 3	10	-0,027	-0,232	354	-0,795	0,114	0,588
5EE и 10EE обе дозы	S015	11	-0,850	0,784	867	-0,635	0,946	0,725
	S06	12	-0,884	0,431	867	-0,726	0,654	0,645
	S 1	13	-0,837	0,243	867	-0,727	0,444	0,609
	S 2	14	-0,743	0,253	867	-0,137	0,426	0,866
	S 3	15	-0,763	0,020	867	-0,191	0,198	0,212
5EE	S015	16	-0,885	0,716	406	-0,663	0,962	0,726
	S06	17	-0,879	0,411	399	-0,751	0,664	0,636
	S 1	18	-0,887	0,244	371	-0,781	0,512	0,633
	S 2	19	-0,817	0,113	425	-0,759	0,321	0,595
	S 3	20	-0,834	0,078	425	-0,769	0,135	0,599

Примечание: а—коэффициент при $\lg \text{Pre}$; b—интерсепт; N—номер уравнения; n—число детей; R—коэффициент корреляции; Titer—среднее значение; σ —квадратичное отклонение; Titer—логарифм отношения титра антитоксина в определенный момент времени к доревакцинальному титру.

уменьшается. Кроме того, коэффициент корреляции растет с увеличением времени определения титра после вакцинации. Следовательно, DPRE есть внутренняя характеристика, тогда как вакцинацию можно рассматривать как возмущения, которые со временем уменьшаются. Это правомерно и в отношении столбняка (уравнения 11—13 и 16—18). Далее, сравнение регрессионных уравнений 1—5 с уравнениями 6—10 показывает, что зависимость D06-D3 от DPRE при варьировании дозы антигена в сыворотке изменяется незначительно в применяемых пределах. Однако это изменение статистически значимо, как и следовало ожидать. Это верно и в отношении столбняка. Таким образом, показана возможность построения линейной модели иммунного ответа организма на ревакцинацию против дифтерии, которая формулируется следующим образом:

$$\lg \frac{\text{Titer}}{\text{Pre}} = \sum a_i x_i + a_0,$$

где X_i —некоторое подмножество информативных параметров, из рассматриваемых в ранее опубликованной работе [1].

a_i —коэффициенты, характеризующие вклады соответствующих параметров в описание относительного титра. Следовательно, нет необходимости в применении сложных функциональных зависимостей, используемых при построении модели Готтлиба. Статистически значима лишь линейная аппроксимация зависимости $\lg \frac{\text{Post}}{\text{Pre}}$ от $\lg \text{Pre}$ как для диф-

терии, так и для столбняка. Вопрос о выборе информативного множества параметров для описания иммунного ответа будет рассматриваться в следующей работе.

Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии,

МЗ Армянской ССР

Поступило 10.1 1983 г.

ԴԻՖԹԵՐԻԱՅԻ ԵՎ ՊՐԿԱԽՏԻ ԴԵՄ ԿՐԿՆԱՊԱՏԱԿԱՍՏՈՒՄԻՑ ՀԵՏՈ ԻՄՈՒՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ ՄՈԴԵԼԻ ԿԱՌՈՒՑՈՒՄԸ

Ա. Ա. ՕՐԴՈՒԽԱՆԻԱՆ, Ե. Վ. ՄԱՆՎԵԼԻԱՆ

Հոդվածում հիմնավորված է գծային ապրոքսիմացիայի վիճակագրական նշանակությունը կրկնապատվաստումից հետո դիֆթերիայի և պրկախտի հանդեպ իմունիտետը բնութագրող մաթեմատիկական մոդելի կառուցման համար:

CONSTRUCTION OF THE IMMUNE RESPONSE MATHEMATICAL MODEL AFTER REVACCINATION TO DIPHTHERIA AND TETANUS

A. A. ORDUKHANIAN, E. V. MANVELIAN

The aim of report has been to prove the statistical significance of the linear approximation for the mathematical model construction, relating to the diphtheria and tetanus antitoxic immunity after revaccination.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ордуханян А. А., Манвелян Е. В. Биолог. ж. Армении, 34, 11, 1176—1181, 1981.
2. Ордуханян А. А., Манвелян Е. В. Биолог. ж. Армении, 35, 7, 525—528, 1982.
3. Dixon W. J., Massey F. S. An Introduction to statistical Analysis, 3-td ed. N. Y., 1969.
4. Gottlieb S. et all. Amer. J. Epidem. Copyr, 85, 2, 207—219, 1967.
5. Forsythe G. F. J. Soc. Ind. Appl. Math., 5, 74—88, 1957.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 611—018.1.7.6

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ЦИТОГРАММЫ АДЕНОГИПОФИЗА ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОЗЕРИНА И ЭФЕДРИНА

А. А. МЕЖЛУМЯН, Б. Д. ГУСОВА

Изучалось влияние антихолинэстеразного вещества прозерина и симпатомиметика эфедрина на гистоструктуру передней части гипофиза.

Показано, что ежедневное двукратное введение прозерина приводит к увеличению количества базофильных и дегенеративных клеток; одновременно наблюдается уменьшение ацидофильных клеток.

При введении эфедрина происходит уменьшение количества хромофобных и увеличение базофильных и ацидофильных аденоцитов.

Ключевые слова: гипофиз, аденогипофиз, гипоталамус, стимуляция.

В последнее время особое внимание уделяется изучению гипоталамической нейросекреции и связи последней с эндокринными функциями [9]. Имеются данные о прямом воздействии веществ, секретируемых передней частью гипофиза, на нервный компонент [10].

Однако стимуляция или угнетение симпатического и парасимпатического звеньев вегетативной нервной системы при биосинтезе и выделение гипофизарных гормонов изучены недостаточно.

Мы поставили задачу проследить за возможным изменением гистоструктуры передней части гипофиза в условиях стимуляции вегетативной нервной системы как регулятора секретируемых веществ передней части гипофиза. Регулирующая роль вегетативной нервной системы показана Акмаевым [1, 2].

В настоящем исследовании приводятся результаты изучения структуры и цитограммы передней доли гипофиза в условиях повышения холин- и адренергической активности вегетативной нервной системы. Учитывалось, что введение медиаторов ацетилхолина и адреналина сопровождается лишь кратковременной стимуляцией нервной системы из-за быстрой инактивации их ферментами крови и тканей, поэтому были использованы фармакологические препараты преимущественно периферического спектра действия.

Материал и методика Опыты проводились на беспородных половозрелых крысах-самцах, которые были распределены по группам следующим образом: прозеринавая, эфедриновая, физиологический контроль (введение физиологического раствора) и интактный контроль.

Прозерин вводился подкожно 2 раза в день с промежутком между инъекциями в 3 ч из расчета 0,1 мг/кг, а эфедрин также подкожно дважды в день с промежутком между инъекциями в 6 ч из расчета 50 мг/кг.

Животные декапитировались под хлороформным наркозом на 14, 21, 28-е сутки после введения препаратов. Для изучения реактивных изменений аденогипофиза применялся метод дифференцированного выявления его клеток альдегид-фуксином по Хэлми в модификации А. П. Дыбана, количественный подсчет на срединных фронтальных срезах гипофиза ацидофильных, базофильных, хромофобных и дегенеративно измененных аденоцитов с последующей статистической обработкой полученных данных, а также метод электронной микроскопии.

Результаты и обсуждение. Опыты показали, что ежедневное двукратное введение прозерина приводит к выраженному накоплению секреторного материала в цитоплазме всех гормонпродуцирующих клеток передней доли гипофиза. При этом не отмечается признаков выхода за пределы клеток в межклеточные щели и перикапиллярные пространства.

Ультрамикроскопическое исследование показало отсутствие в клетках морфологического проявления усиления их секреторной активности. Введение прозерина в течение 21—28-ми суток сопровождалось развитием в гормонпродуцирующих клетках аденогипофиза застойных и дегенеративно-деструктивных изменений, особенно выраженных в соматотропных и адренотропных клетках. Нередко встречались клетки с четко выраженной осмиофобной цитоплазмой, содержащей большое количество цитолизом и огромные миелиноподобные фигуры, являющиеся признаком некроза клетки [7].

Результаты подсчета клеток показали уменьшение количества ацидофильных клеток (интактный контроль—37%, в серии с прозеринном на 14-е сутки—21,7% при $P<0,001$; 21-е сутки—22,6% при $P<0,01$; 28-е сутки—22,2% при $P<0,001$) и значительное увеличение количества дегенеративно измененных клеток (интактный контроль—2,78%; в серии с прозеринном на 14-е сутки—7,2%, $P<0,001$; 21-е сутки—6%, $P<0,05$; 28-е сутки—5,9%, $P<0,01$).

Полученные данные дают основание полагать, что инъекции холлиномиметика прозерина затрудняют отток секреторных продуктов из железистых аденогипофизарных клеток, что в свою очередь приводит к развитию в них застойных и дегенеративных изменений. Механизм действия прозерина может быть различным. Во-первых, он обусловлен влиянием на парасимпатическую иннервацию гипофиза, источником которой у крыс является, как известно, видиев ганглий; во-вторых, прозерин способен влиять на гипофиз через холинреактивные структуры гипоталамуса, что проявляется в незначительной степени, так как он слабо проникает через гематоэнцефалический барьер [6], являясь препаратом преимущественно периферического действия.

Как известно, раздражение парасимпатической зоны гипоталамуса приводит к значительному накоплению секреторных гранул в соматотропных и гонадотропных базофильных клетках гипофиза [8]. Полученные нами данные дают основание полагать, что эффект действия на гипофиз возбуждения центральных и периферических холинреактивных структур одинаков.

Действие прозерина на гипофиз может осуществляться и посредством вазомоторных влияний парасимпатических импульсов. Показано [5], что введение прозерина в организм приводит к задержке жидкости в различных органах и тканях. Избыток же жидкости в гипофизе препятствует наступлению следующей стадии секреторного цикла в его железистых клетках, что приводит к развитию в них застойных явлений [1, 2].

При исследовании структуры и цитогаммы аденогипофиза в серии с эфедрином отмечалось стимулирующее влияние его на секреторное образование и секреторное выделение большей части гормонпродуцирующих аденоцитов, что наиболее отчетливо проявлялось в фолликулостимулирующих аденокортикотропных и тиреотропных клетках.

Высокая функциональная активность базофильных клеток сочеталась с повышением их количества по сравнению с интактным контролем во все сроки эксперимента (интактный контроль—8,84%; в серии с эфедрином на 14-е сутки—11,35% при $P<0,001$, 21-е сутки—13,7% при $P<0,001$, 28-е сутки—15,3% при $P<0,001$). Однако дальнейшая стимуляция этих клеток (21-е и особенно 28-е сутки) приводила к функциональному перенапряжению и истощению их. Отмечались уменьшение в цитоплазме свободных и связанных с мембранами цитоплазматической сети рибосом, деформация и деструкция митохондрий, резкое набухание пластинчатого комплекса и г. д.

В соматотропных ацидофильных клетках во все сроки исследования наблюдались изменения дегенеративно-деструктивного характера.

которые на 28-е сутки после введения препарата сочетались с уменьшением общего количества ацидофильных клеток по сравнению с двумя предыдущими сроками (14, 21-е сутки).

В эндотелиальных клетках, выстилающих просветы аденогипофизарных гемокapилляров, отмечались расширение цистерн цитоплазматической сети, гипертрофия пластинчатого комплекса, низкоамплитудное набухание митохондрий. Эти изменения в совокупности с присутствием в просвете капилляров мелкозернистого электроплотного вещества могут расцениваться как усиление процессов отделения секреторного материала железистых клеток аденогипофиза.

В «истинных» хромофобных клетках, образующих стенку межклеточных каналов и псевдофолликулов, также имело место некоторое расширение вакуолей цитоплазматической сети, пластинчатого комплекса, отмечался полиморфизм митохондрий. Следствием активной деятельности этих клеток является, очевидно, образование коллоида, который в большом количестве обнаруживался в межклеточных пространствах и гипофизарной щели.

Механизм действия эфедрина на гипофиз связан с его влиянием как на симпатические центры гипоталамуса, так и на симпатическую иннервацию гипофиза, источником которой является верхний шейный симпатический узел.

Являясь веществом смешанного, центрального и периферического, действия, эфедрин способен возбуждать адренореактивные структуры мозга, включая гипоталамус. В последнем, по-видимому, активируется синтез и выделение релизинг-факторов, которые через портальную систему проносятся с кровью к аденогипофизу и воздействуют на его железистые клетки.

Предположение о стимулирующем влиянии адренореактивных структур мозга на деятельность гипофиза и связанных с ним периферических эндокринных желез находит подтверждение в ряде работ [3, 4, 8]. Кроме того, эффекты, оказываемые симпатическими импульсами на секреторную деятельность аденогипофиза, могут реализовываться посредством их влияния на кровообращение в портальной системе сосудов и на распределение портальной крови по паренхиме передней доли гипофиза.

Таким образом, при ежедневном двукратном введении антихолинэстеразного вещества прозерина в дозе 0,1 мг/кг в аденогипофизе во все исследованные сроки происходит достоверное по сравнению с интактным контролем увеличение количества базофильных и дегенеративно измененных клеток. Параллельно отмечается уменьшение количества ацидофильных клеток, а также нарушение оттока секреторных продуктов из соматотропных, адренокортикотропных, тиреотропных и других аденоцитов с последующим развитием в них застойных и дегенеративных изменений.

О нарушении оттока свидетельствует выраженное накопление секреторных продуктов в цитоплазме клеток без признаков выхода его в межклеточные и перикапиллярные пространства и отсутствие морфологических проявлений усиления секреции в этих клетках.

Под влиянием ежедневного двукратного введения симпатомиметика эфедрина в дозе 50 мг/кг в аденогипофизе достоверно уменьшается по сравнению с интактным контролем число хромофобных клеток. Увеличивается количество (во все сроки исследования) базофильных и ацидофильных аденоцитов, что сопровождается усилением секреторазования и секретовыделения в аденокортикотропных, гонадо- и тиреотропных клетках и угнетением синтеза в соматотропных клетках.

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт,

Горский сельскохозяйственный институт

Поступило 14.II 1983 г.

ԱՒԵՆՈՂԻՊՈՅԻԶԻ ԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԻ ԵՎ ՑԻՏՈԳՐԱՄԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ՊՐՈՁԵՐԻՆԻ ԵՎ ԷՖԵԴՐԻՆԻ ՆԵՐՄՈՒԾՄԱՆ ԴԵՊԳՈՒՄ

Ա. Ա. ՄԵԺԼՈՒՄՅԱՆ, Բ. Դ. ԳՈՍՍՈՎԱ

Պրոզերինի ամենօրյա կրկնակի ներարկման դեպքում ադենոհիպոֆիզում բազոֆիլների և դեգեներատիվ բջիջների քանակը մեծանում է, իսկ ացիդոֆիլ բջիջներինը՝ փոքրանում: Էֆեդրինի ազդեցության տակ քրոմոֆոբ բջիջների քանակը նվազում է, իսկ բազոֆիլ և ացիդոֆիլ ադենոցիտներինը՝ մեծանում: Ենթադրվում է, որ էֆեդրինի ազդեցությունն իրականանում է հիպոթալամուսի և հիպոֆիզի սիմպատիկ կենտրոնների միջոցով:

THE CHANGES OF THE STRUCTURE AND CYTOGRAM OF ADENOHYPOPHYSIS AFTER PROSERINE AND EPHEDRINE INTRODUCTION

A. A. MEJLUMIAN, B. D. GUSOVA

It has been shown that the introduction of proserine twice a day leads to the increase of the quantity of basophilic and degenerative cells and to the decrease of acidophilic ones. Under the influence of ephedrine the quantity of chromophobic cells decreases and increases that of basophilic and acidophilic ones.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акмаев И. Г. Автореф. канд. дисс., М., 1959.
2. Акмаев И. Г. Тр. 6-го Всесоюзн. съезда АГЭ, 2, 627—629, 1961.
3. Зорян В. Г. Фармакология и химия. 131—132, М., 1965.
4. Кассиль Г. Н., Шрейберг Г. Л., Григорьев М. Ю. Тез. докл. научн. конф. «Действие фармакологических веществ на эндокринные железы». 36—37, Л., 1965.
5. Махмудов Э. С. Мед. журн. Узбекистана, 5, 25—28, 1965.
6. Митропольский Б. А. Врачебное дело, 1, 140—141, 1963.
7. Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки. М., 1970.
8. Tadavasu B. 9-й Междунар. конгр. анатомов. Тез. докл., 175, М., 1970.
9. Harris G., Jacobsohn D. Ciba Found. Coll. on Endocrinol., 8, 115—123, 1952.
10. Szentagothai J. et al. Acta Biol. Hung., 8, 395—404, 1958.

УДК 631.6:634.836.4

СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДОВ В ОРГАНАХ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА ПОГЛОЩЕННОГО НАТРИЯ В МЕЛИОРИРОВАННОМ СОЛОНЦЕ-СОЛОНЧАКЕ

Г. П. ПЕТРОСЯН, Р. Г. СААКЯН

Изучалось влияние содержания поглощенного натрия почвы на углеводный обмен виноградной лозы. Установлено, что повышенные концентрации поглощенного натрия в почве угнетают ростовые процессы винограда, в результате нарушается углеводный обмен и в органах растений повышается содержание углеводов, снижается урожайность и ухудшается качество ягод.

Ключевые слова: виноградная лоза, мелиорированные почвы, углеводы, обменный натрий.

Исследование виноградной лозы, возделываемой на мелиорированных солонцах-солончаках Араратской равнины, показало, что повышенные концентрации поглощенного натрия в почве (свыше 5.0 мэкв) оказывают отрицательное воздействие на минеральный и азотистый обмен, пигменты пластид и активность окислительных ферментов [4—6]. Большой интерес представляет изучение углеводов, количество которых при избытке солей в почве также подвергается изменениям. Установлено, что в листьях ряда культур под воздействием хлоридного засоления повышается содержание моно- и дисахаридов [8], в ягодах винограда увеличивается содержание сахаров [3]. При повышенной щелочности почвы в ягодах идет процесс усиленного сахаронакопления за счет фруктозы и сахарозы [7]. Однако данных о влиянии повышенной концентрации солей почвы на содержание полисахаридов в литературе сравнительно мало. Отмечается, что их избыток чаще всего замедляет синтез биополимеров и ускоряет их распад.

В настоящей работе приводятся результаты исследования количественных изменений углеводов в различных органах виноградной лозы в зависимости от степени мелиорированности почвы.

Материал и методика. Объектом исследований служили листья, побеги и ягоды винограда сорта Гаран Дмак, возделываемого на мелиорированных почвах Ерасханской ОМС, содержащих в корнеобитаемых слоях поглощенного натрия 3,0—3,2 мэкв на 100 г сухой почвы (нормальные растения), и на немелиорированных участках, где содержание обменного натрия варьировало в пределах 5—6 мэкв (угнетенные растения). Листья, побеги и ягоды исследовались в основных фазах развития лозы. Количественное определение глюкозы, фруктозы, сахарозы, крахмала и гемицеллюлозы проводилось методом фракционного разделения [2], калия и натрия—на пламенном фотометре.

Результаты и обсуждение. Наши многолетние исследования показали, что особенностью зольного состава различных органов виноградной лозы, возделываемой на мелиорированных почвах, является

повышенное содержание натрия, обусловленное мелиоративным состоянием почвы. Под воздействием избытка токсичного иона натрия происходит торможение ростовых процессов, снижение всех параметров, характеризующих рост вегетативных органов, сокращается листовая поверхность как за счет уменьшения размеров, так и некротирования тканей листа. Угнетенные растения при этом сравнительно быстро завершают вегетационный цикл.

Результаты анализов свидетельствуют о том, что в листьях и побегах угнетенных растений по сравнению с нормальными повышается содержание натрия и снижается количество калия, в результате чего резко нарушается оптимальное соотношение между указанными катионами (табл. 1). В листьях и побегах угнетенных растений показатель

Таблица 1

Содержание натрия и калия в листьях и побегах нормальных и угнетенных растений винограда, % в золе

Фаза развития	Состояние растения	Na	K	K:Na
Л и с т ь я				
Цветение	нормальное	0,38	12,8	33,6
	угнетенное	0,58	10,8	18,6
Рост ягод	нормальное	0,50	14,0	28,0
	угнетенное	0,78	10,5	13,4
Созревание	нормальное	0,32	12,0	37,5
	угнетенное	0,67	10,6	15,8
Физиологическая зрелость	нормальное	0,38	11,5	30,2
	угнетенное	0,94	6,5	7,0
П о б е г и				
Рост ягод	нормальное	1,69	27,0	16,0
	угнетенное	2,53	23,1	9,1
Созревание	нормальное	2,11	27,1	12,8
	угнетенное	2,38	21,0	8,8
Физиологическая зрелость	нормальное	2,01	22,3	11,0
	угнетенное	2,89	18,4	6,4

отношения калия к натрию снижается, что особенно наглядно в конце вегетации в связи с интенсивным накоплением в них натрия и образованием на листьях некрозов.

Кривые изменения углеводов в листьях и побегах нормальных и угнетенных растений в период вегетации в основном идентичны, однако эти органы растений различаются по содержанию отдельных компонентов (рис.).

В начале вегетации (до цветения) в листьях угнетенных растений отмечается сравнительно высокое содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы, которое в дальнейшем несколько снижается. В побегах угнетенных растений больше сахарозы, а в нормальных—глюкозы и фруктозы.

Содержание крахмала в листьях угнетенных растений винограда по сравнению с нормальными на протяжении всей вегетации выше.

Очевидно, под воздействием избытка натрия повышается гидролитический распад крахмала и отток ассимилянтов замедляется, в то время как введение в листья хлоридов усиливает распад крахмала до декстринов и сахарозы [1]. В побегах угнетенных растений количество крахмала также выше, что обуславливает их раннее вызревание.

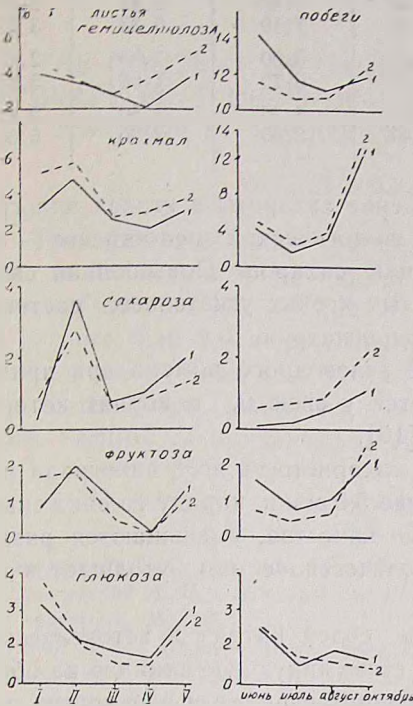


Рис. Содержание углеводов в листьях и побегах нормальных (1) и угнетенных (2) винограда также происходит ряд растений винограда. Фазы развития: I—до цветения, II—цветение, III—рост ягод, IV—созревание, V—физиологическая зрелость.

счет фруктозы и сахарозы (табл. 3).

В период роста заметно усиливается интенсивность дыхания ягод угнетенных растений по мере повышения в почве концентрации ионов натрия.

Следует отметить, что в одревесневших побегах угнетенных растений была обнаружена более низкая активность амилазы и сравнительно высокая активность инвертазы, чем в нормальных растениях (табл. 2).

Содержание высокополимерного углевода гемичеселлюлозы в листьях угнетенных и нормальных растений в начале вегетации примерно одинаково, в конце же вегетации у угнетенных растений оно значительно выше. В побегах наблюдается обратная картина: в начале вегетации содержание гемичеселлюлозы у нормальных растений выше, а в период физиологической зрелости мало чем отличается от аналогичного показателя угнетенных растений.

Под влиянием избытка натрия в мелиорированной почве в ягодах угнетенных растений отмечается сравнительно высокое содержание сахаров, за

Таблица 2
Активность амилазы и инвертазы в побегах винограда, мг/г глюкозы

Состояние растений	24/VI	4/VIII	5/IX
Активность амилазы			
Нормальное	2,56	11,55	22,10
Угнетенное	5,29	5,29	8,29
Активность инвертазы			
Нормальное	26,58	36,55	64,81
Угнетенное	29,85	54,35	74,81

Содержание сахаров и натрия в ягодах нормальных и угнетенных растений винограда, %

Дата взятия проб	Состояние растений	Сумма сахаров	Глюкоза	Фруктоза	Сахароза	Na
11/VII	нормальное	5,22	4,40	0,40	0,42	2,40
	угнетенное	6,13	4,70	1,10	0,33	3,74
4/VIII	нормальное	10,81	4,50	5,00	1,30	2,25
	угнетенное	13,18	4,70	6,70	1,68	5,35
5, IX	нормальное	20,40	10,60	8,30	1,50	2,41
	угнетенное	22,90	10,40	8,60	2,90	6,56

По литературным данным, накопление сахарозы в ягодах винограда главным образом приурочено к физиологической зрелости ягод—периоду повышения общего содержания сахаров. Повышенная сахаристость и наличие сахарозы в незрелых ягодах угнетенных растений обусловлено высоким содержанием ионов натрия.

Следует отметить, что улучшение углеводного обмена при применении натриевых удобрений отмечается у свеклы, в корнях которой увеличивается содержание сахарозы [10].

Однако несмотря на повышенную сахаристость ягод винограда при содержании в почве ионов натрия свыше 5,0 мэкв, наряду со снижением урожайности, ухудшаются их вкусовые качества, уменьшаются размеры гроздей и ягод, увеличивается количество семян, утолщается кожица.

Наличие в мелиорированной почве солей натрия в нетоксических концентрациях (3—4 мэкв) оказывает стимулирующее влияние на образование сахаров, ароматических и красящих веществ и ряд других соединений, обеспечивающих получение высококачественных десертных вин [8].

Таким образом, сравнительно высокое содержание углеводов в органах угнетенных растений винограда в условиях повышенного содержания в почве ионов натрия (свыше 5,0 мэкв), очевидно, обусловлено их неполным использованием на ростовые процессы, а также нарушением обменных реакций.

НИИ почвоведения и агрохимии МСХ Армянской ССР

Поступило 27.X 1982 г.

ԱՇԽԱՋՐԵՐԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽԱՂՈՂԻ ՎԱՋԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐՈՒՄ
ԿԱԽՎԱԾ ՄԵԼԻՈՐԱՅՎԱԾ ԱՂՈՒՏ-ԱԼԿԱԼԻ ՀՈՂԻ ԿԼԱՆՎԱԾ
ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ ՔԱՆԱԿԻՑ

Հ. Պ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ռ. Գ. ՄԱՀԱՅԱՆ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ մելիորացված հողերում աճեցրած խաղողի վազի տարբեր օրգաններում ածխաշրերի քանակը փոփոխություններ է կրում՝ կախված հողում նատրիումի իոնների պարունակությունից: Երբ կլանված նատրիումի քանակը հողում 5,0 մէկվ-ից ավելին է, բույսի աճման պրոցեսները բավական ընկճվում են, որի հետևանքով խաղողի տերևները

րում, շիվերում և պտուղներում տեղի է ունենում շաքարների և օսլալի կուտակում: Սակայն այդ պայմաններում միաժամանակ տեղի է ունենում պտուղների որակական հատկանիշների վատթարացում՝ կոպտանում է մաշկը, ավելանում է սերմերի քանակը, ջրազրկվում է պտղամիսը: Զգալիորեն նվազում է ընկճված վաղերի բերքատվությունը:

THE CONTENT OF CARBO-HYDRATES IN THE ORGANS OF GRAPE-VINE DEPENDING ON THE AMOUNT OF ABSORBED NATRIUM IN MELIORATED SALTED-ALKALINE SOILS

G. P. PETROSIAN, R. G. SAAKIAN

The amount of carbo-hydrates in different organs of grape-vine, grown in meliorated soils, undergoes changes in dependence of the content of natrium ions. When the amount of the absorbed natrium in soil is more than 5,0 mekv., the growth processes of the plant are inhibited and sugar, starch are gathered in the leaves, branches and fruits of the grape. Under such conditions the quality of fruits becomes worse. Fertility of the inhibited vines becomes less.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Баславская С. С. Уч. зап. МГУ. Ботаника, вып. 39, 1940.
2. Белозерский А. Н., Проскураков Н. И. Практическое руководство по биохимии растений. М., 1951.
3. Горев Л. Н. Виноградарство, вып. 4, Киев, 1967.
4. Петросян Г. Н., Саакян Р. Г., Сакунц Л. Е. Тр. Ин-та виноградарства, виноделия и плодоводства МСХ АрмССР, вып. 13, 1976.
5. Петросян Г. П., Саакян Р. Г., Сакунц Л. Е. Биолог. ж. Армении, 29, 10, 1976.
6. Петросян Г. П., Саакян Р. Г., Сакунц Л. Е. Биолог. ж. Армении, 32, 1, 1979.
7. Петросян Г. П., Саакян Р. Г. Изв. АН АрмССР, биол. науки, 14, 9, 1961.
8. Петросян Г. П., Саакян Р. Г., Хизанцян М. С., Сакунц Л. Е. Виноделие и виноградарство СССР, 4, 1975.
9. Строганов Б. П. Растения и засоленные почвы. М., 1958.
10. Яппаров Ф. Ш., Исхаков Ф. М. Резервы повышения продуктивности сахарной свеклы. Уфа, 1973.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.3

ВЫХОД ИОНОВ КАЛИЯ ИЗ БАКТЕРИЙ И ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭТОТ ПРОЦЕСС

А. А. ТРЧУНЯН

Ключевые слова: ионы калия, осмотический шок, мембраны бактерий.

Гликолизирующие бактерии *E. coli* поглощают K^+ в две разделенные во времени фазы [2, 4, 7], осуществляющиеся двумя различными механизмами [3, 7, 8]. В первую фазу при функционировании [7, 8] протонного АТФ-азного комплекса F_1F_0 и TgkA системы поглощения K^+ [10] происходит быстрый осмочувствительный обмен $2H^+$ клетки на один K^+ среды [5, 6]; во вторую фазу при функционировании протонного канала F_0 и TgkA системы, названной TgkF [3, 10], имеет место медленный обмен H^+ клетки на K^+ среды с неустойчивым соотношением потоков ионов [7]. При этом оба механизма ингибируются с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиимида (ДЦКД) [7, 8].

В период между фазами поглощения и при перенесении бактерий из среды с высоким в среду с низким осмотическим давлением (отрицательный осмотический шок) наблюдается заметный выход K^+ из бактерий [1, 2, 4, 7], природа которого остается неясной.

В настоящей работе приводятся результаты экспериментов, показывающие, что выход K^+ из бактерий может осуществляться пассивно по градиенту концентраций.

Материал и методика. В исследованиях использовали бактерии *E. coli* K 12 (λ). Методика выращивания и подготовки бактерий к эксперименту и измерения активностей ионов в среде с помощью ионоселективных электродов описана ранее [2, 4]. Приводимые кинетические кривые представляют собой одну из трех и более подобных кривых экспериментов данной серии.

Результаты и обсуждение. Из рис. 1 видно, что выход K^+ из бактерий наблюдается в период между первой и второй фазами поглощения K^+ при щелочных значениях pH среды (рис. 1 а, кр. 1) и отрицательном осмотическом шоке (рис. 1 а, кр. 2); он имеет место также у бактерий в среде без глюкозы при щелочных значениях pH среды как при положительном, так и отрицательном осмотических шоках и в присутствии ДЦКД (рис. 1 а, кр. 3, 4 и 5 соответственно) и отсутствует у бактерий, не способных утилизировать глюкозу, или у мертвых (рис. 1 а, кр. 6). Выход K^+ замедляется со временем, скорости выхода уменьшаются пропорционально возрастанию активности K^+ в среде (рис. 1 б): такая линейная зависимость свидетельствует о пассивном характере наблюдаемого процесса. Выход K^+ из бактерий при гликолизе в отличие от такового фаз поглощения не чувствителен к ДЦКД (рис. 1 а, пунктир).

Выход K^+ может наблюдаться и при реверсии механизма, обменивающего $2H^+$ на один K^+ [9], а также, как видно из рис. 2, при обращении механизма, осуществляющего вторую фазу поглощения и имеющего место после утилизации глюкозы как при положительном, так и отрицательном осмотических шоках при значительном закислении среды до значений pH ниже 7,0; обмен H^+ среды на K^+ клетки осуществляется при этом с неустойчивой стехиометрией потоков ионов от 4 до 14 и, как и следовало ожидать, ингибируется с помощью ДЦКД (рис. 2, пунктир).

Выход K^+ как в период между фазами поглощения, так и при отрицательном осмотическом шоке зависит от pH среды: с возрастанием

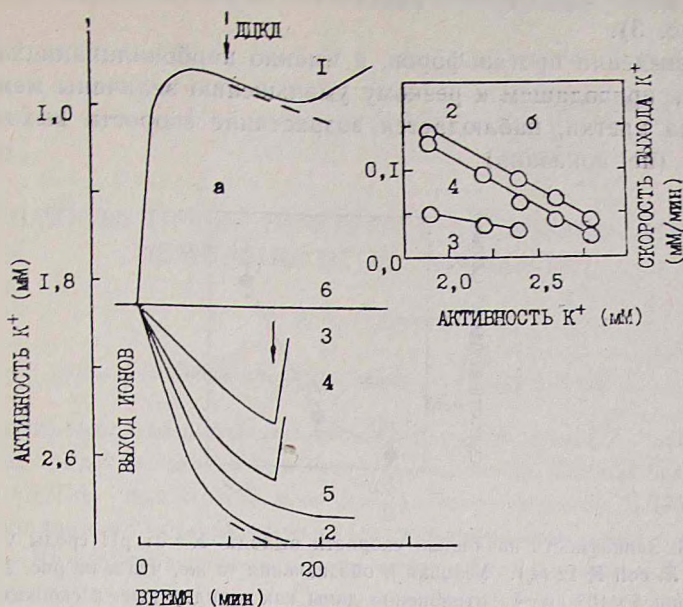


Рис. 1 а) Выход K^+ у бактерий *E. coli* K 12 (λ); б) зависимость скорости выхода K^+ от активности K^+ в среде. Бактерии выращены в течение 24—48 ч до стационарной фазы; 1, 3, 6—бактерии отмыты в дистиллированной воде и перенесены в экспериментальный раствор (фосфатно-трисовый буфер, калий хлористый—2 мМ, натрий хлористый—1 мМ, магний сернокислый—0,4 мМ) с точностью 570 мосМ; 2, 4, 5—бактерии отмыты в растворе с тоничностью 800 мосМ, созданной с помощью сахарозы, и перенесены в экспериментальный раствор; 1, 2, 6—глюкоза в концентрации 50 мМ, 3, 4, 5—глюкоза введена на 15-й мин (стрелка) в концентрации 50 мМ; пунктир—введение ДЦКД (стрелка) в концентрации 5×10^{-4} М; рН 7,8.

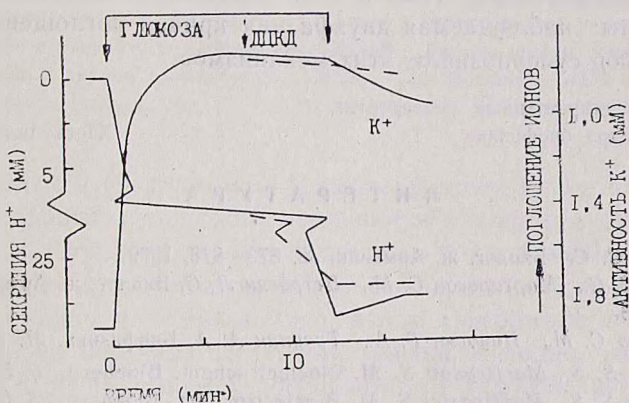


Рис. 2. Обращение потоков H^+ и K^+ после утилизации глюкозы у бактерий *E. coli* K 12 (λ). Бактерии отмыты в дистиллированной воде и перенесены в экспериментальный раствор с тоничностью 570 мосМ, глюкоза—в концентрации 5 мМ, рН 7,8; пунктир—введен ДЦКД (стрелка) в концентрации 5×10^{-4} М.

pH от 6,0 до 8,0 наблюдается увеличение скорости выхода ионов из бактерий (рис. 3).

При введении протонофоров, а именно карбонилцианидхлорфенилгидразона, приводящем к резкому уменьшению величины мембранного потенциала клетки, наблюдается возрастание скорости выхода K^+ и бактерий (не показано).

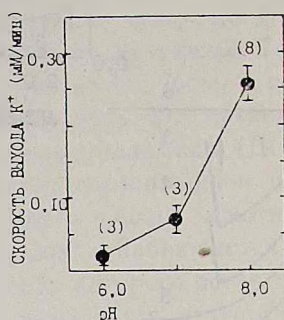


Рис. 3. Зависимость начальной скорости выхода K^+ от pH среды у бактерий *E. coli* K 12 (λ). Условия и обозначения те же, что и на рис. 2, титр бактерий 5×10^9 см $^{-3}$; отклонения даны как стандартные, в скобках приведено число экспериментов.

Приведенные данные в совокупности с тем фактом, что поток K^+ из бактерий тем больше, чем сильнее отрицательный осмотический или температурный шоки [1, 2], свидетельствуют о том, что выход K^+ в период между фазами поглощения и при отрицательном осмотическом шоке осуществляется пассивно по градиенту концентраций, по-видимому, диффузионным путем.

В переносе K^+ через мембраны гликолизирующих бактерий участвуют, по крайней мере, TgkA и TgkF системы и, возможно, диффузионные каналы; наблюдаемая двухфазная кривая поглощения K^+ представляет собой суперпозицию этих механизмов.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 6.XII 1982 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дургарьян С. С. Биолог. ж. Армении, 32, 873—878, 1979.
2. Дургарьян С. С., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. Биолог. ж. Армении, 31, 697—706, 1978.
3. Мартиросов С. М., Паносян Г. А., Трчунян А. А. Биофизика, 27, 249—252, 1982.
4. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554—560, 1978.
5. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 567—573, 1978.
6. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 25—32, 1981.
7. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 597—603, 1981.
8. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 605—611, 1981.
9. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 9, 459—467, 1982.
10. Rhoads D. B., Waters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 325—341, 1976.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОВОДИМОСТИ БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ
МЕМБРАНЫ ОТ ЕЕ ПЛОЩАДИ

Г. Р. ХАЧАТРЯН

Ключевые слова: бислойная липидная мембрана, проводимость.

В результате многочисленных экспериментальных исследований сложилось представление о том, что проводимость бислойных липидных мембран (БЛМ) при отсутствии утечек через границу БЛМ—подложка обусловлена их черной частью [2] и пропорциональна площади бислоя [5]. Возможная проводимость через краевую зону БЛМ экспериментально не исследовалась. Однако из общих физических соображений ясно, что краевая зона БЛМ отличается своими свойствами от собственно бислоя, и при достаточно малых размерах БЛМ «краевые» эффекты должны сказываться достаточно явно [1]. В работе Миямото и Томпсона [4] теоретически рассматривается возможность проводимости БЛМ через переходную зону бислой—мениск, липидный тор и контактную зону БЛМ с подложкой. Наша работа посвящена экспериментальному исследованию проводимости БЛМ в широком диапазоне изменений ее размеров.

Материал и методика. БЛМ формировали в 0,1 М NaCl из общих липидов мозга быка, растворенных в н-декане (20 мг в 0,1 мл). Измеряли ток через БЛМ, при наложении на нее ступенчатого напряжения—20 мВ. Ток усиливали усилителем Keithly-427 и считывали с экрана осциллографа С8-13. Сопротивление БЛМ определяли расчетным методом. Площадь черной части исследуемых БЛМ составляла 0,03, 0,07, 0,16, 0,24, 0,64, 1,32, 2,41 и 3,98 мм².

Результаты и обсуждение. Поскольку исследуемые площади и измеряемые сопротивления БЛМ изменяются в широком интервале значений, результаты удобнее представлять в виде зависимости $\lg \theta \sim \lg S$ (рис. 1), где θ —сопротивление БЛМ, S —площадь черной части БЛМ. Из рисунка видно, что кривая имеет излом в интервале площадей 0,2—0,3 мм². Форма перехода неизвестна, однако очевидно, что в левой части кривой зависимость резко отличается от таковой в правой части. Если для площадей 0,64, 1,32, 2,41, 3,98 мм² сопротивление пропорционально S , то для площадей 0,16, 0,07, 0,03 мм² оно пропорционально $\sqrt{S}$, т. е. начиная с 0,24 мм² и меньше сильно сказывается эффект краевой проводимости БЛМ. Сильно выраженный краевой эффект начиная со значения 0,24 мм² был показан нами ранее [1] для электрического пробоя БЛМ.

Таким образом, общая проводимость БЛМ складывается из проводимости черной части и проводимости края, причем преобладание той или иной проводимости зависит от размеров мембраны.

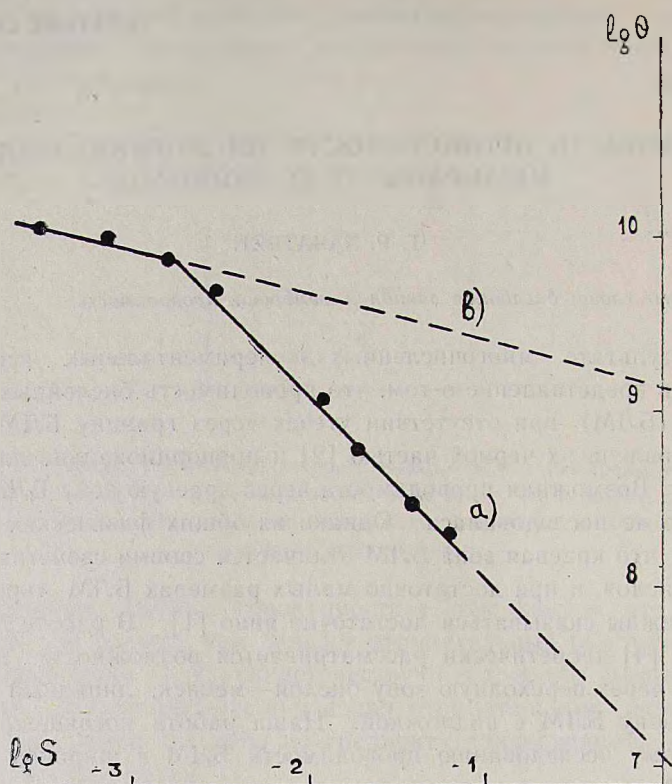


Рис. 1. Зависимость $\lg \theta$ от $\lg S$. Площадь измерена в см^2 , а сопротивление—в омах.

Представим БЛМ в виде параллельно соединенных сопротивлений черной части и края. Тогда общая проводимость БЛМ будет:

$$\frac{1}{\theta_{\text{БЛМ}}} = \frac{1}{\theta_{\text{кр}}} + \frac{1}{\theta_{\text{ч}}}, \quad (1)$$

где $\theta_{\text{БЛМ}}$, $\theta_{\text{кр}}$, $\theta_{\text{ч}}$ —сопротивление БЛМ, края и черной части соответственно. Сопротивление черной части можно записать в виде:

$$\theta_{\text{ч}} = \frac{a}{S_{\text{БЛМ}}}, \quad (2)$$

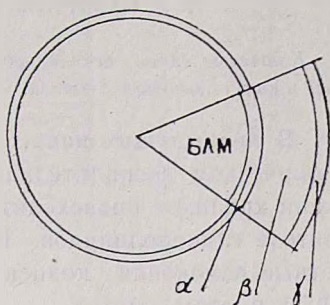
где $a = \rho_{\text{с}} l$; $\rho_{\text{с}}$ удельное сопротивление черной части мембраны, l —толщина бисюля, $S_{\text{БЛМ}}$ —площадь БЛМ. Сопротивление края можно записать в следующем виде:

$$\theta_{\text{кр}} = \frac{b}{\sqrt{S}}, \quad (3)$$

где $b = \frac{\rho_{\text{к}} \cdot \delta}{2\sqrt{\pi \alpha}}$ $\rho_{\text{к}}$ —удельное сопротивление края, δ —средняя толщи-

на краевой зоны, a —ширина края. Если сопротивление черной части определяется однозначно, то в отношении сопротивления краевой зоны возникает некоторая неоднозначность в связи с выбором толщины и ширины краевой зоны. Рассмотрим подробнее проводимость края БЛМ. Краевая зона БЛМ (рис. 2) состоит из переходной зоны бислой—мениск α , из собственно липидного тора β и зоны контакта БЛМ с подложкой γ . От того, которая из этих зон ответственна за краевую проводимость, зависит выбор ширины и толщины края в формуле (3). Для выявления ответственной за проводимость зоны формировали мембрану на отверстии с площадью $0,16 \text{ мм}^2$, при которой БЛМ имеет ярко выраженную краевую проводимость (рис. 1). Мембрану формировали таким образом, чтобы площадь черной части была равна $0,07 \text{ мм}^2$. Измеряли сопротивление такой мембраны и сравнивали с сопротивлением БЛМ, сформированной на меньшем отверстии, но имеющей такую же

Рис. 2. Строение краевой зоны БЛМ. α —переходная зона бислой—мениск; β —липидный тор (мениск); γ —зона контакта БЛМ с гефлоновой подложкой.



площадь черной части, т. е. с более узким тором. Сопротивления этих БЛМ оказались равны в пределах ошибки измерения и, следовательно, зоны β и γ выпали из рассмотрения, так как параметры этих зон резко различаются и если бы зоны были ответственны за проводимость, то дали бы ощутимую разницу в сопротивлениях БЛМ. Таким образом, в рассмотрении осталась лишь зона α . Ширина этой зоны оценивается как $1 \times 10^{-3} \text{ см}$ [3], а среднюю толщину зоны можно принять равной такой же величине. Теперь не составляет труда рассчитать значение удельных сопротивлений черной части и края БЛМ. Значение коэффициентов a и b определяются из рис. 1. Они численно равны участкам, отсекаемым кривыми a) и b) на оси ординат (в наших экспериментах $a = 1,6 \times 10^7$, $b = 2,8 \times 10^9 \text{ Ом}$). Поскольку нами не ставилась задача точного численного определения удельных сопротивлений, то укажем лишь что отношение $\rho_s/\rho_e \gg 1$, т. е. удельное сопротивление черной части БЛМ строго больше удельного сопротивления краевой зоны.

Ереванский физический институт ГКИАЭ, СССР

Поступило 13.V 1982 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аракелян В. Б., Хачатрян Г. Р., Матиян Н. С., Авакян Ц. М. Биолог. ж. Армения, 35, 9, 1982.
2. Бабаков А. В., Ермишкин Л. Н., Либерман Е. А. Журн. эвол. биох. и физиол., 2, 1966.
3. Исков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.

4. Miyamoto V. K. and Thompson T. E. J. Colloid Interface Sci., 25, 1967.
5. Ohki S., Goudup A. Nature, 217, 5127, 1968.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.131.547.915.5.577.11

БИОСИНТЕЗ ФОСФОЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ БРОНХОЛЕГОЧНОМ ПРОЦЕССЕ

П. А. КАЗАРЯН, П. С. СИМВОРЯН, Г. А. ГЕВОРКЯН

Ключевые слова: печень, фосфолипиды, хронический воспалительный бронхолегочный процесс, меченая глюкоза.

В предыдущих наших исследованиях [1] было показано, что при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе в печеночной ткани кроликов происходят глубокие нарушения начальных этапов биосинтеза глицеролипидов. Наряду с этим, были обнаружены также заметные изменения концентрации отдельных фракций фосфолипидов (ФЛ) в этом органе.

Сопоставление данных об активности ферментов фосфатидогенеза и уровне общих и индивидуальных ФЛ позволило сделать заключение о возможном подавлении биосинтеза глицеролипидов из глюкозы при указанном состоянии организма.

Для окончательного решения данного вопроса в новой серии экспериментов изучалось включение *in vivo* ^{14}C -глюкозы в отдельные представители ФЛ печени кроликов в норме и при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе.

Материал и методика. Опыты проводили на кроликах-самцах массой 2,5—3 кг. Хронический воспалительный бронхолегочный процесс вызывали методом Анничкова и Захарьевской в модификации Русанова и соавт. [3]. Животных забивали под тиопенталовым наркозом через 6 месяцев после воспроизведения заболевания.

Экстракцию общих липидов проводили из ацетоновых порошков печеночной ткани [2]. Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли методом хроматографии в тонком слое силикагеля [4].

Для определения биосинтеза ФЛ равномерно меченную ^{14}C -глюкозу в количестве 300 мккюри на 1 кг массы вводили внутрибрюшинно. Длительность радиоактивной экспозиции при введении ^{14}C -глюкозы составляла 60 мин.

Уровень радиоактивности в ФЛ измеряли на сцинтилляционном спектрометре SL-4221 (фирма «Intertechnique», Франция) в сцинтилляторе Брея [5] после предварительной солюбилизации образцов в протозоле (New England Nuclear co U. S. A.). Данные переводили в абсолютные единицы радиоактивности (распад/мин) методом внешней стандартизации. Окончательные результаты получены после машинной обработки.

Результаты и обсуждение. Данные о включении ^{14}C -глюкозы в отдельные представители ФЛ в норме и при хроническом воспалитель-

ном бронхолегочном процессе представлены в таблице, согласно которой через 60 мин после введения равномерно меченной ^{14}C -глюкозы радиоактивность обнаруживается во всех исследуемых фракциях ФЛ. У контрольных животных включение метки в индивидуальные ФЛ печени уменьшалось в следующем порядке: фосфатидилхолины (ФХ) > дифосфатидилглицерины (ДФГ) < фосфатидные кислоты (ФК) > фосфатидилинозиты (ФИ) > сфингомиелины (СМ) > фосфатидилэтанолamines (ФЭ) > фосфатидилсерины (ФС) > лизофосфатидилхолины (ЛФХ).

Таблица

Распределение ^{14}C -глюкозы в отдельные фракции ФЛ печеночной ткани кроликов при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе, % от общего

Фракции ФЛ	Контроль (5)*	Опыт (5)	P
ЛФХ	от следов до 1,8	9,38±3,22	<0,001
ФИ	9,20±4,20	10,87±2,04	>0,5
СМ	8,74±3,43	14,25±3,78	>0,2
ФХ	41,30±9,19	32,06±2,97	>0,05
ФЭ	6,50±1,94	12,22±1,25	<0,05
ФС	6,48±2,15	8,84±3,32	>0,5
ФК	12,60±5,19	2,90±1,07	<0,001
ДФГ	22,05±5,80	10,28±3,84	<0,05
Общие ФЛ (распад/мин.)	1356,60±62,45	978,75±58,50	<0,01

Примечание: * — число животных.

Хронический воспалительный бронхолегочный процесс сопровождался значительным снижением включения ^{14}C -глюкозы в общие ФЛ печени. На этом фоне резко уменьшался уровень радиоактивности ФК и ДФГ. Подавление включения метки отмечалось и в отношении ФХ, что сопровождалось значительным увеличением радиоактивности ЛФХ—токсичных продуктов липолиза. При этом не представилось возможным установить статистически достоверные отклонения в уровне радиоактивности остальных представителей ФЛ печени.

Таким образом, при хроническом воспалительном бронхолегочном процессе имеют место изменения в биосинтезе общих и некоторых фракций ФЛ печеночной ткани. Примечательно, что подавление синтеза общих ФЛ происходит за счет уменьшения скорости включения глюкозы в ДФГ, ФХ и ФК. Изменения в печени количественных соотношений отмеченных ФЛ чреваты серьезными расстройствами физико-химических свойств клеточных мембран и их физиологической активности.

ЕГИДУВ, МЗ Армянской ССР

Поступило 7.IV 1983 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казарян П. А. Ж. Экспер. и клин. мед., 12, 6, 522—525, 1982.
2. Карагезян К. Г. Лабор. дело, 1, 3, 1969.
3. Русанов Г. А., Горбачевич Л. И., Булатова З. В. и др. В сб.: Проблемы пульмонологии, вып. 3, 7—12, Л., 1973.
4. Шгаль Е. (ред.) Хроматография в тонких слоях (пер. с нем.), М., 1965.
5. Bray A. G. Anal. Biochem., 1, 279—285, 1960.

УДК 619:616—981.48—07:636.4

ЦИРКУЛЯЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В СВИНОВОДЧЕСКИХ КОМПЛЕКСАХ

С. Т. МНАЦАКАНОВ, М. Е. КОЦИНЯН, Р. Г. АКОПЯН

Ключевые слова: энтеробактерии, свиноводческие комплексы.

В связи с созданием крупных животноводческих комплексов большую актуальность приобретают вопросы бактериального загрязнения ими внешней среды [4]. Исследования, проведенные на различных территориях Советского Союза, показали, что у животных, содержащихся в этих условиях, особенно у поросят, больных диареей, выделяются *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia*, причем преобладали культуры *E. coli* [1, 2].

В данном сообщении приводятся результаты изучения циркуляции энтеробактерий в двух свиноводческих комплексах, в которых наблюдались диареи у новорожденных поросят.

Материал и методика. Исследования были проведены в Талинском (№ 1) и Мармарашенском свинокомплексах Армении, расположенных примерно на расстоянии 70 км друг от друга.

В Талинском свинокомплексе № 1 было проведено бактериологическое исследование 204-х проб (выделено 1013 культур), а в Мармарашенском—43-х проб (выделено 195 культур).

Идентификация выделенных энтеробактерий проводилась по существующим методическим рекомендациям [3]. О-патогенные серогруппы *E. coli* определялись с помощью 40 сывороток производства МНИИВС им. Мечникова и Армавирской биофабрики.

Результаты и обсуждение. Ни в одном случае нам не удалось выделить патогенных представителей энтеробактерий—сальмонелл и шигелл. В Талинском свинокомплексе № 1 были выявлены *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Arizona* spp., *Hafnia alvei*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*.

В Мармарашенском — *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Y. enterocolitica*.

Данные о выделении условно-патогенных кишечных бактерий в этих свинокомплексах у различных обследованных групп в процентах приводятся в табл. 1 и 2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, наиболее выраженной была микрофлора поросят, больных диареей, которая состояла из

Таблица 1

Выделение условно-патогенных энтеробактерий в Талинском свиномкомплексе № 1, %

Вид микроорганизма	Погибшие поросята	Больные поросята	Условно здоровые поросята	Свиноматки	Предметы комплекса
<i>E. coli</i>	88,0	76,8	87,7	95,2	65,0
<i>C. freundii</i>	—	0,2	—	1,2	5,0
<i>Arizona ssp.</i>	—	—	—	—	10,0
<i>K. pneumoniae</i>	1,3	1,2	—	—	5,0
<i>H. alvei</i>	—	1,1	—	—	3,8
<i>P. vulgaris</i>	2,7	3,9	3,9	0,6	—
<i>P. mirabilis</i>	1,3	3,2	2,3	1,2	3,7
<i>P.morganii</i>	—	2,1	—	—	5,0
<i>P. rettgeri</i>	0,7	1,2	1,5	—	2,5
<i>Y. enterocolitica</i>	6,0	10,3	4,6	1,8	—

Таблица 2

Выделение условно-патогенных энтеробактерий в Мармарашенском свиномкомплексе, %

Вид микроорганизма	Больные поросята	Свиноматки	Предметы комплекса
<i>E. coli</i>	82,8	88,9	58,7
<i>C. freundii</i>	—	—	13,8
<i>K. pneumoniae</i>	1,4	—	—
<i>P. vulgaris</i>	3,6	—	3,4
<i>P. mirabilis</i>	4,3	—	3,4
<i>P. morganii</i>	0,7	—	10,4
<i>P. rettgeri</i>	—	—	6,9
<i>P. alcalifaciens</i>	0,7	—	—
<i>Y. enterocolitica</i>	6,5	11,1	3,4

10-ти видов семейства *Enterobacteriaceae*, и наименее—у свиноматок, у которых было выявлено 5 видов этого семейства. Сравнивая высеваемость энтеробактерий у различных обследованных групп в Талинском свиномкомплексе № 1, можно отметить, что в наибольшем количестве выделялись *E. coli*, удельный вес которых подчас составлял 95,2%. Высеваемость остальных представителей не превышала 10%. Обращает на себя внимание несколько повышенный процент выделения *Y. enterocolitica* у больных поросят (10,3%).

В Мармарашенском свиномкомплексе также чаще всего выделялись штаммы *E. coli*, причем у свиноматок их высеваемость достигала 88,9%, остальные виды выделялись значительно реже.

Сравнивая высеваемость различных представителей семейства *Enterobacteriaceae* в двух свиномкомплексах, можно отметить, что и в Талинском № 1 и Мармарашенском преобладающими были штаммы кишечной палочки, остальные виды выделялись в единичных случаях. Тем не менее, следует подчеркнуть, что в обоих свиномкомплексах наблюдалась циркуляция почти всех представителей условно-патогенных энтеробактерий.

То же самое можно сказать о патогенных серогруппах *E. coli*, которые были выявлены и в Талинском свиномкомплексе (09, 04, 020, 044, 0101, 0119, 0114, 0125, 0128)—33 штамма, и в Мармарашенском (08, 015, 020, 055, 0101, 0114, 0125)—17 штаммов.

Таким образом, в условиях массовых диарейных заболеваний среди новорожденных поросят в двух исследованных свинокомплексах являются почти все представители семейства *Enterobacteriaceae*, что может иметь определенное значение в циркуляции условно-патогенных энтеробактерий среди населения.

Армянский ордена Трудового Красного Знамени
НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А. Б. Алексаняна

Поступила 9.XII 1982 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бердник В. П. Ветеринария, 9, 61, 1975.
2. Кабанков Ю. С. Ветеринария, 8, 30, 1975.
3. Киселева Б. С., Голубева И. В. Сб. тр. МНИИВС им. Мечникова; Диагностические препараты и методы лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых энтеробактериями. 30, М., 1977.
4. Stevens A. J. Ann. Inst. Sup. Sanita, 14, 221, 1978.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.15—074+616.15—73]:615.49

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕЛЕВИЗИОННОГО МЕТОДА ПРИ КАРИОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

А. М. ДАЛЛАКЯН, А. А. ОГАНДЖАНЯН

Ключевые слова: лимфоциты, кариометрия, рентгеновское облучение, телевизионный анализатор.

Методом кариометрического анализа установлен ряд закономерных изменений размеров и количества ядер лимфоцитов при внутреннем облучении*. Целью настоящей работы являлось исследование действия внешнего облучения на некоторые параметры ядер лимфоцитов периферической крови.

Материал и методика. Опыты ставились на 10 половозрелых (трехмесячного возраста) белых крысах массой 150—180 г. Животные подверглись общему однократному равномерному рентгеновскому облучению в дозе 0,875 Гр на аппарате РУМ-17 при следующих стандартных технических условиях: напряжение тока—200 кВ, сила тока—15 мА, фильтры—1 мм алюминия+0,5 мм меди, кожно-фокусное расстояние—60 см, мощность дозы—0,27 Гр/мин. Мазки периферической крови, приготовленные из лейкоконцентрата, исследовались через 3 ч после облучения (параллельно исследо-

* Хуссар Ю. П., Токин И. Б., Луциков Е. П., Хуссар В. С. Радиобиология, 12, 6, 840—843, 1972.

вазлись мазки крози у контрольных, необлученных животных с равной массой и одинакового возраста). Кариометрический анализ лимфоцитов проводили на мазках крови, окрашенных по Лейшману, в нашей модификации: мазки фиксировали и одновременно окрашивали краской Лейшмана. Продолжительность окрашивания—5 мин. После этого их промывали в дистиллированной воде в течение 5 мин и докрашивали гематоксилином Караччи также 5 мин, затем их споласкивали в дистиллированной воде, высушивали на воздухе и исследовали на автоматизированном телевизионном анализаторе микрообъектов (АТАМ), разработанном в Ереванском научно-производственном объединении «Нейрон» Министерства электронной промышленности СССР. В условных единицах измерялись площадь (S) оптического сечения телевизионного изображения ядра лимфоцита и его периметр (L), в каждой мазке по 100 лимфоцитов. По данным измерения площадей ядер лимфоцитов были составлены графики. Использовали арифметический способ группировки лимфоцитов на классы. К малым лимфоцитам относили клетки, площадь ядер которых принимала значения до 30,55 мкм² (1100 усл. ед.), к средним—от 33,33 до 47,22 мкм² (1200—1700 усл. ед.), к большим—свыше 49,99 мкм² (1800 усл. ед.). Цифровые данные подвергали статистической обработке с определением $M \pm m$, где M—средняя арифметическая величина, m—среднеквадратичное отклонение (ошибка) от средней арифметической. Достоверность изменений (P) определялась по таблице Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что через 3 ч после общего однократного равномерного облучения рентгеновскими лучами в дозе 0,875 Гр статистически достоверно увеличивается как площадь, так и периметр ядер лимфоцитов периферической крови. У контрольных, необлученных, крыс площадь (S) ядер лимфоцитов равна $40,67 \pm 1,72$ мкм², через 3 ч после облучения она увеличивается и составляет $48,05 \pm 0,47$ мкм². Различия статистически достоверны ($P < 0,001$). Периметр (L) ядер лимфоцитов до облучения равен $26,67 \pm 1,05$ мкм, через 3 ч— $30,0 \pm 0,22$ мкм ($P < 0,002$). Рентгеновское облучение в дозе 0,875 Гр приводит также к изменению характера распределения лимфоцитов (рис.). У контрольных крыс (рис. А) в мазках периферической крови лимфоциты с малой площадью ядра составляют $15 \pm 4,2\%$, со средней площадью— $49,6 \pm 3\%$, с большой— $31,4 \pm 4,6\%$. Через 3 ч после облучения (рис. Б) процентное содержание лимфоцитов с малой площадью снижается до $3,8 \pm 2,3$ ($P < 0,05$), средние составляют $42,6 \pm 8,3$ (различия статистически недостоверны, $P > 0,05$), процент лимфоцитов с большой площадью увеличивается до $53,6 \pm 7,3$ ($P < 0,05$). После облучения резко меняется также коэффициент отношения числа лимфоцитов с большой площадью ядер к числу лимфоцитов с малой площадью ядер. У необлученных крыс этот коэффициент равен 2,1, а через 3 ч после облучения он возрастает до 11,4, т. е. увеличивается в 5,4 раза.

Итак, через 3 ч после рентгеновского облучения в дозе 0,875 Гр наблюдается статистически достоверное увеличение площади и периметра ядер лимфоцитов периферической крови; возрастает процентное содержание ядер с большой площадью и резко убывает процент ядер с малой площадью. Увеличение площади ядер и изменение характера распределения малых, средних и больших лимфоцитов было выявлено Ю. П. Хуссаром и другими при внутреннем облучении цезием-137 в лимфатическом узле спустя 24 ч после воздействия изотопа. Было зарисовано и измерено на миллиметровой бумаге (в мм²) около 16 тысяч ядер.

Высокая точность проведенных нами измерений (инструментальная погрешность равна $\pm 0,028 \text{ мкм}^2$) и отсутствие субъективных ошибок при использовании АТАМ позволили на сравнительно небольшом экспериментальном материале (измерена площадь и периметр 1000 ядер) менее трудоемким способом получить данные, статистическая достовер-

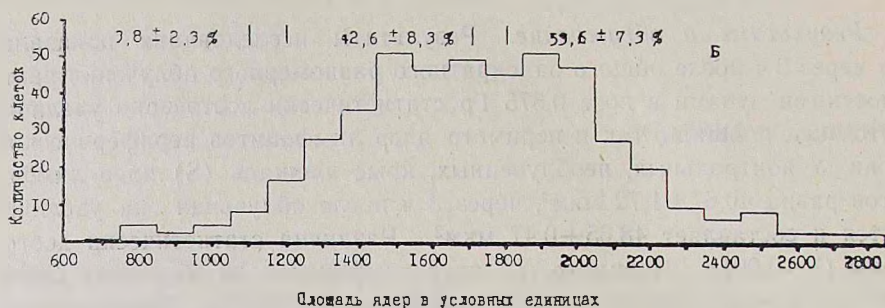
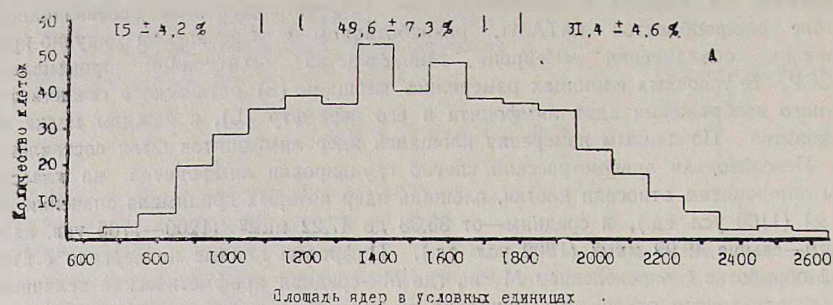


Рис. Кариограмма распределения площадей ядер лимфоцитов периферической крови необлученных (А) и облученных (Б) крыс.

ность которых на порядок выше, чем при применении общепринятого способа кариоцитометрии. Указанные выше преимущества АТАМа и чувствительность метода анализа телевизионного изображения клеток дали возможность обнаружить изменения некоторых геометрических параметров ядра лимфоцита в ранний срок (через 3 ч) после рентгеновского облучения относительно небольшой дозой (0,875 Гр).

Сектор радиобиологии МЗ Армянской ССР

Поступило 12.IV 1983 г.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 612.017.1

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УПРОЩЕННАЯ МЕТОДИКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИММУННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

А. В. МОВСЕСЯН, Н. П. МЕСРОПЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН,
Р. Г. ПОГОСЯН, Ю. Т. АЛЕКСАНИАН

Ключевые слова: иммунные лимфоциты, цитотоксическое действие.

При изучении клеточных факторов иммунитета в условиях *in vitro* большую роль играет предложенный в 1961 г. метод цитотоксического действия иммунных лимфоцитов на культивируемые клетки-мишени [7]. В дальнейшем были разработаны различные модификации этого метода [3--6, 8], однако все они достаточно сложны, и постановка опытов с их использованием требует длительного времени. В литературе имеются также сведения о возможности обнаружения цитотоксического действия (ЦТД) после значительно более короткого периода инкубации лимфоцитов с клетками-мишенями [2].

Задачей настоящей работы являлась разработка упрощенной методики ЦТД иммунных лимфоцитов на клетки-мишени.

Материал и методика. При постановке опытов в качестве клеток-мишеней были использованы клетки линии МГ XXIIa [1], полученной из перевиваемой мышинной гепатомы XXIIa. Клетки выращивали на среде Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Для получения иммунных лимфоцитов крыс четырехкратно с недельным интервалом иммунизировали 50%-ной суспензией ткани печени мышей в растворе Хенкса. Суспензию вводили подкожно в каждую конечность по 0,5 мл. Лимфоциты от иммунизированных животных получали гомогенизацией селезенки на шестой день после последней инъекции. В качестве контроля использовали суспензию клеток селезенки интактных животных. Используемые в опытах лимфоциты и клетки-мишени трижды отмывали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. При отмывании клеток и постановке опытов использовалась среда Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Соотношение клетск-мишеней и лимфоцитов составляло 1:50. В пробирки вносили по 0,1 мл клеток-мишеней (4×10^4 клеток), добавляя по 0,1 мл суспензии лимфоцитов подопытных или интактных животных (2×10^6 клеток). Общий объем реагирующей смеси—0,2 мл. В качестве технического контроля в том же объеме среды инкубировались клетки-мишени, а также лимфоциты. С целью улучшения контакта клеток пробирки центрифугировали при 500 об/мин в течение 5 мин, затем инкубировали при 37° в течение 4 часов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью трипанового синего. После добавления красителя и тщательного пипетирования клеточного осадка производили подсчет живых и мертвых клеток в камере Горяева. ЦТД считается положительным при наличии не менее 50% мертвых клеток-мишеней.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты экспериментов, при инкубации клеток селезенки иммунизированных животных с клетками-мишенями количество мертвых клеток варьировало в пределах 65—84%, что свидетельствует о выраженном ЦТД иммунных лимфоцитов. В то же время лимфоциты интактных животных не действовали цитотоксически на клетки-мишени. Следовательно, для проявления цитотоксического эффекта иммунных лимфоцитов с регистрацией результатов с помощью подсчета живых и мертвых клеток оказалась достаточной их инкубация с клетками-мишенями в течение 4 часов. Полученные данные свидетельствуют также о том, что для изучения цитотоксического эффекта иммунных лимфоцитов, образующихся к ксено-трансплантату, в качестве клеток-мишеней могут быть использованы длительно культивируемые опухолевые клетки. Обнаружение ЦТД Т-киллеров в ксеногенной системе дает определенные основания для выяснения возможностей применения описанного способа регистрации киллерной активности лимфоцитов и при исследований иммунного ответа в аллогенной и сингенной системах. Поскольку при изучении ЦТД

лимфоцитов по упрощенной методике нет необходимости в применении радиоактивной метки и специального оборудования, а регистрация результатов проводится с помощью подсчета клеток, указанный способ целесообразно использовать при проведении экспериментов с небольшим числом проб.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР

Поступило 29.X 1982 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Ю. Т., Басмаджян М. Б., Мовсисян К. С. и др. Бюлл. exper. биол., 5, 94, 1972.
2. Дризлих Т. И., Андреев А. В., Котомина И. Ф., Брондз Б. Д. Бюлл. exper. биол., 81, 3, 340, 1976.
3. Brondz B. D. Folia biol., 10, 164, 1964.
4. Haskill I. S. J. Nat. cancer inst., 51, 1581, 1973.
5. Hellström I., Hellström K. E., Bill A. H., Pierce G. E. Inter. j. cancer, 6, 172 1970.
6. Henney C. S. J. Immunol., 110, 73, 1973.
7. Rosenau W., Moon H. D. J. Nat. cancer inst., 27, 471, 1961.
8. Takasugi M., Klein E. Transplantation, 9, 219, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.017.1

ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

К. А. КАЗАРЯН, М. В. ТАТЬЯН, Н. Г. АКОПЯН, С. А. СИМОНЯН,
Ю. Т. АЛЕКСАНИЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН

Ключевые слова: животные—опухоленосители, антителообразующие клетки, иммунологическая память, первичный иммунный ответ.

Изучение иммунореактивности у животных-опухоленосителей представляет значительный интерес. Однако имеющиеся в литературе данные, касающиеся этого вопроса, довольно противоречивы [2, 4, 7, 10, 11]

Задачей настоящей работы явилось изучение формирования первичного иммунного ответа, иммунологической памяти и розеткообразующих клеток у мышей-опухоленосителей в разные сроки роста опухоли.

Материал и методика. Опыты были проведены на 145-ти мышях-самцах линии СЗНА массой 23—25 г. Использовалась опухоль МГХХIIa, образовавшаяся у мышей

этой линии после введения длительно культивируемых клеток мышинной гепатомы МХIIa—клеток линии МГХХIIa [1].

Мышам подкожно вводили 20%-ную суспензию опухолевой ткани в растворе Хэнкса. Опухоль прививалась в 100% случаев. В опытах использовали животных на 12-й (ранний срок) и 24-й (поздний срок) дни после прививки опухоли. Антигеном служили эритроциты барана (ЭБ). При исследовании первичного иммунного ответа ЭБ вводили в дозе $5 \cdot 10^8$ внутривенно, а иммунологической памяти— $1 \cdot 10^6$ внутривенно, с недельным интервалом между двумя инъекциями. На четвертый день после последней инъекции определяли количество антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в геле [9] и количество розеткообразующих клеток (РОК) по описанной в литературе методике [6]. Полученные данные обработаны статистически по методу Фишера-Стьюдента. В качестве основных показателей использовали среднее геометрическое. Доверительные интервалы вычисляли с вероятностью $P=0,05$.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены обобщенные результаты определения количества АОК и РОК при изучении первичного иммунного ответа и иммунологической памяти в разные сроки роста опухоли.

Т а б л и ц а

Иммунологическая реактивность у мышей-опухоленосителей

Группа	Количество животных	Количество АОК на селезенку	Количество РОК на селезенку
Первичный иммунный ответ (ранний срок)	26	113501 (95225÷135207)	7688100 (4955254÷10420746)
Контроль	12	69024 57513÷82794	6502000 4002239÷9001761
Первичный иммунный ответ (поздний срок)	24	238232 204644÷277432	
Контроль	15	229615 205286÷257040	
Иммунологическая память (ранний срок)	27	241546 187068÷311889	28953600 14305151÷43602049
Контроль	16	83560 59869÷116681	66165666 32669888÷99661444
Иммунологическая память (поздний срок)	12	200447 159221÷252348	16406428 10179911÷22632865
Контроль	14	170608 142889÷203704	10496071 7806669÷13185473

Примечание: контролем служили интактные животные, иммунизированные эритроцитами барана.

Как видно из представленных данных, в ранние сроки как при первичном, так и при вторичном иммунном ответе (иммунологическая память) имело место достоверное увеличение количества АОК в опытных группах по сравнению с соответствующими показателями в контроле.

При изучении иммунного ответа в поздние сроки роста опухоли количество АОК как при первичном, так и вторичном иммунном ответе не отличается от контрольных величин. Не обнаруживается достоверной разницы и в количестве РОК у животных подопытных и контрольных групп.

Полученные нами данные подтверждают имеющиеся в литературе сведения [3] о стимуляции иммунореактивности организма на ранней стадии роста опухоли. На поздней же стадии большинством исследователей [2, 7, 10, 11] установлено подавление иммунного ответа, выражающееся, в частности, в снижении количества антигенреактивных клеток [8], что, по-видимому, можно объяснить цитотоксическим действием опухолевых клеток на лимфоциты [5].

Результаты наших исследований подтверждают имеющиеся в литературе единичные сведения [4] об отсутствии заметных изменений в первичном иммунном ответе на гетерологичный антиген на поздней стадии роста опухоли. На этой же стадии нами обнаружено также отсутствие изменений в иммунореактивности организма при формировании иммунологической памяти и розеткообразующих клеток. Это обусловлено тем, что опухолевые клетки, по-видимому, не оказывают заметного цитотоксического действия на лимфоциты.

Таким образом, у мышей линии СЗНА на ранней стадии роста опухоли МГХХIIа установлена стимуляция первичного иммунного ответа и иммунологической памяти к гетерологичному антигену, в то время как на поздней стадии изменений в иммунореактивности организма не обнаружено.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР Поступило 5.X 1982 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алексанян Ю. Т., Басмаджян М. Е., Мовсесян К. С. и др. Бюлл. exper. биол. и мед., 5, 94, 1972.
2. Волегов А. И., Иванов А. А., Муравьева Л. И. Опухоль и организм (Мат-лы научн. конф. Ин-та проблем онкологии АН УССР), 77, Киев, 1973.
3. Дурнова Г. Н. Бюлл. exper. биол. и мед., 4, 85, 1968.
4. Ковалев И. Е., Григорьян-Ковалева В. Л., Рубцова Е. Д. и др. Вопросы онкологии, 17, 4, 55, 1971.
5. Фукс Б. Б., Зедгинидзе М. С., Спиранде И. В. и др. Бюлл. exper. биол. и мед., 9, 342, 1981.
6. Хоробрых В. В., Тарханова И. А., Юрий Б. Л. и др. Журн. микроб., эпид. и иммунобиол., 9, 105, 1974.
7. Якименко Л. В., Семенова-Кобзарь Р. А., Уманский Ю. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 9, 105, 1974.
8. Якименко Л. В., Уманский Ю. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 5, 86, 1974.
9. Yerne N. K., Nordin A. A. Science, 140, 3565, 405, 1963.
10. Trinkaus J. P. In: The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development 225, Amsterdam, 1976.
11. West W. H., Boozer R. B., Herberman R. B. J. Immunology, 120, 90, 1978.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.353:576.085

КИНЕТИКА КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В СТАЦИОНАРНОЙ КУЛЬТУРЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА, СТИМУЛИРОВАННОЙ К РАЗМНОЖЕНИЮ

Г. Г. ЗАКАРЯН

Ключевые слова: культура клеток, пролиферация, G_2 -период.

Культивируемые клетки, прошедшие спонтанную или индуцированную трансформацию, приобретают ряд свойств, отличающих их от нормальных диплоидных клеток. Культуры нормальных клеток имеют ограниченную продолжительность жизни *in vitro* и прекращают размножение после определенного числа делений [8], трансформированные же клетки при пассировании способны практически к неограниченному во времени размножению. Кроме того, они отличаются от нормальных слабой зависимостью от экзогенных факторов роста [7, 9], низкой чувствительностью к контактному подавлению движения клеток [5], аномалиями клеточной поверхности [6] и анеуплоидией [11]. Широко используемые перевиваемые клеточные линии являются в большинстве своем спонтанно трансформированными.

Ранее было показано [1, 4], что в плотных культурах диплоидных клеток, вступающих в стационарную фазу роста, одновременно с задержкой клеток в G_1 -периоде происходит возрастание числа непроделирующихся клеток, задержанных в G_2 -периоде. Блокирование клеток в периоде G_2 рассматривалось авторами как один из способов подавления скорости роста культуры.

В настоящей работе представлены данные о кинетике стимулированной пролиферации перевиваемых клеток китайского хомячка, полученные в опытах, поставленных с целью выяснения вопроса о способности этих клеток выходить из митотического цикла в G_2 -периоде при резком возрастании плотности клеточного слоя.

Материал и методика. Работа выполнена на перевиваемой 431-й линии фибробластов хомячка, содержащихся в питательной среде 199 с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Клетки рассаживали в концентрации 80—100 тысяч клеток/мл в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Через сутки после посева культуру перепосили в бесывороточную среду, что способствовало быстрому выходу клеток в стационарную фазу роста, еще через 6 сут клетки стимулировали к синтезу ДНК путем смены питательной среды на свежую, содержащую 10% сыворотки. Кинетику пролиферации исследовали методом радиоавтографии и путем определения митотического индекса. Клетки инкубировали с 3H -тимидином непрерывно (0,1—0,2 мкКи/мл) либо кратковременно в течение 4 ч (1 мкКи/мл) и затем фиксировали в смеси 96-градусного этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Препараты готовили по общепринятой методике [3]. С целью определения митотической активности за 4 ч до фиксации клеток в среду вносили колцемид (0,1—0,2 мкг/мл). Эту процедуру повторяли

каждые 4 ч в течение всего периода проведения эксперимента. Избранный срок инкубации определялся тем, что длительная обработка клеток использованным цитостатиком приводит к увеличению числа многоядерных и аберрантных клеток [10]. В эти же сроки подсчитывали индекс меченых клеток (Si) и кумулятивный митотический индекс (Mi) на 4—5 препаратах из 1000 клеток, для определения которого использовали способ, описанный в предыдущей работе [1]. Плотность клеточного слоя определяли путем подсчета среднего числа клеток в 50—200 полях зрения микроскопа (площадь около 0,01 мм²).

Результаты и обсуждение. Смена среды в стационарной 7-суточной культуре приводит к быстрой активации пролиферативных процессов (табл.). Спустя 12 ч после стимуляции клеточной пролиферации

Таблица

Кинетика стимулированной клеточной пролиферации в культуре клеток
китайского хомячка

Время после смены среды, ч	Кумулятивный индекс меченых клеток, %	Митотиче- ский индекс, %	Кумулятив- ный митоти- ческий индекс, %
4	17,7	2,3	2,3
8	26,4	1,9	4,2
12	47,3	2,5	6,8
16	59,2	0,5	7,3
20	71,3	3,8	11,4
24	76,0	8,4	20,4
28	74,7	11,3	34,5
32	75,4	9,4	47,1
36	78,2	9,9	61,7
40	79,9	12,6	82,1
44	79,8	8,8	98,1
48	81,8	9,0	115,9
52	81,4	8,5	134,3
56	80,8	8,5	154,2

наблюдается резкое нарастание индекса меченых клеток, с большой скоростью продолжающееся до 24 ч. Число меченых митозов невелико до 20 ч, затем митотическая активность повышается. В дальнейшем темп пролиферации культуры не спадает и даже через 56 ч после начала стимуляции культура не переходит в стационарную фазу роста. В это время в культуре велико число клеток, находящихся в периоде синтеза ДНК (в течение 52—56 ч метится 34% клеток) и вступающих в митоз (8,5%). В поздние сроки индекс меченых клеток нарастает с малой скоростью (примерно 2% за каждый 4-часовой интервал). Увеличение числа меченых клеток в эти сроки объясняется их делением, а не инициацией синтеза ДНК в немеченых, ранее не пролиферировавших клетках. В противном случае прирост меченых клеток происходил бы со значительно большей скоростью. Надо полагать, что немеченые клетки представляют собой ту часть популяции, которая необратимо утратила способность к пролиферации.

Суммарное число клеток, прошедших митоз, равномерно нарастает начиная с 20 ч и до конца опыта, так что к концу наблюдений кумулятивный митотический индекс (154%) превышает индекс меченых клеток (81%). Это означает, что стимулированные клетки за это время проходят митотический цикл более одного раза и что по меньшей мере часть их делится дважды или трижды. Сказанное согласуется с резуль-

татами работы Яковлева и др. [12], наблюдавших в этой же культуре высокую пролиферативную активность в поздние сроки после смены питательной среды. Плотность клеточного слоя в течение эксперимента возрастает более чем в 3 раза (от $23,5 \pm 1,2$ до $74,2 \pm 4,3$), что значительно выше, чем в культуре диплоидных клеток куриного эмбриона, где мы наблюдали увеличение числа клеток в 1,6 раза (от $14,7 \pm 0,6$ до $23,8 \pm 1,0$) [2].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что перевиваемые клетки китайского хомячка не блокируются в G_2 -периоде даже при резком возрастании числа клеток популяции. Следовательно, зависимость пролиферации от плотности клеточного слоя у них выражена слабее не только при прохождении G_1 -, но и G_2 -периода. Неспособность трансформированных клеток выходить из митотического цикла в G_2 -периоде при увеличении плотности клеточного слоя является еще одним свойством, отличающим их от нормальных диплоидных клеток.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 12.I 1983 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаспарян Г. Г., Зикарян Г. Г., Терских В. В., Магакян Ю. А. Цитология, 23, 654—659, 1981.
2. Гаспарян Г. Г., Терских В. В., Закарян Г. Г., Магакян Ю. А. Цитология, 22, 689—693, 1980.
3. Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография М., 1977.
4. Закарян Г. Г., Гаспарян Г. Г., Магакян Ю. А. Цитология, 25, 47—52, 1983.
5. Abercrombie M., Heaysman J. E. Exp. Cell Res., 6, 293—306, 1954.
6. Domnina L. V., Ivanova O. I., Margolis L. B., Olshevskaya L. V., Rovensky Ju. A., Vasiliev Ju. M., Gelfand I. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 248—252, 1972.
7. Dulbecco R. Nature, 227, 802—806, 1970.
8. Hayflick L., Moorhead P. S. Exp. Cell. Res., 25, 585—621, 1961.
9. Holley R. W. Gold Spring Harbor, N. J.—L., 13—18, 1974.
10. Lalley P. A., Nardone R. M. J. Cell. Biol., 63, 182a, 1974.
11. Ponten J., Westermarck B. Med. Biol., 56, 184—193, 1978.
12. Yakovlev A. Ju., Malinin A. M., Terskikh V. V., Makarova G. F. Cytologie, 14, 279—283, 1977.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.15+577.3+591.39

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ Mg^{2+} -АТФазы И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ВНУТРЕННИХ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

А. А. СИМОНЯН, Р. Б. БАДАЛЯН, Л. Б. БУРНАЗЯН

Ключевые слова: АТФаза, малатдегидрогеназа, онтогенез.

Известно, что митохондрии способны осуществлять самые разнообразные функции, одной из которых является зависящий от энергии перенос ионов через мембраны.

Ранее нами было показано, что АТРазная активность в суммарной фракции и в отдельных субфракциях митохондрий печени кур в ходе эмбрионального развития возрастает [1]. Аналогичные результаты были получены в суммарной мембранной фракции митохондрий печени кур в эмбриональном и постэмбриональном периодах развития. В этом плане представляло интерес изучение изменения АТРазной активности во внутренних мембранах митохондрий, в частности Mg^{2+} -активируемой АТРазы, которая, как известно, является маркером этих мембран. В настоящем сообщении приводятся результаты исследования активности Mg^{2+} -зависимой АТРазы и малатдегидрогеназы внутренних мембран митохондрий печени кур в различные периоды онтогенетического развития.

Материал и методика. Опыты проводили на 15-, 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и половозрелых курах. Печеночную ткань гомогенизировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу и 0,01 М трис-HCl буфер (рН 7,4), митохондрий выделяли центрифугированием, ядра—при 700 g (10 мин), митохондрии—9000 g (15 мин). После трехкратной промывки митохондрии подвергали осмотическому шоку в дистиллированной воде и оставляли на 12 ч при 0°. Затем их центрифугировали в градиенте плотности сахарозы при 45000 g в течение 60 мин для получения внутренних мембран [5].

Для определения активности АТРазы Mg^{2+} добавляли в количестве 10 мМ (конечная концентрация) и 2 мг АТР (в пробу). Общий объем смеси—1 мл. Время инкубации—30 мин при 37°. Об активности фермента судили по нарастанию количества неорганического фосфата в среде, который определяли по Лоури и Лопесу [3].

Общую активность малатдегидрогеназы во внутренних мембранах определяли, используя следующую реакционную смесь: 0,1 мл 0,002 М раствора НАД, 0,1 мл 0,5 М раствора малата, 0,1 мл суспензии мембран. Конечный объем смеси доводили до 2 мл 0,1 М раствором глицинового буфера, рН 10 [2]. Об активности малатдегидрогеназы судили по нарастанию количества НАДН.

Полученные данные были рассчитаны на 1 мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [4].

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что в контрольных опытах (без добавления Mg^{2+}) активность АТРазы в эмбриональном периоде не изменяется, она повышается во

Таблица 1

Mg^{2+} -АТРазная активность внутренних мембран митохондрий печени кур
в онтогенезе, Р в мкатамах/мг белка/30 мин

Условия опыта	Эмбрионы		5-дневные цыплята	Куры
	15-дневные	20-дневные		
Без активаторов	0,67±0,07 (4)*	0,59±0,10 (4)	1,55±0,22 (4)	1,37±0,16 (6)
Mg^{2+}	5,13±0,66 (4)	3,68±0,66 (4)	8,64±1,41 (4)	6,61±0,83 (5)

* В скобках количество опытов.

внутренних мембранах митохондрий печени 5-дневных цыплят. Высокий уровень активности фермента сохраняется и в печени зрелых кур. В присутствии ионов Mg^{2+} активность АТФазы на всех стадиях развития повышается, по сравнению с контролем, в 5—7 раз. Активность Mg^{2+} -АТФазы в мембранах митохондрий печеночной ткани 5-дневных цыплят повышается и несколько снижается у зрелых кур.

Таблица 2

Малатдегидрогеназная активность внутренних мембран митохондрий печени кур в онтогенезе, мМ лиридинуклеотида/мг белка/мин

Эмбрионы		5-дневные цыплята	Куры
15-дневные	20-дневные		
$0,87 \pm 0,012$ (4)	$0,91 \pm 0,016$ (5)	$0,95 \pm 0,013$ (5)	$0,78 \pm 0,023$ (4)

Результаты исследований показывают также (табл. 2), что активность малатдегидрогеназы во внутренних мембранах митохондрий печени кур в ходе развития проявляет небольшую тенденцию к повышению в конце эмбриональной и начале постэмбриональной стадий развития; у кур происходит значительное снижение ее.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 15.III 1983 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Р. Б. Канд. дисс., Ереван, 1981.
2. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии, М., 1971.
3. Lowry O. H., Lopez J. A. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265 1951.
5. Schnaltman C. A., Erwin V. G., Greenawalt J. W. J. Cell. Biol., 32, 719, 1967.