

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ  
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ  
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
Ж У Р Н А Л  
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года

Айастанի քенсабанақан анде

выходит 12 раз в год

на армянском и русском языках

Խմբագրական կոլեգիա՝ Ն. Մ. Ամադյան, Վ. Ն. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (պատասխանատու խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադյան, Ա. Շ. Բաբայան (գլխավոր խմբագիր), Փ. Ի. Հակոբյան, Ե. Ս. Հարությունյան (պատ. քարտուղար), Վ. Հ. Վարդյան, Ս. Հ. Սարգսյան:

Խմբագրական խումբը՝ Ն. Ն. Արամյան, Վ. Շ. Արարյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Գ. Ն. Բարսյան, Ա. Կ. Բախտանյան, Պ. Ա. Խորշակյան, Ս. Կ. Կարասեփյան, Ս. Ի. Հովհաննիսյան, Կ. Կ. Հովսեփյան, Կ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մանուկյան, Մ. Ն. Չալախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Ն. Տեր-Միկայելյան:

Редакционная коллегия: Ц. М. Амадян, В. Ш. Аветисян, Ж. П. Африкян, Г. С. Арутюнян (ответ. секретарь), Э. К. Африкян (главный редактор), О. Г. Баклаваджян, А. Ш. Галетян (зам. главного редактора), В. О. Казарян, С. О. Манукян.

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабян, П. Н. Акрамовский, Э. К. Африкян (през. совета), Д. Н. Бабаян, Л. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, С. А. Погосян, А. Л. Гахчаджян, М. Е. Гер-Минасян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

ԱՄԵ 407

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԻՆՍԱՔԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

Հիմնադրվել է 1936 թ.  
Համար XXXVIII, № 1

Հրատարակվում է ամսական 12 անգամ  
Երևան, 1985 թ.

Ք Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

Փարձառական

Մարտիրոսով Ս. Ս. Մեմբրանային համակարգերի վերադիվերացիային կազմակերպման կենտրոնական նպատակահարմարությունը	7
Յևմեյկի Ֆ. Ն., Սևմյոնով Ս. Մ., Տոնոյան Կ. Ա. Սպորտաշտաբային սկզբունքը և սպորտաշտաբային պրոցեսների մաթեմատիկական մոդելավորումը	19
Սազկի Ս. Պ., Ասերխանյան Կ. Մ., Գուլսաջյան Կ. Ա., Յերմերդիզյանի խրոնիկական երկմասնական ազդեցությունը առանտների լյարդի էներգետիկականությունը որոշ ցուցանիշների և β-գլիկոլիդազների ընդհանուր ակտիվության վրա	25
Մկեռյան Լ. Կ., Կարապետյան Հ. Կ., Հաջյան Ս. Ա. հիթ-ի կայունությունը էլեկտրական դաշտում տեղափոխ անհատների արկայությունը	29
Ուզնեյան Կ. Ն. Տրիպսիի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա գլիկոլամինոզիդների ինհիբիտորական ազդեցության մեխանիզմի ուսումնասիրությունը	38
Մելիքյան Կ. Բ., Երկչերտ լիպիդային մեմբրանների փոխազդեցությունը և միանությունը	44
Պյոլիսանդանյան Ա. Վ. Իոնոֆորենցիա առաջացում K <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> փոխանակության ուսումնասիրությունը էրիթրոցիտներում	51
Սզամյան Ս. Յա., Համբարձումյան Տ. Կ. Ուարաին-անգագյուն Նձ-ԱՅՅ-ազա	56
Սևրյան Մ. Մ., Առանկյան Ս. Կ., Ռոխիկյան Ա. Ա., Սիլիբալյան Վ. Ի. Ըլ-տոկոֆերիլացնատաի ազդեցությունը լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսի վրա ակուտակի ստրեսի պայմաններում	61
Պետրոսյան Ս. Լ., Զախարյան Ա. Ն. Սպորտակուցների լուծույթների ֆոտոքեմիլիումինեսցենցիայի ուլտրամանուշակագույն լույսով երկարատև ճառագայթման պայմաններում	65
Քոչարյան Կ. Կ., Տեր-Մաթևոսյան Ա. Ս. էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությանը ենթարկված առանտների միոտրոնոգրամներում Ca <sup>++</sup> -ի քանակի և լարդում ԱՅՅ-ի մակարդակի հետազոտումը	70
Վլասենկո Է. Վ. Կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների սամանումը անզգայացման պրակտիկայի համար	73
Պետրոսյան Ի. Լ., Վոյնիկյան Ա. Վ., Սևոստ Կ. Լ., Աստվածատույան Ս. Ս., Սամանյան Վ. Ա. H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> K-12-ի քրոմոսոմի արց I.CBH շրջանը կրող սելեմբիանոս պլազմոցների ֆիզիկական վերափոխությունը	79

Համառոտ հաղորդումներ

Ավարյան Յ. Ս., Ազամյան Ս. Յա., Համբարձումյան Ք. Կ., Հովհաննիսյան Ի. Ա., Պետրոսյան Լ. Ա., Սևմյոնով Ս. Մ., Քարիկյան Ա. Ն., Խաչատրյան Կ. Է. β-D-գլյուկոզայի համար լիպոսոմ թափանցելիության արագ որոշման մեթոդ	83
Նաչատրյան Կ. Ի., Առանկյան Վ. Բ., Հաջյան Ս. Ա. Նատրիումի դոզալիտուլոգիայի ազդեցությունը երկչերտ լիպիդային թաղանթների (հիթ) էլեկտրական մակման փոփոխության քանակի վրա	85
Ալավերդյան Կ. Հ., Երզնկյան Կ. Լ. Հակահիստամինային պրակարատների տրանսմեմբրանային փոխազդման հետազոտումը	87

«Հայաստանի կենտրոնական հանդես», 1985:



Մայր կուսակց Վին. Ֆան Ֆայ. Ռենտգենյանի հաղագայթներով և քիմիական մուտագեններով սակածված սոլայի որոշ մուտանոտային ձևերի բնութագրերը . . . . . 89

Լ ր ա տ ա լ

Հովհաննիսյան Ա. Գ. / Կանրապետական կոնֆերանսը՝ նվիրված ֆիզիկաունեխնիկական կենսաբանությանը և կենսատեխնոլոգիային . . . . . 90

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Экспериментальные

<i>Мартиросов С. М.</i> Биологическая целесообразность подмолекулярной организации мембранных систем . . . . .	7
<i>Семевский Ф. И., Семенов С. М., Тоноян Г. А.</i> Принципы оптимальности и математическое моделирование социозтологических процессов . . . . .	19
<i>Соцкий О. П., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А.</i> Влияние хронического введения цереброзидов на некоторые показатели энергообмена и общую активность $\beta$ -гликозидаз печени крыс . . . . .	25
<i>Микаелян Л. Г., Карапетян А. К., Аджян С. А.</i> Устойчивость БЛМ в электрическом поле в присутствии местных анестетиков . . . . .	29
<i>Ерзинкян К. Л.</i> Исследование механизма ингибирования гликозаминогликанами протеолитической активности трипсина . . . . .	38
<i>Меликян Г. Б.</i> Взаимодействие и слияние бислойных липидных мембран . . . . .	44
<i>Гюльханданян А. В.</i> Исследование индуцированного венофирами $K^{+}Ca^{2+}$ обмена в эритроцитах . . . . .	51
<i>Адамян С. Я., Амбарцумян Т. Г.</i> Узавин-нечувствительная Na-АТФ аза . . . . .	56
<i>Мелконян М. М., Аракелян А. Г., Рухкян А. А., Мхитарян В. Г.</i> Влияние $\alpha$ -токофериласцетата на процесс липидной пероксидации при акустическом стрессе . . . . .	61
<i>Гвооркян М. Л., Закарян А. Е.</i> Фотохемилюминесценция растворов белков при длительном облучении ультрафиолетовым светом . . . . .	96
<i>Арцруни Г. Г., Гер-Маркосян А. С.</i> Содержание $Ca^{2+}$ в митохондриях и уровне АТФ в печени крыс, подвергшихся воздействию электростатического поля . . . . .	70
<i>Ваасенко Э. В.</i> Конструирование биологически активного соединения для анестезиологической практики . . . . .	73
<i>Метт И. Л., Кочикян А. В., Метт А. Л., Аствацатурян М. Э., Сакоян В. А.</i> Физический анализ рекомбинантных плазмид, несущих район arg EСВН хромосомы <i>Escherichia coli</i> K-12 . . . . .	

Краткие сообщения

<i>Ловкян Ц. М., Адамян С. Я., Амбарцумян Т. Г., Оганесян Ж. А., Петросян Л. С., Симонян А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э.</i> Метод быстрого определения проницаемости липосом для $\beta$ -Д-галактозы . . . . .	83
<i>Хачатрян Г. Р., Аракелян В. Б., Аджян С. А.</i> Влияние додецилсульфата натрия на число стабильных электрического пробоя БЛМ . . . . .	85
<i>Алавердян К. Г., Ерзинкян К. Л.</i> Изучение трансмембранного переноса антигистаминных препаратов . . . . .	87

Рефераты

Май Куаме Винь, Фан Фай. Характеристика некоторых мутантных форм сои, индуцированных рентгеновскими лучами и химическими мутагенами . 89

Хроника

Оганесян М. Г. I республиканская конференция по физико-технической биологии и биотехнологии . . . . . 90

CONTENTS

Experimental

<i>Maritrosov S. M.</i> Biological Expedience of the Overmolecular Organization of Membrane Systems . . . . .	7
<i>Semevsky F. N., Semgonov S. M., Tonoyan G. A.</i> Principle of Optimization and Mathematical Modelling of Socio-Etiological Processes . . . . .	19
<i>Sotsky O. P., Sarkisova G. M., Chukhadjian G. A.</i> Effect of Cerebrosides Chronic Injection on Some Indices of Energometabolism and on the General Activity of $\beta$ -Glycosidases in the Rats Liver . . . . .	25
<i>Mikaellan L. G., Karapetyan A. C., Adgyan S. A.</i> Stability of Bilayer Lipid Membranes in the Electric Field in the Presence of the Local Anesthetics . . . . .	29
<i>Erzinkyan K. L.</i> Investigation of the Mechanism of Glycoseaminoglycane Inhibitory Influence on the Tripsine Proteolytic Activity . . . . .	38
<i>Melkyan G. B.</i> Interaction and Fusion of Bilayer Lipid Membranes . . . . .	44
<i>Gyulkhandanyan A. V.</i> Investigation of Ionofore-Induced $K^+ - H^+$ Exchange in Erythrocytes . . . . .	51
<i>Adamian S. Ya., Hambartsumian T. G.</i> Ouabain-Insensitive Na-ATP-ase . . . . .	56
<i>Melkonian M. M., Arakelian A. G., Ruchkian A. A., Mkhitarian V. G.</i> Effect of $\alpha$ -Tocopherilacetate on the Lipid Peroxidation Process under the Acoustic Stress . . . . .	61
<i>Gevorkian M. L., Zakarian A. E.</i> Photochemiluminescence of the Proteins Solutions during Prolonged Irradiation by Ultraviolet Light . . . . .	65
<i>Artzruni G. G., Ter-Markosian A. S.</i> Content of $Ca^{++}$ in Mitochondria and ATP Level in the Liver of Rats Exposed to the Treatment of Electrostatic Field . . . . .	70
<i>Vlassenko E. V.</i> Construction of Biologically Active Combinations for Anesthetological Practice . . . . .	73
<i>Mett I. L., Kochikyan A. V., Mett A. L., Astvatsaturyan M. Z., Sahanyun V. A.</i> Physical Analysis of Recombinant Plasmids Carrying <i>arg</i> ECBH Region of <i>Escherichia coli</i> K-12 . . . . .	79

Short Communications

<i>Avakian Ts. M., Adamian S. Ya., Hambartsumyan T. G., Hovhannisian Zh. A., Pitrosian L. S., Stmonian A. L., Tatikian A. Sh., Khachatryan G. E.</i> Method of Quick Determination of Penetration by Lipose for $\beta$ -D-Glucose . . . . .	83
<i>Khachatryan G. R., Arakellian V. B., Adgyan S. A.</i> Influence of Sodium Dodecylsulphate on the Stages Number of Bilayer Lipid Membranes Electric Holding . . . . .	85
<i>Alaverdyan K. G., Erzinkyan K. L.</i> Investigation of Antihistaminic Preparations Transmembraneous Transfer . . . . .	87

A b s t r a c t s

*Mai Kuang Vin, Fan Fai* Characteristics of Some Mutant Forms of Soy—Bean,  
Induced by X-Rays and Chemical Mutagens . . . . . 89

C h r o n i c s

*Hovhannissian M. G.* The First Republican Conference Dedicated to Physiotech-  
nological Biology and Biotechnology . . . . . 90

УДК 577.352.315+23

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ  
ОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ

С. М. МАРТИРОСОВ

На примере взаимодействия  $H^+$ -АТФ-азного комплекса и калиевого ионофора, а также ряда других систем дается разбор гипотезы о структурном воздействии различных механизмов мембраны.

*Ключевые слова:* мембранные системы, взаимодействие, транспорт, регуляция

Клетка как термодинамически открытая система нуждается в постоянном потоке энергии, веществ и информации через свою граничную мембрану, отделяющую внутриклеточное содержимое от окружающей среды. Все три потока тесно взаимосвязаны. Трансформация энергии сопровождается перераспределением веществ по обе стороны мембраны, а перераспределение веществ может привести к информационному сигналу. Потоки энергии, веществ и информации проходят через различные мембранные системы переноса и регуляции. О том, как могут взаимодействовать мембранные системы, рассказано в данной статье.

## 1. Теория косвенного биоэнергетического взаимодействия

В соответствии с теорией Митчелла [40, 41], если в одном месте мембраны какая-то транспортная система вырабатывает определенную разность электрохимических потенциалов  $\Delta\mu$ , то в другом месте ее эту запасенную энергию может использовать любая другая система переноса или регуляции. Известно, что

$$\Delta\mu_i = RT \ln (a_i)_{cp} / (a_i)_{кл} + F\Delta\psi,$$

где первое слагаемое является энергией, связанной с асимметричным распределением веществ, а второе слагаемое — энергия электрического поля на мембране, отнесенная на моль переносимого вещества. Индекс относится к заданному иону,  $(a_i)_{cp}$  и  $(a_i)_{кл}$  — соответственно активности (концентрации) иона в среде и в клетке,  $\Delta\psi$  — разность электрических потенциалов на мембране,  $R$ ,  $T$  и  $F$  — газовая постоянная, абсолютная температура и число Фарадея соответственно.

Итак, если первичная система вырабатывает  $\Delta\mu_1$ , то вторичная система может использовать либо «концентрационную батарею», либо энергию электрического поля, либо обе вместе, и тем самым осуществлять некие функции, связанные с потреблением энергии. Например, механическую, осмотическую, электрическую и химическую работы.

В то же время первичная система, которая вырабатывает  $\Delta\mu$ , т. е. создает градиенты электрического поля и концентраций, потребляет стороннюю энергию: химическую при деградации органических соединений и энергию солнечного света.

Так как  $\Delta\mu$  является термодинамической величиной, которая одинакова во всем данном замкнутом объеме, то первичные и вторичные молекулярные механизмы могут находиться в значительном отдалении друг от друга, и тем не менее взаимодействие между ними будет осуществляться с той же эффективностью, как если бы они находились рядом. Многочисленные факты показывают справедливость этой концепции опосредованного через  $\Delta\mu$  взаимодействия между мембранными системами. Тем не менее остается невыясненным вопрос о том, всегда ли это так? Известно, что белки мембраны подвержены латеральной диффузии и могут образовывать при соприкосновении домены. Более того, такие сложно организованные ансамбли, как редокс-цепи и хроматофорные образования, представляют собой пример структур, в которых белки занимают строго заданные места, и поэтому можно говорить о генетически предопределенной организации белковых ансамблей.

В связи с этим встает вопрос: может ли клетка оказаться в таких условиях, когда две независимые системы переноса вступают в структурный контакт в соответствии с физиологической целесообразностью. Подобные случаи разобраны в последующих разделах данной статьи, в основном на примере внутримембранного взаимодействия двух ионных систем.

## 2. Распределение ионов $K^+$ и $\Delta\mu$

Бактериальные клетки аккумулируют значительное количество ионов  $K^+$ , в зависимости от вида бактерий—от 0,2 до 4 М. Например, *E. coli* и *Salmonella* накапливают до 0,25 [49], *S. faecalis*—до 0,6 [52], *Staphylococci*—до 0,7, а предельные галофильные организмы до 4 М этих ионов [14, 29]. С термодинамической точки зрения более существенной оказалась величина градиентов  $K^+$  между клеткой и средой. Показано, что бактерии способны создавать чрезвычайно высокое отношение концентраций в клетке относительно среды. Например, у *E. coli* и *S. faecalis*, на которых проведены основные исследования по природе транспорта ионов  $K^+$ , это отношение превышает  $10^5$  [11, 26].

В то же время на транспорт любого вещества у бактерий может затрачиваться либо энергия, высвобождаемая при гидролизе АТФ (или другого макроэргического соединения), либо  $\Delta\mu$ . Измеренная величина мембранного потенциала у бактерий ( $\Delta\psi$ ) обычно не превышает 150—180 мВ (отрицательно в бактериальной клетке) [23, 24]. Поэтому при пассивном поглощении ионов  $K^+$  по градиенту электрического поля распределение могло бы достигнуть только  $10^3$ , что значительно ниже измеренного распределения ионов  $K^+$ . Для указанного ранее рас-

предела, достигающего  $10^5$ — $10^6$ , нужен был бы  $\Delta\psi$ , равный 300—350 мВ. На основании этого было высказано предположение, что в мембране бактерий функционирует специальный  $K^+$ -АТФ-азный комплекс, использующий энергию, высвобождаемую при гидролизе терминального макроэргического фосфора, для транспорта ионов  $K^+$  внутрь клетки. Такая система была обнаружена в клетках *E. coli* Элштейном с соавт. и названа Kdp-системой транспорта ионов  $K^+$  [18, 20]. Так как в клетках впервые была обнаружена  $K^+$ -АТФ-аза, она была подвергнута тщательному анализу. Удалось установить, что три структурных гена *kdpA*, *kdpB* и *kdpC* кодируют три мембранных белка с молекулярными весами 47000, 90000 и 22000 Д соответственно [28]. Kdp-система способна создавать очень высокое распределение по ионам  $K^+$ , достигающее  $4 \cdot 10^6$  [26]. Следует заметить, что это распределение достигается не за счет увеличения внутриклеточной концентрации ионов  $K^+$ , а за счет того, что Kdp система в физиологических условиях обычно находится в репрессивном состоянии и включается в работу при очень низких концентрациях ионов  $K^+$  в среде. Поэтому, накачивая в клетку даже  $10^{-1}$  М ионов  $K^+$ , она забирает их из среды, содержащей  $10^{-6}$  и менее ионов  $K^+$ .

Несмотря на всю важность открытия репрессибельной  $K^+$ -АТФ-азы, которая включается в работу только при очень низких концентрациях ионов  $K^+$ , когда не работает другая основная система транспорта ионов  $K^+$  (см. ниже), теория мембранного транспорта не обогатилась новой идеей.

### 3. Протонно-калиевый насос

При физиологических концентрациях ионов  $K^+$  в окружающей среде свыше 1 мМ эти ионы поглощаются бактериями с помощью системы, у которой  $K_m$  лежит в пределах 1—3 мМ [26]. Элштейн с соавт. [44] установили, что такой главной системой поглощения ионов  $K^+$  у *E. coli* является Trk-система (ранее она называлась TrkA-система), генетический анализ которой показал [19, 46], что мутации в четырех несвязанных локусах—*trkA*, *trkD*, *trkE* и *trkC*—отражаются на транспорте ионов  $K^+$ . Кинетический же анализ позволил установить, что функционирование этой системы требует одновременного присутствия АТФ и  $\Delta\mu_{H^+}$  [45]. Были высказаны предположения, что АТФ нужен как источник энергии, а  $\Delta\mu_{H^+}$  как регулятор транспорта [11];  $\Delta\mu_{H^+}$  —источник энергии, АТФ—модулятор транспорта, так как транспортер работает в фосфорилированном состоянии, но не гидролизует АТФ до неорганического фосфора и АДФ [11, 51]; наконец, и АТФ, и  $\mu_{H^+}$  служат источниками энергии для противогradientного движения ионов  $K^+$  внутрь бактериальных клеток [25].

В дальнейшем с помощью нососелективных электродов было установлено, что поток ионов  $K^+$  через Trk-систему для анаэробно выращенных бактерий *E. coli* всегда сопровождается выбросом из клетки дополнительного количества ионов  $H^+$ . Эта компонента потока  $H^+$  со-

составляет около 30% от общей секреции кислоты в период гликолиза у бактерий [3, 16, 32]. Другой особенностью этого обмена ионов  $H^+$  клеткой на ионы  $K^+$  среды является его чувствительность к  $N,N'$ -дициклогексилкарбодимиду (ДЦКД)—ингибитору  $H^+$ -АТФ-азного комплекса  $F_1 \cdot F_0$ . При ДЦКД-чувствительном обмене  $H^+$  на  $K^+$  из клеток выбрасываются  $2H^+$  и один анион лактата, а в клетку входит один ион  $K^+$  [32], т. е. имеет место сохранение макроскопической электронейтральности потоков ионов в отношении  $H^+ : K^+ : \text{лакт}^- = 2:1:1$ . Такая же стехиометрия ионного обмена была найдена и для грамположительных бактерий [38].

Самым удивительным фактом оказалась устойчивость стехиометрии  $2H^+ : K^+$  к различным внешним воздействиям как у *E. coli* [3, 17], так и у *S. faecalis* [38]. Было показано, что стехиометрия  $H^+ / K^+$ -обмена у анаэробно выращенных бактерий не изменяется при изменении температуры от  $12^\circ$  до  $37^\circ$ , активности ионов  $K^+$  в среде—от 0,1 до 10 мМ, рН—от 5,7 до 8,5, а также при изменении типа экзогенного источника энергии (глюкозы или молочной кислоты у *E. coli*) и абсолютных величин потоков ионов  $H^+$  и  $K^+$ . Устойчивость стехиометрии ДЦКД-чувствительного обмена  $2H^+ : K^+$  предполагала существование жесткой структурной связи между потоками  $H^+$  и  $K^+$ . Поэтому было высказано предположение, что в мембранах анаэробно выращенных гликолизующих бактерий функционирует протонно-калиевый насос, обменивающий  $2H^+$  клетки на один ион  $K^+$  среды и чувствительный к ДЦКД [3, 17]. Это допущение означало, что, во-первых, транспорт ионов  $K^+$  внутрь требует АТФ и, во-вторых, что этот транспорт сопряжен с выбросом ионов  $H^+$ .

Два вопроса требовали ответа: а) почему транспорт ионов  $K^+$  у гликолизующих анаэробно выращенных бактерий сопровождается выбросом ионов  $H^+$  и б) почему этот обмен чувствителен к ДЦКД, ингибитору  $H^+$ -АТФ-азы  $F_1 \cdot F_0$ ? Можно допустить, что в анаэробно выращенных клетках *E. coli*, а тем более у анаэробов *S. faecalis* отсутствуют редокс-цепи, поэтому единственным генератором мембранного потенциала  $\Delta\psi$  является  $F_1 \cdot F_0$ . Иными словами,  $F_1 \cdot F_0$  генерирует  $\Delta\psi$ , а ионы  $K^+$  поглощаются клетками в обмен на генерацию  $\Delta\psi$ , т. е. для поглощения клетки нуждаются и в АТФ, и в  $\Delta\psi$  этих ионов.

Измерение мембранного потенциала с помощью ТФФ<sup>+</sup> электродов (тетрафенилфосфоний-проникающий катион) показало, что уже исходно у *E. coli* имеется  $\Delta\psi$  около 0,12В, при рН 7,5. Введение в среду глюкозы кратковременно, на период функционирования  $2H^+ / K^+$  обмена, который длится несколько минут (см. раздел 4), увеличивает  $\Delta\psi$  до 0,14—0,15В. В *S. faecalis* мембранный потенциал в отсутствие экзогенного источника энергии близок к нулю и становится равным 0,15В после добавления глюкозы [39]. Таким образом, обмен  $2H^+$  на  $K^+$  сопровождается генерацией  $\Delta\psi$ , которая снимается с помощью ДЦКД.

Чтобы идентифицировать системы переноса  $H^+$  и  $K^+$ , дальнейшую работу проводили с мутантами *E. coli*, имеющими точно охарактеризованные дефекты. Мутант *E. coli* ТК 509 с неработающей Тгк-системой [46] не обладал ни  $2H^+ / K^+$  обменом, ни способностью увеличи-

вать  $\Delta\Psi$  от 0,12 до 0,15В, как это имело место у дикого типа *E. coli*, K-12 (7.). С другой стороны, естественно было ожидать, что блокирование функций  $F_1 \cdot F_0$  с помощью мутаций в *unc*-кластере, кодирующем структуру этого АТФ-азного комплекса, должно привести к исчезновению ДЦКД-чувствительного потока ионов  $H^+$  из бактерий. Опыты показали, что в мутантах с дефектами в  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицах АТФ-азы  $F_1$ , входящей в состав АТФ-азного комплекса  $F_1 \cdot F_0$ ,  $2H^+ / K^+$  обмен не имеет места [9, 36]. Дефект в  $\gamma$ -субъединице, который находится на границе между АТФ-азой и внутримембранным белком,  $H^+$ -каналом, приводит к нечувствительности этой системы обмена к осмотическому давлению среды (см. раздел 4). Дефект в  $H_1$ -субъединице (м. в 24000) из  $F_0$  приводит к потере ДЦКД-чувствительности и осмотической регуляции этой системы. При дефектах же в  $H_2$ - и  $H_3$ -субъединицах из  $F_0$  система  $2H^+ / K^+$  обмена перестает функционировать.

Эксперименты на мутантах с дефектами по *Tgk*-системе и  $H^+$ -АТФ-азному комплексу  $F_1 \cdot F_0$  с несомненностью показывают, что у анаэробно выращенных гликолизующих бактерий имеется тесная связь между функциями  $F_1 \cdot F_0$ , переносящего ионы  $H^+$  из клетки в среду, и *Tgk*-системой поглощения  $K^+$ . Блокирование функций одной системы ведет к потере функций другой. Поэтому предположение о существовании в бактериях  $H^+ - K^+$  насоса стало обретать молекулярное основание. Однако казалось невероятным, как две генетически независимые системы, такие, как  $F_1 \cdot F_0$  и *Tgk*, создают обмен, эквивалентный функции протонно-калиевого насоса. Более того, как видно из следующего раздела, обе системы принимают деятельное участие в регуляции тургорного давления клетки.

#### 4. Регуляция тургорного давления бактерий

Еще в 1965 г. Шульц и Эпштейн [48] показали, что резкое повышение осмотического давления в среде приводит к значительному, но кратковременному возрастанию скорости поглощения  $K^+$  у *E. coli*. Позже было установлено, что скорость поглощения  $K^+$  возрастает при увеличении осмотичности среды для обеих калиевых транспортных систем — *Tgk* и *Kdp* [45].

Изучение потоков  $K^+$  с помощью ионоселективных электродов выявило необычный характер поглощения  $K^+$  у *E. coli* в средах, содержащих от 0,1 до 10 мМ  $K^+$  при pH выше 7,0 [1, 2, 15]. Вначале, в течение 3—5 мин наблюдается интенсивное поглощение  $K^+$  через *Tgk*-систему [6, 33]. Затем этот процесс и последующий выход  $K^+$  в среду спонтанно прекращаются. Через 15—25 минут начинается более медленное и длительное поглощение этих ионов через *TgkF*-систему. Подобное явление наблюдается только при увеличении осмотического давления среды, и чем выше тоничность среды, тем дольше идет поглощение  $K^+$  через *Tgk*-систему [2, 16]. При осмотическом равновесии между клеткой и средой или уменьшении тоничности среды поглощение  $K^+$  через *Tgk*-систему полностью подавляется, в то время как медленное поглощение этих ионов через *TgkF*-систему сохраняется. Подавление функции *Tgk*-

системы уменьшением осмотического давления среды сопровождается исчезновением ДЦКД-чувствительной секреции ионов  $\text{H}^+$ , т. е. при отсутствии фактора повышения осмотического давления в среде исчезает ДЦКД-чувствительный обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$ .

С помощью мутантов *E. coli* (см. раздел 3) было показано, что в этот обмен вовлечены как  $\text{F}_1\text{-F}_0$ , так и Tgk. Следовательно, когда тургор клетки уменьшается при увеличении осмотического давления среды и соответственно уменьшается объем клеток, включается не только система поглощения  $\text{K}^+$ , но и протонный насос  $\text{F}_1\text{-F}_0$ .

Было высказано предположение, что регуляция тургора клеток осуществляется со стороны периплазматического пространства [31]. Эта гипотеза включала в себя следующие допущения: потоки  $\text{H}^+$  и  $\text{K}^+$  через  $\text{F}_1\text{-F}_0$  и Tgk систему взаимозависимы и подчиняются жесткой стехиометрии ( $2\text{H}^+:\text{K}^+$ ); протонный насос  $\text{F}_1\text{-F}_0$  у грамотрицательных бактерий состоит не из двух функциональных белков, а из трех; третий белок является периплазматическим белком-клапаном, который механически открывает и закрывает вход в  $\text{H}^+$ -канал  $\text{F}_0$  в зависимости от увеличения или уменьшения осмотичности среды.

Таким образом, постулируется, что осмотическая регуляция поглощения  $\text{K}^+$  у *E. coli* осуществляется не через Tgk-систему, а с помощью  $\text{H}^+$ -АТФ-азного комплекса  $\text{F}_1\text{-F}_0$ .

Из предложенной гипотезы вытекает ряд следствий. АТФ-зависимый обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  с участием  $\text{F}_1\text{-F}_0$  у грамположительных бактерий *S. faecalis*, лишенных периплазматического пространства, не должен зависеть от осмотического давления среды, что было экспериментально подтверждено [38]. Роль периплазматического пространства в регуляции функций  $\text{F}_1\text{-F}_0$  подтверждается тем, что в сферопластах, приготовленных из *E. coli*, обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  не чувствителен к осмотическому давлению среды. Другой существенный факт был получен на мутантах *E. coli* AN 382, у которых  $\text{H}^+$ -канал  $\text{F}_0$  резистентен к ДЦКД [7, 9, 34, 36]. Обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  у этих мутантов терял чувствительность к осмотическому давлению среды, хотя скорость обмена  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  оставалась неизменной. Таким образом, мутация по *uncW* гену ведет не только к ДЦКД-резистентности  $\text{H}^+$ -канала, но и к потере его чувствительности к тоничности среды. Имеются и другие данные, подтверждающие регуляцию обмена  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  с наружной стороны  $\text{H}^+$ -канала  $\text{F}_0$ , входящего в комплекс  $\text{F}_1\text{-F}_0$ . Если сперва уменьшить тоничность среды, чтобы клетки *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ) набухли, затем добавить в среду ДЦКД и через 15 мин резко увеличить тоничность среды, то вначале происходит обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  и только через некоторое время замечается ингибирующее действие ДЦКД. ДЦКД подавляет этот обмен с некоторым запозданием. Если же ДЦКД был введен в среду при высокой тоничности, когда клетки сморщены и должен начаться обмен  $2\text{H}^+:\text{K}^+$  при введении в среду источника энергии, то ДЦКД сразу же полностью подавляет его. Между периплазматическим белком-клапаном и ДЦКД идет конкуренция за вход в  $\text{H}^+$ -канал  $\text{F}_0$ . Все эти косвенные факты дают основание думать, что надмолекулярная физиологическая конструкция протонного насоса  $\text{F}_1\text{-F}_0$  состоит из трех белков:  $\text{F}_1\text{-F}_0$  и периплазматического

белка-клапана (БК, см. рис.). Кроме того, Тгк-система поглощения  $K^+$ , т. е. основная система этих бактерий, ответственная за сохранение тургора клетки, по-видимому, не имеет собственного осмотического ре-

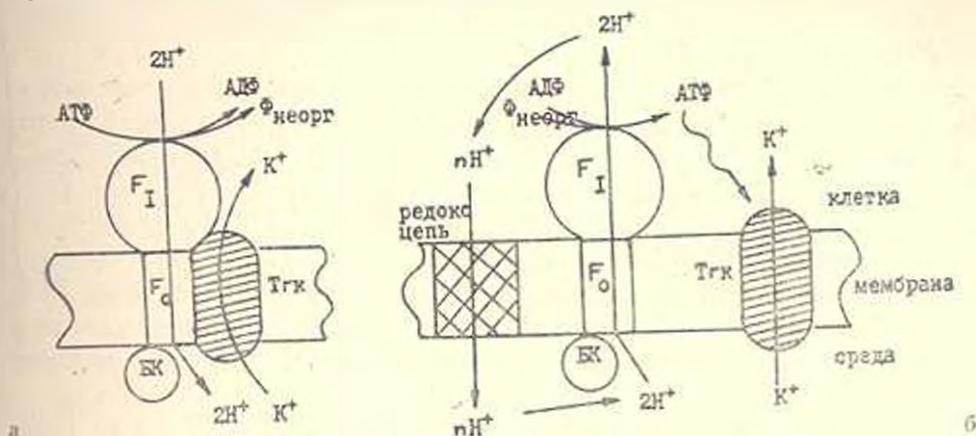


Рис. Характер взаимосвязи  $H^+$ - $ATP$ -азной  $F_1$ - $F_0$  с калиевым ионофором Тгк в анаэробных и аэробных бактериях. а)  $H^+$ - $ATP$ -азный комплекс  $F_1$ - $F_0$  образует с транспортером ионов  $K^+$  Тгк суперкомплекс в анаэробных гликолизующих бактериях. Этот суперкомплекс работает, как протонно-калиевый насос, обменивающий  $2H^+$  клетки на один ион  $K^+$  среды [2, 10, 35]. БК—белок-клапан, расположенный в периплазматическом пространстве грамотрицательных бактерий, который открывает и закрывает  $H^+$ -канал  $F_0$  в зависимости от тургорного давления клетки [32]. б) Те же системы, работающие порознь у аэробно выращенных *E. coli*. В этом случае Тгк система в качестве источника энергии использует энергию электрического поля, а  $ATP$  служит модулятором процесса [37], в то время как дыхательная цепь, выбрасывая какое-то количество ионов  $H^+$ ,

поддерживает нужную величину  $\Delta\psi_{H^+}$ .

гулятора. Если белок-клапан у *E. coli* не функционирует, то поглощение  $K^+$  через Тгк-систему теряет свою чувствительность к осмотическому давлению среды.

### 5. Симбиоз молекулярных механизмов

Это пока гипотеза [10, 12, 35], хотя и неплохо обоснованная. Допускается, что две независимые транспортные системы— $F_1$ - $F_0$  и Тгк—способны к комплементарному структурному объединению внутри мембраны для совместного использования энергии гидролиза  $ATP$  (рис., а). Такое структурное объединение систем дает возможность создать одновременно распределение  $K^+$  между клеткой и средой около  $10^5$ ,  $\Delta pH$  1 и  $\Delta\psi$  около 0,15 В при фосфатном потенциале клетки около 50 кДж, в то время как дыхательная цепь или  $F_1$ - $F_0$  могут создать  $nH^+$  лишь около 20 кДж ( $\Delta\psi$  0,15В и  $pH$  1), что совершенно недостаточно для распределения  $K^+$  в  $10^5$  при непрямом взаимодействии между  $F_1$ - $F_0$  и калиевым транспортером.

Образование суперкомплексов, составленных из  $ATP$ -азного комплекса  $F_1$ - $F_0$  и калиевого транспортера, может быть как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий к этому суперкомплексу добавляется периплазматиче-

ческий белок-клапан (рис., а), который регулирует время включенного состояния суперкомплекса ( $F_1-F_0-Tgk-BK$ ).

Суперкомплекс, состоящий из  $F_1-F_0$  и калиевого транспортера  $Tgk$ , обладает несомненной биологической и термодинамической целесообразностью.

Калиевый транспортер, например,  $Tgk$ -система, лишен собственно преобразователя энергии. При объединении с  $F_1-F_0$  калиевая система становится АТФ-зависимой, что и наблюдали ряд авторов. Следовательно, один преобразователь энергии обслуживает два ионофора:  $F_0$  и  $Tgk$ -систему, т. е. протонсфор и  $K^+$ -ионофор. Таким путем достигается структура экономя.

Эта система очень экономно расходует и энергию гидролиза АТФ, что крайне важно при таком низкоэнергетическом процессе как гликолиз. При обмене  $2H^+ : K^+$  часть энергии гидролиза АТФ затрачивается на создание  $\Delta\mu_{H^+}$ , а другая — тратится на поддержание  $\Delta\mu_{K^+}$ . В общей сложности получается, что когда системы работают порознь, то к. п. д. этих систем не превышает 10—15%, в то время как при совместной их работе он выше 60—70%.

Из вышесказанной гипотезы вытекают два важных следствия:

1. Если этот суперкомплекс способен гидролизовать АТФ при движении ионов  $H^+$  из клетки в среду, а ионов  $K^+$  — в обратном направлении, то при реверсии потоков, когда ионы  $H^+$  будут входить в клетку по градиенту электрического поля и концентраций, а ионы  $K^+$  по градиенту концентраций будут выходить из клетки, можно наблюдать синтез АТФ, если величины  $\Delta\mu_{H^+}$  и  $\mu_{K^+}$  окажутся в сумме достаточными для той энергии, которая нужна для синтеза АТФ. Это характерно для ионообменного насоса и впервые экспериментально было подтверждено Тарраханом и Глинном [22] на эритроцитах для  $Na^+ - K^+$ -насоса.

2. Согласно данной гипотезе, симбиоз двух транспортных механизмов целесообразен только при таком низкоэнергетическом процессе, как гликолиз в анаэробных клетках, когда не работает редокс-цепь и вырабатывается всего 2 молекулы АТФ для всех нужд клетки. Поэтому в аэробно выращенных клетках, когда  $F_1-F_0$  занято вместе с редокс-цепью синтезом АТФ и когда благодаря этому бактериальная клетка вырабатывает до 24 молекул АТФ, симбиоз  $F_1-F_0$  и  $Tgk$ -системы становится нецелесообразным, во-первых, потому, что  $F_1-F_0$  вместе с редокс-цепью работает в режиме синтеза АТФ и не может объединиться с  $Tgk$ -системой для гидролиза АТФ, во-вторых, редокс-цепь вырабатывает стабильный и высокий  $\Delta\mu_{H^+}$  и обеспечивает выход 24 молекул АТФ, вследствие чего  $Tgk$  может использовать любой из указанных видов энергии.

Оба следствия нашли подтверждение в экспериментах, проведенных Трчунином на кафедре биофизики ЕРГУ [8, 35, 37].

Для экспериментального доказательства первого следствия необходимо иметь на мембране  $\Delta\psi$  в 0,15 В и рН 1, так как  $2H^+$ , переносимые через  $F_1-F_0$ , используют как  $\Delta\psi$ , так и  $\Delta pH$ . В целом  $F_1-F_0$  расходуют  $2 \times \Delta\mu_{H^+}$  ( $2 \times 20$  кДж) для синтеза одной молекулы АТФ. Оба иона

$H^+$  переносятся через  $F_1 \cdot F_0$  электрогенно, поэтому используют энергию как  $\Delta\psi$ , так и  $\Delta pH$ .

Суперкомплекс  $\{F_1 \cdot F_0 - Trk - BK\}$  переносит электрогенно только один ион  $H^+$  и, следовательно, другой ион  $H^+$  не в состоянии использовать  $\Delta\psi$ . Поэтому  $\{F_1 \cdot F_0 - Trk\}$  при тех же условиях, которые создаются для  $F_1 \cdot F_0$ , уже не в состоянии синтезировать АТФ. Иными словами,  $\Delta\mu_{H^+}$  величиной 20 кДж будет недостаточно для синтеза АТФ с помощью этого суперкомплекса, так как около 12 кДж, которые дает электрическое поле, не будет использовано вторым ионом  $H^+$ . Таким образом, из  $\Delta\mu_{H^+}$  (44 кДж) будет использовано только 32 кДж. А этого недостаточно для синтеза АТФ. Поэтому недостающую энергию суперкомплекса должен брать из разности химических потенциалов по ионам  $K^+$ . Это очень важная особенность синтеза АТФ с помощью ионообменного  $H^+ - K^+$ -насоса. Для синтеза же АТФ с помощью  $F_1 \cdot F_0$  градиент по  $K^+$  не имеет никакого значения, если на мембране исходно имеется  $\Delta\psi$  около 0,12 В.

Другой отличительной особенностью функций суперкомплекса является его стехиометрия. Если при гидролизе АТФ из клетки выносятся 2  $H^+$ , а в клетку вносятся один  $K^+$  против градиента концентраций, то при реверсии такого насоса на каждый выносимый из клетки ион  $K^+$  по градиенту концентрации в клетку будет вноситься 2  $H^+$ , при этом будет синтезироваться одна молекула АТФ.

Третьей отличительной особенностью синтеза АТФ с помощью суперкомплекса является чувствительность этой системы к осмотическому давлению среды. Система будет синтезировать АТФ только при увеличении тоничности среды, так как, согласно допущению, увеличение тоничности среды открывает вход  $H^+$ -канала.

Экспериментально было показано [8, 35], что реверсия потоков ионов  $H^+$  и  $K^+$  через эту систему сопровождается одновременным синтезом АТФ в соотношении: АТФ: $H^+$ : $K^+$  = 1:2:1. Уменьшение  $\Delta pH$  или  $\Delta pK$  на единицу, введение в среду протонифоров или ДЦКД, уменьшение тоничности среды блокируют реверсированный цикл.

Не менее интересными оказались данные, доказывающие второе следствие из гипотезы [37]. Если ввести в суспензию аэробно выращенных клеток *E. coli* цианид и тем самым заблокировать функции редокс-цепи, то легко показать, что  $F_1 \cdot F_0$  из режима синтеза переходит в режим гидролиза АТФ, т. е. транспортирует ионы  $H^+$  из клетки в среду. Такие клетки *E. coli* становятся эквивалентными анаэробно выращенным бактериям. Однако при изменении величины потоков  $H^+$  и  $K^+$  в зависимости от условий окружающей среды наблюдается изменение стехиометрии ДЦКД-чувствительного обмена  $H^+$  на  $K^+$  от 0,5 до 4,5. Неустойчивость стехиометрии является важным свидетельством независимости функционирования  $F_1 \cdot F_0$  и  $Trk$  в аэробно выращенных *E. coli* (рис. 6).

Особенно наглядно разъединенность систем переноса  $F_1 \cdot F_0$  и  $Trk$  видна при исследовании потоков  $H^+$  и  $K^+$  в зависимости от температуры. Если для потока ионов  $H^+$  через  $F_1 \cdot F_0$  величина  $Q_{10}$  была близка

к 3, то для калиевого насоса Tpk она была ниже 1,5, что прямо указывает на независимость работы обеих систем:  $H^+$ -АТФ-азный комплекс  $F_1F_0$  функционирует как фермент с  $Q_{10}$ , равным 3, в то время как «диффузионный» калиевый канал Tpk работает как пассивная система с низким  $Q_{10}$ . В то же время в анаэробно выращенных клетках обе системы имеют  $Q_{10}$ , равный 3, что и должно быть в соответствии с гипотетическим рисунком. В то же время арсенат, препятствующий образованию АТФ, подавляет транспорт ионов  $K^+$  в обоих случаях. Согласно рисунку (б), этот факт подтверждает гипотезу ряда авторов о том, что Tpk-система нуждается в  $Ar_{10}$  как источнике энергии, а АТФ служит модулятором процесса [11, 51]. Однако надо отметить, что эта функция Tpk подобных систем переноса  $K^+$  может наблюдаться только в условиях аэробноза.

### *б. Внутримембранное взаимодействие белков*

В настоящее время имеется множество данных, полученных как на интактных мембранах, так и на солюбилизованных белках, которые показывают, что мембранные системы представляют собой олигомерные формы простых функциональных единиц. Это относится к АТФ-азам, переносчикам, рецепторам, цитохромам и т. д. Клянгелберг в своем интересном обзоре [27] высказывает предположение, что олигомерное состояние гомологических структур в изолированных мембранах могло бы служить критерием интактности выделенного механизма.

Однако ассоциация гомологических мембранных единиц, как нам кажется, затрагивает лишь один аспект проблемы внутримембранного взаимодействия белков. Ряд экспериментов, включая и вышеизложенные, указывают на образование внутри мембраны гетерологических суперструктур. Два или более мембранных белков могут образовывать димер для мембранной регуляции транспорта и клеточного метаболизма. Рассмотрим некоторые наиболее интересные результаты.

Уже в конце прошлого века было известно, что, когда микроорганизмам даны одновременно два источника углерода, они вначале утилизируют полностью один из них и только после этого начинается утилизация второго источника. Этот феномен известен как глюкозный эффект, так как глюкоза оказывается наиболее предпочтительным источником углерода в силу своей легкой утилизируемости [30]. Сущность явления состоит в способности микроорганизмов включать и выключать некоторые катаболитные опероны. Вначале включаются опероны, ответственные за синтез ферментов и транспортных систем наиболее легко утилизируемого субстрата.

Глюкоза способна репрессировать экспрессию катаболитных генов двумя способами, известными как катаболитная репрессия и исключение индуктора. Предполагается, что катаболитная репрессия связана с блокадой синтеза ферментов вследствие уменьшения активности мембранной аденилатциклазы (АЦ). Уменьшение активности АЦ ведет

к блокаде синтеза цАМФ, необходимого для проявления катаболит-чувствительных оперонов.

Явление же, известное как исключение индуктора, есть прямое следствие блокады транспортных систем, переносящих определенные субстраты, которые и являются индукторами соответствующих оперонов.

В расшифровке этих механизмов значительное место занимают работы Бурда и его соавт. [4, 5]. Им удалось показать, что основная система транспорта глюкозы у бактерий—фосфоэнолпируватзависимая фосфотрансферазная система бактерий (ФТС)—играет основную роль в регуляции как катаболитной репрессии, так и при исключении индуктора [4, 5, 50]. Ими было высказано предположение, получившее косвенные экспериментальные подтверждения о том, что ФТС вступает в структурную связь как с М-протеином, мембранным белком, ответственным за транспорт  $\beta$ -галактозидов, так и с мембранной АЦ. В обоих случаях при наличии глюкозы в среде ФТС переносит ее внутрь клеток и во время этой работы в определенных условиях в состоянии блокировать как М-протеин, так и АЦ. В первом случае наблюдается исключение индуктора, так как, например, лактоза не может проникнуть в клетку и способствовать экспрессии *lac*-оперона, во втором—имеет место катаболитная репрессия: АЦ не синтезирует цАМФ. Такое же допущение о внутримембранном взаимодействии белков было впоследствии высказано Петерковским и Газдаром [12] в отношении взаимодействия М-протеина и АЦ.

Различие между идеей о внутримембранном взаимодействии мембранных механизмов, высказанной при изучении взаимодействия  $F_1-F_0$  с Tgk-системой переноса  $K^+$ , и тем, что разработано Бурдом с соавт. [4, 5], заключается в следующем: ионные механизмы вступают в симбиотическую связь, помогая друг другу при энергетическом кризисе, в то время как транспортеры сахаров и АЦ связаны антибиотически—функции одной системы исключают работу другой; для взаимодействия  $H^+$ -АТФ-азного комплекса  $F_1-F_0$  и  $K^+$ -ионофора Tgk допускается комплементарное или генетически предопределенное взаимодействие, в то время как в отношении ФТС и М-белка предполагается случайное взаимодействие, зависящее от концентрации этих белков в мембране.

До сих пор говорилось лишь о бактериальных клетках. Однако феномен гетерологического объединения мембранных белков известен и для животных клеток. Между многими тканями, как известно, имеется гормональная связь. Показано, что в определенных случаях рецепторы пептидных гормонов вступают в структурную связь с мембранной АЦ животных клеток [13]. Имеются в настоящее время также данные о том, что  $Na^+K^+$ -АТФ-азы клеток животных вступают в структурную взаимосвязь с гликолитическими ферментами, образуя сложные домены [21].

Вопрос сейчас в том, чтобы понять, когда имеет место случайное белок-белковое взаимодействие, а когда это взаимодействие генетически предопределено.

ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ ՎԵՐՄՈՒՆԿՈՒՄԸ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՄԱՆ  
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՆՊԱՏԱԿԱԶԱՐՄԱՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎ

Ջրածնային ԱՆՖ-ազային կոմպլեքսի և կալիումական իոնոֆորի փոխազդեցության, ինչպես նաև մեմբրանային այլ համակարգերի օրինակի վրա վերլուծվում է մեմբրանի տարրեր մեխանիզմների սարուկաուրային փոխազդեցության մասին հիպոթեզը:

BIOLOGICAL EXPEDIENCE OF THE OVERMOLECULAR  
ORGANIZATION OF MEMBRANE SYSTEMS

S. M. MARTIROSOV

The hypothesis of structural interaction between different membrane mechanisms has been discussed. The results discussed regard the interaction of H<sup>+</sup>-ATP-ase complex and potassium ionophore, as well as some other membrane systems.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аликян М. А., Мартиросов С. М., Петросян Э. С. Докл. АН АрмССР, 58, 94, 1973.
2. Дургарян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, 25, 469, 1980.
3. Дургарян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, 25, 654, 1980.
4. Колачев И. Ю., Гершикович В. И., Бурд Г. И. Биохимия, 45, 873, 1980.
5. Колачев И. Ю., Умярова А. М., Бурд Г. И. Биохимия, 46, 732, 1981.
6. Мартиросов С. М., Трцунян А. А. Биофизика, 26, 817, 1981.
7. Мартиросов С. М., Трцунян А. А. Биофизика, 26, 1033, 1981.
8. Мартиросов С. М., Трцунян А. А. Биофизика, 29, 255, 1984.
9. Мартиросов С. М., Трцунян А. А., Варданян А. Г. Биофизика, 27, 48, 1982.
10. Мартиросов С. М., Наносян Г. А., Трцунян А. А. Биофизика, 27, 249, 1982.
11. Bakker E. F., Harold F. M. J. Biol. Chem., 255, 433, 1980.
12. Bourd G. I., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg, 10, 315, 1993.
13. Calt K. J., Dufou M. L. Annu. Rev. Physiol., 49, 529, 1979.
14. Christian J. H. W., Waltho J. A. Biochim. Biophys. Acta, 65, 596, 1962.
15. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554, 1978.
16. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Ibid., 5, 561, 1978.
17. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Ibid., 5, 567, 1978.
18. Epstein W., Davies M. J. Bacteriol., 101, 836, 1970.
19. Epstein W., Kim B. S. Ibid, 108, 639, 1971.
20. Epstein W., Lalmins L. Trends Biochem. Sci., 5, 21, 1980.
21. Fassel E. T., Solomon A. K. Biochim. Biophys. Acta, 464, 82, 1977.
22. Garrahan P. J., Glynne I. M. J. Physiol., 192, 287, 1967.
23. Grtlnuolene B., Chmellauskotte V., Grtlnus L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 203, 1974.
24. Harold F. M., Papirnan D. J. Membr. Biol., 8, 27, 1972.
25. Heefner D. L. Mol. Cell Biochem., 44, 81, 1982.
26. Helmer G. L., Lalmins L. A., Epstein W. In: Membranes and Transport, 2, New--York, 1982.
27. Klingenberg M. Nature (London), 290, 449, 1981.

28. *Laimins L. A., Rhoads D. B., Attendorf K., Epstein W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3216, 1978.
29. *Lanyi J. K.* Biochim. Biophys. Acta, 559, 337, 1979.
30. *Magasanik B.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 249, 1961.
31. *Martirosov S. M.* Bioelectrochem. Bioenerg., 6, 315, 1979.
32. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 8, 25, 1981.
33. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 8, 597, 1981.
34. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 8, 605, 1981.
35. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 9, 459, 1982.
36. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 11, 29, 1983.
37. *Martirosov S. M., Trchountian A. A.* Ibid, 13, 1955, 1984.
38. *Martirosov S. M., Petrosian L. S.* Ibid, 8, 17, 1981.
39. *Martirosov S. M., Petrosian L. S., Trchountian A. A., Vartanian A. G.* Ibid, 8, 613, 1981.
40. *Mitchel P.* Symp. Soc. Gen. Microbiol., 20, 121, 1970.
41. *Mitchel P. J.* Bioenerg., 3, 5, 1972.
42. *Peterkofsky A., Gazdar C.* Bioscience Rep., 1, 53, 1981.
43. *Proverbio F., Hoffman J. F. J.* Gen. Physiol., 69, 605, 1977.
44. *Rhoads D. B., Epstein W. J.* Biol. Chem., 252, 1394, 1977.
45. *Rhoads D. B., Epstein W. J.* Gen. Physiol., 72, 283, 1978.
46. *Rhoads D. B., Waters F. W., Epstein W. J.* Gen. Physiol., 67, 315, 1976.
47. *Schrier S. I.* Amer. J. Physiol., 210, 159, 1966.
48. *Schultz S. G., Epstein W. J.* Gen. Physiol., 49, 221, 1965.
49. *Schultz S. G., Solomon A. K. J.* Gen. Physiol., 45, 355, 1961.
50. *Shulgina M. V., Kalachev I. Y., Bourd G. I.* FEBS Lett., 103, 238, 1979.
51. *Silver S.* In: Bacterial Transport, New York, 1978.
52. *Zarlengo M. H., Schultz S. G.* Biochim. Biophys. Acta, 126, 308, 1966.

«Биолог. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1987

УДК 551.510.42

## ПРИНЦИП ОПТИМАЛЬНОСТИ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СОЦИОЭТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Ф. Н. СЕМЕВСКИЙ, С. М. СЕМЕНОВ, Г. А. ТОНОЯН

Рассматривается процесс естественного отбора в популяциях на определенные формы поведения. В отличие от классической схемы отбора по наследуемым признакам в статье анализируется обобщенный процесс отбора по таким признакам, которые могут распространяться в популяции как за счет наследуемости, так и за счет копирования, научения.

Показано, что в рамках схемы отбора на индивидуальном уровне можно объяснить такие эффекты, как распространение в популяции альтруистических черт поведения особей. Подчеркивается, что для количественного анализа такого рода процессов достаточно ранее предложенного авторами [7] математического аппарата, базирующегося на принципе оптимальности для параметров состояния особи.

*Ключевые слова:* социозтологические процессы, математическое моделирование.

Наблюдаемые в природе определенные черты организации в системах надорганизменного уровня—популяциях, биоценозах—в современной биологии объясняются с эволюционных позиций. Та или иная

структура системы надорганизменного уровня есть продукт естественного отбора, протекающего на фоне естественной изменчивости биологических объектов. В результате отбора непрерывно повышается степень соответствия свойств объекта (параметров его состояния) условиям внешней среды. Таким образом, отбор приводит к оптимизации свойств биологических объектов в заданных условиях среды обитания.

Можно сформулировать две различные гипотезы относительно этого процесса, к которым, пожалуй, и сводится все многообразие существующих представлений.

— структура популяции есть продукт изменчивости и естественного отбора на уровне особей, наблюдаемые свойства особей оптимальны в заданных условиях среды (в последнее понятие в данном случае включается и структура популяции);

— структура популяции есть продукт изменчивости и естественного отбора на уровне популяций, наблюдаемые свойства популяции (в том числе их структурная организация) оптимальны в том смысле, что обеспечивают максимум популяционных преимуществ в заданной среде.

Первая гипотеза основывается на концепции индивидуального отбора, а вторая — на концепции группового отбора. Существуют соответствующие математические формулировки этих утверждений, называемые обычно принципами оптимальности. Последние суть формулировки относительно максимизации значения функции приспособленности (индивидуального или популяционного ранга) в ходе естественного отбора.

Ниже обсуждается роль естественного отбора, происходящего на различных уровнях, в становлении определенной структуры популяции, а также специфика этого процесса, свойственная отбору на определенные формы поведения. Подчеркнем, что далее идет речь о панмиктических популяциях без управления, состоящих из потенциально равноценных особей. Под структурой популяции мы подразумеваем распределение слагающих ее особей по возможным состояниям, в частности, по различным формам поведения. И, наконец, если в популяции наблюдаются такие стратегии особей, в том числе типы поведения, которые являются целесообразными, полезными с популяционной точки зрения, то мы будем полагать, что популяция обладает чертами организации.

Авторы считают, что подавляющее число задач экологии и этологии, относящихся к области организации биологических систем надорганизменного уровня, может быть с достаточной точностью решено с позиций естественного отбора на индивидуальном уровне. В работе [7] проведено обоснование принципа оптимальности, опирающегося на концепцию индивидуального отбора, продемонстрирована его конструктивность и эффективность при решении ряда задач теоретической и прикладной экологии.

Концепцию группового отбора обычно привлекают для объяснения происхождения каких-либо фактов, которые трудно объяснить с позиций индивидуального отбора. Пожалуй, наиболее яркий пример тако-

го свойства можно найти в этологии. Это—альтруистические черты в поведении особей.

Альтруистической следует считать такую стратегию особи, которая обеспечивает какие-либо преимущества другим особям (или же популяции в целом) в ущерб данной особи и/или ее потомству.

Поскольку естественный отбор на индивидуальном уровне по наследуемым признакам явно не может привести к таким результатам, то возникновение альтруистических черт в поведении особей обычно объясняют с позиций группового отбора, с точки зрения улучшения свойств популяции в целом [8, 10]. Следует отметить, что сторонники концепции группового отбора—Вини-Элвардс [12], Вильсон [11], Наумов [5]—не отрицают как наличия отбора на уровне особей, так и его эффективности, т. е. оптимизации свойств особей по отношению к состоянию среды в ходе отбора. В то же время они придают очень большое значение отбору на популяционном уровне.носителем адаптивных свойств популяции считается генофонд.

Альтруизм часто путают с коалиционным малоагрессивным поведением. Особи часто применяют стратегии, повышающие их приспособленность и не наносящие ущерба (а иногда и приносящие пользу) другим особям. Но это явление никакого отношения к альтруизму не имеет (см. приведенное выше определение). Это—максимизация индивидуального коэффициента размножения, не сопровождающаяся нанесением ущерба другим членам популяции вследствие специального стечения обстоятельств, сложившихся конкретных условий среды обитания.

Говоря о невозможности возникновения альтруистических черт поведения особей (т. е. расходования своих ресурсов вещества и энергии в ущерб себе и/или своему потомству и на пользу другим особям) в ходе отбора на индивидуальном уровне, следует подчеркнуть, что здесь идет речь об отборе по наследуемым признакам. Если внести в рассмотрение какие-либо качества особей, которые могут распространяться в популяции не только за счет наследования, но и другим путем, например, за счет копирования, научения, то выводы могут оказаться несколько иными. Такая ситуация довольно характерна именно для этологии.

В этологии и, пожалуй, только в этологии имеется много примеров стратегии особей, которые трудно объяснить с позиций отбора по наследуемым признакам, протекающего на уровне особей [1, 3]. Особенно богата такими примерами социэтология общественных перепончатокрылых, птиц и приматов. Панов [6] правильно указывал на перспективность филогенетического подхода для объяснения конкретных форм поведения. Любые адаптации развиваются не на пустом месте, а реализуют возникшие в ходе филогенеза возможности.

Развитие системы памяти создает возможности для эволюции сиграм, идущей параллельно эволюции генома. Морган [4] писал о передаче опыта путем традиционной наследственности. Лобашев [2] применял к тем же явлениям термин «сигнальная наследственность». При этом, с нашей точки зрения, недостаточно подчеркивалось, что в

данном случае эволюционируют не особи, не генотипы, а именно энграммы, поскольку передача такой наследственности происходит не обязательно от родителей к их потомству.

В результате эволюции и отбора энграмм в популяции могут реализовываться альтруистические типы поведения особей. Основной причиной этого явления, по нашему мнению, является большая селективная ценность самого свойства копирования, изучения. Действительно, особи, могущие усваивать черты поведения других особей, довольно часто имеют заметное преимущество перед «несобучающимися», например, быстро приобретают сумму жизненно важных реакций на изменение состояния внешней среды.

Механизм копирования, «приемник сигнальной наследственности», не может, разумеется, обладать абсолютной избирательностью. Поэтому наряду с чертами, повышающими приспособленность особей, копируются также черты поведения, понижающие ее. Таким путем в популяции может распространиться, в частности, и альтруистический тип поведения.

Чтобы установить, какой именно тип поведения реализуется в результате отбора, необходимо изучить механизмы и скорость распространения в популяции различных типов поведения. Рассмотрим следующий иллюстративный пример, который, однако, позволяет осветить главные особенности количественных расчетов в рамках предлагаемого нами метода. Пусть особи в популяции могут обладать типами поведения 1, 2, ..., N. В течение одной генерации последовательно происходят следующие события.

1. Особи приносят потомство. Если плотность особей, обладающих поведением  $i$ , есть  $x_i$ , то количество их потомков есть  $Q_i x_i$ , где  $Q_i$  — плодовитость в расчете на одну особь. Всего таких особей в популяции после размножения станет  $x_i + Q_i x_i$ .

2. Между взрослыми особями и их потомками происходят контакты, в результате которых устанавливается тип поведения потомков. Будем считать, что доля  $p$  ( $0 \leq p < 1$ ) потомков обязательно имеет тип поведения родителей, а доля  $q = 1 - p$  образует группу потомков, тип поведения которых устанавливается в результате случайного сигнального контакта со всеми взрослыми особями, в том числе и с теми, которые обладают родительским типом поведения. Будем предполагать, что вероятность сигнального контакта с особями, имеющими поведение  $i$ , есть

$\lambda_i x_i / \sum_{j=1}^N \lambda_j x_j$ . Число  $\lambda_i$ , тем самым, характеризует скорость распро-

странения типа поведения  $i$  в популяции. Таким образом, после завершения сигнальных контактов плотность особей с поведением  $i$  есть

$$x_i + pQ_i x_i + q \left( \sum_{j=1}^N \lambda_j x_j \right) \lambda_i x_i / \sum_{j=1}^N \lambda_j x_j.$$

3. Взрослые особи погибают, а на всю совокупность потомков действует неспецифический фактор смертности, приводящий плотность всей популяции к исходному значению. После этого потомки превра-

щаются во взрослых особей. Численность (плотность) особей, обладающих поведением  $i$ , оказывается равной

$$\bar{i} [pQ_i x_i + q(\sum_{j=1}^N Q_j x_j) \lambda_i x_i / \sum_{j=1}^N \lambda_j x_j],$$

где  $\bar{i}$ —выживаемость от упомянутого выше неспецифического фактора смертности. Принимая исходную численность популяции за единицу, можно определить, что  $\bar{i} = (\sum_{j=1}^N Q_j x_j)^{-1}$ .

Таким образом, в предположениях 1—3 плотность взрослых особей, обладающих поведением  $i$ , в последовательных поколениях связана соотношением

$$x_i(t+1) = \left( \frac{pQ_i}{\sum_{j=1}^N Q_j x_j(t)} + \frac{q\lambda_i}{\sum_{j=1}^N \lambda_j x_j(t)} \right) x_i(t),$$

где  $t$ —номер генерации,  $i=1, \dots, N$ .

Какой же тип поведения отбирается в рамках данной модели? Рассмотрим сначала два частных случая.

Если  $p=1$  ( $q=0$ ), т. е. тип поведения особи жестко определен родительским типом, то отбирается такой тип поведения  $i_0$ , который соответствует максимуму плодовитости  $Q: Q_{i_0} = \max_{i=1, \dots, N} Q_i$ . Этот вывод полностью соответствует классическому принципу оптимальности, в силу которого отбор максимизирует коэффициент размножения особи.

Если  $p=0$  ( $q=1$ ), т. е. тип поведения потомка определяется целиком копированием в ходе сигнальных контактов, то отбирается такой тип поведения  $i_0$ , который соответствует максимуму скорости сигнального распространения, т. е.  $\lambda_{i_0} = \max_{i=1, \dots, N} \lambda_i$ . Таким образом, в данном случае в ходе отбора максимизируется скорость сигнального распространения типа поведения в популяции.

В общем случае, когда  $p \neq 0, 1$ , отбор может приводить к иным результатам: установившийся в ходе отбора тип поведения может не соответствовать ни максимуму скорости сигнального распространения, ни максимуму плодовитости (т. е. скорости «наследственного» распространения). Справедливо следующее утверждение: если в результате отбора в популяции установился тип поведения  $i_0$ , то  $p \frac{Q_{i_0}}{Q_{i_0}} + q \frac{\lambda_{i_0}}{\lambda_{i_0}} \leq 1$  для  $i \neq i_0$ ; для  $i = i_0$  это неравенство, как легко видеть, превращается в равенство.

Таким образом, для анализа процессов отбора различных форм поведения в популяции можно использовать практически без изменения достаточно развитый в настоящее время математический аппарат, связанный с индивидуальным принципом оптимальности [7]. Для этого нужно заменить множество возможных фенотипов множеством типов поведения, а коэффициент размножения особи—коэффициентом воспроизводства соответствующего типа поведения (с учетом всех путей его распространения в популяции).

Проведенные в данной работе рассмотрения показывают, что в общем случае отбор не приводит ни к максимизации скорости распространения типа поведения за счет наследования, ни к максимизации скорости сигнального распространения. Отбирается некоторый средний оптимальный тип поведения, обладающий максимальной скоростью «воспроизводства» в популяции, с учетом вкладов двух путей его распространения в популяции—наследственного и сигнального. Этот тип поведения не обеспечивает особи-носителю оптимального коэффициента размножения (т. е. его максимальной), как это произошло бы в результате отбора лишь по наследуемым признакам. В данном случае максимальный «коэффициент размножения» имеет не особь, а тип поведения.

Именно за счет таких эффектов, по нашему мнению, в популяции может распространиться альтруистический тип поведения, который безусловно снижает коэффициент размножения особи,—носителя, но, по-видимому, имеет высокую скорость воспроизводства в популяции за счет сигнального распространения и копирования.

Ереванский государственный университет,  
кафедра высшей математики

Поступило 22.X 1984 г.

**ՄԱՏԵՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ԱԿՉՐՈՒՆՔԸ ԵՎ ՍՈՑԻՈԼՔՍԻՈԳԻԱԿԱՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԻ  
ՄԱՔԵՄԱՏԻԿԱԿԱՆ ՄՈԴԵԼԱՎՈՐՈՒՄԸ**

**Յ. Ն. ՍԵՄԵՎՍԿԻ, Ս. Մ. ՍԵՄՅՈՆՈՎ, Գ. Ա. ՏՈՆՈՅԱՆ**

*Հոդվածում վերլուծվում է ժառանգական հատկանիշների բնական ընտրության դասական սխեմայից տարբեր ընդհանրացված ընտրության պրոցեսներում այնպիսի հատկանիշների, որոնք կարող են պոպուլյացիայում տարածվել ինչպես ժառանգականության, այնպես էլ պատճենավորման սովորեցման հաշվին: Ցույց է տրվում, որ ընտրության սխեմայի սահմաններում (անհատական մակարդակով) հնարավոր է բացատրել այնպիսի էֆեկտներ, ինչպիսիք են պոպուլյացիայում տեսակների վարքագծում այտրոիստական զծերի տարածումը:*

**PRINCIPLE OF OPTIMIZATION AND MATHEMATICAL  
MODELLING OF SOCIO—ETOLOGICAL PROCESSES**

**F. N. SEMEVSKY, S. M. SEMYONOV, G. A. TONOVAN**

In contradiction to classical inbred election by hereditary symptoms, the process of generalized election by the symptoms, which may be spread all over the population not only in hereditary, but also in imitating and instructive ways, has been discussed. Within the framework of the election it is possible to explain such effects as dissemination of unselfish lines in the behaviour of the population species.

1. Дьюсбери Д. Поведение животных. 476, М., 1981.
2. Лобашев М. Е. Генетика. Изв. ЛГУ, 601—602, 1967.
3. Меннинг О. Поведение животных. 221—225, М., 1982.
4. Морган Т. Г. Экспериментальные основы эволюции. 250, М.—Л., 1936.
5. Наумов Н. П. Журн. общ. биол., 32, 6, 651—666, 1971.
6. Панов Е. Н. Зоол. журн., 61, 7, 988—999, 1982.
7. Семеновский Ф. Н., Семенов С. М. Математическое моделирование экологических процессов. 280, Л., 1982.
8. Boorman J. A., Levitt P. R. Theoret. Pop. Biol., 4, 1, 85—128, 1973.
9. Hamilton W. D. Ann. rev. Ecol. a. Syst. Palo Alto., Ann. rev. Inc., 3, 192—232, 1972.
10. Levins R. Extinction. In: M. Gerstenhaber ed. Some Mathematical Questions in the Life Science. Providence, Rhode Islands, American Mathematical Society, 2, 77—107, 1970.
11. Wilson E. O. 23, 11, 631—636, 1973.
12. Wynne-Edwards V. C. In: Regulation and Control in Living Systems.—N. Y., J. Wiley, 347—421, 1966.

*«Биолог. ж. Армении», т XXXVIII, № 1, 1987*

УДК 616.36+612.396:547.952

## ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ЦЕРЕБРОЗИДОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГООБМЕНА И ОБЩУЮ АКТИВНОСТЬ $\beta$ -ГЛИКОЗИДАЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

О. П. СОЦКИЙ, Г. М. САРКИСОВА, Г. А. ЧУХАДЖЯН

Показано, что хроническое внутрибрюшинное введение цереброзидов в виде эмульсии в количестве 5 мг/кг массы животного приводит к нарушениям в энергетическом обмене печени без изменения в ней общей активности  $\beta$ -гликозидаз.

*Ключевые слова:* цереброзиды, адениннуклеотиды,  $\beta$ -гликозидазы.

Согласно результатам многочисленных исследований, гликосфинголипиды обладают выраженной биологической активностью [1]. Так в опытах *in vitro* показано, что они подавляют процессы дыхания, снижают эффективность окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий мозга и печени [5], оказывают активирующее и ингибирующее действие на активность  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$ азы, в зависимости от их концентрации [4]. Все указанные эффекты гликосфинголипидов, как было установлено нами методом флуоресцентных зондов, обусловлены их способностью легко встраиваться в мембранные структуры, вызывая конформационные перестройки [7].

Интересно, что в опытах *in vivo*, т. е. при хроническом введении в организм животных гликосфинголипидов (цереброзидов), обнаружены сдвиги в холестеринном обмене [14], окислительном фосфорилировании [6], в функциональном состоянии системы кровь—сосудистая стен-

ка [9]. Последнее не может не заинтересовать исследователей, занимающихся проблемами атерогенеза и артериальной гипертензии, ввиду того, что гликофинголипиды входят в состав наиболее функционально-динамического слоя клеточной мембраны — гликокаликса [2], принимающего непосредственное участие в таких важнейших функциях клетки, как процессы ионного транспорта, узнавания, контактного ингибирования, пролиферации [10].

В связи с этим большой теоретический и практический интерес представляют исследования, направленные на изучение влияния гликофинголипидов на обменные процессы экспериментальных животных. В настоящей работе приведены результаты анализа содержания адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), характеризующих энергообеспечение печеночных клеток, и общей активности  $\beta$ -гликозидаз печени в условиях хронического введения цереброзидов белым крысам.

*Материал и методика.* Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 150—180 г, разделенных на две группы. Животным опытной группы ежедневно в течение 4-х месяцев интратрибуциально вводили эмульсию цереброзидов, приготовленную на смеси этанол—физиологический раствор в соотношении 1:20 (в объемах) в количестве 0,5 мл из расчета 5 мг цереброзидов на 1 кг массы; контрольной группе — 0,5 мл аналогичной смеси, не содержащей цереброзидов.

Цереброзиды выделяли из мозга крупного рогатого скота по методу Кленка с очисткой на колонке с силикагелем марки «Л» («Хемпол», ЧССР) [9].

Крысы забивали деканитацией, с последующим погружением печеночной ткани в жидкий азот. Адениннуклеотиды экстрагировали из навесок, замороженных в жидком азоте и растертых в тонкий порошок, 6%-ым охлажденным раствором  $\text{HClO}_4$  (из расчета на 1 г навески — 2 мл раствора  $\text{HClO}_4$ ). Белки осаждали посредством центрифугирования (16000 об/мин, 2°, 30 мин). Надосадочную жидкость нейтрализовали сухим порошком  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , чтобы не изменить объем. Перхлорат калия удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость наносили микрошприцем в шире пятен на пластинки фирмы «Мерк» (ФРГ) на расстоянии 15 мм от нижнего края в конечном объеме 10 мкл. В качестве свидетелей использовали чистые АТФ, АДФ и АМФ («Сигма», США). Пластинки помещали в стеклянную хроматографическую камеру, предварительно насыщенный парами растворителей. Из рекомендованных систем растворителей наиболее эффективной оказалась система диоксан— $\text{H}_2\text{O}$ —11Н аммиак, взятых в соотношении 6:4:1 (в объемах), при комнатной температуре.

Прямую денситометрию в отраженном свете осуществляли на сканирующем устройстве флуоресцентного спектрофотометра МРФ-11 при длине волны 260 нм [3]. Апертуру сканирующего устройства настраивали с учетом диаметра пятен определяемых веществ. Площади пиков отдельных компонентов на денситограммах рассчитывали как произведение высоты пика на его ширину на половине его высоты [8].

Общую активность  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы печеночной ткани определяли по методу Гатт в модификации Зингера и соавт. [16]. Активность ферментов выражали в каналолах освобожденного *p*-нитрофенола на 1 мг белка в течение часа инкубации при 37°. В качестве субстратов использовали *p*-нитрофенил— $\beta$ -D-галактопиранозид—для  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкопиранозид—для  $\beta$ -глюкозидазы («Хемпол», ЧССР). Содержание белка в пробах определяли по методу Лоурри и соавт. [15].

Полученные данные обрабатывали общепринятым методом с использованием критерия Стьюдента.

*Результаты и обсуждение.* Как видно из данных, представленных в табл. 1, хроническое введение цереброзидов сопровождается заметными сдвигами в энергетическом обмене печени крыс. Они проявляются как в изменении содержания отдельных нуклеотидов, так и показана-

телей, характеризующих их обмен. Следует отметить, что большинство количественных показателей аденинуклеотидов у животных контрольной группы соответствует литературным данным [3], за исключением содержания АМФ, которое оказалось выше. В опытной группе животных, по сравнению с контрольной, выявлено заметное снижение содержания АТФ (на 38,8%), сопровождаемое неадекватным увеличением АМФ (на 29%).

Таблица 1

Показатели обмена аденинуклеотидов в печени крыс при хроническом введении цереброзидов, мкмоль на 1 г ткани

Группы	АТФ	АДФ	АМФ
Контрольная	2,68±0,07 (n=9)	1,53±0,05 (n=9)	1,03±0,05 (n=9)
Опытная	1,93±0,03* (n=13)	1,52±0,06 (n=13)	1,33±0,08* (n=13)
Группы	АТФ/АДФ	АН	ЭЗ
Контрольная	1,75±0,03 (n=9)	5,27±0,16 (n=9)	0,55±0,03 (n=9)
Опытная	1,26±0,05* (n=13)	4,70±0,25 (n=13)	0,56±0,02* (n=13)

Примечание: \*— достоверное отличие от контроля ( $P < 0,05$ ), АН—аденинуклеотиды, ЭЗ—энергетический заряд. (n)—число опытов.

Количество АДФ в этих условиях не изменяется. Как следствие снижения содержания АТФ (основного аккумулятора и переносчика химической энергии в клетке) происходит падение величины молярного отношения АТФ/АДФ—показателя энергетического уровня адениловой системы: с 1,75 до 1,26.

Обнаруженная нами разнонаправленность количественных сдвигов АТФ, АДФ и АМФ, снижение показателя энергетического уровня адениловой системы свидетельствуют об определенных нарушениях в системах фосфорилирования (окислительного и гликолитического), приводящих к энергетическому дефициту клеток. Указанные нарушения усугубляются отсутствием факта повышения АДФ, являющегося мощным стимулятором клеточного дыхания. Однако сравнительно небольшие сдвиги в суммарном содержании аденинуклеотидов и энергетическом заряде [13] свидетельствуют о сохранении компенсаторных механизмов в клетках печени, направленных на поддержание энергетического обмена. Возможно, с этих позиций следует трактовать факт уменьшения количества АТФ без адекватного увеличения АДФ—как результат активации компенсаторно-приспособительных механизмов, ведущих к усилению пирофосфатного расщепления АТФ с образованием АМФ [12]. Не исключается, что обнаруженные нами нарушения в энергетическом обмене связаны с гепатотоксическим действием цереброзидов, содержащих в своей молекуле ряд токсических соединений (галактоза, сфингозин) [11, 17].

Для проверки этого предположения нами была изучена общая активность  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы—ферментов лизосом.

Общая активность  $\beta$ -гликозидаз печени крыс при хроническом введении цереброзидов, наизомоль освобожденного р-нитрофенола на 1 мг белка за 1 ч инкубации при 37°

Группы	$\beta$ -галактозидаза	$\beta$ -глюкозидаза
Контрольная	278.33 $\pm$ 15.7 (n=9)	75.22 $\pm$ 6.06 (n=9)
Опытная	285.24 $\pm$ 10.24 (n=7)	75.31 $\pm$ 6.30 (n=7)

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение животным цереброзидов в течение 4-х месяцев не вызывает изменений активности указанных ферментов.

Таким образом, хроническое введение цереброзидов в виде эмульсии внутрибрюшинно в количестве 5 мг/кг массы животного приводит к выраженным нарушениям в энергетическом обмене, без изменения активности общих гликозидаз печени.

Ереванский медицинский институт,  
кафедра бионеорганической и биофизической химии

Поступило 15.X 1984 г.

ՑԻՐԵԲՐՈԶԻԴՆԵՐԻ ԽՐՈՆԻԱԿԱՆ ՆԵՐՄՈՒԾՄԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆ.  
ԱՌՆՆՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԷՆԵՐԳԱՓՈՒՅԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ  
ԵՎ  $\beta$ -ԳԼԻԿՈԶԻԴՆԵՐԻ ԸՆԴՉԱՆՈՒՐ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ո. Պ. ՍՈՏՅԻ, Գ. Մ. ՍԱՐԿԻՍՈՎԱ, Գ. Ա. ՉՈՒԽԱԴՅԱՆ

Ցույց է տրված, որ ցերեբրոզիդների էմուլսիայի ներորոլայնային ներարկումը 5մգ/կգ կենդանու մասսային հաշվով հանգեցնում է լյարդի էներգետիկ փոխանակության խանգարման՝ անփոփոխ թողնելով լյարդի  $\beta$ -գլիկոզիդազների ընդհանուր ակտիվությունը:

## EFFECT OF CEREBROSIDES CHRONIC INJECTION ON SOME INDICES OF ENERGETIC METABOLISM AND ON THE GENERAL ACTIVITY OF $\beta$ -GLYCOSIDASES IN THE RATS LIVER

O. P. SOTSKY, G. M. SARKISOVA, G. A. CHUKHADJIAN

Chronic intraperitoneal injection of cerebroside emulsion in the dose of 5 mg/kg of animal body brings to alterations in the energetic metabolism without any alterations in the general activity of  $\beta$ -glycosidases in the rats liver.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аврора Н. Ф., Обухови Е. Л. Успехи совр. биол., 79, 1, 33—47, 1975.
2. Ваганова М. Е. Кардиология, 21, 7, 106—112, 1981.
3. Зарубина И. В., Кривооручко Б. И. Укр. биохим. ж., 54, 4, 137—139, 1982.
4. Мирзоян С. А., Мхехян Э. Е., Секоян Э. С., Соцкий О. П., Акопян С. Э. Бюлл. экпер. биол., 2, 682—684, 1978.
5. Мхехян Э. Е., Соцкий О. П. Вопр. биохим. мозга, 10, 6, 219—222, Ереван, 1970.

6. Мхехян Э. Е., Соцкий О. П. Укр. биохим. ж., 44, 5, 644—647, 1972.
7. Мхехян Э. Е., Соцкий О. П., Баджинян С. А., Ахопов С. Э. Биофизика, 25, 4, 638—642, 1980.
8. Перри С., Атос Р., Брюер П. В кн.: Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 171, М., 1974.
9. Соцкий О. П., Ахопов С. Э., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Бюлл. экспер. биол., 4, 387—388, 1984.
10. Туманова С. Ю., Прохорова М. И. Нейрохимия, 1, 2, 184—199, 1982.
11. Уэллс В. В., Колинз К. А., Куртц Дж. В. В кн.: Лизосомы и лизосомные болезни накопления. 32—47, М., 1984.
12. Шамов Н. А., Векслер Я. Р., Асланова Н. Р. Вопр. мед. химии, 24, 3, 310—314, 1978.
13. Atkinson D. E., Biochemistry J., 11, 4030—4031, 1968.
14. Carroll K. K. Lipid Res., 1, 2, 171—178, 1960.
15. Lowry E., Rosenbrough N., Farr A, et al. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
16. Singer H., Hunkers G., Schafer I. Pediatrics, 49, 352—361, 1972.
17. Stoffel W., Grol M. Chem. and phys. Lipids, 13, 4, 372—388, 1974.

«Биолог. ж. Армени», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.352

## УСТОЙЧИВОСТЬ БЛМ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ В ПРИСУТСТВИИ МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ

Л. Г. МИКАЕЛЯН, А. К. КАРАПЕТЯН, С. А. АДЖЯН

Изучена зависимость  $\tau$  БЛМ от  $\varphi$  в присутствии МА дибуканна и пропранолола. Оба местных анестетика увеличивают  $\tau$  БЛМ относительно контроля в изученном интервале  $\varphi$ .

Зависимость  $\tau$  БЛМ от концентрации дибуканна в пределах  $10^{-7}$ — $10^{-2}$  М имеет форму колокола с максимумом при концентрации  $10^{-5}$  М. При фиксированных значениях концентрации пропранолола  $10^{-4}$  М и  $\varphi$ , равном 400 мВ, увеличение pH водного раствора от 5 до 9 приводит к уменьшению  $\tau$  БЛМ.

Субклинические концентрации МА стабилизируют, а суперклинические — дестабилизируют структуру БЛМ.

Результаты обсуждаются с точки зрения современных представлений о механизме электрического пробоя БЛМ, а также возможной роли эффективной формы молекул во влиянии МА на структуру БЛМ.

*Ключевые слова:* мембраны бислоиные липидные, плоские, диэлектрическая прочность, местные анестетики.

В настоящее время большинство исследователей склоняются к мнению, что местные анестетики (МА) влияют на ключевые белки, например, ионные каналы мембран клеток. Однако до сих пор нет однозначного ответа на вопрос, является ли это влияние непосредственным или опосредовано липидной компонентой мембран. Альтернативные точки зрения на эту проблему детально рассматриваются в недавно опубликованном обзоре [12]. Из сказанного следует, что в рамках про-

блемы «стабилизирующего действия» МА на биомембраны [27] исследование взаимодействия МА с липидами в бислоях имеет исключительно важное значение.

Данные последних лет, полученные с помощью методов ЭПР, ЯМР и флуоресцентной спектроскопии, показывают, что МА увеличивают жидкость липидного бислоя [10, 17, 21]. Выяснились также некоторые детали межмолекулярного взаимодействия МА с молекулами липидов. Оказалось, что МА внедряется в липидный бислой и взаимодействует с липидными молекулами как электростатически, так и гидрофобно, причем степень погружения зависит от рН [16].

МА влияют также на электрические свойства плоских бислоевых липидных мембран (БЛМ). Оки [19] показал, что МА дипукаин (дибукаин), тетракаин, кокаин и прокаин (новокаин) при их симметричной аппликации к БЛМ в низких концентрациях увеличивают, а в высоких — уменьшают электрическое сопротивление мембран по постоянному току. Оки показал также, что в присутствии МА разрушающая БЛМ концентрация  $Ca^{2+}$ , вводимая асимметрично, увеличивается в 25 раз. В этой работе впервые на плоских БЛМ было показано стабилизирующее влияние низких концентраций МА на структуру бислоя.

В предыдущей работе [5] нами было показано, что дипукаин, пропранолол и лидокаин при симметричном добавлении к БЛМ в низких концентрациях увеличивают их электрическое сопротивление и устойчивость в электрическом поле.

Цель данной работы состояла в выяснении зависимости стабилизирующего эффекта МА на БЛМ от потенциала  $\phi$ , устойчивости БЛМ от концентрации МА, выявлении вклада заряженной и незаряженной формы МА в стабилизацию БЛМ.

*Материал и методика.* БЛМ формировали из 2%-ных растворов суммарной фракции фосфолипидов мозга быка в *n*-декане или смеси *n*-декана и *n*-гептана. Водный раствор содержал 100 мМ NaCl; рН раствора изменяли добавлением HCl и NaOH. В экспериментах использовали кристаллический дипукаингидрохлорид, который растворяли в экспериментальном растворе, а также эмульгированный пропранололгидрохлорид для инъекции (ГДР). Методика измерения времени жизни ( $\tau$ ) БЛМ в электрическом поле подробно изложена в работе [7]. Напряжение на БЛМ подавали от генератора прямоугольных импульсов, сконструированного в нашей лаборатории. Регистрацию  $\tau$  БЛМ осуществляли на осциллографе с памятью марки С8-11. Использовались хлорсеребряные электроды собственного изготовления без ягачевого мостика. Натяжение БЛМ измеряли по методу, описанному в работе [4]. Электрическую емкость БЛМ измеряли на частоте 159 Гц и напряжении 30 мВ. Среднее время жизни ( $\tau$ ) БЛМ получали на 85—140 мембранах.

*Результаты и обсуждение.* Зависимость  $\tau$  БЛМ от  $\phi$ . На рис. 1 представлена зависимость  $\tau$  БЛМ от  $\phi$  в контроле и в присутствии  $10^{-5}$  М пропранолола и дипукаина. Видно, что с увеличением  $\phi$  от 350 до 700 мВ  $\tau$  контрольных БЛМ уменьшается. Этот результат качественно согласуется с данными работы [1].

В присутствии местных анестетиков характер зависимости  $\tau$  от  $\phi$  практически не изменяется. Однако видно, что увеличиваются абсолютные значения  $\tau$  БЛМ, причем дипукаин более эффективен. Небольшое

снижение  $\tau$  БЛМ при высоких значениях  $\varphi$  связано, по-видимому, с ограниченностью временной разрешающей способности измерительной цепи.

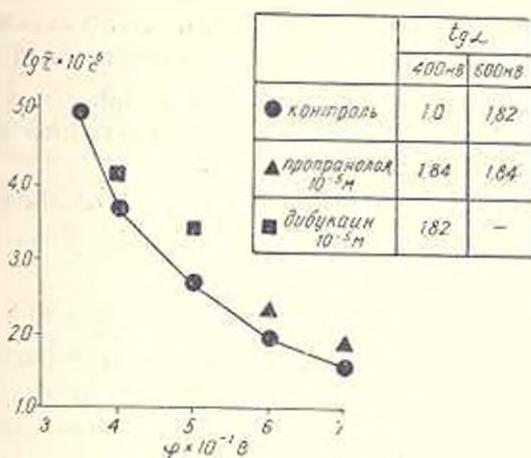


Рис. 1. Зависимость логарифма  $\tau$  БЛМ от  $\varphi$  в контроле и в присутствии  $10^{-5} M$  пропранолола и дибуканина. В таблице даны значения тангенса угла наклона зависимости логарифма плотности распределения от логарифма на малых временах, при 400 и 600 мВ.

Эти результаты показывают, что при низкой концентрации пропранолола и дибуканина увеличивают устойчивость БЛМ в электрическом поле, т. е. оказывают стабилизирующее действие на структуру БЛМ. Этот эффект МА не зависит от величины напряжения. Таким образом, наши данные, полученные с помощью адекватного определения устойчивости плоских БЛМ, подтверждают результаты Окс, показывающие стабилизирующее влияние низких концентраций МА на структуру БЛМ.

Для интерпретации полученных результатов обратимся к представлениям, развитым в последние годы в теории электрического пробоя мембран [2]. Согласно этой теории, пробой БЛМ связан с появлением и развитием дефектов типа сквозных пор в матриксе мембраны под влиянием электрического поля. Процесс пробоя БЛМ в электрическом поле происходит, по крайней мере, в две стадии: стадию рождения дефекта и стадию его роста (диффузии в пространстве радиусов) до критических размеров. Двустадийность процесса разрыва БЛМ в электрическом поле была экспериментально показана в работах [3, 6]. Каждая стадия имеет свое характеристическое время, и сумма этих времен определяет  $\tau$  БЛМ при данном потенциале. Если характеристические времена стадий имеют близкие значения, то функция распределения  $\tau$  БЛМ не является экспоненциальной, если же они сильно отличаются, то функция распределения  $\tau$  БЛМ описывается простой экспоненциальной зависимостью. В координатах  $\ln F \sim t(\ln \tau)$ , где  $F$ —плотность распределения,  $\tau$ —время жизни БЛМ в области малых времен, значение  $tg \alpha$  наклона кривой этой зависимости соответствует числу стадий пробоя БЛМ.

В таблице на рис. 1 представлены значения  $\lg \tau$  для контрольных БЛМ и в присутствии МА при  $\varphi$ , равном 400 и 600 мВ. При 400 мВ в контроле регистрируется одностадийный процесс разрыва БЛМ, при 600 мВ—двухстадийный. В присутствии МА для обоих значений  $\varphi$  обнаруживаются две стадии разрыва БЛМ. Это указывает на то, что в присутствии МА характеристические времена стадий пробоя БЛМ приобретают близкие значения. Более того, поскольку возрастают  $\tau$  БЛМ, то следовательно, увеличиваются по абсолютной величине и характеристические времена стадий.

На основании полученных данных можно заключить, что увеличение  $\tau$  БЛМ при действии низких концентраций МА связано с повышением общей устойчивости мембран.

В работе [2] выведена также формула для расчета  $\tau$  БЛМ. Основными параметрами, от которых сильно зависит  $\tau$ , являются коэффициенты поверхностного и линейного натяжения мембраны, температура и потенциал. В меньшей степени  $\tau$  зависит от толщины, вязкости и электрической емкости мембраны.

*Зависимость  $\tau$  БЛМ от концентрации дибуканна.* В этой серии экспериментов изучали влияние дибуканна в широком спектре изменения его концентраций на  $\tau$  БЛМ при  $\varphi$ , равном 400 мВ. Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что при концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М

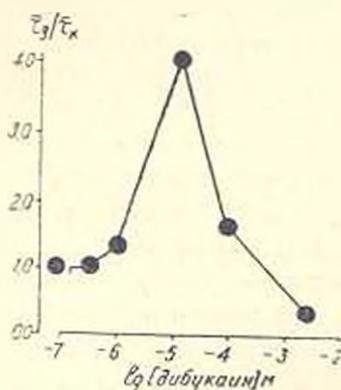


Рис. 2. Зависимость отношения  $\tau$  БЛМ в присутствии дибуканна и в контроле от концентрации дибуканна,  $\varphi = 400$  мВ.

дибуканн не оказывает влияния на устойчивость мембран. Достоверное изменение  $\tau$  БЛМ наблюдается при концентрации анестетика, равной  $5 \times 10^{-6}$  М. С увеличением концентрации дибуканна до  $10^{-5}$  М  $\tau$  БЛМ достигает максимального значения. Дальнейшее увеличение концентрации дибуканна приводит к снижению этого показателя, а в области концентраций  $5 \times 10^{-4}$ — $10^{-3}$  М устойчивость мембран падает ниже контрольного значения в 3,5—4 раза. Таким образом, кривая зависимости  $\tau$  БЛМ от концентрации дибуканна представляет собой колокол с максимумом при концентрации 0,01 мМ.

Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными. В частности, они подтверждают данные Оки [19], касающиеся

ся стабилизирующего влияния низких концентраций третичных аминов на структуру БЛМ. Розенберг [21] наблюдал упорядочивающий эффект 0.1 мМ тетракамина на структуру синапсомозга. Недавно полученные результаты экспериментов на монослоях из фосфатидилсерина [29] показали, что уже при концентрации пропранолола  $5 \times 10^{-6}$  М обнаруживается расширение монослоя. Что касается дестабилизирующего влияния высоких концентраций МА, то в литературе имеется большое количество такого рода данных, полученных на различных липидных модельных системах, микросомальных и синапсомальных фракциях, форменных элементах крови и срезах мозга. Эти данные детально обсуждаются в ряде обзоров [15, 27, 28]. Здесь важно указать, что высокие концентрации МА различной природы, как правило, увеличивают жидкость мембранных липидов, снижают температуру фазового перехода липидов, разупорядочивают структуру мембран, т. е. дестабилизируют ее. Более важным, с точки зрения идентичности объектов, является совпадение полученных нами данных с данными Оки [19], которые показали, что высокие концентрации МА уменьшают устойчивость плоских БЛМ.

*Влияние двух форм МА на  $\tau$  БЛМ.* При нейтральных (физиологических) значениях рН третичные аминовые анестетики в водном растворе существуют в двух формах: заряженной, или катионной, и в нейтральной форме. Электрофизиологические данные показывают, что обе формы способны блокировать нервный импульс [23]. В этой связи интересно было выяснить, являются ли обе формы МА эффективными с точки зрения их влияния на устойчивость БЛМ.

В данной серии экспериментов мы изучали влияние пропранолола в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М на  $\tau$  БЛМ при двух значениях рН водного раствора. Необходимо отметить, что в литературе фигурируют два значения рК пропранолола. Согласно Фадки и др. [22] рК—7,5, а по данным Саса и др. [26], рК—9,45. Несмотря на значительное расхождение между этими данными, ясно, однако, что с увеличением рН раствора доля нейтральной формы должна возрастать.

Результаты этих экспериментов, представленные в таблице, показывают, что при рН 5  $\tau$  контрольных БЛМ равно  $190 \pm 40$  мс, а в присутствии пропранолола— $500 \pm 55$  мс. При рН 9 в контроле оно составляет  $360 \pm 35$  мс, а в присутствии пропранолола— $100 \pm 20$  мс. Таким образом, в кислых средах пропранолол увеличивает устойчивость БЛМ в электрическом поле, а в щелочных—уменьшает. Из таблицы видно, что эффект дестабилизирующего действия пропранолола на БЛМ выражен сильнее, поскольку увеличение основности водного раствора  $\tau$  БЛМ увеличивает устойчивость БЛМ. Относительное увеличение  $\tau$  БЛМ в присутствии пропранолола составляет 2,6 раза, в то время как относительное уменьшение—3,6 раза. Если принять, что рК пропранолола 9,45 (это значение представляется нам более реальным, поскольку рК дибукаина—анестетика, близкого по химической структуре к пропранололу,—8,5 [26]), то при рН 5, согласно уравнению Гендерсона-Хассельбаха  $\log_{10} \left( \frac{[AH^+]}{[A]} \right) = pK - pH$ , где  $[AH^+]$  и  $[A]$ —концент-

рация заряженной и нейтральной формы МА соответственно, концентрация заряженной формы в  $10^4$  раза больше концентрации нейтральной формы. При рН 9 концентрации обеих форм пропранолола принимают близкие значения. Из этого сопоставления следует, что уменьшение  $\tau$  БЛМ при рН 9 в присутствии пропранолола связано с увеличением нейтральной формы анестетика. Как было отмечено выше, устойчивость БЛМ в электрическом поле зависит от таких ее параметров, как натяжение ( $\sigma$ ) и электрическая емкость (С). В ряде экспериментов мы измеряли указанные параметры БЛМ (табл.). Как видно

Таблица

Параметры БЛМ при двух значениях рН одного раствора и контроле и в присутствии  $10^{-4}$  М пропранолола

Параметры БЛМ	Контроль		Пропранолол	
	рН5	рН9	рН5	рН9
$\tau$ (мс) $\epsilon = 400$ мВ	190±40	360±35	500±55	100±20
$\sigma$ (дин см)	3.50±0.20	4.36±0.04	4.40±0.30	4.20±0.50
С (мкф/см <sup>2</sup> )	0.490±0.01	0.500±0.02	0.532±0.01	0.545±0.02

из приведенных в таблице данных, натяжение БЛМ в присутствии пропранолола при рН 5 увеличивается в 1,26 раза и не изменяется при рН 9. Наряду с этим, электрическая емкость БЛМ в присутствии пропранолола увеличивается при обоих значениях рН. Данные табл. показывают также, что в отсутствие пропранолола при рН 9 увеличение  $\tau$  БЛМ сопровождается увеличением натяжения. Электрическая емкость БЛМ при этом не изменяется. Таким образом, на основании данных табл. можно заключить, что увеличение  $\tau$  БЛМ при рН 5 в присутствии пропранолола связано с увеличением натяжения и емкости мембран. Однако результаты, полученные при рН 9, указывают на то, что увеличение емкости БЛМ не всегда связано с увеличением их устойчивости, оно может наблюдаться даже при уменьшении устойчивости БЛМ. Этот факт свидетельствует о том, что  $\tau$  БЛМ в электрическом поле является комплексной характеристикой, которая сложным образом зависит от других параметров мембраны.

Изменение устойчивости БЛМ в электрическом поле в присутствии МА является, естественно, результатом взаимодействия молекул МА с молекулами фосфолипидов в бислое.

Как показано в ряде работ [8, 9, 16], молекулы МА, в частности, третичные и четвертичные амины, внедряются в липидный бислой и ориентируются параллельно молекулам липидов, причем ароматическая группа локализуется в области углеводородных хвостов и сильно взаимодействует с ними гидрофобными силами притяжения. Аминная группа молекулы, содержащая положительно заряженный атом азота, вступает в электростатическое взаимодействие с отрицательным зарядом гидрофильной головки молекулы фосфолипида.

Нейтрализация отрицательного заряда на поверхности мембраны катионной формой МА приведет к ослаблению электростатического отталкивания между головками липидных молекул. Этот фактор будет способствовать увеличению устойчивости БЛМ. В том же направлении будет действовать усиление гидрофобного взаимодействия из-за ослабления электростатического отталкивания. Именно этими факторами мы склонны объяснить стабилизирующий эффект МА на структуру БЛМ.

По мере роста концентрации нейтральной формы МА, т. е. при высоких рН, накопление ее в бислой до некоторой критической концентрации приведет к разбалансу между силами электростатического отталкивания и силами гидрофобного притяжения. Это может послужить причиной дестабилизации структуры БЛМ. Последнее рассуждение, однако, не может быть привлечено при объяснении данных, касающихся влияния высоких концентраций дибуканина на БЛМ, поскольку эти эксперименты проводились при значениях рН водного раствора—5,8—6,2, при которых более проникающая нейтральная форма МА [20] присутствует в пренебрежимо малых концентрациях. Одной из возможных причин дестабилизации структуры БЛМ при высоких концентрациях МА может явиться инверсия знака поверхностного заряда БЛМ, обусловленная полной нейтрализацией отрицательного заряда не только на заряженных головках фосфолипидов (фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола), но и цвиттерных фосфолипидов (фосфатидилхолина).

В заключение необходимо рассмотреть еще один аспект взаимодействия молекул МА с липидными молекулами. Речь идет о роли геометрии молекулы в определении устойчивой конформации липидных фаз. Согласно теории, развитой Израэлашвили с соавт. [13], устойчивость липидных фаз определяется как  $i = \frac{V}{a \cdot l}$ , где  $V$ —объем молекулы,  $l$ —ее полная длина,  $a$ —площадь, полярной головки. Устойчивой фазе соответствует условие  $i \geq 1$ ; неустойчивой— $i < 1/3$ . Основываясь на этих представлениях, стабилизацию БЛМ низкими концентрациями МА и наших экспериментах можно объяснить, во-первых, переводом молекул лизоформ липидов (в тех или иных количествах, присутствующих в липидном растворе [25]) в конфигурацию, образующую устойчивую структуру; во-вторых, взаимодействием МА с фосфатидилэтаноламином, который составляет 35% суммарной фракции фосфолипидов мозга [25]. Как показали недавние исследования [16], тетракаин с большим сродством взаимодействует с этим фосфолипидом, стабилизируя переход бислоя от ламеллярной в гексагональную структуру [11]. Считается, что тетракаин в этом случае действует как клин.

Структура молекул дибуканина и пропранолола дает основание считать их форму также клиновидной. Учитывая преимущественное связывание этих МА с молекулами фосфатидилэтанолamina, можно предположить, что стабилизирующий эффект низких концентраций МА на структуру БЛМ связан с изменением геометрии молекул фосфолипидов. По мере роста концентрации МА и постепенного заполнения в мембра-

не «мест» с большим сродством. МА будут взаимодействовать с липидами, формирующими устойчивые фазы (фосфатидилхолин). В результате этого взаимодействия устойчивость фазы уменьшится, что и обусловит дестабилизацию структуры БЛМ.

Мы сознаем, конечно, что сделанные выше предположения, в достаточной степени спекулятивны применительно к бислоям с гетерогенным липидным составом, в которых имеется фазовое разделение [14] и доменная структура [18]. Тем не менее нам кажется, что процессы стабилизации и дестабилизации, которые могут развиваться на границах доменов, не могут не отразиться на устойчивости БЛМ в целом.

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Апакиану И. М. за большой вклад в создание условий для проведения экспериментов, а также Аракеляну В. Б. и Меликяну Г. Б. за полезное обсуждение результатов работы.

Ереванский физический институт ГКНЭ СССР

Поступило 25 X 1984 г.

### ՆԼՔ-Ի ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԳԱՇՏՈՒՄ ՏՆՂԱՅԻՆ ԱՆՆՍՏՆՏԻՎՆԵՐԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՄԸ

Լ. Կ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Զ. Կ. ԿԱՐԱԳՅՏՅԱՆ, Ս. Ա. ԶԱԶՅԱՆ

Ուսումնասիրված է Լրկչերտ լիպիդային թաղանթներին (ՆԼՔ) կյանքի միջին տևողության ( $\psi$ ) կախվածությունը էլեկտրական լարման արժեքից ( $\varphi$ )  $0.01\text{Մ}$  խտությունը տեղային անհետևորկների (ՏԱ)՝ դիբուկայինի և պրոպրանոլիլ առկայության դեպքում: Նրկու ՏԱ-ն էլ մեծացնում են ՆԼՔ-ի  $\tau$  կոնտրոլի համեմատ՝ լարման ուսումնասիրվող  $350-700$  մՎ տիրույթում:

ՆԼՔ-ի  $\tau$  կախվածությունը դիբուկայինի խտությունից  $10^{-7}-10^{-2}$  Մ տիրույթում գանգաձև է և Մ մաքսիմումը զտնվում է  $10^{-5}$  Մ կետում, Յույց է տրված, որ ՏԱ  $10^{-2}$  Մ խտության արժեքի դեպքում մեծացնում են ՆԼՔ-ի  $\tau$ -ի  $350-700$  մՎ տիրույթում:

Պրոպրանոլիլ ( $10^{-4}$  Մ) և Գ-ի ( $100$  մՎ) հաստատուն արժեքների պայմաններում ջրային լուծույթի pH-ի փոփոխումը 5-ից մինչև 9-ը հանդեպնում է ՆԼՔ-ի  $\tau$  արժեքի անկմանը:

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ՏԱ-ի կլինիկականից ցածր կոնցենտրացիաները կայունացնում են, իսկ կլինիկականից բարձրը՝ ապակայունացնում ՆԼՔ-ի կառուցվածքը: ՏԱ-ի կայունացնող էֆեկտը հատկապես պայմանավորված է զրանց լիցքավորված ձևի, իսկ ապակայունացնողը՝ շիզոք ձևի ազդեցությամբ:

Ստացված տվյալները թննարկվում են ՆԼՔ-ի էլեկտրական խզման մեխանիզմի արդի պատկերացումների, ինչպես նաև՝ ՆԼՔ-ի կառուցվածքի վրա ՏԱ-ի ազդեցության էֆեկտիվ ձևի հնարավոր դերի համաձայն:

# STABILITY OF BILAYER LIPID MEMBRANES IN THE ELECTRIC FIELD IN THE PRESENCE OF THE LOCAL ANESTHETICS

L. G. MIKAELYAN, A. C. KARAPETYAN, S. A. ADGYAN

Dependence of mean lifetime ( $\bar{\tau}$ ) of bilayer lipid membranes (BLM) on the potential ( $\varphi$ ) in the presence of two local anesthetics (LA) dibucaine and propranolol of  $10^{-4}$  M has been studied.

Both LA increase  $\bar{\tau}$  of BLM at all values of  $\varphi$  (350—700 mV). Dibucaine is a more effective one.

Dependence of  $\bar{\tau}$  of BLM on the concentration of dibucaine in the range of  $10^{-7}$ — $10^{-2}$  M is of bell shape and has a maximum at  $10^{-5}$  M.

At the constant values of  $\varphi$  (400 mV) and concentration of propranolol, the increase of pH of water solution from 5 to 9 decreases  $\bar{\tau}$  of BLM.

The data on the mechanism of electric breakdown of BLM, as well as on the possible role of effective shape of molecules in stabilizing and destabilizing action of LA on structure of BLM are discussed.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф., Тарасевич М. Р., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 240, 733, 1978.
2. Аракелян В. Б. Автореф. канд. дисс., М., 1980.
3. Крусяков П. М., Булавченко П. И. В сб.: Физико-химия модельных клеточных мембран. Владивосток, 1981.
4. Крусяков П. М., Ровин Ю. Г. В кн.: Физико-химия черных углеводородных пленок. М., 1978.
5. Михаэлян Л. Г., Карапетян А. К., Кургин Е. И. Биолог. ж. Армении, 36, 566, 1983.
6. Хачатрян Г. Р. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1984.
7. Чизмаджев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф., Абидор И. Г. В кн.: ИНИТ, серия Биофизика мембран, 2, М., 1982.
8. Boulanger Y., Schreier S. J.C.P. Smith. Biochemistry, 10, 6824, 1981.
9. Browning J. L., Akutsu H. Biochem. Biophys. Acta, 694, 172, 1982.
10. Butler K. W., Schneider H. J.C.P. Smith. Arch. Biochem. Biophys., 154, 518, 1973.
11. Hornby A. P., Cullis P. R. Biochem. Biophys. Acta., 647, 285, 1981.
12. Franks N. P., Lieb W. R. Nature, 300, 487, 1982.
13. Israelaschvili J. N., Mitchel D. J., Ninham B. W. Biochem. Biophys. Acta., 470, 185, 1977.
14. Jain M. K., Wu M. N., Morgan K. T., Briggs S. M., Murray R. K. Chem. Phys. Lipids, 17, 71, 1976.
15. Kaufman R. D. Anesthesiology, 46, 49, 1977.
16. Kalusky E. C., Smith J. C. P. Biochemistry, 22, 6011, 1983.
17. Lee A. G. Biochem. Biophys. Acta., 448, 34, 1976.
18. McCammon I. A., Deutch J. M. J. Amer. Chem. Soc., 97, 6675, 1975.
19. Ohki S. Biochem. Biophys. Acta., 219, 18, 1970.
20. Ohki S., Graef C., Pant H. Biochem. Biophys. Acta., 643, 495, 1981.
21. Papaflopoulos D., Jacobson K., Poste G., Shepherd G. Biochem. Biophys. Acta., 394, 504, 1975.
22. Phudke R. S., Kumar N. V., Hosur R. V., Kulkarni V. M., Saran A. Proc. Symp. on Steric Effects in Biomolecules, Eger Hungary, 1981.
23. Ritchie J. M., Ritchie B. R. Science, 162, 1394, 1968.
24. Rosenberg P. M. In: Molecular Mechanisms of Anesthesia (Progress in Anesthesiology, 2), 325, Raven Press, 1980.
25. Rouzer G., Nelson G., Fetscher S., Simon G. In: Biological Membranes, ed. Chapman D., Acad. Press, 1968.

25. Sasa M., Avner B. P., Albuquerque E. X. Eur. J. Pharmacol., 23, 97, 1973.  
27. Seeman P. Pharmacol. Rev., 24, 583, 1972.  
28. Strichartz G. Anesthesiology, 45, 421, 1976.  
29. Surewicz W. K., Leyko W. Biochem Biophys. Acta., 643, 387, 1981.

1.

«Биолог. ж. Армении», т XXXVIII, № 1, 1982

УДК 577.156

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНАМИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

К. Л. ЕРЗИНҚЯН

Методами микрокалориметрии и УФ-дифференциальной спектроскопии изучено влияние гликозаминогликанов (гепарина, хондроитинсульфата, гиалуроновой кислоты) протеолитическую активность трипсина при pH среды 8,0. Установлено их ингибирующее действие на протеолитическую активность трипсина, являющееся следствием усиления в щелочной среде необратимой инактивации трипсина в присутствии гликозаминогликанов. Показано, что этот процесс связан со способностью гликозаминогликанов вызывать денатурационные изменения в молекуле фермента.

*Ключевые слова:* трипсин, гепарин, хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота.

Согласно современным представлениям, процесс язвообразования в желудке и двенадцатиперстной кишке обусловлен нарушенном равновесии между агрессивными свойствами желудочного сока, дуоденального содержимого и резистентностью гастродуоденальной стенки.

К агрессивным факторам воздействия на слизистую гастродуоденальной стенки относятся соляная кислота, секретлируемая обкладочными клетками желудка, протеолитические ферменты желудочного сока и дуоденального содержимого [1]. Патогенное действие протеолитических ферментов дуоденального содержимого связано с «дуоденальным рефлексом», представляющим собой обратный заброс дуоденального содержимого в антральную область желудка, что приводит к подщелачиванию среды и активации протеолиза слизистой [1, 7]. В то же время в обеспечении резистентности гастродуоденальной стенки участвуют входящие в состав ее слизистой гликозаминогликаны (хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота и другие гепариноподобные вещества) [10].

Нами с целью выяснения природы защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоденальной стенки изучено их влияние с трипсином.

*Материал и методика.* Использовались препараты трипсина и гепарина («Спофла», Чехословакия), хондроитинсульфата («Сервис», ФРГ), гиалуроновой кислоты, диметилата натрия («Реалхим», СССР).

Ацелированный трипсин получали по методу Френкель-Конрата с соэпт. [8]: препарат обрабатывали в полунасыщенном растворе ацетата натрия уксусным ангидридом (1,2 мл ангидрида на 1 г белка), подвергали диализу в течение 24 ч при 5° против дистиллированной воды, лиофилизировали, процедуру ацелирования повторяли. Степень ацелирования препарата составляла 76,4%.

Растворы гликозаминогликанов и казеината натрия приготавливали в 0,05 М трис-НСI буфере, рН 8,0, а раствор трипсина—для предотвращения автолиза—в 0,0025 М НСI. Концентрацию трипсина в растворе рассчитывали по величине оптической плотности на 280 нм с использованиет коэффициента пересчета 0,585.

Микрокалориметрические измерения выполняли на приборе 2107-020 фирмы ЛКБ с использованиет проточной ячейки. Скорость прокачки реакционной смеси в ячейку микрокалориметра составляла  $4,17 \cdot 10^{-6}$  л/сек. Рабочая температура была равна 25°.

Инкубационный раствор приготавлиали смещением 0,5%-ного раствора трипсина с раствором гликозаминогликана в объемном соотношении 1:19. Реакционную смесь получали путем добавления инкубированной в течение определенного времени смеси трипсин-гликозаминогликан к 2% раствору казеината натрия. Объемное отношение реагентов в растворе составляло 1:50. Тепловой эффект реакции регистрировали относительно базовой линии, полученной при прокачке раствора казеината натрия.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе «Спекторд М 40» в термостатированных при 25° 1-сантиметровых кварцевых кюветках.

*Результаты и обсуждение.* Возможность применения метода проточной микрокалориметрии для изучения ферментативных реакций подробно обсуждена в работе Бизера и Тиррела [6]. Как показано авторами, для реализуемого в наших экспериментах случая насыщения фермента субстратом наблюдается прямо пропорциональная зависимость тепловой мощности реакции от активности фермента.

Изменение исходной активности фермента в зависимости от времени инкубации с гликозаминогликанами графически может быть представлено в виде прямых в координатах  $(C_0/C_t) - t$ , где  $C_0$ —величина, определяемая путем экстраполяции прямой автолиза к моменту времени  $t=0$ .

На рис. 1 представлены кинетические прямые инактивации трипсина в присутствии различных концентраций гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина. Из наклона прямых были определены константы скорости автолиза фермента, что позволило построить зависимости скорости инактивации трипсина от содержания гликозаминогликанов в инкубационной смеси (рис. 2).

Как видно из рис. 2, для гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина зависимости имеют экстремальный характер, причем в точке экстремума скорость автолиза трипсина в присутствии гликозаминогликанов значительно превышает скорость инактивации трипсина в растворе, не содержащем их.

С целью выявления природы взаимодействия трипсина с гликозаминогликанами было проведено сравнительное изучение их влияния на протеолитическую активность трипсина и ацелитрипсина, получены дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина—гликозаминогликан относительно составляющих их компонентов.

Ацелирование трипсина делает его устойчивым к самоперевариванию в слабощелочной среде, рН 8,0, что согласуется с литературными

данными [3]. Добавление в раствор гликозаминогликана также не приводит к инактивации ацетилтрипсина.

Дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина-гепарина, трипсина-хондроитинсульфат и трипсина-гиалуроновая кислота (время

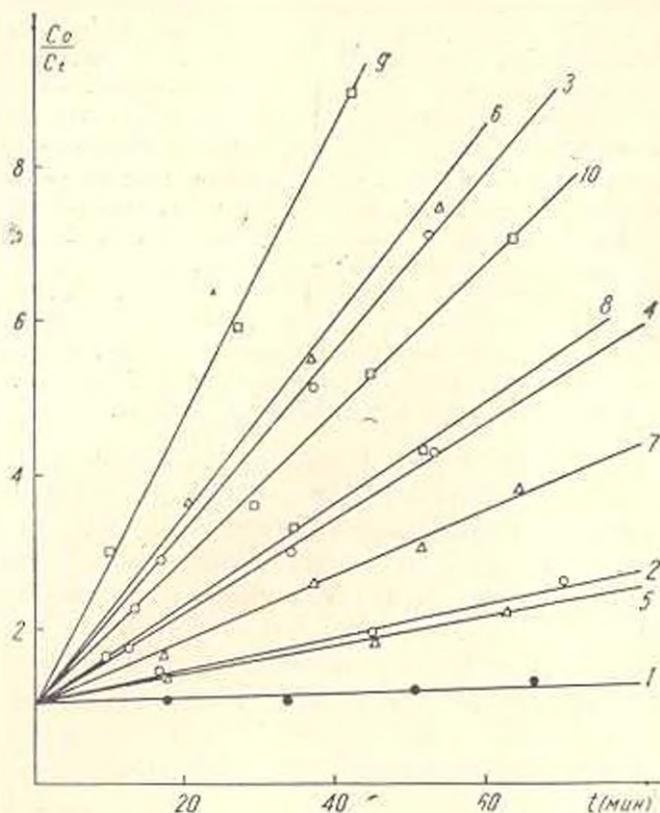


Рис. 1. Кинетика инактивации лативного трипсина (1) и трипсина в присутствии различных концентраций (мг/мл) гивлуконовой кислоты— $9,5 \cdot 10^{-4}$  (2);  $9,5 \cdot 10^{-3}$  (3);  $2,85 \cdot 10^{-2}$  (4); хондроитинсульфата —  $1,9 \cdot 10^{-3}$  (5);  $4,75 \cdot 10^{-2}$  (6);  $3,8 \cdot 10^{-1}$  (7); гепарина— $9,5 \cdot 10^{-3}$  (8);  $4,75 \cdot 10^{-2}$  (9);  $3,16 \cdot 10^{-1}$  (10).

инкубации 10 мин) относительно составляющих их компонентов указывают на изменение в поглощении остатков ароматических аминокислот трипсина при его взаимодействии с гликозаминогликанами (рис. 3). В наибольшей степени эти изменения выражены для комплекса трипсина—гепарина.

Экстремальный характер зависимостей констант скоростей инактивации трипсина от концентрации гликозаминогликанов можно объяснить изменением эффективной концентрации фермента вблизи полимерной цепи [1]. С повышением концентрации гликозаминогликанов в растворе локальная концентрация трипсина в области молекул поликислоты возрастает (усиление автолиза), достигая максимума при насыщении молекул поликислоты. При дальнейшем увеличении концентрации гликозаминогликана происходит нераспределение молекул фер-

мента между молекулами поликислоты и уменьшение локальной концентрации трипсина.

В рассматриваемой области физиологических значений pH 8,0 количество положительно заряженных групп в молекулах фермента преобладает над отрицательно заряженными группами (изоэлектрическая точка трипсина 10,5) и вследствие этого они в целом заряжены положи-

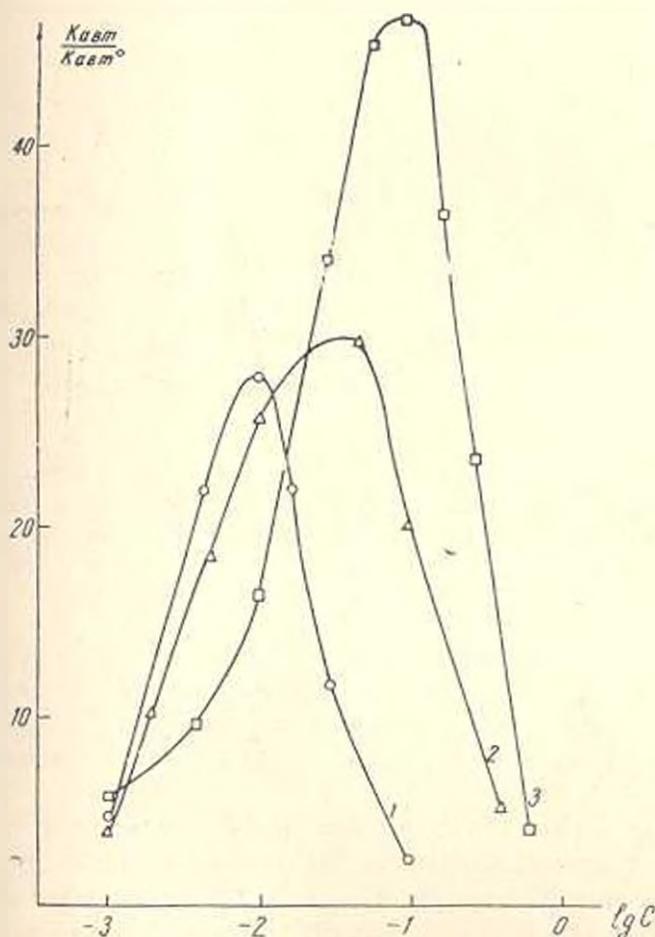


Рис. 2. Зависимость относительной константы автолиза трипсина от логарифма концентрации гликозаминогликанов (мг/мл): гиалуроновая кислота (1), хондроитинсульфат (2), гепарин (3).

тельно. В этих же условиях полимерные цепи гликозаминогликанов полностью ионизированы и несут отрицательный заряд ввиду значительного содержания ионизируемых групп (карбоксильные группы гиалуроновой кислоты, сульфо-, карбоксильные группы гепарина и хондроитинсульфата). Последние вступают в электростатическое взаимодействие с положительно заряженными аминогруппами трипсина.

Участие ε-аминогрупп фермента в электростатическом связывании подтверждается полученными данными об отсутствии инактивирующего действия гликозаминогликанов на ацетилтрипсин, у которого эти группы заблокированы.

Связывание трипсина гликозаминогликанами сопровождается разрушением гидрофобной оболочки фермента. Молекула трипсина содержит большое количество остатков с гидрофобными боковыми цепями, играющими важную роль в поддержании его нативной структуры [11]. При комплексообразовании фермента с гликозаминогликанами часть аминокислотных остатков тирозина и триптофана, локализован-

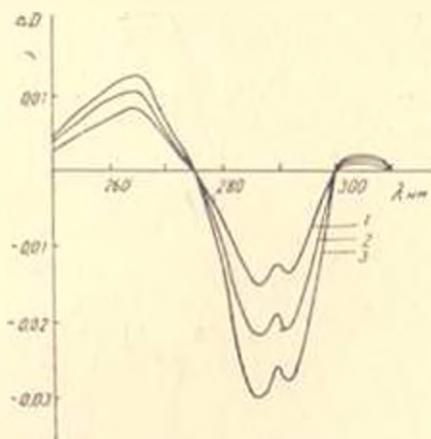


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина—гиалуроновая кислота (1), трипсина—хондроитинсульфат (2), трипсина—гепарин (3) относительно составляющих их компонентов. Концентрации трипсина в растворе 0,25 мг/мл, гиалуроновой кислоты—0,1 мг/мл; хондроитинсульфата—0,075 мг/мл; гепарина—0,015 мг/мл.

ных внутри гидрофобного ядра белка, переходит в область доступного растворителю (из среды с более высоким показателем преломления в среду с более низким показателем преломления), что должно обуславливать наблюдаемый на дифференциальных спектрах «голубой сдвиг» [9].

В пользу вывода о конформационных перестройках в молекуле трипсина под действием гликозаминогликанов свидетельствует дифференциальный спектр денатурированного в 8 М мочеvine трипсина относительно нативного трипсина, который, согласно литературным данным [2], имеет аналогичный «голубой сдвиг».

Процесс автолиза трипсина можно рассматривать как расщепление нативным ферментом своей частично денатурированной формы [1]. Это позволяет предположить, что усиление процесса самопереваривания трипсина под действием гликозаминогликанов связано с их способностью вызывать денатурационные изменения в молекуле фермента.

Предложенный механизм усиления необратимой инактивации трипсина под действием гликозаминогликанов хорошо согласуется с экспериментальными данными. Гепарин вызывает наибольшие денатурационные изменения в молекуле трипсина и обладает способностью максимально увеличивать скорость инактивации фермента.

В заключение следует отметить, что одним из механизмов защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоде-

пальной стенки может являться их способность усиливать процесс самопереваривания трипсина.

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений.

Купавна, Московская область

Поступило 15.VIII 1984 г.

ՏՐԻՊՏԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԳԼԻԿՈՉԱՄԻՆԳԼԻԿԱՆՆԵՐԻ ԽՆՆԻՐՏՈՐԿԱՆ ԱՉԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԿԱՆԻԶՄԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Կ. Լ. ԵՐԶԿՅԱՆ

Միկրոկալորիմետրիկ և ուլտրամանուշակագույն (ՈՒՄ)-դիֆերենցիալ մեթոդով ուսումնասիրվել է գլիկոզամինգլիկանների (հեպարինի, խոնդրոիտին-սուլֆատի, հիալուրոնաթթվի) ազդեցությունը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա pH 8,0 միջավայրում: Որոշված է նրանց ինհիբիտորային ազդեցությունը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա, որը գլիկոզամինգլիկանների ներկայությամբ տրիպսինի անդառնալի ինակտիվության ուժեղացման հետևանք է ակալային միջավայրում: Ցույց է տրված, որ այդ պրոցեսը կախված է գլիկոզամինգլիկանների կարողությունից՝ կատարելու անդառնալի փոփոխություններ տրիպսինի մոլեկուլում:

## INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF GLYCOSEAMINOGLICANES INHIBITORY INFLUENCE ON THE TRIPSINE PROTEOLYTIC ACTIVITY

K. L. ERZINKYAN

The influence of glycoseaminoglicanes (heparine, chondroitinesulphate, hialuronic acid) on the tripsine proteolytic activity in pH 8,0 medium has been investigated by microcalorimetric and ultraviolet (UV) differential method. Their inhibitory influence on the tripsine proteolytic activity has been revealed, which in case of the glycoseaminoglicanes presence is the result of tripsine inactivation strengthening in alkaline medium. This process depends on the glycoseaminoglicanes ability of making changes in tripsine molecule.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Миргородская О. А., Иванова Г. И., Пахарин Е. Ф., Москвичев В. В. Биорганическая химия, 2, 1695, 1976
2. Мосолов В. В. Биохимия, 30, 3, 597, 1966
3. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты, 72, М., 1971
4. Смотров И. А., Полубоков В. А. Актуальные вопросы гастроэнтерологии, 2, 9, 110, 1976.
5. Хомутоцкий О. А., Дестярева И. И. Ультраструктура слизистой желудка при язвенной болезни, 278, Киев, 1978.
6. Beezer A. E., Lyrell J. H. V. Sci Tools, 19, 13, 1972.
7. Blak R. B., Roberts G., Rhodes I. Yut, 12, 552, 1971
8. Jrankel—Caurat N., Bean R. S. et al. J. Biol. Chem., 177, 385, 1949.
9. Herskovits T. Method in Enzymology, 11, 748, 1967.
10. Sekino T., Nurata K., Saito Y. et al. Digestiku, 16, 1—7, 28, 1977.
11. Smittle L. B., Farke A. et. et. Nature, 218, 343, 1968.

УДК 577.352.26

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СЛИЯНИЕ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН\*

Г. Б. МЕЛИКЯН

Исследованы молекулярные механизмы взаимодействия и слияния бислойных липидных мембран. Показано, что при их взаимодействии имеет место следующая последовательность событий: монослойное слияние, полное слияние и деление мембран. Изучены молекулярные механизмы монослойного слияния, а также электростимулируемого и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемого слияния, которые приводят к позднековению мембранной трубки. Выявлены причины дестабилизации такой трубки и деления ее на два бислоя.

*Ключевые слова:* бислойные липидные мембраны, триламнарная структура, деление мембранной трубки.

Слияние биологических мембран является одной из необходимых стадий многих физиологических процессов, таких, как экзоцитоз, оплодотворение, биогенез мышечных волокон и т. п. С другой стороны, разработка методов направленного слияния клеток *in vitro* с целью получения соматических гибридов и, в частности, гибридом, имеет важное значение для генной инженерии и биотехнологии.

Несмотря на значительное количество работ [14], посвященных изучению слияния мембран, механизм этого явления остается невыясненным. Однако имеются многочисленные данные, указывающие на то, что структурные перестройки, приводящие к слиянию, в значительной мере обусловлены взаимодействием липидных матриц биологических мембран [13, 14]. В связи с этим для изучения слияния мембран в последние годы широко применяются различные модельные системы — липидные бислои, липосомы и т. д. Особенно интересна, на наш взгляд, модельная система двух бислойных липидных мембран (БЛМ), предложенная Либерманом и Ненашевым [2], которая позволяет исследовать единичные акты слияния бислоев. В настоящей работе приводятся данные, полученные при исследовании взаимодействия двух БЛМ, и обсуждаются молекулярные механизмы различных стадий их взаимодействия.

*Материал и методика.* Для формирования БЛМ использовали следующие липиды: азолектин—Аз (Ассошиэйтед Коунс), фосфатидилэтаноламин—ФЭА (Кох-Лайт), янчий фосфатидилхолин—ФХ, кардиолипин—КЛ (Харьковский завод бактериальных препаратов), а также лизофосфатидилхолин—ЛФХ (Сигма), диолеилфосфатидилхолин—ДОФХ, холестерин (Серва). В качестве растворителей липидов использовали н-декан (хч) и сквален (Мерк, 97% чистоты). Сквален дополнительно очищали от полярных примесей при помощи окиси алюминия (Хемалол). Эксперименты проводили в 0,01—1 М растворах КС1 (осч) при 30°.

\* Основные результаты работы получены в лаборатории биоэлектрохимии Института электрохимии АН СССР.

Конструкция трехкамерной измерительной ячейки и принцип визуального контроля за взаимодействием БЛМ подробно описаны [4, 11].

В основу получения не содержащих растворителя БЛМ была положена идея Уайта [16]: использовать с этой целью растворы липидов в сквалене. Такой подход позволяет нам впервые получить мембраны без растворителя из различных фосфолипидов [7].

Установка для измерения сопротивления, емкости, разности граничных потенциалов, натяжения и других параметров БЛМ, а также для исследования основных стадий слияния мембран описана ранее [7, 8, 11].

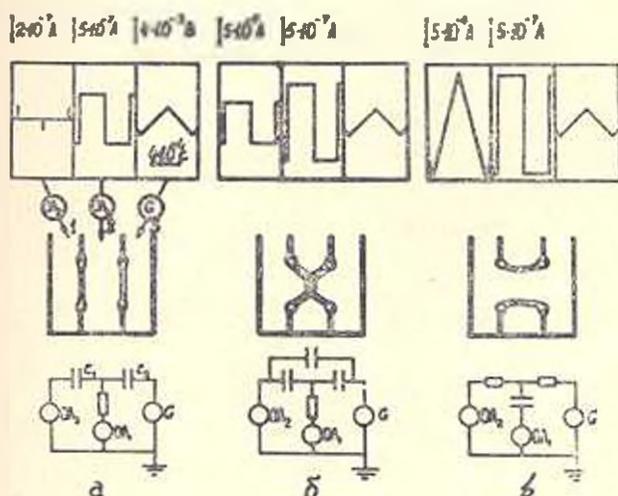


Рис. 1. Принцип емкостного контроля за взаимодействием БЛМ. а—плоские БЛМ, не приведенные в контакт, б—триламнарная структура, в—мембранная трубка. В верхней части рисунка показаны осциллограммы сигналов, регистрируемые на выходе операционных усилителей  $ОА_1$  и  $ОА_2$  и генератора линейной развертки напряжения  $G$ , подключенных к хлор-серебряным электродам 2, 1 и 3 соответственно. В нижней части рисунка приведены эквивалентные схемы соответствующих состояний системы, поясняющие характерную форму емкостных сигналов на выходе  $ОА_1$  и  $ОА_2$ .

Примененный нами емкостный метод контроля за взаимодействием БЛМ [5, 11, 12] позволяет четко различать стадии слияния мембран (рис. 1). Как видно из рисунка, осциллограммы токов на выходе операционного усилителя  $ОА_2$  для различных состояний системы качественно отличаются.

**Результаты и обсуждение.** При взаимодействии мембран из различных липидов и их смесей, содержащих или не содержащих органический растворитель, наблюдается следующая последовательность событий. После сближения БЛМ посредством выдавливания их до полусферической формы между ними устанавливается плоскопараллельный контакт (рис. 2б) [9]. Через некоторый промежуток времени, зависящий от ионной силы и состава фонового электролита [7, 11], заряд бислоев и содержания в них растворителя, происходит монослойное слияние БЛМ и образование триламнарной структуры (ТС), изображенной на рис. 2 в. При этом в области контакта двух мембран формируется одиночный бислой (контактный бислой), имеющий совпадающее с обычной БЛМ значение удельной емкости [5].

Триламнарная структура стабильна, но при определенных условиях может быть осуществлен переход системы в мембранную трубку

(рис. 2 г), т. е. полное слияние БЛМ. При повышении гидростатического давления снаружи мембранной трубки происходит коллапс трубки, приводящий к делению ее на две мембраны. Система снова возвращается в исходное состояние (рис. 2 а). Таким образом, в системе двух

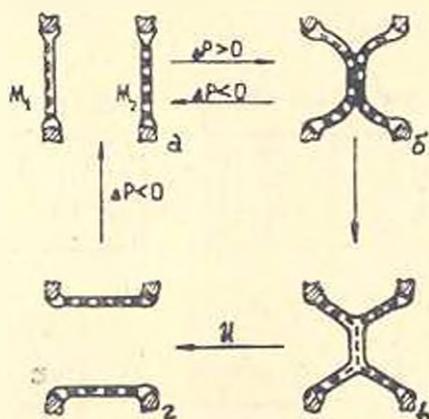


Рис. 2 Цикл слияние—деление БЛМ. а—две мембраны до приведения в контакт. б—плоскопараллельный контакт БЛМ, в—триламнарная структура, г—мембранная трубка, образованная в результате полного слияния мембран.  $\Delta P$ —трансмембранная разность гидростатических давлений,  $U$ —разность потенциалов на мембране.

БЛМ реализуется цикл—монослойное слияние, полное слияние, деление мембран,—который можно повторять многократно на одной паре мембран.

*Исследование механизма монослойного слияния.* Ранее было установлено [9], что образование триламнарной структуры в случае с бислоями, содержащими растворитель, инициируется при контакте микродлизов взаимодействующих БЛМ и, следовательно, не может служить моделью для изучения монослойного слияния биологических мембран. Поэтому мы исследовали механизм возникновения ТС при взаимодействии бислоев, не содержащих органического растворителя. Нам была обнаружена сильная зависимость средних времен ожидания монослойного слияния  $t_{MF}$  (т. е. промежутка времени с момента образования плоскопараллельного контакта до инициации ТС) от липидного состава БЛМ.

Согласно сталкерной гипотезе монослойного слияния Маркина и Козлова [1], на контактирующих монослоях образуются локальные дефекты—«вспучивания»,—замыкание которых друг на друга даст начало перемычке—сталке между двумя бислоями (рис. 3). Очевидно, что при образовании сталка монослой сильно изгибается и должен обладать упругой энергией, зависящей от эффективной формы липидных молекул, составляющих бислой [1, 6]. Для молекул, имеющих цилиндрическую форму (площадь полярной головки в плане равна площади гидрофобной части молекулы), например, для ФХ, «ненапряженной» является плоская форма монослоя и бислоя. Молекулы, имеющие форму прямого (ЛФХ) или обратного конуса (ненасыщенный ФЭА), умень-

ашают энергию образования дефектов типа гидрофильных пор в бислое (ЛФХ) или типа «вспучиваний» (ФЭА). Очевидно, что эти структурные перестройки предполагают изгиб монослоя в противоположных направлениях, следовательно, энергия таких дефектов должна противо-

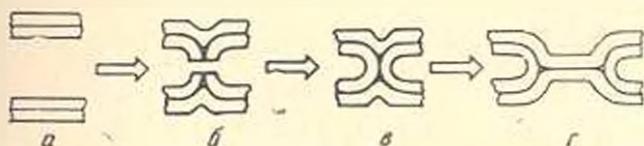


Рис. 3. Сталкерный механизм формирования триламнарной структуры. Показан процесс возникновения на контактирующих монослоях «вспучиваний», замыкание которых друг на друга дает начало триламнарной структуре.

положным образом зависеть от формы липидных молекул. Эта идея была положена в основу проверки сталкерного механизма монослойного слияния с использованием двух независимых экспериментальных подходов [6].

Из теории следует липидная зависимость времени ожидания монослойного слияния от эффективной формы липидных молекул: в данном случае для изменения эффективной кривизны молекул бислоя из ФЭА мы вводили в раствор ЛФХ, который внедрялся в состав БЛМ.

$$\lg t_{MF} = B + 6,15 \frac{\xi}{kT} C_0 \quad (1)$$

где  $B$  — объединяет все сомножители, не зависящие от объемной концентрации ЛФХ  $C_0$ ;  $\xi$  — параметр, характеризующий эффективную форму липидных молекул;  $k$  — постоянная Больцмана;  $T$  — абсолютная температура. Полученные экспериментальные значения  $t_{MF}$  при различных  $C_0$  ложатся на прямую (рис. 4).

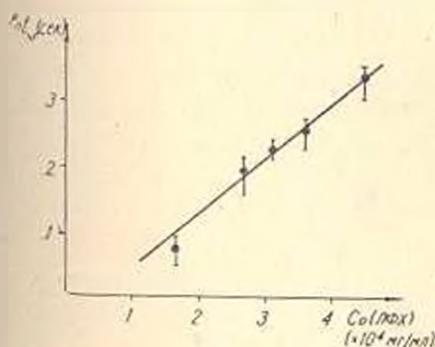


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость времени ожидания монослойного слияния БЛМ от концентрации ЛФХ в растворе. Мембраны из раствора ФЭА в сквалене, 0,1 М раствор KCl. Сплошная кривая получена теоретически.

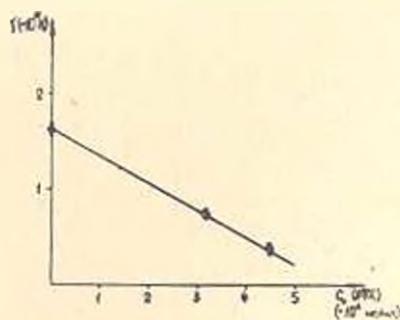


Рис. 5.

Рис. 5. Линейное натяжение пор  $\gamma$  в присутствии различных концентраций ЛФХ. Точки на рисунке получены из экспериментальных зависимостей  $|\lg I_1| (U)$ . БЛМ из ФЭА в сквалене, 0,1 М KCl.

Известно, с другой стороны, что наложение электрического поля на мембраны способствует образованию в них гидрофильных пор, приво-

лящих к электрическому пробое БЛМ. Параметром, характеризующим энергию образования такой пары, является ее линейное напряжение  $\gamma$ , которое можно определить из экспериментальных зависимостей среднего времени жизни БЛМ  $t_g$  от амплитуды наложенного на нее напряжения  $U$  [6].

Зависимость  $\gamma$  от эффективной формы липидов выражается в виде:

$$\gamma = D - \frac{2\pi}{h} \xi C_0, \quad (2)$$

где  $D$ —объединяет все параметры, не зависящие от объемной концентрации ЛФХ  $C_0$ ;  $h$ —толщина монослоя. Сравнение этого уравнения с уравнением (1) выявляет одинаковую комбинацию параметров  $\xi$  в них. Экспериментальная зависимость  $\gamma$  от  $C_0$ , согласно теоретическому выражению (2), линейна (рис. 5). Из наклона прямой  $\gamma(C_0)$  можно определить  $\xi$  и, подставив его в выражение (1), получить теоретическую зависимость  $\lg t_{\text{жизни}}(C_0)$ , которая представляется в виде прямой. Как видно из рис. 4, экспериментальные точки хорошо ложатся на теоретическую прямую. Поскольку теория не имеет ни одного свободного параметра [6], совпадение наклонов экспериментальной и теоретической зависимостей  $\lg t_{\text{жизни}}(C_0)$  доказывает, что при монослойном слиянии двух БЛМ реализуется стокерский механизм.

*Полное слияние БЛМ.* Поскольку спонтанный переход ТС в мембранную трубку—событие достаточно редкое, для реализации полного слияния необходимы специальные условия. Так, слияния можно добиться наложением на ТС напряжения, вызывающего разрушение контактного бислоя и образование мембранной трубки. На рис. 6 показана

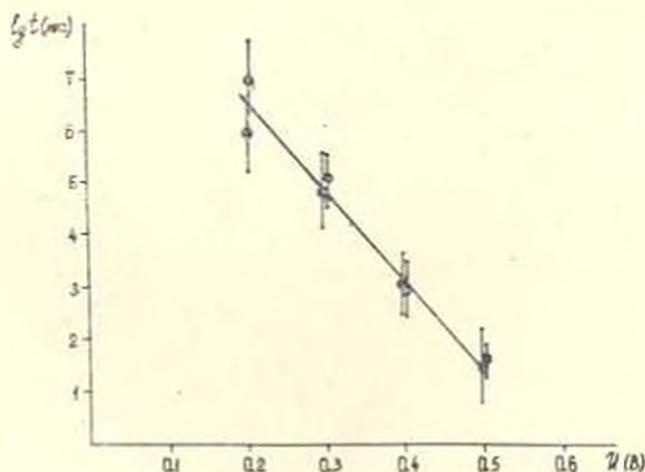


Рис. 6 Зависимости от напряжения среднего времени жизни обычной БЛМ ( $\circ$ ) и средней длительности импульса, необходимого для индукции полного слияния двух мембран ( $\bullet$ ); площади БЛМ в области контакта одинаковы и составляют  $\sim 1,7 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$ . БЛМ из смеси ДОФХ/холестерин (9/1 по весу), 0,1 М раствор KCl. Каждая точка на графике соответствует среднему из десяти измерений.

на зависимость промежутка времени с момента наложения на контактный бислой прямоугольного импульса напряжения до образования трубки от амплитуды импульса (черные точки). Эта кривая совпадает во всем исследованном диапазоне с зависимостью времени жизни обычной мембраны от напряжения (белые точки). Следовательно, в основе электростимулируемого слияния лежит необратимый электрический пробой контактного бислоя, т. е. образование в нем гидрофильной поры надкритического радиуса [11].

Нами обнаружено и исследовано также явление полного слияния кардиолипидсодержащих скваленовых БЛМ в присутствии между ними ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\sim 1$  мМ). Отметим, что  $\text{Ca}^{2+}$ , введенный лишь в среднее отделение ячейки, не может модифицировать и дестабилизировать контактный бислой, сформированный из внешних монослоев двух БЛМ [3, 5, 12]. Результаты экспериментов, в которых мембранную трубку получали при введении  $\text{Ca}^{2+}$  после монослойного слияния, позволяют предположить, что этот катион дестабилизирует участок соединения трех бислоев и ТС, т. е. периметр контактного бислоя (рис. 2 в) [5].

Необходимо подчеркнуть, что как при электростимулируемом, так и при  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемом слиянии образование ТС обязательно предшествует слиянию. Так, наложение электрического поля на БЛМ до монослойного слияния приводит к их разрушению, но не вызывает слияния. Таким образом, формирование одного бислоя в области контакта двух БЛМ является необходимой стадией взаимодействия мембран, предшествующей слиянию.

*Исследование устойчивости мембранной трубки.* Деление мембранной трубки носит пороговый характер: при увеличении гидростатического давления снаружи трубки происходит своеобразный коллапс, приводящий к делению трубки на две БЛМ [4]. Теоретическое и экспериментальное исследование устойчивости мембранной трубки показало, что в основе коллапса лежит потеря устойчивости трубки при определенном соотношении параметров системы: длины трубки  $L$ , радиуса ее основания  $R$ , трансмембранной разности гидростатических давлений  $\Delta P$  и натяжения БЛМ  $\sigma$ . Дело в том, что не любым значениям названных параметров соответствует равновесная форма трубки, отвечающая минимуму свободной энергии [4].

Теоретические расчеты, произведенные Козловым [4], подтверждаются экспериментами и дают следующую зависимость критического давления, вызывающего коллапс, от параметров системы:

$$\Delta P^* = \frac{2,2\sigma}{R} \left( 1 - 0,754 \frac{L}{R} \right). \quad (3)$$

Как следует из теории, при  $\Delta P^* = 0$  трубка делится при  $L/R = 1,325$ . Анализ выражения (3) показывает, что из наклона зависимостей  $\Delta P^*(L)$  можно определить натяжение БЛМ  $\sigma$ .

Система двух контактирующих БЛМ представляет собой упрощенную модель взаимодействия биологических мембран. Основные закономерности взаимодействия и слияния бислоев, обнаруженные нами,

наблюдаются, однако, и на биологических объектах. Так, экспериментально доказанный нами вывод о том, что слиянию бислоев обязательно предшествует образование ТС, подтверждается электронномикроскопическими данными, полученными, например, при слиянии секреторной везикулы с плазмалеммой [13, 14].

Условия реализации описанного выше  $Ca^{2+}$ -индуцируемого слияния БЛМ, не содержащих растворителя, близки к условиям слияния мнобластов в культуре и *in vivo* [15]. В обоих случаях необходимо присутствие миллимолярных концентраций этого иона только между контактирующими мембранами. Необходимо подчеркнуть, что слияние БЛМ, подобно биологическим мембранам, может иметь  $Ca^{2+}$ -специфичность.

В последние годы успешно осуществлено электростимулируемое слияние животных и растительных клеток [17]. Авторы метода полагают, что в его основе лежит электрический пробой клеточных мембран в области контакта. Однако в этой системе не удается определить величины потенциалов, падающих на мембранах клеток, и идентифицировать промежуточные стадии слияния. Исследование электростимулируемого слияния БЛМ позволило строго доказать, что механизм такого явления предполагает образование гидрофильной коры надкритического радиуса в контактном бислое после формирования ТС. Иными словами, полное слияние вызвано необратимым электрическим пробоем одиночного бислоя в области контакта.

Обращает на себя внимание также сходство эндоцитоза и деления клеток с описанным выше коллапсом мембранной трубки. Можно предположить, что эти процессы протекают по сходному механизму. Особенно наглядно это проявляется при получении мембранного пузырька в patch-clamp методе Неера и соавт. [10].

Изложенный материал позволяет предположить, что молекулярные механизмы взаимодействия и слияния липидных бислоев, изученные нами в системе БЛМ—БЛМ, реализуются также при структурных перестройках биологических мембран, приводящих к слиянию.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР,

Поступило 25.X 1984 г.

## ԵՐԿՇԵՐՏ ԻՌՊԻԿԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՄԻԱԶՈՒՈՒՄԸ

Գ. Բ. ՄԵԼԻՔՅԱՆ

Հետազոտված են երկչերտ լիպիդային մեմբրանների (ԵԼՄ-ների) փոխազդեցությունը և միաձուլումը: Յույց է տրված, որ ԵԼՄ-ների փոխազդեցության ղեկավարում դիտվում է երևույթների հետևյալ հաջորդականությունը՝ միաչերտ միաձուլում, լիովին միաձուլում և մեմբրանների բաժանում: Միաչերտ միաձուլման հիմքում ընկած է լուկալ ղեֆեկտների առաջացումը հարակից միաչերտների մեջ, որոնք սկիզբ են տալիս ելամինար կոռուցվածքին (մեկ երկչերտ մեմբրան ԵԼՄ-ների հարակցման տիրույթում): Ուսումնասիրված է նաև մեմբրանային խողովակ առաջացնող էլեկտրախթանվող և  $Ca^{2+}$ -խթանվող միաձուլումների մեխանիզմը: Պարզաբանված են այս խողովակի անկայունացման և երկու ԵԼՄ-ների բաժանման պատճառները:

# INTERACTION AND FUSION OF BILAYER LIPID MEMBRANES

G. B. MELIKYAN

The interaction and fusion of bilayer lipid membranes (BLM) have been studied. The interaction of BLM passes through 3 stages: monolayer fusion, complete fusion and fission of membranes. The structural rearrangement underlying the monolayer fusion involves the formation of a trilaminar structure (single bilayer formation in the BLM contact region) as a result of local defects in the interacting monolayers. Complete fusion gives rise to the membranous tube formation. The electrostimulated and  $Ca^{2+}$ -induced fusion mechanism and the reasons of membrane tube destabilization have been investigated.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Козлов М. М., Маркин В. С. Биофизика, 28, 242—247, 1983.
2. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 13, 193—196, 1968.
3. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 17, 1017—1023, 1972.
4. Меликян Г. Б., Козлов М. М., Черномордик Л. В., Маркин В. С. Докл. АН СССР, 274, 4, 1984.
5. Меликян Г. Б., Черномордик Л. В., Абидор И. Г., Чайлакян Л. М., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 269, 1221—1225, 1983.
6. Черномордик Л. В., Козлов М. М., Меликян Г. Б., Абидор И. Г., Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Биологические мембраны, 1, 411—427, 1981.
7. Chernomordik L. V., Melikyan G. B., Dubrovina N. I., Abidor I. G., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem. and Bioenerg., 12, 155—166, 1984.
8. Cherny V. V., Sokolov V. S., Abidor I. G. Bioelectrochem. and Bioenerg., 7, 413—420, 1980.
9. Frenkel'sky G. N., Gyulkhandanyan M. Z. Stud. Biophys., 26, 19—20, 1976.
10. Jamil O. P., Morty A., Neher E., Salmann B., Sigworth F. J. Hügler Arch., 391, 85—100, 1981.
11. Melikyan G. B., Abidor I. G., Chernomordik L. V., Chaikakhyan L. M. Biochim. et Biophys. Acta, 730, 395—398, 1983.
12. Neher E. Biochim. et Biophys. Acta, 373, 328—336, 1974.
13. Pinto da Silva P., Nogueira M. L. J. Cell Biol., 692, 171—175, 1977.
14. Poste G., Nikolov G. L. (eds.) Membrane Fusion Amsterdam: Elsevier—North-Holland Biomedical Press, 835, 1978.
15. Schadt C., Fette D. FEBS Lett., 59, 36—38, 1975.
16. White S. H. Biophys. J., 23, 337—347, 1978.
17. Zimmermann U. Biochim. et Biophys. Acta, 694, 227—271, 1982.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.352.36

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ИОНОФОРМИ $K^+ - H^+$ ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ

А. В. ГЮЛЬХАНДЯНИ

Исследовано влияние мембранного потенциала эритроцитов крысы на скорость выхода  $K^+$  и входа  $H^+$ . Показано, что при индуцировании вытока  $K^+$  валиномицином скорости  $K^+ - H^+$  обмена повышаются при увеличении мембранного потенциала в сторону положительных значений. В случае вызванного  $Ca^{2+}$ -ионофором A23187 пере-

распределения ионов наблюдается немонотонная зависимость скоростей от мембранного потенциала.

*Ключевые слова:* эритроциты, мембранный потенциал, валиномицин,  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофор A23187,  $\text{K}^+$ — $\text{H}^+$  обмен

Известно, что концентрация  $\text{K}^+$  в эритроцитах большинства млекопитающих намного выше, чем  $\text{K}^+$  во внеклеточной среде [1, 4]. Наряду с системой активного переноса, обменивающей ионы натрия из клетки на ионы калия [6, 7], должна существовать также пассивная утечка  $\text{K}^+$  из эритроцитов по градиенту концентрации. Поскольку на мембране эритроцитов существует мембранный потенциал [5], определяемый распределением ионов в клетке и внеклеточной среде, то изменение его должно влиять на выход ионов калия из клетки.

*Материал и методика.* Эритроциты из крови крысы популяции Вистар получали осаждением при 4000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге К-24. Осадок дважды промывали в тех же условиях в среде, содержащей 150 мМ NaCl в соотношении 1:5, pH среды выделения при этом доводили до 7,2—7,4 с помощью NaOH. Изменения концентрации  $\text{K}^+$  и  $\text{H}^+$  в суспензии эритроцитов измеряли пленочным  $\text{K}^+$ -селективным илиономициновым и  $\text{H}^+$ -селективным стеклянным электродами, соединенными в одной ячейке, и регистрировали с помощью pH-метров, подключенных к самописцам. Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в среде определяли пленочным  $\text{Ca}^{2+}$ -селективным электродом [2]. Изменение мембранного потенциала эритроцитов определяли по методу, основанному на измерении внеклеточного pH после добавления эритроцитов в незабуференную среду инкубации [9].

*Результаты и обсуждение.* В работах [3, 9] было показано, что с изменением концентрации  $\text{Cl}^-$  в среде мембранный потенциал эритроцитов изменяется, а именно с уменьшением концентрации KCl или NaCl он увеличивается со знаком «плюс» внутри.

Нами были проделаны опыты по изучению влияния мембранного потенциала на скорость потока  $\text{K}^+$  через мембрану эритроцитов. Выход ионов калия индуцировали добавлением переносчика  $\text{K}^+$ —валиномицина [8] или  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора A23187, который, переносит ионы кальция внутрь клетки, приводит к образованию специфического кальевого канала [10, 12]. Во всех случаях выход  $\text{K}^+$  сопряжен с входом  $\text{H}^+$  внутрь.

На рис. 1 представлена одновременная запись выхода  $\text{K}^+$  и входа  $\text{H}^+$  внутрь эритроцитов, индуцируемых валиномицином при различных концентрациях NaCl в среде. Как видно из рисунка, с увеличением концентрации NaCl скорости сопряженного  $\text{K}^+$ — $\text{H}^+$  обмена снижаются. Если при 150 мМ NaCl в среде скорость выхода  $\text{K}^+$  ( $V_{\text{K}^+}$ ) составляла 3,9 мкмоль/мин/мл, а входа  $\text{H}^+$  ( $V_{\text{H}^+}$ ) — 0,11 pH/мин/мл, то при 50 мМ NaCl  $V_{\text{K}^+}$  и  $V_{\text{H}^+}$  были равны соответственно 5,45 мкмоль/мин/мл и 0,24 pH/мин/мл, а при 10 мМ — 7,14 мкмоль/мин/мл и 0,9 pH/мин/мл. (За величину скорости бралась средняя величина изменения  $\text{K}^+$  или pH в течение 5 мин, деленная на 1 мл эритроцитов). Мембранный потенциал ( $\Delta\varphi$ ) при 150, 50 и 10 мМ NaCl соответственно равнялся: —45,6 мВ, —21,2 мВ и +17,6 мВ. При подкислении среды после добавления эритроцитов мы считали, что мембранный потенциал изменяется со знаком «плюс», при подщелачивании — со знаком «минус». Некоторое от-

клонение его от величины, предписываемой уравнением Нерста, может быть вызвано наличием в среде неучтенных ионов (в частности NaCl), вносимых эритроцитами.

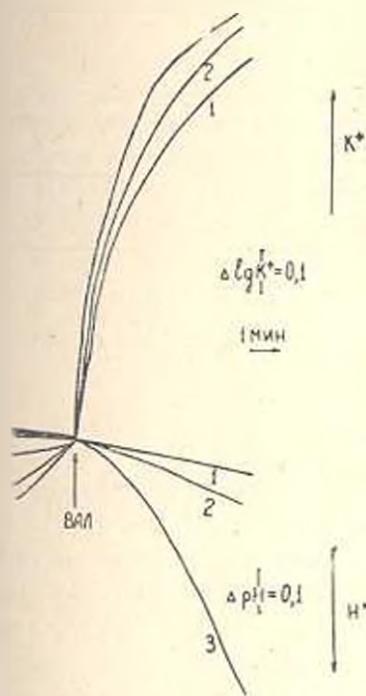


Рис. 1.

Рис. 1. Сопряженный  $K^+ - H^+$  обмен через мембрану эритроцитов, индуцированный валиномицином. 3 мл среды инкубации содержит: 1. 150 мМ NaCl; 2. 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы; 3. 10 мМ NaCl, 280 мМ сахарозы. Во всех случаях pH равнялось 7,2. Добавлено 0,1 мл эритроцитов и 2 мг валиномицина.

Отметим, что скорость спонтанного вытока  $K^+$  после внесения эритроцитов в среду инкубации росла с уменьшением концентрации NaCl в среде, т. е. с увеличением мембранного потенциала со знаком «плюс».

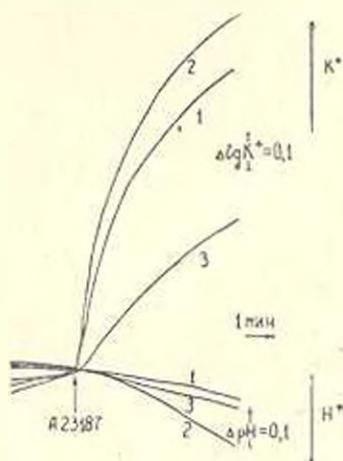


Рис. 2.

Рис. 2. Сопряженный  $K^+ - H^+$  обмен через мембрану эритроцитов, индуцированный  $Ca^{2+}$ -ионофором A23187. 3 мл среды инкубации содержат: 1. 150 мМ NaCl; 2. 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы; 3. 10 мМ NaCl, 280 мМ сахарозы. Во всех случаях pH равнялось 7,2. Добавлено 0,1 мл эритроцитов и  $3,3 \cdot 10^{-6}$  М ионофора A23187.

В следующей серии опытов мы попытались выяснить влияние мембранного потенциала на  $K^+ - H^+$  обмен, обусловленный действием  $Ca^{2+}$ -ионофора A23187. Поскольку на мембране эритроцитов имеется  $Ca^{2+}$ -АТФаза [11], «откачивающая»  $Ca^{2+}$  наружу, то добавление ионофора A23187 дает возможность ионам кальция входить внутрь и вызывать утечку  $K^+$ . На рис. 2 представлена зависимость выхода  $K^+$  и входа  $H^+$  в клетки, индуцируемых A23187 при тех же концентрациях NaCl, что и в опытах, показанных на рис. 1. В среде инкубации во всех трех случаях находилось около  $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$  в виде примесей от сахарозы и NaCl (определено с помощью  $Ca^{2+}$ -селективного электрода по отношению к

бидистиллированной воде, в которой концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  мы приняли равной 0).

В данном случае результат получился иным (табл.).

Таблица

Влияние мембранного потенциала на индуцированный А23187  $\text{K}^+ - \text{H}^+$  обмен в эритроцитах. В случаях 2, 3, 4, 5 добавлялось соответствующее количество сахаразы, чтобы суммарная осмолярность составляла бы 300 мосмолей.

Условия такие же, как в опытах, показанных на рис. 2.

№	NaCl, mM	$\Delta\psi$ , мВ	$V_{\text{K}^+}$ , мкмоль/мин/мл	$V_{\text{H}^+}$ , рН/мин/мл
1	150	-47.6	3.27	0.107
2	50	-19	3.4	0.27
3	20	-9.4	3.06	0.22
4	10	+12.4	0.95	0.14
5	5	+24	0.51	0.13

Из рис. 2 и таблицы видно, что при 150 и 50 mM NaCl в среде данные аналогичны результатам, представленным на рис. 1 при тех же концентрациях NaCl, т. е. с уменьшением количества NaCl (при этом падает гиперполяризация мембраны) скорости сопряженного  $\text{K}^+ - \text{H}^+$  обмена повышаются. Однако далее с понижением NaCl  $V_{\text{K}^+}$  и  $V_{\text{H}^+}$  уменьшаются, хотя мембранный потенциал увеличивается в сторону положительных значений. Отметим весьма интересный факт: в случае отсутствия NaCl (в среде 300 mM сахаразы) ионофор А23187 не индуцирует выток  $\text{K}^+$  из эритроцитов. При этом уже до внесения ионофора происходит заметный выход  $\text{K}^+$  из клеток. Скажем также, что в данном случае наблюдается видимая даже на глаз агрегация эритроцитов. При использовании же валиномицина с уменьшением концентрации NaCl в среде скорости выхода  $\text{K}^+$  и входа  $\text{H}^+$  увеличиваются.

Таким образом, при наличии в мембране эритроцитов калиевого ионофора валиномицина, с увеличением мембранного потенциала в сторону положительных значений, скорости сопряженного  $\text{K}^+ - \text{H}^+$  обмена монотонно увеличиваются. При индуцировании выхода  $\text{K}^+$  ионофором двухвалентных катионов А23187 наблюдается немонотонная зависимость скорости выхода  $\text{K}^+$  от мембранного потенциала. Максимальная скорость  $\text{K}^+ - \text{H}^+$  обмена отмечается при значении мембранного потенциала около -20 мВ (концентрация NaCl в среде порядка 50 mM). Это различие в скоростях ионных потоков может быть связано с разной «точкой приложения» ионофоров: валиномицин действует в мембране как подвижный переносчик, А23187 же открывает  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый калиевый канал. Возможно, что наиболее оптимально калиевый канал функционирует при определенном значении мембранного потенциала.

ԻՌՆՈՑՈՐՆԵՐՈՎ ԱՌԱՋԱՑԱՆ  $K^+$ — $H^+$  ՓՈՒՆԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ

Ս. Վ. ԳՅՈՒԽԱՆԴԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրված է առնետի էրիթրոցիտների մեմբրանային պոտենցիալի ազդեցությունը  $K^+$  դուրս մղելու և  $H^+$  ներս մտնելու պարունակությունների վրա: Ցույց է տրված, որ եթե  $K^+$  դուրս մղումն առաջացված է վալինոմիցինով,  $K^+$ — $H^+$  փոխանակության արագությունները մեծանում են, երբ մեմբրանային պոտենցիալը մեծանում է դեպի դրական նշանակությունների կողմը:  $Ca^{2+}$ -իոնոֆոր A23187-ով պայմանավորված իոնների վերաբաշխման ղեկարում նկատվում է ոչ մոնոտոն արագությունների կախվածություն մեմբրանային պոտենցիալից:

INVESTIGATION OF IONOPHORE—INDUCED  $K^+$ — $H^+$   
EXCHANGE IN ERYTHROCYTES

A. V. GYULKHANDANYAN

Influence of rats erythrocyte membrane potential on the rates of  $K^+$  efflux and  $H^+$  influx has been investigated. When  $K^+$  efflux is induced by valinomycin the rates of  $K^+$ — $H^+$  exchange increase with the increase of membrane potential in the direction of positive values. In case of ions redistribution caused by  $Ca^{2+}$ —ionophore A 23187 the non-monotonous dependence of rates on membrane potentials is observed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лев А. А. Ионная избирательность клеточных мембран. Л., 1975.
2. Матерова Е. А., Грекович А. Л., Дидина С. Е. Электрхимия, 8, 1829—1832, 1972.
3. Путьинский А. В., Попов С. А., Пучкова Т. В., Данилов Ю. А., Владимиров Ю. А. Биофизика, 28, 505—506, 1983.
4. Bernstein R. E. Science, 120, 459—460, 1954.
5. Funder J., Wleth J. O. Acta Physiol. Scand., 68, 234—249, 1966.
6. Garrahan P. J., Glynn I. M. J. Physiol., 192, 159—174, 1967.
7. Garrahan P. J., Glynn I. M. J. Physiol., 192, 175—188, 1967.
8. Harris E. J., Pressman B. C. Nature, 216, 918—920, 1967.
9. Macey R. I., Adorante J. S., Orme F. W. Biochim. Biophys. Acta, 512, 284—295, 1978.
10. Reed P. W. J. Biol. Chem., 251, 3489—3493, 1976.
11. Sarcastl B. Biochim. Biophys. Acta, 604, 154—190, 1980.
12. Sarcastl B., Szasz J., Gardos G. J. Membrane Biol., 26, 357—370, 1976.

УДК 577.352

## УБАИН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ Na-АТФ-аза

С. Я. АДАМЯН, Т. Г. АМБАРЦУМЯН

Приводятся литературные и собственные данные, доказывающие существование убаин-нечувствительной АТФ-азной транспортной системы. Они рассматриваются в том аспекте, в котором должны проводиться дальнейшие исследования для решения вопроса о том, является ли убаин-нечувствительная АТФ-аза отдельным ферментом, отличным от Na-K-АТФ-азы, или это—модификация того же фермента, возникающая в результате частичного ингибирования АТФ-азы убаином.

*Ключевые слова:* АТФ-аза убаин-нечувствительная, липидное окружение.

Исследование клеточных механизмов, осуществляющих активный транспорт ионов через биологические мембраны, является одной из основных проблем мембранологии. Среди этих механизмов наибольший интерес представляют системы, транспортирующие ионы Na и K, которые поддерживают ионный гетерогенитет клетки и играют особо важную роль в специфической деятельности возбудимых образований. Одна из таких систем хорошо известна—это Mg-зависимая Na-K-АТФ-аза—мембранный фермент, использующий энергию АТФ для переноса ионов натрия и калия против их электрохимического градиента [37, 38]. К концу шестидесятых годов этот фермент, обнаруженный почти во всех тканях, начал интенсивно изучаться. Был выявлен параллелизм между активностью фермента и интенсивностью Na $\leftrightarrow$ K обмена, определена последовательность ступеней ферментативной реакции, приводящей к ионному обмену, определены структурные субъединицы [6, 23, 29, 33].

Таким образом, в настоящее время структура и функция Na-K-АТФ-азы хорошо изучены, причем большую роль в этих исследованиях сыграл убаин—специфический ингибитор Na-K-АТФ-азы и ионного насоса. Убаин использовался не только для качественного отличия Na-K-АТФ-азы от других АТФ-аз, но и для количественного определения фермента и активных потоков, так как считается, что одна молекула убаина связывается с одной функциональной единицей фермента [16, 19]. Считается также, что связывание убаина с ферментом тормозит целиком и полностью все стадии работы фермента: от связывания с субстратом до стадии дефосфорилирования [31, 32].

Существует некоторая концентрация убаина, которая вызывает максимальное подавление ферментной активности и обменных ионных потоков— $5 \cdot 10^{-5}$ — $10^{-4}$  М. Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к дополнительному ингибированию активности фермента, при этом 10—15% ионных потоков и АТФ-азной активности так и остаются нечувствительными к убаину [20, 36].

Анализ потоков ионов натрия на скелетных мышцах лягушки, инкубированных в бескальциевом растворе Рингера с убаином, показал,

что нулевой разностный поток ионов натрия наблюдается при концентрации наружного натрия на два порядка выше расчетной [20, 36]. Полученное более высокое значение равновесной концентрации наружного натрия означает, что транспортная система мембраны мышечного волокна, очевидно, в состоянии совершать активный транспорт ионов против существенного электрохимического градиента при подавлении обычного Na:K обмена.

В связи с этим, естественно, возникает интерес к механизму убаин-резистентных потоков и к ферменту, ответственному за противогradientный перенос ионов.

На основании результатов изучения влияния ряда ингибиторов на ионные потоки и зависимости величины потока от различных источников энергии исследователи пришли к выводу, что вынос ионов натрия представляет собой активный транспортный процесс, отличный от убаин-чувствительного переноса ионов [14, 28]. Гоффман с соавт. выдвинули предположение, согласно которому кроме убаин-чувствительной транспортной системы, работающей на основе Na-K-АТФ-азы (насос 1), существует насос 2, не ингибируемый убаином. Убаин-нечувствительный выход ионов натрия, осуществляемый через насос 2, дополнительно тормозится этакриновой кислотой еще в 2—3 раза. Сравнительное изучение выходящего потока ионов натрия через насосы 1 и 2 показало ряд существенных различий между ними. Однако некоторые авторы считают, что убаин-нечувствительный выход ионов натрия осуществляется тем же механизмом, что и убаин-чувствительный.

В опытах Закса [30] был обнаружен выход ионов натрия из эритроцитов против электрохимического градиента в присутствии убаина. Этот поток блокируется фуросемидом в тех случаях, когда по какой-либо причине нарушено нормальное натрий-калиевое сопряженное движение. По мнению автора, система активного транспорта, которую принято определять как ингибируемую гликозидами систему, по-видимому, полностью не блокируется гликозидами. Кроме того, предполагается, что дополнительное ингибирование выходящего потока ионов натрия, которое наблюдается при действии фуросемида, связано с блокированием «остаточного» потока натрия.

Существование убаин-нечувствительной транспортной системы было показано на мышцах [1, 4, 5, 7, 8, 36], однако связать наблюдаемые изменения потоков с изменением Na-K-АТФ-азной активности не удалось [2]. Возможность функционирования убаин-нечувствительной АТФ-азой транспортной системы продемонстрирована на следующих объектах: на гигантских аксонах кальмара [10], на матке крысы и заре крилика [13], на почке крысы [22] и др.

На основании имеющихся многочисленных данных, касающихся убаин-резистентных потоков ионов на эритроцитах, была сделана попытка построить модель, отражающую степени ферментативной реакции, приводящей к транспорту ионов [3]. По полученным аналитическим выражениям потоков были построены качественные кривые зависимости потоков ионов натрия от концентрации ионов натрия и АТФ. Смысл построения такого рода в сопоставлении предсказаний, получае-

мых из анализа модели, с экспериментальными данными. Такое сопоставление поможет совершенствованию схемы убаинн-резистентного транспорта ионов.

Возникает вопрос о том, какой фермент ответствен за эти потоки. Естественно, речь идет об АТФ-азе, но необходимо выяснить, является ли убаинн-нечувствительная Mg-зависимая АТФ-аза, стимулируемая натрием, отдельным ферментом, или это — особое состояние Na-K-АТФ-азы.

Первые работы показали, что уменьшение убаинн-чувствительной АТФ-азной активности приводит к увеличению убаинн-резистентной АТФ-азы. Например, по данным Аскари с соавт. [9], в свежих человеческих эритроцитах, обработанных ультразвуком, снижается убаинн-чувствительная АТФ-азная активность и, соответственно, появляется убаинн-нечувствительная АТФ-азная активность, т. е., по-видимому, эти АТФ-азы — различные проявления одного и того же фермента. Пакао с соавт. [21] получили сходные результаты.

С другой стороны, Воловик с соавт. [39] обнаружили убаинн-нечувствительную АТФ-азу в микросомальной фракции кролика. Однако здесь убаинн-нечувствительная АТФ-аза не была количественно связана с убылью натрий-кальцевой АТФ-азной активности. Для объяснения убаинн-резистентности крысиной АТФ-азы ряд авторов предположили, что на ферменте отсутствует место связывания с ненасыщенным лактоновым кольцом или глюкозидным остатком убаина [40]. Было также высказано предположение, что низкая чувствительность к убаину АТФ-азы из сердца, мозга и почки собаки является артефактом процедуры очистки [13]. Это предположение было опровергнуто результатами тщательно проведенного исследования на АТФ-азе почки крысы [26]. Фермент выделялся двумя различными способами, полученные фракции обрабатывались NaI, глицерином, дезоксихолатом или додецилсульфатом, а чувствительность к убаину проверялась на всех стадиях очистки. Электрофорез энзима на полиакриламидном геле показал, что загрязнения отсутствуют. Показано, что помимо  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, примерно 6% белка от общего количества его имеет более высокий молекулярный вес. Эти результаты говорят в пользу того, что убаинн-нечувствительная АТФ-аза — не артефакт изоляции и что нечувствительность к убаину свойственна первичной структуре Na-K-АТФ-азы.

Изучая влияние ряда агентов на убаинн-нечувствительную АТФ-азу коронарной и сонной артерии, Прейсс [27] пришел к выводу, что эта АТФ-аза состоит из других энзиматических единиц, хотя ряд агентов действует так же, как и на Na-K-АТФ-азу. В пользу этого свидетельствуют и результаты Джильберта [15], показавшего, что некоторые вещества, например, простагландин E, оказывают влияние на убаинн-нечувствительную АТФ-азу, но не влияют на Na-K-АТФ-азу. Это также свидетельствует о существовании двух разных ферментов.

Однако в настоящее время обе точки зрения имеют хождение в научных кругах. Хотелось привести соображения в пользу того, что убаинн-нечувствительная АТФ-аза является не отдельным ферментом, а

той же Na-K-АТФ-азой, но проявляющей иные свойства в зависимости от внешних условий.

АТФ-аза является ферментом, тесно связанным с липидами. Как показано рентгеновскими исследованиями, обработка даже избытком детергента не разрушает целиком структуру липидного бислоя [17, 35]. Кимельберг [18] показал, что обработка фосфолипазами сводит к нулю АТФ-азную активность и что температуры фазового перехода мембранных липидов и АТФ-азной активности совпадают. Кроме того, оказалось, что связывание уабанина с Na-K-АТФ-азой является липид-зависимым процессом. В работе Чарнока и др. [11] показано, что обработка фосфолипазой А и детергентами изменяет число мест связывания. Детергенты открывают добавочные места, чувствительные к фосфолипазе А. В то же время есть постоянное число мест, на которое не влияет такая обработка, т. е. чувствительные к уабанину места существуют в двух окружениях— одно резистентное, другое—чувствительное к липолизу.

Хотя АТФ-аза активируется любыми фосфолипидами, при векторном встраивании при реконструкции АТФ-азы важно иметь в мембране фосфатадилсерин и фосфатадиглицерин, так как они обладают высокой избирательностью [25]. Папаханджонянос [21] предполагает прямое участие липидов в формировании нонселективных каналов мембранных структур. Так что весьма возможно, что чувствительность фермента к уабанину—прямое следствие липидного окружения.

Таким образом, не отрицая возможности существования уабанин-нечувствительной Na-АТФ-азы как отдельного фермента, а не конформационного состояния Na-K-АТФ-азы, все же следует отметить, что для окончательного решения этого вопроса необходимо подробно исследовать липидное окружение ферментов.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Поступило 9.X 1984 г.

## ՈՒԱԲԱԻՆ-ԱՆՉԳԱՅՈՒՆ Նa-ԱՆՑ-ԱԳՍ

Ս. ՅԱ. ԱԴԱՄՅԱՆ, Տ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՏՈՒՄՅԱՆ

Հոգվածում բերված են գրական և անձնական դիտարկումների տվյալներ, որոնք ապացուցում են ուարաին-անզգայուն ԱնՑ-ազային տրանսպորտային համակարգի գոյությունը: Այդ տվյալները դիտարկվում են այն առաջնությունով, որով պետք է կատարվեն հետագա հետազոտությունները հետևյալ հարցի լուծման համար, արդյո՞ր ուարաին-անզգայուն ԱնՑ-ազան առանձին Ֆերմենտ է և գոյություն ունի Na-K-ԱնՑ-ազայինց զատ, թե՛ այն հանդիսանում է նույն ֆերմենտի մոդիֆիկացիան, որն առաջանում է ուարաինով ԱնՑ-ազայի մասնակի արգելակման հետևանքով:

## OUABAIN—INSENSITIVE Na-ATP-ase

S. YA. ADAMIAN, T. G. HAMBARTSUMIAN

The literature and original experimental data are presented to prove the existence of an ouabain—insensitive Na-ATP-ase transport system.

It is important to know whether the ouabain-insensitive Na-ATP-ase is a separate enzyme and exists apart from Na-K-ATP-ase or it is a modification of the same enzyme and appears in the result of partial inhibition of ATP-ase by ouabain.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамян С. Я., Джанджугазян К. И., Симонян А. Л. Сб. Биофизика мембран. 20—25. Каунас, 1973.
2. Адамян С. Я., Джанджугазян К. И. Цитология, 16, 11, 1424—1425, 1974.
3. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 1978.
4. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г. Биофизика, 25, 6, 1037—1040, 1980.
5. Амбарцумян Т. Г., Марилян Г. Г., Адамян С. Я. Биофизика, 3, 489—492, 1982.
6. Лисовская Н. И. Успехи биол. химии, 8, 93—116, 1967.
7. Марилян Г. Г., Адамян С. Я., Авакян Ц. М. Биолог. ж. Армении, 33, 11, 1171—1175, 1980.
8. Симонян А. Л., Адамян С. Я., Марилян Г. Г. Биофизика, 24, 6, 1070—1073, 1979.
9. Askari A., Frantantoni I. C. Proc. Soc. Exptl. Med. Biol., 116, 751, 1964.
10. Brinley F. J., Mullins L. L. J. Gen. Physiol., 52, 2, 181—211, 1968.
11. Charnock J. S., Simonson L. P., Almsdta A. F. Bloch int. Biophys. Acta, 465, 77—92, 1977.
12. Chipperfield A. R. Nature, 286, 5770, 281, 1980.
13. Daniel E. E., Wolowyk M. W. J. Physiol., 214, 1, 20P—21P, 1971.
14. Hoffman J. F., Kregenow F. M. Ann. N. Y. Acad. Scie., 137, 2, 566—576, 1966.
15. Gilbert J. C., Whyllie M. G. Blochem. Pharmac., 24, 551, 1975.
16. Jorgensen P. L. Biochim. Biophys. Acta, 356, 53—67, 1974.
17. Jorgensen P. L. Quart. Rev. Biophys., 7, 239—274, 1975.
18. Kimelberg H. K. Papahadjopoulos. J. Biol. Chem., 249, 1071—1080, 1974.
19. Lane L. K., Copenhagen J. H., Lindenmayer G. E., Schwartz A. J. Biol. Chem., 248, 7197—7200, 1973.
20. Manery J. F., Dryden E., Still J. S., Madapullattam G. Can. J. Physiol. Pharmacol., 55, 21—33, 1977.
21. Nakao T., Nagano K., Adachi K., Nakao M. Blochem. Biophys. Res. Commun., 13, 444, 1963.
22. Osore E. E. Blochem. Pharmacol., 28, 18, 2865—2866, 1979.
23. Post R. L., Kume S., Tobin T., Orcutt L., Sen A. K. J. Gen. Physiol., 54, 1, 306S, 326 S, 1969.
24. Papahadjopoulos D., Kimelberg H. K. Progr. Surface Sci., 4, 141—232, 1, 1973.
25. Palatini P., Dabbeni-Sala F., Pitotti A., Brant J., Manderstrot J. Biochim. Biophys. Acta, 466, 1—9, 1977.
26. Periyasamy S. M., Lane L. K., Askari A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 3<sup>\*</sup> 1979.
27. Preiss R., Busse E., Banaschak H. Acta biol. med. Germ., 38, 10, 38, 1978.
28. Rettori O., Lenoir J. P. Amer. J. Physiol., 222, 4, 880—884, 1972.
29. Robinson J. D. Biochim. Biophys. Acta, 519, 145—176, 1979.
30. Sachs J. R. J. Gen. Physiol., 57, 3, 259—282, 1971.
31. Choi Y. R., Akera T. Biochim. Biophys. Acta, 508, 313—327, 1978.
32. Sen A. K., Tobin T., Post R. L. J. Biol. Chem., 244, 6596—6604, 1969.
33. Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. In: Current Topics in Membranes and Transport. Bronner F., Kleinzeller A., (Eds), N. Y., London, 3, 1—82, 1972.
34. Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. Pharmacol. Rev., 27, 1—134, 1975.
35. Simptkus H., Hoktu L. E. Arch. Blochem. Biophys., 158, 897—902, 1973.
36. Sjodin R. A., Beauge L. A. J. Gen. Physiol., 61, 2, 222—250, 1973.
37. Skou J. C. Biochim. Biophys. Acta, 23, 2, 394—401, 1957.

38. Skou J. C., Hilbert C. *Biochim. Biophys. Acta*, 110, 2, 359—369, 1965.  
39. Wolowyk M. W., Kidwell A. M., Dantel E. E. *Can. J. Biochem.*, 49, 377, 1971.  
40. Yoda A., Hokit L. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 880—886, 1970.

*«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985*

УДК 577.16:616.45—001.1/3

## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРИЛАЦЕТАТА НА ПРОЦЕСС ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ ПРИ АКУСТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

М. М. МЕЛКОНЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН, А. А. РУХКЯН, В. Г. МХИТАРЯН

Установлено, что при введении  $\alpha$ -токоферилацетата в условиях акустического стресса подавляется перекисное окисление липидов в мозге, сердце, печени и эритроцитарных мембранах. Содержание  $\alpha$ -токоферола при этом в тканях колеблется в пределах контрольного уровня. Интенсивность перекисного окисления липидов коррелирует с уровнем  $\alpha$ -токоферола в исследуемых тканях.

*Ключевые слова:* стресс акустический,  $\alpha$ -токоферол, перекисное окисление липидов.

Результаты целого ряда морфологических, физиологических, гистохимических, клинических исследований свидетельствуют о значительном повреждающем действии акустического стресса на организм [1, 5]. Нами [4] было показано изменение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровня  $\alpha$ -токоферола в тканях белых крыс в условиях действия широкополосного шума уровнем 97 дБА.

Известно, что в организме перекиси участвуют в синтезе простагландинов, стероидных гормонов, в обновлении фосфолипидов биомембран; они являются эффекторами некоторых ферментативных реакций. Стационарный уровень перекисей липидов в нормально метаболизирующих тканях обусловлен сбалансированностью реакций образования и устранения их, наличием антиоксидантной системы. Однако избыточное перекисное окисление липидов биологических мембран, развивающееся в результате дисбаланса в системе образования и устранения липидных перекисей под влиянием различных факторов, приводит к изменению структуры мембран, их проницаемости, устойчивости липид-белковых комплексов, инактивации ферментов, разрушению белков, т. е. вызывает изменение функциональной активности мембран. В связи с этим важное значение приобретает использование факторов, регулирующих интенсивность ПОЛ в тканях организма. Особое внимание уделяется  $\alpha$ -токоферолу, природному антиоксиданту, обладающему очень высокой антирадикальной активностью. Исходя из вышесказанного, мы поставили задачу изучить интенсивность ПОЛ и динамику содержания  $\alpha$ -токоферола в тканях белых крыс, подвергавшихся воздействию шума на фоне внутрибрюшинного введения  $\alpha$ -токоферилацетата.

*Материал и методика.* Эксперименты ставили на беспородных белых крысах-самцах массой 180—220 г., содержащихся в обычных условиях вивария. Животных

опытной группы подвергали воздействию постоянного широкополосного шума уровнем 97дБА (63-12000 Гц) с максимальной акустической энергией в области средних и высоких частот. Сроки воздействия—15 мин, 120 мин, 7, 28, 56 дней ежедневно по 120 мин.  $\alpha$ -Токоферилацетат вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг массы за 24 ч до первого воздействия. Инъекции повторяли через 48 ч. Животных забивали декантацией. Сердце, печень, мозг перфузировали охлажденным 0,154 М КС1.

Мембраны эритроцитов выделяли по Лимберу [8]. Об уровне ПОЛ судили по накоплению малоальдегида, концентрацию которого определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3], колориметрически на спектрофотометре «Спектол» (ГДР) при  $\lambda$  535 нм; содержание  $\alpha$ -токоферола—флуориметрически по методу Дуггана [6] на спектрофлуориметре «Хитачи» (Япония)  $\lambda$  295/330; белок—по Лоурн [9]. Данные пересчитаны на 1 мг белка.

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание  $\alpha$ -токоферола повышается в первые сроки эксперимента в мозге, печени и сердце. В плазме спустя 15 мин от начала воздействия содержание  $\alpha$ -токоферола снижается, однако через 2 ч оно нормализуется (рис. 1). В эритроцитарных мембранах в эти сроки

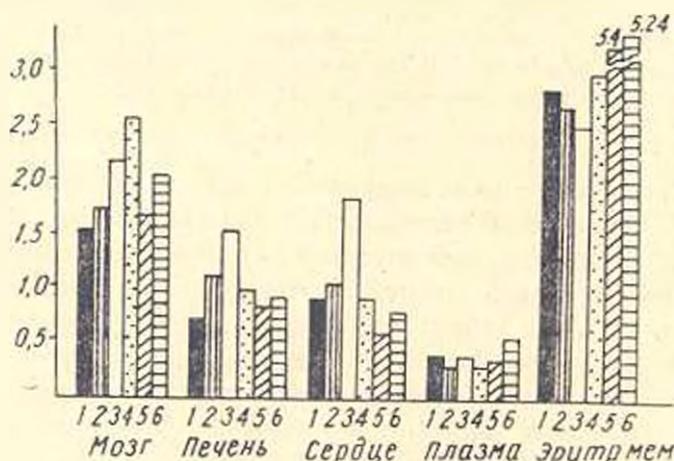


Рис. 1. Уровень  $\alpha$ -токоферола в тканях белых крыс в условиях акустического стресса на фоне внутривенного введения  $\alpha$ -токоферилацетата (в мг/мг белка). 1—контроль, 2—15 мин, 3—120 мин, 4—7x120 мин, 5—28x120 мин, 6—56x120 мин.

уровень его ниже контрольного. При 7-кратном ежедневном воздействии шума на фоне введения  $\alpha$ -токоферилацетата отмечается высокий уровень  $\alpha$ -токоферола в мозге и эритроцитарных мембранах и тенденция к его снижению в печени, сердце и плазме. При 28-ми ежедневных воздействиях стрессора содержание  $\alpha$ -токоферола в мозге, печени и плазме доходит почти до контрольного уровня. Однако в сердце оно снижено, а в эритроцитарных мембранах наблюдается обратная картина. Интересно отметить, что именно 7-дневное воздействие приводит к наибольшему снижению содержания  $\alpha$ -токоферола, не достигающему, однако, контрольного уровня в мозге и печени. Это коррелирует с полученными нами ранее данными [4], согласно которым максимальная интенсификация ПОЛ наблюдалась при семикратном воздействии стрессора. Известно также, что увеличение липидных перекисей в тканях повышает их потребность в витамине Е, как в естественном антиоксиданте [2, 16], что, по-видимому, и является причиной наблюдаемых

сдвигов. При последующем воздействии шума (56 ежедневных воздействий) отмечается значительно более высокий уровень  $\alpha$ -токоферола во всех изученных тканях, кроме сердца, в котором этот показатель несколько ниже контроля ( $P < 0,05$ ).

Ферментативное ПОЛ (рис. 2) подавлено во всех исследуемых тканях, за исключением сердца, через 15 мин от начала воздействия и после 7 ежедневных воздействий. На наш взгляд, интересным является

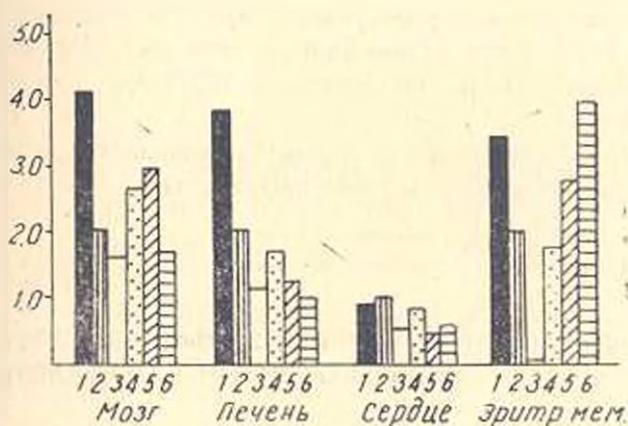


Рис. 2. Уровень ферментативного перекисного окисления липидов в гомогенатах тканей и эритроцитарных мембранах белых крыс в условиях акустического стресса на фоне внутривнутрибрюшинного введения  $\alpha$ -токоферилацетата (в нмоль МДА/мг белка). Обозначения те же, что на рис. 1.

сглаживание пиков роста ПОЛ под влиянием введенного  $\alpha$ -токоферилацетата на 7-й день эксперимента, когда уровень ПОЛ при воздействии шума превышает контрольный фон и исследуемых тканей в пределах 200–700%. Сдвиги особенно выражены в сердце. Следует отметить также тенденцию к нормализации уровня ферментативного ПОЛ в сердце и эритроцитарных мембранах при 28- и 56-разовом воздействии. Аналогичная картина наблюдается при изучении интенсивности (рис. 3) неферментативного ПОЛ.

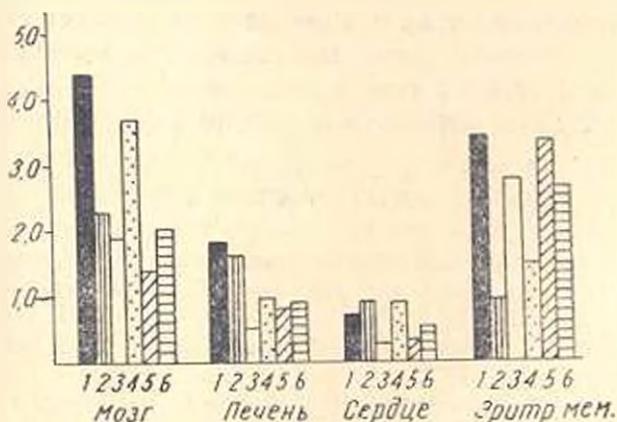


Рис. 3. Уровень неферментативного перекисного окисления липидов в гомогенатах тканей и эритроцитарных мембранах белых крыс в условиях акустического стресса на фоне внутривнутрибрюшинного введения  $\alpha$ -токоферилацетата (нмоль МДА/мг белка). Обозначения те же, что на рис. 1.

Таким образом, внутрибрюшинное введение  $\alpha$ -токоферилацетата белым крысам, подвергавшимся воздействию шума, приводит к сохранению в тканях эндогенного антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола, исполняющего, помимо антиоксидантной, очень важные функции в ряде других метаболических процессов. При этом наблюдается некоторое подавление уровня ПОЛ в тканях, что коррелирует с содержанием в них  $\alpha$ -токоферола. Известно, что введение высоких доз  $\alpha$ -токоферола провоцирует избыточное ПОЛ. На наш взгляд, использованная доза  $\alpha$ -токоферилацетата является оптимальной и при хронических воздействиях стрессора препятствует истощению запасов антиоксидантов в тканях, вызывает нормализацию интенсивности ПОЛ в сердце и эритроцитарных мембранах.

Полученные данные могут служить основанием для разработки патогенетически обусловленных мер профилактики.

Ереванский медицинский институт,  
кафедра биоорганической и биологической химии

Получено 15.X 1984 г.

### $\alpha$ -ՏՈԿՈՖԵՐԻԼԱՑԵՏԱՏԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԸՊԴԴԱՅԻՆ ԳԵՐՔՐՈՒԹԱՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ՎՐԱ ԱԿՈՒՍՏԻԿ ՍՏՐԵՍԻ ՁԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ. Մ. ՄԵԼԿՈՆԻԱՆ, Ա. Գ. ԱՐԱԿԵԼԻԱՆ, Ա. Ա. ՐՈՒՇԿԻԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻՏՐԻԱՆ

Ստուճնափրոթլուճնեբրը ցաւց են ազի, որ ախուստիկ սարեւս պայմաններում  $\alpha$ -տոկոֆերիլացետատի պրոֆիլակտիկ ներարկումը կարգափորում է լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսը և  $\alpha$ -տոկոֆերոլի քանակը հյուսվածքներում:

### EFFECT OF $\alpha$ -TOCOPHERILACETATE ON THE LIPID PEROXIDATION PROCESS UNDER THE ACOUSTIC STRESS

M. M. MELKONIAN, A. G. ARAKELIAN, A. A. RUCHKIAN, V. G. MKHITARIAN

The inhibition of lipid peroxidation processes in the brain, heart, liver, erythrocyte membranes is observed on the background of  $\alpha$ -tocopherilacetate administration under the acoustic stress conditions. The  $\alpha$ -tocopherol content varies in control level range. The lipid peroxidation intensity is correlated with the  $\alpha$ -tocopherol level in the studied tissues.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аргюхина И. И., Левшина И. П. Бюлл. экпер. биол. и мед., 1, 98—100, 1982
2. Бурлакова Е. Б., Кухтина Е. И., Хромова И. Г., Аристархова С. А. Биохимия, 47, 5 822—826, 1982
3. Владимирова Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., 1972
4. Мелконян М. М., Мхитарян В. Г., Мелх-Асегян Е. А., Ручкян А. А. Биол. ж. Армении, 36, 7, 582—587, 1983.
5. Пичков С., Крипичков Г. И. Акустический стресс и церебровисцеральные нарушения, М., 1969.

6. Duggan D. E. Arch. Biochem. Biophys., 84, 116, 1959.
7. Green J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 23, 1972.
8. Limber G. K., R. Davis Bakerman S. Blood, 39, 111, 1970.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. S., Faur A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
10. Tappet A. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 12-27, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.343

## ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ

М. Л. ГЕВОРКЯН, А. Е. ЗАКАРЯН

Обнаружено существенное возрастание интенсивности фотохемилюминесценции растворов аргиназы и сывороточного альбумина человека при облучении ультрафиолетовым светом в течение 2—3 часов. Предполагается, что облучение ультрафиолетовым светом приводит к нарушению нативной конформации белков, в результате чего в фотохимические процессы вовлекаются ранее недоступные участки макромолекулы белка, что и приводит к возрастанию интенсивности фотохемилюминесценции.

*Ключевые слова:* фотохемилюминесценция растворов белков, конформация белков.

Фотохемилюминесценция (ФХЛ) растворов белков, возникающая при облучении ультрафиолетовым светом, исследовалась в ряде работ [3—6]. Показана свободнорадикальная природа этого явления и участие кислорода в процессах ФХЛ. Установлены в общих чертах механизм процессов, приводящих к ФХЛ, и важная роль в них остатков триптофана [5, 6]. Исследование процессов ФХЛ позволяет получить ценные сведения о фотохимии белков, свободнорадикальных превращениях в растворе, а также о конформационных изменениях белковых молекул [3, 6]. Большинство работ, однако, посвящено исследованию процессов, происходящих на начальных этапах облучения ультрафиолетовым светом. В данной работе приводятся результаты изучения закономерностей ФХЛ растворов аргиназы и сывороточного альбумина человека (САЧ) при длительном облучении. Такое исследование поможет лучше понять процессы, происходящие в растворах белков при облучении, внесет вклад в изучение механизма нарушения конформации и инактивации ферментов под действием ультрафиолетового света.

*Материал и методика* В работе использовались препараты аргиназы печени крупного рогатого скота, сывороточного альбумина человека, N-ацетил-d,l-триптофана, глицина (Резанл, Венгрия), уреазы (отечественного производства). Растворы белков готовили на 0,05 М глициновом (рН 9,5) и 0,01 М фосфатном (рН 7) буферах в концентрации  $10^{-5}$  М. Исследуемые растворы (5 мл) облучали в открытой термостатированной (25°) кювете при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Облучение проводили полным светом ртутной лампы ПРК-4 с помощью об-

лучения ОКУФ-5 на расстоянии 4,5 см от основания кюветы. Интенсивность ФХЛ измеряли на установке для регистрации хемилюминесценции, описанной ранее [1]. В облученных растворах аргиназы определяли активность фермента по методу Рагнер с небольшими изменениями, как описано ранее [1]. Тепловую денатурацию растворов белков проводили путем их нагревания на водяной бане в течение 5—10 мин при 70° или 80°. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры и исследовали обычным способом.

При исследовании влияния ионов  $Mn^{2+}$  на интенсивность ФХЛ растворов белков перед облучением к ним добавляли раствор  $MnCl_2$  в концентрации 25 мМ (0,5 мл). Присутствие этих ионов в растворе не влияло на кинетику послесвечения белков в данных условиях.

**Результаты и обсуждение.** ФХЛ растворов аргиназы исследовалась нами и ранее [1, 2]. Основные характеристики ее сходны с таковыми растворов других белков [6]. Типичная кинетическая кривая ФХЛ растворов аргиназы, как было показано в работе [1], состоит из двух составляющих: на начальном этапе скорость снижения интенсивности ФХЛ несколько выше, чем на более поздней стадии затухания свечения. В данной работе исследовалась зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ— $I^0$  от времени облучения. Эта величина определялась экстраполяцией начального участка полудогарифмической асимптоты кинетической кривой к нулевому моменту [1]. На рис.

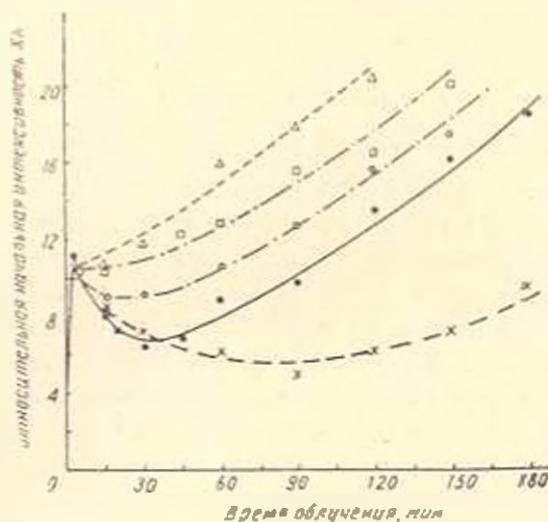


Рис. 1. Зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ растворов аргиназы от времени облучения (O) и влияние на нее ионов  $Mn^{2+}$  (x), предварительной тепловой обработки при 70° (10 мин) (O), 80° (10 мин) (O), а также предварительного облучения ультрафиолетовым светом (1 час) (Δ).

Видно, что относительная начальная интенсивность ФХЛ возрастает в первые 2—5 мин, достигает максимума, затем медленно снижается, что наблюдалось и ранее [1, 2]. Однако при увеличении времени облучения до 2—3 ч наблюдается повторное увеличение интенсивности ФХЛ, превышающее начальное повышение  $I^0$  почти в 2 раза. По тангенсу угла наклона двух составляющих полудогарифмической асимптоты кинетической кривой были определены значения величины констант скоростей снижения интенсивности ФХЛ— $k_1$  и  $k_2$ , характеризующие

форму кинетической кривой. Из рис. 2 а видно, что значения  $k_1$  с увеличением времени облучения не меняются, тогда как значения  $k_2$  уменьшаются. Это свидетельствует об изменении кинетики ФХЛ и наличии конформационных изменений молекулы белка при длительном облучении [3].

Полученные данные позволяют предположить, что повторное возрастание интенсивности ФХЛ связано с нарушением конформации аргиназы в ходе облучения, благодаря чему активные продукты фотолиза триптофанов взаимодействуют с ранее недоступными участками макромолекулы, образуя свободные радикалы, участвующие в процессах ФХЛ. В связи с этим представляло интерес исследовать влияние факторов, поддерживающих нативную конформацию молекулы белка, на интенсивность ФХЛ. Как известно, ионы  $Mn^{2+}$  оказывают стабилизирующее влияние на молекулу аргиназы [7, 8]. Эксперименты, проведенные с растворами аргиназы в присутствии этих ионов, показали, что добавление ионов  $Mn^{2+}$  в концентрации 2,5 мМ влияет на ход кривой зависимости начальной интенсивности ФХЛ от времени облучения (рис. 1), не отражаясь на кинетике послесвечения. Вторичное повышение начальной интенсивности ФХЛ в этом случае происходит только после 2,5—3 ч облучения, тогда как без ионов  $Mn^{2+}$  возрастание  $I^0$  наблюдается уже через 45—60 мин после начала облучения.

Измерение интенсивности ФХЛ было проведено также в растворах аргиназы, подвергнутых предварительной тепловой обработке в течение 10 мин при температуре 70° и 80° (рис. 1). Эти эксперименты показали, что вторичное повышение начальной интенсивности ФХЛ в растворах белка после тепловой обработки происходит уже через 15—20 мин после начала облучения, а через 2 часа  $I^0$  возрастает почти в 2 раза (рис. 1). Значения  $k_1$  и  $k_2$ , характеризующие форму кинетической кривой ФХЛ в этих растворах, в результате облучения уменьшаются (рис. 2 б), т. е. кинетика процессов ФХЛ существенно изменяет-

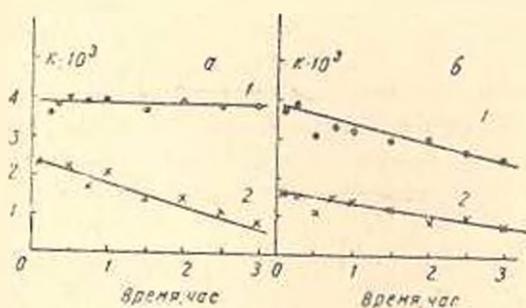


Рис. 2. Влияние длительности облучения на величины констант скоростей снижения интенсивности ФХЛ— $k_1$  и  $k_2$  для растворов нативной (а) и подвергнутой тепловой обработке (80°, 10 мин) аргиназы (б).

ся. Значение  $k_2$  для раствора аргиназы, подвергнутого тепловой обработке, при облучении в течение 5 мин составляет  $1,4 \cdot 10^{-3}$  сек<sup>-1</sup>. Это ниже соответствующего значения константы для растворов нативной аргиназы и совпадает со значением  $k_2$  для облученного в течение 90 мин раствора фермента, что указывает на сходство процессов ФХЛ в этих

случаях (рис. 2). Интенсивность ФХЛ раствора аргиназы, предварительно облученного ультрафиолетовым светом в течение часа в тех же условиях (рис. 1), возрастает сразу, минуя стадию снижения на начальном участке кривой. Все эти данные указывают на связь повторного возрастания интенсивности ФХЛ при длительном облучении ультрафиолетовым светом с процессами нарушения нативной конформации белка.

Параллельно с измерением интенсивности ФХЛ было проведено определение аргиназной активности в облученных растворах фермента. В ходе облучения активность аргиназы постепенно снижается (рис. 3) и через 3 ч составляет 20% от исходной. Присутствие ионов  $Mn^{2+}$  частично снижает степень инактивации аргиназы в данных условиях, причем защитный эффект лучше выражен при длительном облучении. Очевидно, стабилизация нативной конформации молекулы аргиназы в присутствии ионов марганца отражается на скорости инактивации фермента и на процессах ФХЛ растворов аргиназы в данных условиях.

Аналогичные эксперименты были проведены на растворах САЧ (рис. 4). Как видно из рисунка, в этом случае наблюдаются те же за-

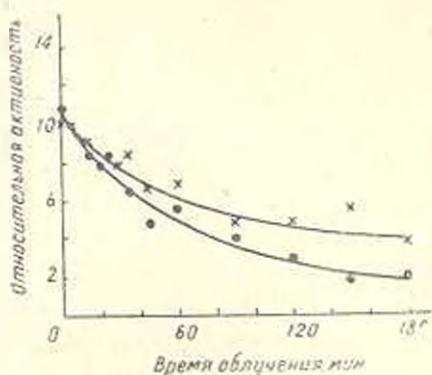


Рис. 3.

Инактивация растворов аргиназы (●) в ходе облучения и влияние ионов  $Mn^{2+}$  (x) на этот процесс.

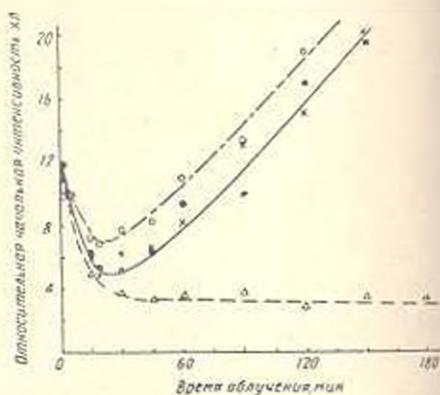


Рис. 4.

Зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ растворов САЧ (рН 7) (●) и ацетил-триптофана ( $5 \cdot 10^{-3}M$ , рН 9,5) (Δ) от времени облучения. Влияние ионов  $Mn^{2+}$  (x) и предварительной тепловой обработки ( $80^{\circ}$ , 5 мин), (○).

кономерности. После 2,5 ч облучения  $I^0$  увеличивается в 2 раза по сравнению с ее начальным увеличением. Ионы  $Mn^{2+}$ , однако, не влияют на интенсивность ФХЛ растворов САЧ при длительном облучении, что свидетельствует о специфичности их воздействия на аргиназу (рис. 4). Предварительная тепловая обработка растворов САЧ ( $80^{\circ}$ , 5 мин) приводит к повышению уровня интенсивности ФХЛ уже через 20 мин после начала облучения. Можно было предположить, что повышение интенсивности ФХЛ связано с накоплением фотопродуктов, образующихся в результате фотолиза триптофанилов в растворе белка. Для выяснения этого вопроса была исследована ФХЛ растворов ацетил-триптофана

при облучении ультрафиолетовым светом в тех же условиях (рис. 4). Однако в этом случае с увеличением времени облучения до 3 ч не наблюдается повторного возрастания начальной интенсивности ФХЛ, т. е. накопление продуктов фотолиза триптофана в растворе не влияет на интенсивность ФХЛ в данных условиях.

Таким образом, обнаруженное нами повторное увеличение интенсивности ФХЛ растворов исследуемых белков при длительном облучении, по-видимому, связано с нарушением нативной конформации их и вовлечением ранее недоступных участков макромолекул в процессы фотохимических превращений, происходящих при облучении ультрафиолетовым светом.

Греванский государственный университет,  
кафедра биофизики

Поступила 24.11 1981 г.

**ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԼՈՒՄԻՆՅՕՆԵՐԻ ՖՈՏՈՔԵՄԻԼՅՈՒԼՈՒՄԻՆԵՍԻՑԻԱՆ  
ՈՒՆՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿՈՒՄԻՅԵ ԼՈՒՅՍՈՎ ԵՐԿԱՐԱՏԵԼ ՃԱՌԱԳԱՅՑՄԱՆ  
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

**Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ե. ՉԱԿԱՐՅԱՆ**

Հայտնաբերված է խոշոր եղջյուրափոր անասունների լյարդի արգինազային և մարզու շիճուկային սպրումինի լուծույթների ֆոտոքեմիլումինեսցենցիայի (ՖՔԼ) ինտենսիվության բարձրացում ուլտրամանուշակագույն լույսի երկարատև (3 ժամ) ազդեցության դեպքում: Յույց է տրված  $M_n$  և  $\tau$  իոնների արդելակող և չերմային ղենատուրացիայի խթանող ազդեցությունները ՖՔԼ-ի ինտենսիվության վրա: Ենթադրվում է, որ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման ժամանակ ա.եզի է ունենում սպիտակուցների կոնֆորմացիայի խախտում: Ֆոտոքեմիական պրոցեսների մեջ բնդրվվում են սպիտակուցային մոլեկուլի նոր հասվածներ, որոնց փոխազդեցությունը ճառագայթման ժամանակ առաջացող ակտիվ մասնիկների հետ հանդեցնում է ՖՔԼ-ի ինտենսիվության բարձրացման:

**PHOTOCHEMILUMINESCENCE OF THE PROTEINS SOLUTIONS  
DURING PROLONGED IRRADIATION BY ULTRAVIOLET LIGHT**

**M. L. GEVORKIAN, A. E. ZAKARIAN**

The essential growth of the intensity of photochemiluminescence of arginase and human serum albumin solutions is observed under the ultraviolet irradiation during 2—3 hours. Under the ultraviolet prolonged irradiation the disturbance of native conformation of proteins takes place. New sites of molecule are included into the photochemical processes and owing to this the increase of intensity of photochemiluminescence takes place.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Дантян М. А. Биолог. ж. Арзени, 27, 9, 44—49, 1974.

2. Геворкян М. Л., Захарян А. Е., Демин Ю. М. Уч. зап. ЕГУ, 1, 78—83, 1976.
3. Нисенбаум Г. Д., Аксентев С. Л., Конец С. В. Биофизика, 11, 3, 402—406, 1969.
4. Сапежинский И. И. ДАН СССР, 175, 1167, 1967.
5. Сапежинский И. И. Химия высоких энергий, 3, 325—328, 1969.
6. Сапежинский И. И. В сб.: Молекулярная радиобиология, М., 95—129, 1972.
7. Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A. Arch. Biochem. Biophys., 62, 2, 446—453, 1956.
8. Hirsch—Kotb H., Helne I. P., Kotb H. J., Greenberg D. M. Comp. Biochem. Physiol., 37, 3, 315—359, 1970.

«Биолог ж. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 615.81:576.311

## СОДЕРЖАНИЕ $Ca^{++}$ В МИТОХОНДРИЯХ И УРОВЕНЬ АТФ В ПЕЧЕНИ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, А. С. ТЕР-МАРКОСЯН

Исследовалось содержание  $Ca^{++}$  в митохондриях печени и АТФ в печеночной ткани крысы после воздействия электростатического поля напряженностью 2000 в/см и длительностью 1 час, сутки и 6 суток по 6 часов ежедневно. Установлено уменьшение  $Ca^{++}$  в митохондриях и АТФ печени в этих условиях. Максимальные сдвиги в изученных параметрах наблюдаются после одночасового воздействия.

*Ключевые слова:* электростатическое поле, митохондрии,  $Ca^{++}$ , АТФ.

Ранее нами было показано, что воздействие электростатического поля (ЭСП) приводит к определенным структурным [1] и функциональным перестройкам митохондрий печени крыс, нарушению процесса окислительного фосфорилирования [5]. Для оценки функционального состояния митохондрий, наряду с процессом окислительного фосфорилирования, представляется интересным изучение и другой весьма важной функции этих органелл—способности активно накапливать ионы  $Ca^{++}$ .

В настоящей работе приводятся данные о влиянии ЭСП на содержание  $Ca^{++}$  в митохондриях печени и уровень АТФ в печеночной ткани крыс.

*Материал и методика.* Эксперименты проводили на белых беспородных крысах самца массой 150—180 г. Животных подвергали воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см, продолжительностью час, сутки и 6 суток по 6 часов ежедневно. ЭСП создавали при помощи установки конденсаторного типа [2]. Опыты ставили сразу после воздействия, но избежали влияния циркадных ритмов экспериментальных и контрольных животных, забивали в одно и то же время суток. Митохондрии из печени животных выделяли по методу Мосоловой с соавт. [4]. Степень чистоты фракции и целостности митохондрий контролировали электрономикроскопически.

Содержание ионов  $Ca^{++}$  в митохондриях определяли при помощи флуоресцентного зонда, в качестве которого использовали хлортетрациклин, обладающий большим сродством к внутримитохондриальному  $Ca^{++}$ . Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции комплекса  $Ca^{++}$ —хлортетрациклин [8]. Подробное описание методики приведено в нашей предыдущей работе [6]. Измерения проводили на спек-

уфлуориметре MPF-4 («Хитачи», Япония). Возбуждение флуоресценции вызывалось при длине волны 380 нм, а интенсивность флуоресценции измеряли при 540 нм. Митохондрии вводили в измерительную кювету из расчета 1,2 мг белка на 1 мл среды инкубации, содержащей 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl и 10 мкМ хлортетрациклина (рН 7,4). Содержание  $Ca^{++}$  в митохондриях выражали в относительных единицах интенсивности флуоресценции.

Количество белка в митохондриях определяли по Лоури [11].

Содержание АТФ определялось методом ферментативного анализа [3], в основе которого лежит ферментативное превращение глюкозы в 6-фосфоглюконовую кислоту при помощи гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и АТФ. О количестве АТФ судили по изменению экстинкции НАДФН<sub>2</sub>, образующегося в результате этой реакции. АТФ из печени экстрагировали 6%-ной перхлорной кислотой после предварительного замораживания в жидком азоте и растирания в порошок. Измерения проводили на спектрофотометре «Спекорд» UV VIS (ГДР) при длине волны 366 нм в термостатируемой кювете (130°). Количество АТФ выражали в мк моль/г ткани. Все полученные экспериментальные данные обрабатывали с применением критерия достоверности Фишера-Стьюдента.

*Результаты и обсуждение.* Установлено, что воздействие ЭСП приводит к понижению содержания внутримитохондриального  $Ca^{++}$  и уровня АТФ. Однако статистически достоверные изменения исследуемых параметров имеют место только после часового воздействия (табл.).

Таблица  
Содержание  $Ca^{++}$  в митохондриях и уровень АТФ в печени крыс после воздействия ЭСП напряженностью 2000 в/см

		Контроль	1 ч	1 сут	6 сут по 6 ч ежедневно
Ca	М <sub>ср</sub>	96,77	78,30	89,70	83,69
	m	3,44	7,52	3,20	8,56
	n	11	9	10	8
	t		2,44	1,93	1,63
АТФ	М <sub>ср</sub>	1,50	0,74	1,23	1,34
	m	0,13	0,09	0,10	0,09
	n	10	9	9	8
	t		5,30	1,65	1,03

Согласно химическотеоретической теории Митчела [12], процессы синтеза АТФ и транспорта  $Ca^{++}$  используют один и тот же источник энергии — электрохимический потенциал ионов водорода, генерируемый дыхательной цепью. Изменения указанного потенциала приводят к нарушению как процесса окислительного фосфорилирования, так и транспорта  $Ca^{++}$  в митохондриях.

Нашими предыдущими исследованиями [5] показано, что воздействие ЭСП напряженностью 2000 в/см и длительностью 1 ч приводит к падению эффективности фосфорилирования без нарушения скоростей поглощения кислорода в состояниях 3 и 4 по Чапоу, суточное и недельное воздействие оказывает выраженное угнетающее действие на процессы терминального окисления, однако сопряжение процессов окисления и накопления энергии практически не страдает. Анализ ряда работ [7, 9, 10] показывает, что деэнергизация митохондрий приводит к уменьшению их  $Ca^{++}$  —накапительной способности.

Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить, что уменьшение содержания внутримитохондриального  $Ca^{++}$  после

воздействия ЭСП обусловлено дезэнергизацией митохондрий. В пользу такого предположения говорят данные о симбатных изменениях содержания внутримитохондриального  $Ca^{++}$  и уровня АТФ в печени после воздействия ЭСП.

Говорить о конкретных механизмах воздействия ЭСП на содержание внутримитохондриального  $Ca^{++}$  и тканевого АТФ на данном этапе исследований преждевременно. Однако можно предположить, что наложение внешнего ЭСП приводит к изменению трансмембранной разности электрохимических потенциалов водорода, вследствие чего имеет место дезэнергизация митохондрий и уменьшение содержания внутримитохондриального  $Ca^{++}$ .

Таким образом, полученные данные еще раз доказывают, что ЭСП является физическим фактором воздействия, существенно влияющим на функциональное состояние митохондрий.

Ереванский государственный медицинский институт,  
лаборатория биофизики и молекулярной биологии ЦНИИ

Получено 13.VII 1984 г.

**ԼԵԿՏՐԱՍՏԱՏԻԿ ԴԱՇՏԻ ԱԶԻԵՑՈՒԻՅԱՆԸ ԵՆԹԱՐԿՎԱՆ ԱՌՆՏՆԵՐԻ  
ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐՈՒՄ  $Ca^{++}$ -Ի ՔԱՆԱԿԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴՈՒՄ ԱՆՖ-Ի  
ՄԱԿԱՐԴԱԿԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ**

**Գ. Գ. ԱՐՇՐՈՒՆԻ, Ա. Ս. ՏԵՐ-ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ**

2000վում լարվածությունը և 1 ժամ, 1 օր ու 6 օր վեցական ժամ տևողությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությանը ենթարկված սպիտակ առնետների մոտ ուսումնասիրված է լարդի միտոքոնդրիաներում  $Ca^{++}$ -ի և լարդի հյուսվածքում ԱՆՖ-ի պարունակությունը: Ցույց է տրված, որ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը հանդեպում է ուսումնասիրված պարամետրերի անկմանը և ամենամեծ փոփոխությունները նկատվում են 1 ժամյա ազդեցությունից հետո:

**CONTENT OF  $Ca^{++}$  IN MITOCHONDRIA AND ATP LEVEL  
IN THE LIVER OF RATS EXPOSED TO THE TREATMENT  
OF ELECTROSTATIC FIELD**

**G. G. ARTZRUNI, A. T. TER-MARKOSIAN**

The content of  $Ca^{++}$  in mitochondria and ATP in the liver of rats has been investigated after the treatment by electrostatic field of different parameters. The content of  $Ca^{++}$  in hepatic mitochondria, as well as ATP in the liver decreases under the electrostatic field influence. Maximum shifts in the studied parameters are observed after one-hour influence.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Арируни Г. Г., Авакян Л. А., Мкртчян С. Л. Биолог. ж. Армении, 33, 1195, 1980.
2. Арцруни Г. Г. Мат-лы конф. мол. уч., посвящ. XXV съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.

3. Асатиани В. С. Ферментативные методы анализа. 262, М., 1969.
4. Мосолова Н. М., Горская Н. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии. 45, М., 1975.
5. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биолог. ж. Армения, 31, 750, 1978.
6. Худавердян Д. П., Арцруни Г. Г., Тер-Маркосян А. С., Ойсемян Р. С. Бюлл. эксп. биологии и медицины, 97, 301, 1981.
7. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
8. Caswell A. H., Hutchison J. D. Fed. Proc., 30, 1281, 1971.
9. Drahotu Z., Carafolt E., Rosst G. S., Gamble R. L., Lehninger A. L. J. Bio Chem., 240, 2712, 1965.
10. Engstrom A. W., DeLula H. P. Biochem., 3, 379, 1964.
11. Lowry O. H., Rosenbrough G. N., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
12. Mitchell P. Biol. Rev., 41, 449, 1966.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 615:11.23.211.212

## КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Э. В. ВЛАСЕНКО

Приведены данные обзорного характера о роли атома азота, соединенного углеводородным мостиком с ароматической фенильной группой («тираминный фрагмент»), ответственного за связывание с опиоидной рецепторной системой. Выдвинуто предположение об участии карбонильной группы в качестве вспомогательной функции в субстрат-рецепторном взаимодействии. Введение в состав молекулы вещества «тираминового фрагмента» и карбонильной группы может служить предпосылкой создания новых эффективных наркотических анальгетиков, противонаркотических и местноанестезирующих средств.

*Ключевые слова:* «тираминный фрагмент», карбонильная группа.

В основе современного подхода к проблеме изыскания эффективных соединений направленного действия лежит поиск определенных фрагментов молекулы с ограниченными конформационными возможностями. Наличие последних, выполняющих функцию «жестких» участков в молекуле субстрата, способствует пространственному соответствию (комплементарности) молекулы к рецепторной системе [16, 25]. На основании существующего в настоящее время представления о субстрат-рецепторном взаимодействии [2, 3, 20, 27, 40, 41, 52, 53, 59, 63, 67], предполагается, что ответственными структурами за реализацию обезболивающего действия наркотических анальгетиков является атом азота, соединенный углеводородной цепью с ароматическим фенильным радикалом [26, 38]. В последние годы было высказано предположение, что эти фрагменты, находящиеся в строго определенной конформации,

участвуют не только в анальгетическом, но и в антагонистическом типе фармакологического действия [6]. Присутствие этих элементов в составе «анестезиофорной» группировки, как полагают, связано с развитием местноанестезирующего [17] и общенаркотизирующего [31] действия.

Исходя из тех же принципов, мы не исключаем, что в субстрат-рецепторном взаимодействии принимает участие и карбонильная группа, отражающая количественное выражение биологического ответа.

При рассмотрении структур некоторых лекарственных средств анальгетического и противонаркотического действия (рис. 1) обращает

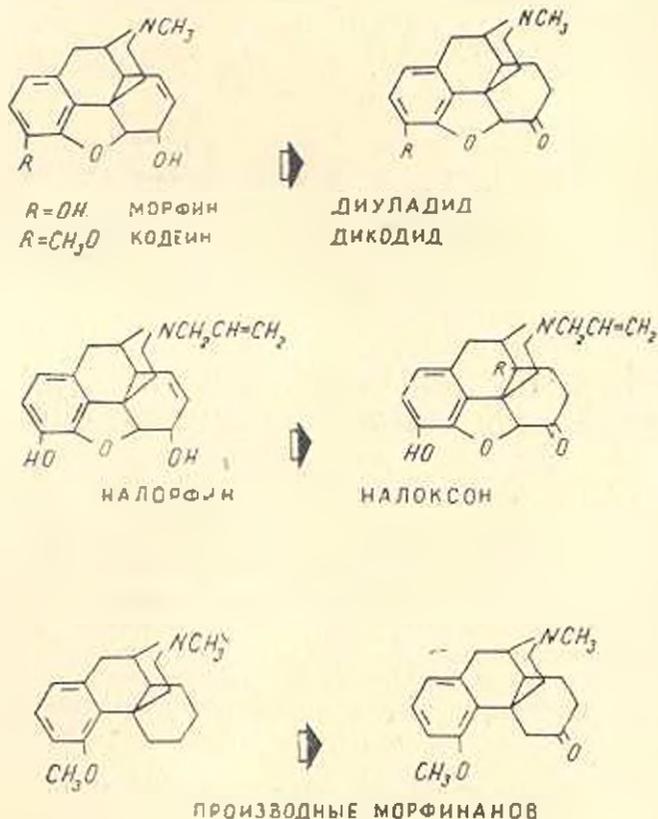


Рис. 1. Сравнительное усиление биологической активности (указано стрелкой) у соединений, содержащих карбонильную группу.

внимание отсутствие карбонильной группы в молекуле морфина, кодеина, налофина, производных морфина. В то же время идентичные по строению химические вещества с карбонильной группой по анальгетической активности превосходят морфин (диуладид), анальгетическому и противокашлевому действию — кодеин (дикодид), противонаркотическому эффекту — налорфин (налоскон), анальгетической активности — соответствующий производный морфина.

При сравнении фармакологической активности морфина и некоторых его модифицированных производных, содержащих карбонильную группу, также выявляется различие количественного характера. Воз-

можно, это одна из причин того, что морфин как анальгетик почти на два порядка уступает в активности обезболивающего действия фентанилу в ряду его производных [4, 8, 22, 35, 49, 69]. К тому же он не обладает высокой местноанестезирующей активностью. Наркотические анальгетики промедол, лидол и другие [14, 15, 19], содержащие в структуре карбонильную группу, отличаются эффективностью местноанестезирующего действия (рис. 2), сохранившейся и у противонаркотического средства налоксона [29, 30].

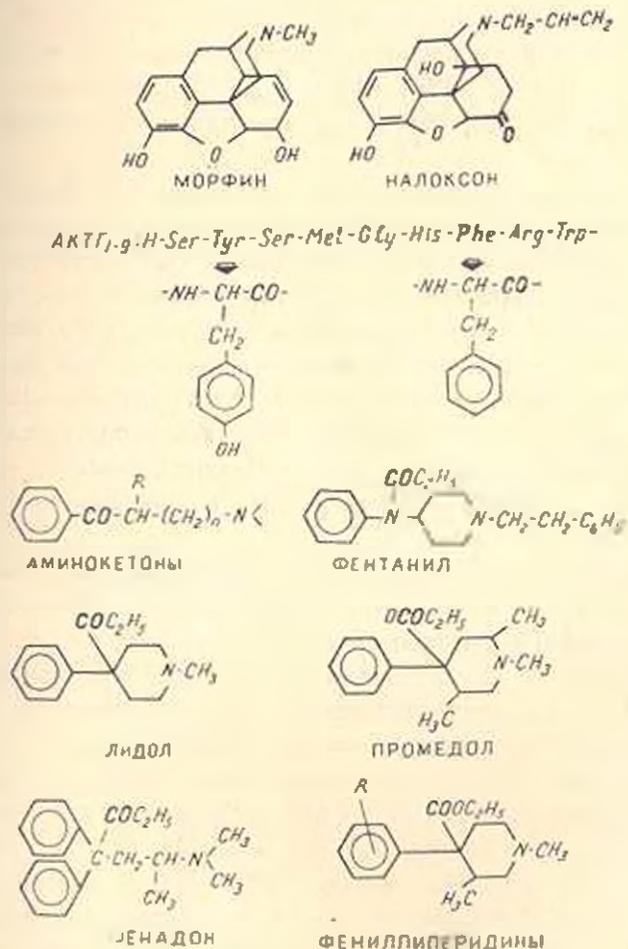


Рис. 2. Химические структуры ряда фармакологических средств. Выделена карбонильная группа.

Возможно, функциональное значение карбонильной группы как вспомогательного фактора во взаимодействии с рецепторной системой проявляется в следующих случаях: анальгетического—7α-аланил—4,5α-эпоксиморфина—6 [42], никоморфина [46], производных 14-арилгидрокси-амин) кодеина [60], некоторых производных морфина [37]; «смешанного», агонист-антагонистического—производных 14-метоксиморфина [34], TR 5109 [36], кодорфина [45] и других [54]; противонаркотического—S-20682 [32], калтрексона. Ряд произ-

водных бензодиазепинов, обладающих опиоидной активностью—тифлюдом, флюнитрозелам [39, 50, 58]—также содержат карбонильную группу. Некоторые фармакологические анализаторы, обладающие определенной афинностью к опиоидной рецепторной системе, имеют в своей структуре карбонильную группу: арилизидо-14-аминоморфинаны [56], феналтрексон ( $\beta$ -FNA) [68], соединение RX 336-M [23], производные 4-минобензенацетамидов [66] и другие [55].

Анализ химических веществ с иной организацией структурных элементов в молекуле, как, например, в классе пептидов, показал, что установленная здесь аналгетическая активность [28, 33, 64], возможно, связана с присутствием в молекуле «тираминового фрагмента». Некоторые участки АКГГ<sub>2-3</sub> [70], АКГГ<sub>1-21</sub> [21], соединение с дивалентным заместителем [61, 65] обладают противонаркотической активностью.

Далее, в классе аминокетонов, соединений с широким спектром фармакологического, в том числе и местноанестезирующего [12], действия выявлена высокая аналгетическая активность—фенадон [11]. Сочетание в структуре соединений «тираминового фрагмента» и карбонильной группы, с одной стороны, а также наличие местноанестезирующих и аналгетизирующих свойств—с другой, позволили предположить, а в дальнейшем и выявить у них противонаркотическую активность [1]. Такой подход позволит изыскать биологически активные соединения аналгетического, противонаркотического и местноанестезирующего типа действия, применяемые в анестезиологической практике.

Как справедливо отмечалось [18], не всегда может быть правильным суждение о функциональной пригодности тех или иных фрагментов, обеспечивающих высокое сродство к рецепторной системе, только по исходным химическим элементам молекулы. Необходимы глубокие знания о взаимодействии субстрата с растворителем, энзимами и тканями организма, позволяющие конкретизировать наше представление о достижении субстратом клетки-мишени с рецепторной системой и образовании необходимых для «фармакофора» связей—водородных, электростатических, ионных и т. п. [5, 9, 24, 44, 48, 51]. Тем не менее лежащий в основе фундаментальных исследований способ «фрагментирования кодирования» [10] в состоянии в определенной мере прогнозировать наши возможности при создании новых биологически активных соединений.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Минджоян,  
АН Армянской ССР

Получено 13.VII 1984 г.

ԿԻՆՈՒՐԱՆՈՐԻՆ, ԱՅՏԻՎ, ԻՐԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՍԱՀՄԱՆՈՒՄԸ ԱՆԳԱՅԱՑՄԱՆ ՊՐԱԿՏԻԿԱՅԻ ՀԱՄԱՐ

Է. Վ. ՎԱՍԵՆՅՈՒ

Հոդվածում բերված են բնդհանրացնող աղյուսներ ֆենիլային խմբի և ազոտի ատոմի դերի մասին, որոնք պատասխանատու են նարկոտիկ անալգե-

տիկների, օպիոիդների հակադդիչների և տեղային անզգայացնող միացությունների դեղաբանական ազդեցության համար:

Ծնթադրություն է արված կարբոնիլ խմբի (CO) մասնակցության մասին՝ որպես օգնող մասնիկ սուբստրատ-ռեցեպտորային փոխազդեցության մեջ. նրա մոլեկուլի կազմում ֆենիլային, կարբոնիլային խմբերի և ազոտի առումի ենթմոծուժը կարող է ծառայել որպես նախադրյալ ուղղված ազդեցությամբ էնեսարանորեն ակտիվ նյութերի ստեղծման համար:

## CONSTRUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMBINATIONS FOR ANESTHESIOLOGICAL PRACTICE

E. V. VLASSENKO

The review data mentioned in the paper point out the role of the phenyl group and of the nitrogen atom as being responsible for the pharmacological effect of narcotic analgesics, narcotic analgesics antagonists and local anesthetics. The participation of the carbonyl group as an auxiliary fragment in the substrate-receptor interaction is suggested. The introduction of phenyl and carbonyl groups and of a nitrogen atom in the molecule can serve as a prerequisite in the creation of biologically active compounds of a directed action.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асхабабян А. Г., Геворгян Г. А., Дургарян Л. К., Власенко Э. В., Асхабабян Р. В., Тер-Захарян Ю. Э., Туманян А. Е., Акопян Н. А., Миджоян О. Л. Хим.-фарм. ж., 6, 691—697, 1984.
2. Белла Д. Д., Катанчи Ф., Сасси А. Эндорфины. 270—276, М., 1981.
3. Болен Э. Э. Рецепторы клеточных мембран для лекарств и ядов. Междисциплинарный подход. 142—166, М., 1983.
4. Булагин В. М. Итоги науки и техники, 13, 101—184, 1982.
5. Вартамян М. Е., Лидерман Р. Р. Ж. неврол. и психиатр., 21, 519—529, 1978.
6. Вартамян Р. С. Арм. хим. ж., 3, 192—194, 1982.
7. Дойсон Г., Мей П. Химия синтетических лекарственных веществ, 69—89, М., 1964.
8. Дарбинян Т. М. Нейролептанальгезия, 3—11, М., 1969.
9. Дашевский В. Г. Хим.-фарм. ж., 6, 21—34, 1981.
10. Закусов В. В., Яснецов В. В. Фармакол. и токсикол., 1, 5—8, М., 1983.
11. Кругликова-Львова Р. Н. Мед. пром. СССР, 3, 38, 1956.
12. Кудрин А. Н., Воробьев В. Г. Амниокетоны, 99—148, М., 1970.
13. Ландау М. Ф. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. 106—125, М., 1981.
14. Машковский М. Д., Ищенко В. Н. Фармакол. и токсикол., 4, 11—13, 1952.
15. Мошер Г. Гетероциклические соединения. 480—528, М., 1953.
16. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. Н. Конформации пептидных биорегуляторов. 62—61, М., 1983.
17. Преображенский П. А., Гечкин Э. Н. Химия лекарственных веществ. 183—190, М., 1953.
18. Раевский О. А., Лукьянов Н. В., Мартынов И. В. Хим.-фарм. ж., 12, 1472—1476, 1983.
19. Созина М. Г. Фармакол. и токсикол., 1, 3—5, 1918.
20. Ariens E. J. Bull. et mem. Acad. Belg., 136, 1, 91—105, 1981.
21. Bertolini A., Poggioli R., Castelli M., Genedani S. Riv. farmacol. e ter., 10, 1, 85—94, 1979.

22. Van Bever W. F. M., Niemegeers C. J. E., Schellekens K. H. L., Janssen P. A. J. *Arzneim.-Forsch.*, 26, 6, 1548-1551, 1976.
23. Cowan A. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 40, 5, 1497-1501, 1981.
24. Dennis S. G. *Prog. Neuropsychopharmacol.*, 3, 2, 11-122, 1980.
25. Duax W. L., Smith G. D., Griffin J. F., Portoghese P. S. *Science* 220, 4385, 417-418, 1983.
26. Eddy N. B., May E. L. *Science*, 181, 4098, 407-417, 1973.
27. Feinberg A. P., Creese I., Snyder S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 11, 4215-4219, 1976.
28. Fournie-Zalusk M. C., Gucel G., Matigret B., Premilat S., Roques B. P. *Mol. Pharmacol.*, 29, 3, 484-491, 1981.
29. Frank G. B. *Arch. int. pharmacodyn. et ther.*, 217, 1, 4-17, 1975.
30. Frank G. B., Meruaha J. J. *Pharmacol. and exp. therap.*, 209, 3, 382-388, 1979.
31. Frank L. S. *Perspect. Biol. and med.*, 25, 2, 322-331, 1982.
32. Frege E., Hartung E., Schenk G. K. *Pharmacology*, 26, 2, 110-116, 1983.
33. Fukui K., Shiomi H., Takagi H., Hayashi K., Kiso Y., Kitayama K. *Neuropharmacol.*, 22, 2, 191-196, 1983.
34. Ghosh A. C., Lavote R. L., Herlthy P., Howes J. F., Razdan R. K. *NIDA Res. Monogr. (pub. 1982)*, 41, 105-111, 1981.
35. Haigh J. C., Lee L. J., Schwelnsburg R. F. *J. wildl. Dis.*, 19, 2, 140-144, 1983.
36. Howes J. F., Osgood P. F., Razdan R. K., Moreno F., Castro F., Villareal J. *NIDA Res. Monogr.*, 27, 90-105, 1979.
37. Jacobson A. E., Schmidhammer H., Hsu E. L., Rozwadowska M. D., Atwell L., Brosil A., Aceto M. D., Harris L. S., Katz J. L. *et al.* *NIDA Res. Monogr. (pub. 1982)*, 41, 86-92, 1981.
38. Janssen P. A. J. *Narcotic Antagonists*, 109-111, 1974.
39. Kley H., Scheidemann U., Bering B., Müller W. E. *Eur. J. Pharmacol.*, 87, 4, 503-504, 1983.
40. Knoll J. *Opiate receptors and neurochemical correlates of pain*, 3-13, Budapest, 1979.
41. Kobylecki R. J., Carling R. W., Lord J. A. H., Smith C. F. C., Rane A. C. *J. Med. Chem.*, 25, 2, 116-120, 1982.
42. Kotte M. P., Leland L. L., Polozzi J. O., Howes J. F., Basquet A. R. *J. Med. Chem.*, 24, 12, 1445-1450, 1981.
43. Kramer M., Kling D., Walter P., Bormann B., Hempelmann G. *Anaesthesist*, 32, 6, 265-271, 1983.
44. Lee N. M., Smith A. P. *Life Sci.*, 26, 18, 1459-1464, 1980.
45. Lelling J. L., Evans J. V., Helms P. J., Everson B. A. *Drug. metal. Dispos.*, 19, 6, 642-653, 1982.
46. Lohbezon M. W., Van Rooy H. H., Van Wylnguarden J., Sordijn W. *Eur. J. Pharmacol.*, 82, 3-4, 207-211, 1982.
47. Loew G. H., Burt S. K., Hashimoto G. M. *NIDA Res. Monogr.*, 34, 399-405, 1980.
48. Morre M., Botgegrain R., Ranceel R. *Biomed. et pharmacother.*, 26, 6-7, 282-285, 1982.
49. Niemegeers C. J. E., Schellekens K. H. L., Van Bever W. F. M., Janssen P. A. J. *Arzneim.-Forsch.*, 26, 8, 1551-1556, 1976.
50. Perez R., Silva P. *Arch. Med. Veat.*, 14, 1, 17-22, 1982.
51. Pert C. B., Snyder S. H. *Science*, 179, 4077, 1011-1014, 1973.
52. Pfeiffer A., Herz A. *Life Sci.*, 31, 12-13, 1355-1358, 1982.
53. Portoghese P. S. *J. Med. Chem.*, 8, 5, 609-615, 1965.
54. Portoghese P. S., Larson D. L., Sayre L. M., Fries D. S., Takemori A. E. *J. Med. Chem.*, 23, 3, 233-234, 1980.
55. Portoghese P. S., Ronstsvolle G., Larson D. L., Yim C. B., Sayre L. M., Takemori A. E. *Life Sci.*, 31, 12-13, 1263-1286, 1982.
56. Rance M. J., Kobylecki P. J., Lane A. C., Haldgate M. J., Burnard E. A. *Adv. Enclog. Exog. Opioids, Proc. Int. Nat. Res., Conf.*, 12th, 408-410, 1981.
57. Robinson F. M. In: *Narcotic Antagonists*, 21-31, 1974.

58. Roemer D., Buesscher H. H., Hill R. C., Maurer R., Peichor T. J., Zeugner H., Benson W., Fluner E., Milkowski W., Thies P. W. *Nature*, 298, 5876, 759-760, 1982.
59. Sawynok J., Penky C., LaBella F. C. *Life Sci.*, 25, 19, 1621-1638, 1979.
60. Schwab L. S. *J. Med. Chem.*, 23, 6, 698-702, 1980.
61. Shaw J. S., Miller L., Turubull M. J., Gormley J. J., Morley J. S. *Life Sci.*, 31, 12-13, 1259-1262, 1982.
62. Simon E. J. 7th Congr. Pharmacol., 613, Paris, 1978.
63. Simon E. J. *Life Sci.*, 16, 12, 1795-1800, 1975.
64. Snyder S. H. *Scientific American*, T-3, 9, 1813, 4-56, 1977.
65. Sormley J. J., Morley J. S., Priestley T., Shaw J. S., Turubull M. J., Wheeler H. *Life Sci.*, 31, 12-13, 1263-1266, 1982.
66. Szmuszkowicz J., Van Voigtlander P. F. *J. Med. Chem.*, 25, 10, 1125-1126, 1982.
67. Takemori A. E., Ohu T., Nishiyama N. *J. Pharmacol. exp. therap.*, 180, 2, 261-265, 1973.
68. Ward S. J., Portoghese P. S., Takemori A. E. *Adv. Endog. Opioids, Proc. Int. Max. Res. Conf.*, 12th, 229-231, 1981.
69. Vinogradova N. D., Kuznetsov S. V., Monastenkova S. F., Predtchinskii M. B., Chigareva S. W. USSR SU 990.759, Otkrytiya, Izobret., Prom. Obroztisy, Tovarynye Znaki, 3, 109, 1983.
70. Zakusov V. V. in: Opiate receptors and neurochemical correlates of pain, 109-114. Budapest, 1979.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 579.262

## ФИЗИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ РАПОН *argECBH* ХРОМОСОМЫ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Н. Л. МЕТТ, А. В. КОЧИКЯН, А. Л. МЕТТ, М. З. АСТВАЦАТРЯН,  
В. А. САКАНЯН

Осуществлено молекулярное клонирование генов *argECBH* *E. coli* K-12 на векторе pBR322. Построена рестрикционная карта плазмиды pALM1, несущей *Bam*HI-фрагмент со всеми генами биполярного оперона *argECBH*. С помощью различных рестриктаз получены делеционные мутанты плазмиды pALM1, сохранившие, по крайней мере, ген *argE*. Рекombинантные плазмиды характеризуются многокопийностью, способностью к амплификации и стабильностью в клетках *E. coli*. Отмечен «эффект дозы гена» по активности N-ацетилаорнитин деацетилазы (продукт гена *argE*) в экстрактах штамма *E. coli*, несущего рекомбинантную плазмиду.

*Ключевые слова:* гены *argECBH*, молекулярное клонирование, рестрикционная карта.

Аргининовый регулон *Escherichia coli* K-12 состоит из 10 генов, расположенных в разных местах хромосомы. Четыре гена представлены в виде биполярного оперона *argECBH*, в котором транскрипция генов *argE* и *argCBH* идет в противоположных направлениях с перекрывающегося регуляторного участка ДНК [4]. Транскрипция этих генов находится под контролем репрессора, кодируемого геном *argR*. В регу-

ляции оперона *argECBII* аргинин выступает в качестве корепрессора [2].

Нами осуществлено молекулярное клонирование генов *argECBII* *E. coli* K-12. Скопструированные рекомбинантные плазмиды представляют собой удобное средство для изучения структурной и функциональной организации генов биполярного оперона *argECBII*.

*Материал и методика.* В работе использовали прототрофный штамм *E. coli* K-12, а также аукоотрофные штаммы *E. coli* K-12 MA 102 (*prc<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> thr<sup>-</sup> his<sup>-</sup> argE<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> L recA*) и MA 105 (*pur<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> argII recA*).

Измерение активности *N*-ацетилорнитин деацетилазы проводили согласно описанной методике [5]. Генно-инженерные методики также описаны [3].

ДНК-лигаза фазы T4, рестриктазы *Sal*I и *Bgl*II получены из Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, г. Пущино-на-Оке; рестриктазы *Hind*III, *Xba*I, *Xho*I, *Kpn*I, *Pvu*II, *Eco*R1 из ВНИИ прикладной микробиологии, г. Вильнюс.

Рестриктазы *Bam*HI, *Sau*3A и *Pst*I выделены в нашей лаборатории по общепринятым методикам.

*Результаты и обсуждение.* Клонирование генов *argECBII* *E. coli* K-12. Расщепленную рестриктазой *Bam*HI или *Eco*R1 хромосомную ДНК, выделенную из прототрофного штамма *E. coli* K-12, сшивали с помощью лигазы с вектором pBR322, расщепленным теми же рестриктазами. Лигированной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* K-12 MA 102. Трансформанты отбирали на минимальной селективной среде без аргинина и в присутствии ампициллина (Ар, 50 мкг/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл).

В каждом из опытов по клонированию было получено несколько трансформантов. Плазмидные ДНК из всех *Arg<sup>-</sup> Ar<sup>+</sup>* клонов характеризовались большим молекулярным весом, чем ДНК вектора pBR322. При перетрансформации штамма *E. coli* K-12 MA 102 плазмидной ДНК приблизительно с одинаково высокой частотой ( $2-6 \cdot 10^5$  трансформантов/мкг ДНК) для всех образцов ДНК возникали *Arg<sup>+</sup> Ar<sup>+</sup>* колонии. Рестрикционный анализ плазмидных ДНК ферментами *Bam*HI или *Eco*R1, использованными для клонирования, подтвердил их рекомбинантную природу.

Размер *Eco*R1-вставок колебался в пределах 18,1—21,6 тысячи пар оснований (т. п. о.) у разных плазмид, а *Bam*HI-вставок—8 т. п. о. Клетки, несущие рекомбинантные плазмиды с *Bam*HI-вставкой, были чувствительны к тетрациклину вследствие инсерционной инактивации *tet* гена вектора pBR322.

Эти данные свидетельствуют о том, что рекомбинантные плазмиды содержат ген *argE*.

Трансформация клеток штамма *E. coli* K-12 MA 105, дефектного по гену *argII*, образцами как *Bam*HI-, так и *Eco*R1-рекомбинантных плазмид также дает высокий выход *Arg<sup>+</sup>*-колоний. Поскольку гены *argE* и *argII* являются дистальными в опероне *argECBII*, можно заключить, что в составе рекомбинантных плазмид отклонирован весь кластер *argECBII* генов.

Для дальнейшей работы использовали одну из рекомбинантных плазмид, несущую *Bam*HI-фрагмент размером 8,0 т. п. о. Эта плаزمид, обозначенная как pALM1, имеет молекулярную длину 12,3 т. п. о.

**Рестрикционное картирование плазмиды pALM1.** Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды pALM1 построена на основании анализа фрагментов, образующихся при расщеплении плазмидной ДНК различными рестриктазами в отдельности и в комбинации друг с другом.

Клонированный BamHI-фрагмент не содержит сайтов расщепления для ферментов XhoI, XmaI, KpnI, EcoRI и PstI, но содержит 1 сайт для BglII, по 2 сайта для HindIII и SalI и 4—5 сайтов для рестриктазы PvuII. Локализация сайтов расщепления ферментами HindIII, SalI и BglII в геноме pALM1 показана на рис. 1.

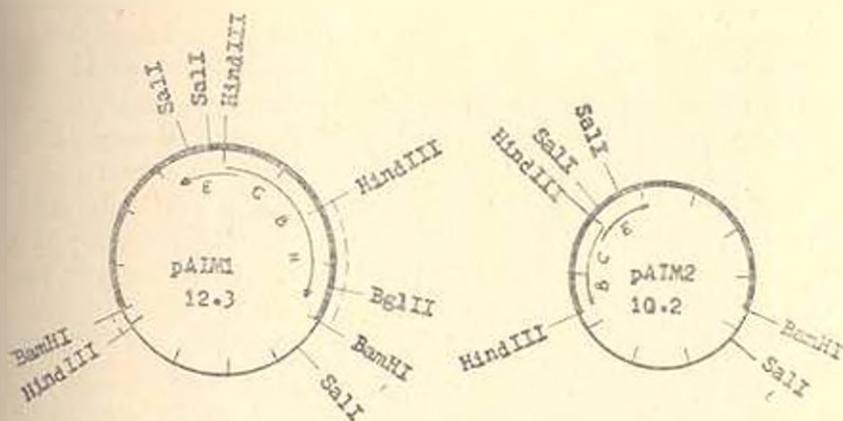


Рис. 1. Рестрикционные карты плазмид pALM1 и pALM2. Тонкой линией обозначена ДНК вектора pBR322, толстой — клонированный BamHI-фрагмент хромосомы, пунктиром — участки, удаленные в геноме pALM2. Стрелками обозначено направление транскрипции генов *argE* и *argCB11* по [4].

**Генерирование делеций в геноме pALM1.** Для удобства последующей работы были получены делеционные мутанты плазмиды pALM1. Один из мутантов генерирован в результате расщепления плазмиды pALM1 одновременно рестриктазами BamHI и HindIII и отбором *Arg*<sup>+</sup> трансформантов в штамме *E. coli* K-12 MA 102. Плазмидные ДНК, выделенные из нескольких десятков *Arg*<sup>+</sup> клонов, имели одинаковый молекулярный вес и характеризовались утратой небольшого HindIII/BamHI-фрагмента (~0,3 т. п. о.) вектора и HindIII/BamHI-фрагмента (~1,8 т. п. о.) исходной вставки (рис. 2). К тому же в геноме таких плазмид изменилась ориентация клонированной вставки. Рестрикционная карта одной из делеционных плазмид, обозначенной pALM2, представлена на рис. 1.

Поскольку *argE*<sup>+</sup>-плазида pALM2 (как и все другие делеционные мутанты) сохраняют смежные BamHI/HindIII-фрагмент (4,0 т. п. о.) и HindIII/HindIII-фрагмент (1,8 т. п. о.), то HindIII-сайт, разделяющий эти два фрагмента, расположен в гене *argE*. Следовательно, плазида pALM2 возникла либо в результате неполного расщепления по сайтам HindIII генома pALM1, либо в результате лигирования двух указанных смежных фрагментов ДНК с восстановлением интактного гена *argE*.

Возможно, ген *argE* инактивируется также в результате расщепле-

ния рестриктазой Sall, так как жизнеспособных ArgE<sup>+</sup> трансформантов не удалось генерировать при одновременной обработке ДНК рALM1 рестриктазами BamHI/Sall.

Чтобы получить более протяженную делецию с сохранением гена argE, ДНК плазмиды рALM1, неполностью расщепленную рестриктазой Sau3A, переклонировали на векторе рBR322 по BamHI-сайту. В результате среди ArgE<sup>+</sup> трансформантов обнаружено несколько делеционных вариантов, сохранивших вставки различной длины. Самая маленькая из этих плазмид, обозначенная рALM3, имеет вставку размером ~2,6 т. п. о.

По данным Бени с соавт. [1], ожидаемый размер биологического клона argECBII составляет около 5 т. п. о. Поскольку величина вставки в геноме рALM3 значительно меньше указанного размера, в нем не должен присутствовать, по крайней мере, ген argII. Аналогично в HindIII-фрагменте (1,8 т. п. о.) плазмиды рALM2 не могут присутствовать все гены оперона. Эти предположения подтверждаются результатами трансформации штамма E. coli K-12 MA 105 плазмидами рALM2 и рALM3. В отличие от плазмиды рALM1 эти делеционные мутанты не дают ArgH<sup>+</sup> трансформантов.

Рекомбинантные плазмиды рALM1 и рALM2 стабильно наследуются в штамме E. coli K-12 MA 102 по прошествии более чем 20 генераций. Все три плазмиды—рALM1, рALM2 и рALM3—характеризуются сравнимой с вектором рBR322 копийностью. Кроме того, они амплифицируются при инкубации клеток с хлорамфениколом. Следовательно, у рекомбинантных плазмид рALM1, рALM2 и рALM3 сохранены репликационные функции исходного вектора.

В экстракте клеток штамма E. coli K-12 MA 102, несущего плазмиду рALM2, активность N-ацетилорнитин деацетилазы (продукт гена argE) приблизительно в 10<sup>7</sup> раз выше, чем в экстракте клеток прототрофного штамма E. coli K-12. Имея в виду многокопийность плазмиды рALM2, повышение активности N-ацетилорнитин деацетилазы может быть объяснено «эффектом дозы гена».

В настоящее время изучается экспрессия генов argECBII оперона в условиях репрессии и дерепрессии и в разном цитоплазматическом окружении.

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, г. Ереван

Получено 16.VII 1981 г.

**E. coli K-12-ի ԳՐՈՒՈՍՈՄԻ argECBII ՇՐՋԱՆԸ ԿԵՐՈՂ ՌԵԿՈՄԻՆԱՆՏ ՊԼԱՉՄԻԳԵՆԵՐԻ ՖԵՂԻԿԱԿԱՆ ՎԵՐՈՒՆԵՐՈՒՅՈՒՆԸ**

Մ. Ա. ՄԵՏՏ, Ա. Վ. ՂՈՅԳՅԱՆ, Ա. Լ. ՄԵՏՏ, Մ. Զ. ԱՍԳԽԱՍԵՐՅԱՆ, Վ. Ա. ՍԱԹԱՆՅԱՆ

*Իրականացված է E. coli K-12-ի argECBII գեների մուդելայրար կոնստրուկտի րBR322 վեկտորի վրա:*

*Կառմված է pALM1 պլազմիդի սեստրիկցիոն բարտեղը: pALM1 պլազմիդը կրում է BamHI հատվածը, որը պարունակում է argECBII կրկնարևև օպերոնի բոլոր գեները:*

Տարբեր ռեստրիկցիոն ֆերմենտների օգնությամբ ստացված են *pALM1* պլազմիդի ղեկցիոն մուտանտներ, որոնց մոտ համենայն դեպս պահպանված է *argE* գենը: *E. coli*-ի բջիջներում ռեկոմբինանտ պլազմիդները առաջացնում են բազմաթիվ պատճեններ, բնութագրվում են ամպլիֆիկացիայի ենթարկվելու փորձանկությամբ և կայունությամբ:

Նկատված է սպինի զոզայի էֆեկտ: ըստ N-ացետիլորնիթին ղենացետիլազայի (*argE* գենի պրոդուկտը) ակտիվության ռեկոմբինանտ պլազմիդը կրող *E. coli* շտամի էքստրակտներում:

## PHYSICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT PLASMIDS CARRYING *argECBH* REGION OF THE CHROMOSOME OF *ESCHERICHIA coli K-12*

I. L. METT, A. V. KOCHIKYAN, A. I. METT, M. Z. ASTVATSATORYAN,  
V. A. SAKANYAN

*ArgECBH* genes of *E. coli K-12* have been cloned on the vector-*pBR322*. Restriction map of the *pALM1* recombinant plasmid, harbouring *BamHI*-fragment (8 kb) with whole bipolar operon *argECBH*, has been constructed. Deletion mutants of *pALM1* plasmid have been generated by different restriction enzymes. The mutant plasmids have retained at least *argE* gene. Recombinant plasmids are multicopy, amplifiable and stable in *E. coli* cells. The strains carrying recombinant plasmids have increased the activity of N-acetylornithine deacetylase, coded by *argE* gene.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Beny G., Cuntin R., Glansdorff N., Boyen A., Charlier J., Kether N. J. Bact., 151, 1, 58, 61, 1982.
2. Cuntin R., Eckhardt T., Plette J., Boyen A., Pierard A., Glansdorff N. Nucl. Acids Res., 11, 15-5007-5019, 1983.
3. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual., Cold Spring Harbor Labor., Cold Spring Harbor, New York, 1982.
4. Plette J., Cuntin R., Boyen A., Charlier D., Crabot M., Van Ytter F., Glansdorff N., Squires C., Squires C. L. Nucl. Acids Res., 10, 24, 8031-8048, 1982.
5. Vogel H. J., McLeilan W. Methods Enzymology, 17A, 255-259, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.2-577.15.0.87

## МЕТОД БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПОСОМ ДЛЯ $\beta$ -D-ГЛЮКОЗЫ

Ц. М. АВАКЯН, С. Я. АДАМЯН, Т. Г. АМБАРЦУМЯН, Ж. А. ОГАНЕСЯН,  
Л. С. ПЕТРОСЯН, А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН

Ключевые слова: липосома, иммобилизованный фермент, глюкоза.

В настоящее время в медицинских и биологических исследованиях интенсивно используются липосомы как для доставки веществ в ткани

организма, так и для моделирования различных свойств клетки [1, 2, 3]. В связи с этим особое значение придается изучению их физико-химических свойств, в частности, проницаемости липосомальной мембраны.

Для тестирования проницаемости липосом выбрана глюкоза—вещество, играющее важную роль в метаболизме клеток. О проницаемости липосомальной мембраны судили по прибыти глюкозы в наружном растворе, обусловленной ее выходом из липосом. Обычно химические методы анализа глюкозы требуют довольно большой затраты времени и, возможно, оказывают влияние на мембраны клеток. Энзиматические методы анализа требуют постоянного расхода высокоочищенных ферментов и кофакторов. От этих недостатков свободен метод определения концентрации глюкозы с использованием иммобилизованных ферментов. При определении проницаемости мембраны липосом для глюкозы в данной работе впервые применена аналитическая система—глюкозиметр, сконструированный в нашей лаборатории [4].

В основе работы глюкозиметра лежит реакция окисления глюкозы с помощью иммобилизованной на силикагеле глюкозооксидазы. О концентрации глюкозы, окисляемой глюкозооксидазой, судили по убыли кислорода, определяемой кислородным мембранным электродом. Измерения проводили в проточном реакторе с вытеснением. Необходимую осмотичность проточающего раствора создавали добавлением сахаразы. Результаты измерений регистрировали в цифровом виде с помощью электронного блока. Время отклика глюкозиметра—30 с. Для получения липосом использовали яичный лецитин харьковского завода Химреактивов. Исходная водно-лецитиновая смесь состояла из 25 мг лецитина на 1 мл триэтанового буфера с 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 400 мг% глюкозы и 10 мМ дезоксиколата натрия. Диспергирование проводили ультразвуком частотой 22 кГц с использованием трубчатого излучателя прибора ХЗДН-1.

Наиболее удобным условием определения выходящего потока глюкозы из липосом по данной методике было бы отсутствие глюкозы в наружном растворе. Однако в процессе освобождения наружного раствора от глюкозы, например, методом гельфильтрации, липосомы теряют ее, и к началу измерения выходящего потока истинная концентрация глюкозы в липосомах оказывается неизвестной. Это затрудняет определение константы выхода глюкозы. Поэтому мы пошли по пути создания градиента концентрации, направленного из липосом в наружную среду. Для этого раствор с липосомами, содержащий 400 мг% глюкозы, развели соевым буфером до 50 мг% глюкозы, а изотоничность раствора создавали добавкой сахаразы. За нулевую точку отчета времени принимали момент разведения раствора и через определенные временные интервалы вводили в проток пробу объемом 70 мкл. В качестве калибровочного раствора использовали соевый буфер с 50 и 100 мг% глюкозы.

Рассчитанный коэффициент проницаемости  $P = 3,5 \cdot 10^{-11}$  м/с (среднее из 40 измерений) является несколько заниженным, так как в такой постановке опыта, строго говоря, измеренный поток является разностным; потоком, направленным внутрь липосом, можно пренебречь из-за сравнительно низкой наружной концентрации глюкозы. Введение поправки на утечку глюкозы из раствора в липосомы увеличивает рассчитанный коэффициент проницаемости всего на  $0,12 \cdot 10^{-11}$  м/с.

Аналогичные опыты по определению потока глюкозы из липосом проводились на спектрофотометре энзиматическим методом [5], позволяющим определять концентрацию глюкозы в растворе. Результаты

полностью совпали с результатами, полученными с помощью глюкозиметра

С помощью глюкозиметра можно определить внутренний объем липосом по количеству захваченной липосомами глюкозы. Для этого через проточный реактор пропускали не изотонический раствор, а дистиллированную воду, что приводило к осмотическому шоку липосом. Калибровочные кривые при изотоническом сахарозном протоке и протоке дистиллированной воды не отличались друг от друга.

Разница между показаниями глюкозиметра до осмотического шока и после него соответствует количеству глюкозы, вышедшей из липосом. Поделив количество глюкозы, вышедшей из липосом в результате осмотического разрушения, на концентрацию глюкозы в липосомах, которая известна, можно вычислить объем липосом, который в данном случае составлял в среднем 10—15%.

Описанный метод быстрого определения глюкозы может быть модифицирован для определения проницаемости не только мембран липосом, но и проницаемости клеток в клеточной суспензии благодаря высокой специфичности метода определения.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР

Получено 25.IV 1983 г.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Биомембраны Структура Функции Медицинские аспекты Рига, 1981.
2. Липосомы в биологических системах М., 1983
3. Липосомы и их взаимодействие с клетками и тканями. Материалы Всесоюзу симп., М., 1981.
4. Сидякин А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э., Абабян Ц. М. Биолог. ж. Армении, 36, 575, 1983
5. Lamprecht W., Trautshold J. In: Methods of Enzymatic Analysis II. Bergmeyer (ed.), N.—J., London, 1963.

*«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985*

#### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

### ВЛИЯНИЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ЧИСЛО СТАДИЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ БЛМ

Г. Р. ХАЧАТРЯН, В. Б. АРАКЕЛЯН, С. А. АДЖЯН

*Ключевые слова: бислойная липидная мембрана, пробой, детергент*

В работах Абидора, Аракеяна и др. [1, 4] было показано, что пробой бислойных липидных мембран (БЛМ) в электрическом поле связан с появлением и развитием дефектов типа скважных гидрофильных пор. Рост этих пор, приводящий к разрушению БЛМ, связан с преодолением энергетического барьера (диффузионная стадия пробоя). Число стадий электрического пробоя БЛМ можно определить из зависимости, приведенной в работе [2]

$$\bar{t} = M \cdot S^{-\frac{1}{m+1}}, \quad (1)$$

где  $\bar{t}$ —среднее время жизни БЛМ,  $S$ —площадь БЛМ,  $m$ —число стадий, дополнительных к диффузионной и  $M$ —независимая от  $S$  константа. Зависимость (1) была использована нами ранее [3], причем было показано, что при относительно высоких потенциалах (500 и 600 мВ) пробой происходит в две стадии. Для выяснения природы второй стадии электрического пробоя БЛМ представлялось целесообразным исследовать влияние детергентов на число стадий пробоя.

**Материал и методики.** БЛМ формировали обычным способом из общих липидов мозга быка, растворенных в *n*-декане. Детергент добавляли как в омывающий мембрану раствор (0,1 М NaCl), так и в рабочий раствор липида, из которого формировались мембраны. В качестве детергента использовали додецилсульфат натрия (ДДС Na), концентрация которого в растворе составляла  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М. Измеряли  $\bar{t}$  мембран, имеющих площадь черной части 0,64, 0,85, 1,32 и 2,41 мм<sup>2</sup>. Число стадий электрического пробоя определяли по углу наклона кривых  $\lg \bar{t} \sim \lg S$  [3].

**Результаты и обсуждение.** Отметим вначале, что способ добавления детергента практически не влиял на полученный результат; при концентрациях детергента  $10^{-3}$  М мембраны сформировать не удавалось.

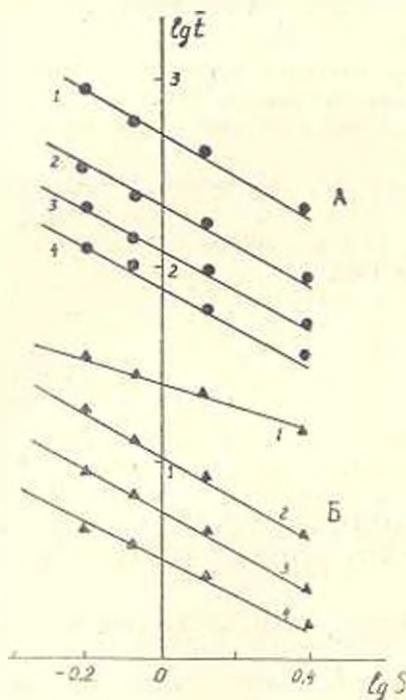


Рис. Зависимость  $\lg \bar{t}$  от  $\lg S$  при потенциалах пробоя 300 и 500 мВ в присутствии ДДС Na. А—300 мВ; В—500 мВ. Цифрами 1, 2, 3, 4 обозначены кривые, соответствующие контролю (0,1 М NaCl и концентрациям ДДС Na  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М, соответственно).

Результаты работы представлены на рисунке, из которого видно, что наклон кривых при 300 мВ не изменяется от концентрации детергента и  $\lg \bar{t}$  равен 1,1; 1,0; 1,02 и 0,98. Поскольку число стадий не может

быть дробным, то  $I_{gf}$  можно принять равным единице для всех четырех кривых. Это означает, что  $m=0$  и процесс определяется диффузионным барьером. Для кривых группы В ситуация иная. Наклон контрольной кривой соответствует двухстадийному процессу, как и было показано в работе [3]. Однако в присутствии ДДС Na наклон кривых изменяется, и пробой происходит в одну стадию—как и при низких потенциалах пробоя. Это означает, что пробой БЛМ в присутствии детергента при высоких потенциалах пробоя переходит из двухстадийного в одностадийный процесс.

Присутствие ДДС Na как бы «убирает» одну из стадий при электрическом пробое БЛМ (500 мВ), что может быть связано как с облегчением рождения дефекта, так и с уменьшением высоты диффузионного барьера.

Ереванский физический институт ГКНАЭ СССР

Поступило 25.X 1981 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф., Тарасевич М. Р., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 240, 733, 1978.
2. Аракелян В. Б. Электрохимия, 16, 218, 1980.
3. Аракелян В. Б., Хачатрян Г. Р., Матинян Н. С. Studia Biophysica, 93, 1, 69, 1983.
4. Abidor I. G., Arakelyan V. B., Pastushenko V. F., Tarasevich M. R., Chernomordik L. V., Chizmadzev Yu. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 6, 218, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352

## ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА АНТИГИСТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

К. Г. АЛАВЕРДЯН, К. Л. ЕРЗИНЬЯН

*Ключевые слова:* антигистаминные препараты, модельные мембраны, трансмембранный перенос.

Общепринятым методом лечения заболеваний, связанных с повышением концентрации свободного гистамина в плазме крови и тканевых жидкостях, является применение антигистаминных препаратов. Однако есть основания полагать, что некоторые особенности действия антигистаминных препаратов обусловлены их способностью высвобождать гистамин [1, 2]. Предполагается также, что действие этих препаратов обусловлено изменением проницаемости клеточных мембран [3].

В связи с этим представляло интерес изучение влияния антигистаминных препаратов на модельные мембраны, выявление возможности

их диффузии через нее и, в конечном итоге, сопоставление полученных результатов с данными об их гистаминвысвобождающей активности.

**Материал и методика.** В качестве антигистаминных препаратов использовали дипразин, аминазин, супрастин и димедрол в концентрациях от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  М. Кроме того, в экспериментах использовали метиленовый синий в тех же концентрациях, хотя он и не обладает антигистаминной активностью, но является гистаминвысвобождающим агентом и относится к ряду фенотиазиновых производных, как, например, дипразин и аминазин.

Измерения сопротивления проводили на бислойных мембранах, сформированных из общих фосфолипидов мозга крупного рогатого скота по методу Мюллера [4], в концентрации 50 мг/мл в и-декаде. В качестве фоновых растворов электролитов использовали 0,1 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 М  $\text{KCl}$  и 0,005 М  $\text{MgCl}_2$ . Сопротивление бислой во всех фоновых растворах составляло  $1,0 \cdot 10^{-9}$  Ом $^{-1}$ ·см $^{-2}$ . Трансмембранное напряжение равнялось 50 мВ. Ошибка при измерениях была равна 15–20%.

Эксперименты по изучению трансмембранного переноса антигистаминных препаратов проводили путем фиксирования трансмембранного потенциала при 10-кратном градиенте концентраций исследуемого препарата в присутствии 0,005 М  $\text{MgCl}_2$  по обе стороны мембраны. Использовали фосфатный буфер (рН 6,8). Все исследования проводили при температуре 22°.

**Результаты и обсуждение.** Результаты измерения сопротивления модельных мембран показали, что дипразин, аминазин и метиленовый синий в концентрациях от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  М являются модификаторами проводимости бислойных липидных мембран. При этом характерно, что стационарные значения модифицированной проводимости были практически недостижимы. Супрастин и димедрол вплоть до концентрации  $10^{-3}$  М не обладали указанным свойством.

Измерения трансмембранного потенциала показали (табл.), что 10-кратный градиент концентраций дипразина, аминазина и метилено-

Таблица  
Результаты измерений трансмембранного напряжения на модельных мембранах при 10-кратном градиенте концентраций исследуемых соединений

Вещество	Концентрация вещества по одну сторону мембраны, М	Концентрация вещества по другую сторону мембраны, М	Трансмембранная разность потенциалов, мВ
Дипразин	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	30
Аминазин	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$	35
Метиленовый синий	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$	30
Супрастин	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	—
Димедрол	$6,8 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-5}$	—

вого синего создает разность потенциалов порядка 30–35 мВ. Положительный заряд был на электроде, погруженном в раствор с более высокой концентрацией препарата. Супрастин и димедрол в том же интервале не вызывали изменений трансмембранного потенциала.

Для изучения трансмембранного переноса антигистаминных препаратов нами специально были выбраны значения концентраций, при которых данные соединения вызывают высвобождение гистамина [1].

Учитывая высокую поверхностную активность производных фено-

твaziнового ряда, а также практическую недостижимость стационарных значений проводимости, можно предположить, что данные соединения понижают сопротивление мембран по механизму, характерному для поверхностно активных веществ.

Полученные результаты при 10-кратном градиенте концентраций свидетельствуют о том, что дипразин, аминазин и метиленовый синий диффундируют через мембрану, в то время как супрастин и димедрол этим свойством не обладают.

Сопоставляя результаты проведенных исследований с литературными данными [1], мы пришли к заключению, что антигистаминные препараты, способные диффундировать через клеточные мембраны, являются гистаминвысвобождающими агентами. Этим свойством, в частности, обладают соединения фенотиазинового ряда, представителями которого являются дипразин и аминазин.

Сектор радиобиологии МЗ Армянской ССР

Поступило 13.VII 1981 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гущин Н. С., Дерюгин И. Я., Каминка М. Э. Бюлл. эксперим. биол., 3, 329, 1978.
2. Lichtenstein L. M., Gillespie E. J. Pharmacol. exp. Ther., 192, 441, 1975.
3. Frisk-Holmberg M. Acta physiol. scand., 84, 376, 36, 1972.
4. Mueller R., Rudin D. et al. Phys. Chem., 67, 531, 1-63.

«Биолог. ж. Армения», т XXXVIII, № 1, 1985

### РЕФЕРАТЫ

УДК 576.8.576.24

## ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МУТАНТНЫХ ФОРМ СОИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ И ХИМИЧЕСКИМИ МУТАГЕНАМИ

МАП КУАНГ ВИНЬ, ФАН ФАП

Работа посвящена характеристике некоторых хозяйственно-ценных мутантов сои, индуцированных у двух местных сортов Северного Вьетнама Кек-чэм и Куанг-хоа рентгеновскими лучами в дозах 15, 18 и 20 кР и химическими мутагенами НММ, НДММ и ЭИ в концентрациях 0,01, 0,06 и 0,08% при экспозиции 6 часов. Мутанты выведены в  $M_2$ , а подробному анализу подверглись в  $M_1$  и  $M_5$  поколениях, полученных при двух посевах—весеннем и летне-осеннем.

Доказана возможность устранения ряда основных недостатков местных сортов сои: низкорослости, малобобовости, полегаяемости, позднеспелости. Создана богатая коллекция мутантных форм с улучшенными

ми ценными свойствами: иммунитет, высокоустойчивость, высокоадаптивность к неблагоприятным условиям региона возделывания. В работе приводятся данные предварительного производственного испытания некоторых ценных мутантов. Дальнейший целенаправленный отбор перечисленных мутантов позволит выделить для внедрения в сельскохозяйственное производство многих районов Северного Вьетнама константные и хозяйственно-ценные образцы этой очень важной для страны культуры.

8 с., табл. 1, библиогр. 9 назв.

Ереванский государственный университет,  
кафедра генетики и цитологии

Поступило 5.XI 1984 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ.

*«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1985*

ХРОНИКА

## I РЕСПУБЛИКАНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Межведомственным научно-техническим советом по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии при Президиуме АН АрмССР 12—13 декабря 1984 г. была организована I республиканская конференция по физико-химической биологии и биотехнологии, посвященная вопросам производства кормов, физиологически активных соединений и пищевых продуктов.

Со вступительным словом конференцию открыл президент Академии наук Армянской ССР академик В. А. Амбарцумян, отметивший достижения и перспективы физико-химической биологии и биотехнологии и особое значение их для такой малоземельной республики, как Армения. В республике создан известный научно-технический потенциал и заложены основы развития биотехнологических производств. Сегодня в Армении производятся аминокислоты, витамины, антибиотики, многовековые традиции имеют виноделие, пивоварение, сыроделие и т. д. Президент указал на большую наукоемкость биотехнологических производств, требующую ускоренного и опережающего развития научного потенциала в этой области. Академик В. А. Амбарцумян с удовлетворением отметил, что первая республиканская конференция посвящена таким важным для Продовольственной программы СССР вопросам, как производство пищевых продуктов, кормов и физиологически активных соединений.

На пленарных заседаниях было заслушано девять докладов, отражавших тенденцию и развитие различных областей биотехнологии. На конференции было представлено также около двадцати стендовых сообщений.

Наибольшее число работ, как и следовало ожидать, касалось вопросов кормопроизводства. Этой теме была посвящена половина заслушанных пленарных докладов.

В докладе Э. Г. Африкян («Современное состояние проблемы микробиологического производства кормового белка») были обобщены состояние и перспективы работы по получению кормовых и пищевых продуктов прежде всего на возобновляемом сырье. Дано обоснование организации в Армении производства белка одноклеточных в целях обогащения растительных кормов. Особое место в докладе было уделено вопросам получения белково-витаминных концентратов с использованием фотосинтезирующих микроорганизмов и метанового брожения. Во второй части доклада рассматри-

Важный вопрос о возможности обогащения крахмалистых продуктов белком амилотических дрожжей с получением белково-витаминных кормовых добавок, применение которых в птицеводстве показало их высокую эффективность.

В докладе М. Г. Оганесяна («Технологическая стратегия сбалансированного кормопроизводства») рассматривалась совокупность технологических процессов, от которых зависит количество и качество производимых растительных кормов: селекция и земледелие, агротехника, переработка и хранение кормов, и, наконец, технологии скармливания животных. В докладе указывались области наиболее эффективного использования биотехнологических подходов, в частности, селекция зерновых культур и кормовых растений. Особенно детально были обсуждены проблемы биологического обогащения кормов, в том числе технологии прямого микробиологического обогащения (дрожжевание, силосование) и методы балансирования кормов с использованием таких продуктов микробного синтеза, как белки, аминокислоты, витамины, ферменты и др.

В докладе Б. П. Авакяна («Рациональная биотехнология переработки отходов агропромышленного комплекса для использования белковых продуктов в животноводстве») обсуждался вопрос о максимальном использовании отходов агропромышленного комплекса в качестве вторичного сырья для кормопроизводства. С этой точки зрения была дана оценка отходам виноградарства, виноделия, овошесоведства, переработки плодов и др.

В докладе В. А. Петросяна в соавторстве с Г. А. Чухаджияном и С. С. Минцелином («Стабилизация некоторых биологически активных веществ в травяной муке») рассматривался вопрос сохранения биологически активных веществ в кормах и, в частности, возможность применения химических препаратов в этих целях.

Вопросы кормопроизводства и кормопотребления был посвящен и ряд стандартных сообщений. Так, в сообщениях А. М. Караджяна и А. М. Чиркияна, а также Ф. Р. Аракеляна были рассмотрены физиологические, биохимические и пищеварительные особенности у мясных и сельскохозяйственных птиц при использовании природных соединений (цеолитов, бентонитов).

В докладе В. М. Даяна и ряде стандартных сообщений обсуждалась проблема микробиологического производства продуктов для обогащения кормов. В. М. Даяном представлены материалы о развитии микробиологической науки и промышленности в нашей республике за последние 15 лет, состоянии и перспективах развития этой отрасли, охарактеризована выпускаемая ею продукция. В серии стандартных сообщений Е. А. Арзуманова, А. О. Армянджян и М. Г. Оганесяна, В. А. Сакяняна, В. А. Упяняна в соавт. рассмотрены вопросы селекции штаммов-продуцентов и технологии микробиологического производства лизина и других аминокислот.

Два пленарных доклада были посвящены методам биологического удобрения почвы и защиты растений от вредителей сельскохозяйственных культур. В докладе А. П. Налбандяна («Состояние и перспективы получения и применения бактериальных удобрений в Армянской ССР») была показана эффективность бактериального удобрения — интрагина и рассмотрены вопросы получения новых форм этого препарата и перспективы организации его производства в нашей республике.

В докладе Г. Х. Азаряна («Результаты полевых испытаний синтезированных ЦОХ АН АрмССР образцов феромона гроздовой листовертки и перспективы их промышленного применения») были представлены данные о промышленных испытаниях феромонов гроздовой листовертки, синтезированных в Институте органической химии АН АрмССР (группа ученых — Меликян Г. Г., Атанесян К. А., Бадалян Ш. О.) — в своем стандартном сообщении представила данные о синтезе феромонов). Испытания показали высокую эффективность синтетических феромонов и их безвредность для человека и животных.

В другой группе докладов были приведены данные о производстве растений для пищевых, медицинских и технических целей. Особо следует отметить работы, представленные вистигутами ботаники и агрохимических проблем и гидропоники АН АрмССР.

Группа авторов (Денисова И. П., Чарчоглян А. А., Петришев Н. И., Саядян А. С.) в докладе «Культура высших грибов — перспективный продуцент препаратов медицинского назначения и пищевого белка» рассматривает возможность организа-

ции безотходного промышленного производства некоторых съедобных грибов, часть из которых используется в пищевых и кормовых целях, а культуральная жидкость служит источником получения ферментов с тримолитической активностью.

В серии интересных сообщений (С. Х. Мылрапетян, Э. Д. Саркисян, М. К. Назганян, М. А. Бабахациян) описаны технологические процессы получения лекарственных эфиромасличных культур и хны гидропоническим способом. Разработанные технологические процессы отличаются малой трудоемкостью, высокой эффективностью в использовании высококачественного сырья для пищевой, фармацевтической, парфюмерной и мясной промышленности.

Группа сообщений касалась вопросов применения молочнокислых бактерий в различных отраслях народного хозяйства. Было показано, в частности, стимулирующее влияние некоторых биополимеров на молочнокислые бактерии (С. Н. Айрапетян с соавт.), использование концентратов этих бактерий в сыроделии, ветеринарии, медицине, при сплюсовании кормов (Э. Х. Дилванян и Р. С. Курдянян), возможность замены дорогостоящего сычужного фермента дешевым и эффективным препаратом микробного происхождения (Дж. Т. Магакьян с соавт.).

В пленарном докладе А. М. Самвеляна («Хересование вина в непрерывном потоке с применением дубовых клепок и автолизатов дрожжей») описана высокопроизводительная технология получения хересных вин с высокими органолептическими характеристиками поточным методом с использованием дрожжевых автолизатов (в том числе осадков старых хересов) и дубовых клепок взамен дубовых бочек.

В двух сообщениях были представлены данные об антиагрегационной активности более 50 флавоноидов, выделенных из различных растений (Э. А. Амроян, А. Г. Пакосени, Э. С. Габриелян) и способе получения самоклеющихся биодеструктурирующихся полимерных двухслойных пленок, обладающих направленным фармакологическим действием, на основе антибиотиков стрептомицина, линкомицина, мономицина и тетрациклина (Г. А. Чухаджян, Ф. А. Саркисян, С. А. Карапетян, Э. С. Габриелян).

Интересное сообщение об электродах на основе иммобилизованных ферментов было представлено группой авторов из Ереванского физического института (А. Л. Симонян с соавт.). С. Ш. Тер-Казарян представил материалы о систематизации микроорганизмов, которая может облегчить поиски культур-микроорганизмов для биотехнологических нужд, а А. Анянян — об использовании методов аффинной хроматографии для выделения ферментов.

Оценивая работу первой республиканской конференции, с удовлетворением можно отметить широту охвата проблем биотехнологии и тесную связь проводимых исследований с народнохозяйственными проблемами. А сам факт проведения конференции свидетельствует о том, что в республике создан определенный научный и производственный потенциал в области биотехнологии.

М. Г. ОГАНЕСЯН.

