

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
ՀԱՆԴԵՍ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года. Айастан кенсабаханкани андес, vychodit 12 рат и год на армянском и русском языках.

Հայաստանի Կենտրոնական Կադրերի Եռամսյակային Ի. Շարիպյան ՊՈԸ Գիտությունների ակադեմիայի Կադրի և ուսուցում Ի. Կարամանյան իս ուսուցան րում, կենդանականության, ինչպես ասիադ, Էկոնոմիկայի, ժամկետականություն, գենետիկա ի և բնագիտություն և կրթական կենտրոնական այլ քննարկումները վերաբերյալ Կադրեր և ուսուցում և ուսուցում և ուսուցում

«Биографический журнал» Арменки, написанный капитаном Иваном Степановичем Лоповицким из Армянской ССР, представляет собой описание жизни и деятельности автора, его семьи, друзей, знакомых, а также его деятельности в различных областях и учреждениях. В журнале также приводятся различные документы, фотографии и другие материалы, относящиеся к жизни автора и его семьи. Журнал является важным источником информации о жизни и деятельности автора и его семьи.

ՆԱԲԱՐԱՐԱԿԱՆ ՎՊԱՅԻՄ՝ Է. Գ. ԱԳՐԵԿՆԻՆ ԸՊԻՏԵՐ ԿԱՐԱԳԻՐԻ, ԵՄ. ԱՆՆԱՆՈՎ, Դ. Ա. ԱՅԻՆՅԱՆԻ, Զ. Գ. ԲԱԿԿԱՎՈՐՅԱՆԻ, Ա. Շ. ԳԱՅՈՒՅԱՆԻ ԲԱՎՈՐՏԵՐ ԽՈՐՀԱՆՈՒՄԻ, Ժ. Բ. ՀԱՎԻՐՅԱՆԻ, Կ. Ա. ՀԱՆՈՒՄԵՆՅԱՆԻ ԽԱՆՈՒՄԻ ԿԱՐԱՆԱԳԱՆՈՒՄԻ, Ա. Բ. ՀԱՅՈՒՄՆԻՆԻ, Վ. Հ. ՀԱՅՈՒՄՆԻՆԻ, Ա. Հ. ԿՈՍՏԱՆԻՆՈՎՈՎՈՒՆՈՒՄԻ:

Государственные коллегия: А. К. Аронзон, главный редактор, П. М. Ахмедов, И. П. Аветисян, Ж. П. Азарян, Г. С. Арутюнян, заместитель главного редактора, Р. М. Ахмедов, О. Г. Бакалавян, А. Ш. Голестян, зам. главного редактора, В. М. Каленко, К. Г. Карапетян, С. О. Мовсесян.

Ректационный совет: Э. К. Афарян (председатель), Г. Г. Ахмедов, Е. III. Ахмедов, А. Н. Ахмедовский, А. III. Яхьяев, А. III. Габриелян, А. А. Габриелян, А. А. Габриелян, С. К. Карапетян, А. А. Митевский, М. Г. Оганесян, А. Д. Оганесян, К. А. Погосян, А. Я. Тахтаджян, III. А. Хуршудян, М. X. Чайлаханян.

Адрес редакции: 375019, Лепзан, ул. Математик Бирамьяна, 201, кав. 11. Тел.: 8 (01) 97

Editorial address: 32203, Yerevan, Matenadaran Bagramian Avenue 24.

Отчет, внесенный в реестр. № 5. Технический редактор: Лаврова Л. А.

Сдано в набор 11.02.1986 г. Подписано в печать 20.11.1986 г. Бум. № 2, 70×108¹/₈. Вып. 1 печатн. Уч.-изд. 5,25. Стр. 1. Тираж 100 экз. Цена 6,48. Тираж 100 экз. 1985 г. 07/2

Издательство Академии наук Армянской ССР, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г. Типография Издательства АН АрмССР, Ереван-10, пр. Маршала Баграмяна, 24.

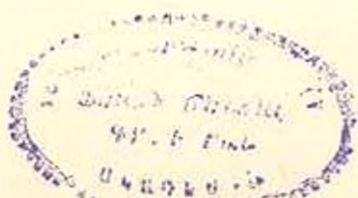
1986, XXXIX, 3

PO-11274401-2013.

Հովհաննիսյան Ս. Ս. Հիվանդանոցային թորչների ֆակտորների ազդեցությունը մկանային սխառմի վրա	191
Տիկունով Բ. Ա. Անատոմիոգենային կոմպլեքսի զարգացման հատկանիշները միջազնայրի տարրեր իոնական ուժերի պայմաններում	196
Մեծանյան Կ. Շ., Սիմոնյան Կ. Վ., Ավստրալան Կ. Մ. Լազերային և իոնիզացիոն ճառագայթների կոմբինացված ազդեցությունը <i>Escherichia coli</i> K-12 բակտերիաների <i>pol A</i> 1- ազդեցության մոտանոտի քիմիայի կենսաոնաություն վրա	200
Մուսոզով Վ. Ն., Մետրյան Ս. Գ. Սպիրտապոզների բյուրեղների մածուցիկ և արածգանյան հատկությունների հետազոտումը զածր ջերմաստիճաններում	203
Անատոնյան Բ. Ա., Լուսուբաչյան Կ. Ս. Նատրիումի զոլեգիլատոֆատի հետ Ca^{2+} (II)- ի կոմպլեքսների փոխազդեցության հետազոտումը էՊՐ և ՄՄՌ մեթոդներով	208
Փյուլսանդանյան Ս. Վ. Ca^{2+} - ի արանսպորտի ուղղության փոփոխությունը էրիթրոցիտներում Ca^{2+} - ի ազդեցության տակ	212
Խաչատրյան Ս. Ժ. X^{2+} - ի կոմպլեքսային առանձնահատկությունները <i>Serratia marcescens</i> - ի մոտ	217
Քոչոնյան Ս. Հ., Տեր-Նիկողոսյան Վ. Ա. Զլայ - ը տարրեր բակտերիաների մոտ	221
Աղաբանյան Ս. Մ. Տ չեզուտի բույսմայելություն մասին	227
Հաբարյունյան Է. Ա., Պաղոսյան Կ. Ս. Լազերի վաղի իմպլանտի փոփոխությունը զածր բազաապակե ջերմաստիճանների ղեպում	233

ឯសាស្ត្របុរាណ គឺជាភូតច្បាស់ណាស់

Այլաշխարհային Լ. Ի., Լեյպցիգ 11. Ա., Կարապետյան Ա. Կ. Երկշերտ ֆուֆոդիպիդաբոնի մեմբրանները լեզերարամեխանիկական կայունության վրա բենզոկախին ազդեցության գործընթացի մեխանիզմը	241
Աղամալյան Ա. Գ. Կալցիումի իոնների ազդեցությունը մարդու լիթիումդիոտների օսմոտիկական ճեմոդիզի կինետիկայի վրա	243
Ղաերամանյան Բ. Ա., Ավալյան Ս. Մ., Ավալյան Ի. Մ. Մինքրոտորոնային ճառագայթման և ունեղենյան ճառագայթների ամոմատական ազդեցությունը Arabidopsis thaliana-ի սերմերի վրա	246
Տեր-Մարգարյան Ա. Ա., Արմաշին Ի. Ս., Շոգենկյան Ի. Ս. Առնետների լյարդի և զբխուղների միոտոքոնդրիոմների ԶԱԴ- և ՆԱԴ- կախյալ ֆունկցիոնալ պարամետրերի ամոմատական բուրեմագիտը ճարվածանաձև զեղծների թերթունկերային մոմանակ	249
Վադենանյան Ա. Հ., Տիրացույան Ս. Ի., Վադենանյան Պ. Հ., Փանոսյան Ի. Հ. Քառա-կան ցուրտաթափումները առնետների լյարդի բրոմատիոնում նրա ալտիմադիայի զեպրում	252
Շոգենկյան Ա. Պ. Մենդային օրարամիկ ազդեցությունը ազոտային փոխանակության որոշ կոմերի վրա ՅՖՊ-դիքթոբուտեոմ-1 խրոնիկական թուխամոման զեպրում	254
Խոգիբալյան Ա. Ա., Աղայան Ա. Ա., Տոսյան Ս. Ի., Օրդյան Վ. Վ. Ատոմոֆերոլի և նատրիումի նուկլեինատի նատուղ ազդեցությունը ճաղարների սրտամկանի կոմոմեմաթիկալային ալտիմոմյան վրա միոկարդի փոքարարական ինֆարկտի զեպրում	256
Չաղյան Ա. Ա., Ղաերբալյան Ս. Տ., Ուգրալյան Լ. Ի. Նի. Քո. Հաղարմ խնյատիների նկարագրացային ալտիմոմյան ուտումատիոնությունը	260



Կեռեղյան Ա. Ս., Սևմեղյան Գ. Ա. Սակավաթարթիչ խնժոցորիաների արգիմագայի իզո- ֆերմենտների որոշ կինետիկական հատկություններ	262
Նարինյան Լ. Ա. Միկրոմեղվարտանիքների ստեղծումը և մեղուների դամբա-հատա- զայթահարումը վարձատրողի դեպքում	262
Գրիգորյան Գ. Ս., Մանուսյան Ա. Վ., Նիկողոսյան Ա. Ն., Կալոյան Պ. Ս., Միսայան Ս. Ն. Տրիմերագիների և սուլֆադիմենտոբինի նկատմամբ հորթերի շնչառական ուղիների միկրոֆլորայի պայտուկային բնորոշումը	263
Սարկիսովա Մ. Մ., Հովհաննիսյան Ի. Ս., Զեբեղյան Ա. Զ. Անի կարգավորիչների ազդե- ցությունը խեժորենու յուվենիլ ծառերի անի ու պաշարերման վրա	264
Հակոբյան Ս. Ս., Հովհաննիսյան Ա. Օ. Նոցիքնպարիզ զգայունների դերը ձայնավորված կեն- դանների հիպոթիկ զգայունության և կայունության համար	265
Նիկողոսյան Գ. Յ., Պետրյան Ի. Ի. Գորաի լլարդի, երկհամանների և զլիսուղեղի 1-ամինա- թիմային օքսիդազայի որոշ հատկություններ	266
Նովիկովսկայան Լ. Մ. Տղաների ստոպենդի պերիպերիտատային էտապի շրջանացումը. յազմակի ստատիստիկ որոշում	267

С О Д Е Р Ж А Н И Е

Ս. Ս. Հովհաննիսյան (ծննդյան 60-ամյակի առթիվ)	268
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Оганесян С. С. Действие факторов космического полета на мышечную систему	191
Тикмюв Б. А. Особенности функционирования актомнозинового комплекса при различных ионных силах среды	196
Восканян К. Ш., Симонян Н. В., Авакян Ц. М. Комбинированное действие лазерного и ионизирующего излучений на выживаемость клеток радиочув- ствительного рол АГ-хуанта бактерий Escherichia coli K-12	200
Морозов В. Н., Геворкян С. Г. Измерение вязкоупругих свойств кристаллов белков при низких температурах	203
Асатурия Р. А., Лусарарян К. С. Исследование взаимодействия комплексов Cu (II)-БСА с додещилсульфатом натрия методами ЭПР и ЯМР	208
Гюльханджян А. В. Изменение направления транспорта Ca^{2+} в эритроцитах под дефектом Ca^{2+}	212
Хачатрян А. Ж. Особенности поглощения K^{+} у <i>Serratia marcescens</i>	21
Трчунян А. А., Тер-Никогосян В. А. ΔH у различных бактерий	221
Агаджанян А. М. О множественных аллелях локуса S	227
Арутюнян Э. А., Погосян К. С. Изменение нипеданса виноградной лозы при низ- ких отрицательных температурах	235

Краткие сообщения

Микаелян Л. Г., Аджян С. А., Карапетян А. К. Физико-химический механизм действия бензокаина на электрохимическую устойчивость бислойных фосфолипидных мембран	241
Агаджанян А. Г. Действие ионов кальция на кинетику осмотического гемолиза эритроцитов человека	243
Каграмнян Р. С., Авакян Ц. М., Аликян Г. М. Сравнительное действие син- хротронного излучения и рентгеновских лучей на покоящиеся семена <i>Agri- bidopsis thaliana</i>	246
Тер-Маркосян А. С., Ацируни Г. Г., Овсепян Р. С. Сравнительная характери- стика параметров ФАД- и НАД-зависимого дыхания в митохондриях пе- чени и головного мозга крыс при гипопункции околотитовидных желез	249
Вардеванян А. О., Тирацун С. Г., Вардеванян П. О., Паносян Г. А. Количе- ственные изменения в хроматине печени крыс при его активации	252
Ерзнкяцян М. П. Влияние пищевого рациона на некоторые стороны азотистого обмена при экспериментальной хронической интоксикации 3,4-дихлорбуте- ном-1	251

Енгисбарян А. А., Агаян А. А., Косян С. А., Ордян В. В. Влияние α -токоферола в комбинации с пукленнатом натрия на активность креатинфосфокиназы в сердечной мышце кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда	256
Чачоян А. А., Гарибджанян Б. Т., Саградян Л. Н. Изучение противоопухолевой активности водорастворимых хелатов Ni, Pd, Cu	260

Рефераты

Леворкян А. С., Семерджян Г. А. Некоторые кинетические свойства изоферментов аргиназы малоресничных инфузорий	262
Наришкян Л. А. Создание пчелиных микросемей и гамма-облучение пчел при варроатозе	262
Григорян Г. С., Манасян А. В., Нишогосян А. Н., Галоян П. С., Минасян С. Н. Определение чувствительности микрофлоры дыхательных путей телят к тримеразину и сульфадиметоксину	263
Саркисова М. М., Оганесян Р. С., Джереджан А. З. Влияние ретардантов на рост и плодоношение ювенильных деревьев яблони	264
Акопян С. А., Оганесян А. О. Роль поведенческой эмоции в гипоксической чувствительности и устойчивости озвученных животных	265
Нишогосян Ф. Ц., Петян Р. Р. Некоторые свойства L-аминокислотной оксидазы печени, почек и мозга лягушки	266
Епископосян Л. М. Периодизация перипубертатного этапа онтогенеза мальчиков: многомерное статистическое решение	267

Хроника

С. С. Оганесян (к 60-летию со дня рождения)	268
---	-----

CONTENTS

Oganessyan S. S. Effect of Cosmic Flight Factors on the Muscle System	191
Tikunov B. A. Peculiarities of Actomyosin Complex Functioning under Various Ionic Strengths of Medium	196
Voskanyan K. Sh., Stimonyan N. V., Avakyan Ts. M. Combined Effect of Laser and Ionizing Radiations on Survival of <i>Escherichia coli</i> K-12 Bacteria Cells of Radiosensitive Pol A1 ⁻ Mutant	200
Morozov V. N., Gevorgian S. G. Measuring of Viscoelastic Properties of Protein Crystals in Low Temperatures	203
Asaturyan R. A., Lusararyan K. S. Investigation of Interaction of Cu (II) BSA Complexes with Sodium Dodecyl Sulphate by EPR and NMR Methods	208
Gyulkhandanyan A. V. Change in Direction of H ⁺ Transport in Erythrocytes Affected by Ca ²⁺	212
Khachatryan A. G. Specificities of K ⁺ Accumulation by <i>Serratia marcescens</i>	217
Trehounian A. A., Ter-Nikogossian V. A. ΣH_2O_2 in Different Bacteria	221
Aghadjanian A. M. On the Multiple Alleles of S Locus	227
Harutunian E. A., Poghosian K. S. Change of Grape-Vine Impedance in Low Negative Temperatures	235

Short Communications

Mikaellian L. G., Ajian S. A., Karapetian A. K. Physico-Chemical Mechanism of Benzokain Action on Electromechanical Stability of Bilayer Phospholipid Membranes	241
Agamallan A. G. Influence of Calcium Ions on the Kinetics of Osmotic Hemolysis of Human Erythrocytes	243
Kagramantun R. S., Avakian Ts. M., Avakian H. M. Comparative Action of Synchrotron and Roentgen Rays on Dormant Seeds of <i>Arabidopsis thaliana</i>	246

<i>Ter-Markosian A. S., Artzruni G. G., Hovsepian R. S.</i> Comparative Characteristics of the Parameters of FAD- and NAD-Dependent Respiration in the Liver and Brain Mitochondria of the Rats during Hypofunction of Parathyroid Glands	249
<i>Vardevanyan A. O., Tiratsuyan S. G., Vardevanyan P. O., Panosyan G. H.</i> Quantitative Alterations in Rat Liver Chromatin during Its Activation . .	252
<i>Yerznkatsian M. P.</i> Influence of Food Rations on Some Sides of Nitrogen Exchange during Experimental Chronic Intoxication with 3,4-Dichlorine Butene—I	254
<i>Yengibartian A. A., Agayan A. A., Kosian S. A., Ordian V. V.</i> α -Tocopherol Effect in Combination with Sodium Nucleinate on the Creatine Phosphokinase Activity in Cardiac Muscle of Rabbits during Experimental Myocardial Infarction	256
<i>Chucholan A. A., Charibjantian B. T., Sagolun L. I.</i> Study of Antitumour Activity of Ni, Pd, Cu Watersoluble Chelates	260

Abstracts

<i>Gevorgian A. S., Semerjian G. A.</i> Some Kinetic Properties of Less-Eyelashed Infusoria Arginase Isoenzymes	262
<i>Nartmantan L. A.</i> Set-Up of Bee Microfamilies and Gamma-Irradiation of Bees during Varrotoxis	262
<i>Griqorian G. S., Manasian A. V., Nikoghosian A. N., Galoian P. S., Minasian S. N.</i> Determination of Sensitivity of Lambs Respiratory Ways Microflora to Trimerazine and Sulphadimetoxine	263
<i>Sarkisova M. M., Hovhannissian R. S., Jerejian A. Z.</i> Influence of Growth Regulators on the Growth and Fruit-Bearing of Juvenile Apple-Trees . .	264
<i>Hakopian S. A., Hovhannissian A. O.</i> Role of Nociceptive Emotion in Hypoxic Sensitivity and Stability of Sounded Animals	265
<i>Nikogosian F. Ts., Petoyan R. R.</i> Some Properties of L-Amino Acid Oxidases of Frog Liver, Kidneys and Brain	266
<i>Yeplskoposian L. M.</i> Periodization of Peripubertate Stage of Boys Ontogenesis. Multiple Statistic Solution	267

Chronics

<i>S. S. Hovhannissian</i> (to the 60-th Birthday Anniversary)	268
--	-----

УДК 612.744.2:612.744.01:477-063

ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЁТА НА МЫШЕЧНУЮ СИСТЕМУ

С. С. ОГАНЕСЯН

Сопоставлены экспериментальные данные, полученные при исследовании скелетных мышц разного фенотипа в условиях невесомости, а также при моделировании гипергравитационного поля и исключения тонического элемента сокращения в наземных условиях. Обсуждается механизм обратного приспособления мышцы к новому биомеханическому режиму с точки зрения репрограммирования синтеза отдельных компонентов белков миофибрилл и их изоформ в зависимости от морфофункционального профиля мышечного волокна. Выдвигается представление о том, что фактором, лимитирующим степень адаптивных обратимых изменений, является фенотип мышечного волокна.

Համեմատված են տարբեր ֆենոտիպի կմախքային մկանների օստոսնասիրություններից առաջացած փորձարարական սովորյալների անկտենիություն պայմաններում, ինչպես և չիպերգրավիտացիոն դաշտի և կրճատման տոնիկական էլեմենտի բացառությամբ մոդելավորելիս՝ ապրտոնի տոնենտների մոտ: Քննարկվում է մկանների ճնտադարձ փորձարարչույն մեխանիզմը նոր կենսամեխանիկական ուժիմին միոֆիբրիլների և նրանց իզոֆորմների սպրտակուցների առանձին բաղադրամասերի վերափոխողփորձման տեսանկյունից՝ կոխված մկանային բնի մարֆո-ֆունկցիոնալ պրոֆիլից: Առաջ է րադվում ենթադրություն այն մասին, որ սղաղարիվ ճնտադարձ փոփոխությունների աստիճանը սահմանափակող ֆակտոր է՝ հանդիսանում մկանային բնի ֆենոտիպը:

Experimental data, received during the study of skeletal muscles of various phenotype under conditions of weightlessness, as well as during the modelling of hypergravity field and exclusion of the tonic element of contraction under ground conditions, have been compared. The mechanism of reversible adaptive changes to new biomechanical regime from the point of view of reprogramming the synthesis of myofibrillar proteins various components and their isoforms in dependence on the morpho-functional profile of muscle fibre has been discussed. It has been supposed that a factor, limiting the degree of reversible adaptive changes is the phenotype of muscle fibre.

Ключевые слова: космический полет, гипергравитация, мышечные белки.

Одной из важнейших задач космической биологии является выяснение молекулярно-генетических основ приспособления опорно-двигательного аппарата, в частности мышечной системы, к факторам длительного полета. Ввиду того, что физические упражнения на тренажерах у космонавтов требуют больших затрат времени в полете, необходима разработка новых методов и способов тренировки, предполагающая рассмотрение сложных механизмов зависимости состояния сократительного аппарата от механических условий работы мышц разного фенотипа. В этом аспекте большое значение имеет биомеханический

профиль индивидуальных мышечных волокон как регулятор синтеза отдельных изоформ сократительных белков. Особый интерес представляет также изучение обратимости наступающих адаптивных сдвигов и природы информационных сигналов, управляющих репрограммированием фенотипа мышц.

Физико-химические свойства сократительных белков скелетных мышц разного фенотипа (кинетика АТФазной реакции, суперпресципитации актомиозинового комплекса при взаимодействии с АТФ, Са-чувствительность, состав легких и тяжелых полипептидных компонентов миозина, состав компонентов регуляторных белков) исследовали у животных, которые находились на борту космического корабля или в наземных условиях. У последних дефицит тонического компонента создавали путем подвешивания животных за крестец таким образом, чтобы задние конечности отрывались от пола камеры и при передвижении они опирались только на передние конечности [2, 9]. Воздействие фактора ускорения осуществляли путем центрифугирования животных на специальной центрифуге с диаметром ротора 322 см, ежедневно по 30 мин, в течение 15 дней при $+5G$. Вектор ускорения проходил в направлении голова—хвост.

Сравнительный анализ относительного содержания отдельных компонентов миофибриллярных белков и их физико-химических свойств был проведен в быстро- и медленносокращающихся мышцах, которые отличаются по структурно-функциональной характеристике, в том числе по содержанию изоформ сократительных белков [11, 12, 19].

Результаты исследования скелетных мышц белых крыс, экспонированных на борту корабля «Космос-1129», показывают, что в полете происходят значительные изменения в содержании отдельных компонентов макромолекулы миозина, а также в комплексе регуляторных

Таблица. Относительное содержание компонентов регуляторного мышечного белкового комплекса тропомиозин-тропонин после 18,5-суточного полета на корабле «Космос-1129» в отн. %-ах ($M \pm m$). Синхронная группа — животные, находившиеся в макете корабля на земле (средние данные из 5—10 форегрaмм препаратов белков)

Мышцы	Группы животных	Тропомиозин	Тропонин-Т	Тропонин-И	Тропонин-С
Плечевая	Контрольная	46.6 $\pm$ 1.9	11.0 $\pm$ 0.9	21.7 $\pm$ 2.4	17.9 $\pm$ 0.5
	Полетная	62.3 $\pm$ 2.3	8.1 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 2.5	23.0 $\pm$ 1.3
	Реадаптированная	41.4 $\pm$ 1.5	19.5 $\pm$ 0.4	18.3 $\pm$ 1.3	17.6 $\pm$ 1.7
	Синхронная	38.6 $\pm$ 1.8	12.8 $\pm$ 0.1	28.0 $\pm$ 0.6	20.6 $\pm$ 0.6
Медialная головка трехглавой мышцы	Контрольная	52.2 $\pm$ 1.7	12.4 $\pm$ 1.3	10.7 $\pm$ 3.1	13.3 $\pm$ 1.5
	Полетная	65.3 $\pm$ 1.4	4.1 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.7	24.6 $\pm$ 1.5
	Реадаптированная	50.1 $\pm$ 0.6	15.6 $\pm$ 2.0	28.9 $\pm$ 3.4	15.3 $\pm$ 2.3
	Синхронная	50.8 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 2.3
Длинный разгибатель пальцев	Контрольная	51.4 $\pm$ 1.1	10.5 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.3	18.8 $\pm$ 0.8
	Полетная	62.8 $\pm$ 2.2	4.9 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.3	18.9 $\pm$ 1.1
	Реадаптированная	51.9 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.3	16.1 $\pm$ 0.6	18.8 $\pm$ 0.6
	Синхронная	40.8 $\pm$ 0.7	10.5 $\pm$ 0.1	29.7 $\pm$ 0.4	—

белков—тропонина-тропомиозина. Таким образом, были получены дополнительные данные, расширяющие и подтверждающие выводы, сделанные на основании изучения скелетных мышц животных, экспонированных на борту корабля «Космос-605» [4].

Из данных, приведенных в таблице, видно, что при разделении тропомиозин-тропомиозинового комплекса методом электрофореза на ПААГ обнаруживается увеличение в белковом комплексе тропонина-С (Са-связывающего белка) во всех исследованных мышцах, кроме длинного разгибателя пальцев, который характеризуется быстрым сокращением и отсутствием антигравитационной функции. В медленных мышцах наблюдается изменение соотношения всех трех компонентов за счет значительного увеличения содержания именно тропонина-С и тропомиозина. Через месяц после возвращения на Землю в целом восстанавливается относительное содержание почти всех белковых компонентов комплекса. Следовательно, можно говорить об обратимости наступающих в полете под влиянием фактора невесомости адаптивных изменений в составе регуляторных белков. Большие колебания содержания тропонина-Н, возможно, обусловлены появлением дополнительной фракции этого ингибиторного белка в полосе из-за близкого молекулярного веса [1]. В то же время хорошо заметна тенденция к незначительным изменениям в количественном содержании компонентов регуляторных белков в синхронном опыте, что обусловлено гиподинамией при исключении фактора невесомости. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее в других условиях [1, 7].

Результаты определения количественного состава компонентов основного сократительного белка—актомиозина в условиях силовой перегрузки и исключения тонического элемента сокращения скелетных мышц подтвердили возможность адаптивных изменений в содержании тяжелых и легких полипептидных цепей миозина, что согласуется с данными

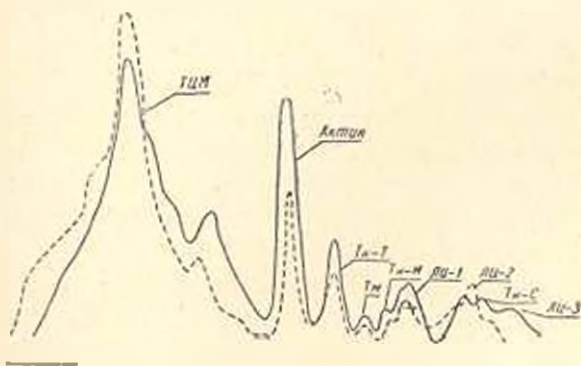


Рис. 1. Денситограмма актомиозина из бедренных мышц белой крысы, разделенного на 10%-ном полиакриламидном геле методом электрофореза в присутствии 0,1% ДСН и 0,1% бета-меркаптоэтанола. Сплошная линия—контрольная группа животных, пунктирная—животные, подвергнутые действию фактора гипергравитации. Обозначения: ТЦМ—тяжелые полипептидные цепи миозина, ТМ—тропомиозин, ТН—тропонин, ТН-И—ингибиторный компонент тропонина, ЛЦ1, ЛЦ2 и ЛЦ3—соответственно первая, вторая и третья легкие цепи миозина, ТН-С—компонент тропонина, связывающий ионы Са.

ми, полученными при изучении препаратов суммарно выделенных миофибриллярных белков животных в условиях космического полета [7, 21]. Из рис. 1 видно, что силовая перегрузка и гипергравитационное поле значительно повышает содержание тяжелых цепей миозина, расположенных в области тяжелого меромиозина, от $40,3 \pm 0,16$ до $60,0 \pm 0,27$ отн. % ($P < 0,001$). Адаптивное снижение второй легкой цепи миозина, по-видимому, вызывает изменения в АТФазной активности актомиозина. Отметим, что идентификацию электрофоретических фракций белков проводили определением их молекулярных весов широко принятым электрофоретическим методом с использованием белок-сенсибилизаторов. Сравнение изменений в содержании отдельных типов легких цепей миозина в быстро- и медленносокращающихся мышцах позволяет допустить, что, во-первых, космический полет обуславливает повышение генетических изоформ миозина, характерных для медленных мышц, а во-вторых — изоформ быстрых мышц, хотя в последних трансформация изоформ протекает медленнее. Следовательно, в космическом полете происходит как бы унификация молекулярной структуры белкового аппарата миофибрилл. Установлено, что сдвиги в содержании компонентов миозина также обратимы и через две—три недели после выхода животных из условий воздействия гипергравитации происходит восстановление исходной картины распределения легких цепей миозина [3]. Это подтверждено также в экспериментах на корабле «Космос-1129» [21]. Сроки восстановления исходных величин отдельных компонентов миофибриллы и в принципе совпадают с периодами полураспада этих белков, т. е. примерно 2 недели.

Возможность белковой трансформации индивидуальных мышечных клеток, отмеченная нами ранее [18], подтверждается сведениями литературы последних лет о существовании генов разных изоформ миозина в индивидуальном мышечном волокне [13, 16]. Важным является тот факт, что указанные гены распределены неравномерно в отдельных типах мышечных волокон [14, 15, 17]. Отсюда видна зависимость адаптивной трансформации белкового состава миофибрилл от количественного соотношения генов, контролирующих синтез отдельных полипептидных цепей и обуславливающих характер мышечного сокращения. В частности, изменения в составе полипептидных цепей, способных реагировать с ионами Ca , определяют взаимодействие активных и миозиновых пинтей в процессе сокращения. Известные три изоформы миозина в разных типах мышц отличаются по чувствительности к Ca^{2+} -АТФазной реакции [16]. Поэтому представляет большой интерес определение кинетических параметров АТФазной реакции и суперприсципитации актомиозина (СПП) в зависимости от концентрации ионов Ca в среде.

Из рис. 2 видно, что силовая перегрузка скелетных мышц при воздействии фактора гипергравитации снижает чувствительность актомиозина к этим ионам, что выражается как в изменении кооперативности реакции с Ca^{2+} , так и увеличении коэффициента Хилла от 1,3 до 1,7. Так как эти различия остаются и после удаления из состава актомиозина регуляторных белков, т. е. тропонина и тропомиозина, допускается

что изменения Са-регулируемости обусловлены адаптивными сдвигами в молекуле миозина, а именно в области активного центра АТФазы на тяжелом меромиозине. Это предположение подтверждается изменением величин максимальной активности АТФазы и константы Михаэлиса. После двухнедельного реадаптационного периода наблюдается восстановление исходного значения ряда кинетических параметров ф.р.

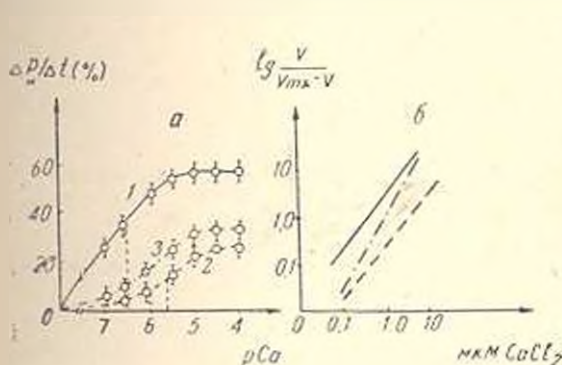


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза АТФ Mg-т.-АТФазой актомиозина от концентрации ионов Са в среде (а). Степень кооперативности АТФазной реакции в координатах Хилла (б). Нативный актомиозин контрольной (1), адаптированной к ускорению (2) и реадаптированной групп животных (3).

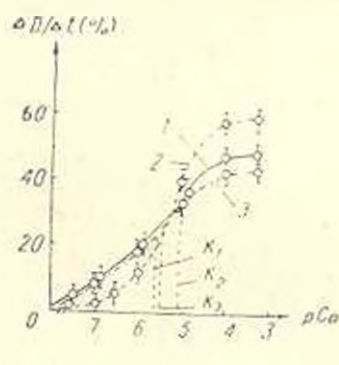


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость скорости суперпреципитации актомиозина от концентрации ионов Са в среде. Обозначения те же, что на рис. 2. K_1 , K_2 и K_3 — концентрации ионов Са, вызывающих полумаксимальный эффект.

ментативной реакции, однако действие ионов Са восстанавливается незначительно. Этот вопрос более подробно изучен и при других формах изменения режима работы скелетных мышц [3, 8].

Из рис. 3 видно, что у адаптированных к силовой перегрузке животных для полумаксимального повышения скорости реакции СПП актомиозина необходимо больше ионов Са, чем для актомиозина контрольной группы животных, причем выявляются изменения в кинетике реакции СПП, особенно актомиозина медленносокращающихся мышц [9, 10]. Эти сдвиги также обратимы в течение месячного срока. Сопоставление данных об изменении скорости реакции СПП и АТФазной активности показывает, что силовая нагрузка ведет к адаптивному повышению эффективности работы актомиозиновой сократительной «машин».

На основании полученных результатов выдвигается предположение, что под влиянием факторов недлительных космических полетов происходят обратимые адаптивные изменения в сократительном аппарате мышц, которые свидетельствуют о целостном репрограммировании мышечной клетки. Одним из основных механизмов в этом случае является репрограммирование выраженности отдельных генов, ответственных за синтез тех или иных изоформ сократительных и регуляторных белков. Отсюда ясно, что степень адаптивной перестройки белкового сократительного аппарата зависит от фенотипа скелетных мышц, которые отличаются друг от друга составом генов, контролирующих синтез

тех или иных изоформ белков. Большая степень изменчивости медленнотонусовых мышц подтверждается также данными измерения физиологических параметров сокращения глицеринизированных мышечных волокон в эксперименте и работы скелетных мышц человека методом «Миотест» [5, 6]. Таким образом, значение фенотипа скелетных мышц как фактора, лимитирующего адаптивные реакции в экстремальных условиях, должно быть учтено при разработке профилактических и восстановительных тренировочных режимов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян Ж. С. Автореф. дисс. канд., Ереван, 1982.
2. Ильян Е. А., Ношиков В. Е. Космич. биол., 14, 3, 79—80, 1980.
3. Кайфаджян М. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1985.
4. Оганесян С. С. Биолог. ж. Армении, 7, 661—672, 1978.
5. Оганов В. С., Скуратова С. А., Ширванская М. А. 16-е Совещ. соц-стран по космической биологии. Тез. докл., 37—38, Варна, 1982.
6. Оганов В. С. Автореф. докт. дисс., М., 1984.
7. Оганов В. С., Скуратова С. А., Мурашко Л. М. и др. Биофизика, 27, 36—30, 1982.
8. Тикуннов Б. А., Кайфаджян М. А., Оганесян С. С. Космич. биол., 18, 5, 44—48, 1984.
9. Тикуннов Б. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1985.
10. Тикуннов Б. А., Кайфаджян М. А., Оганесян С. С. Космич. биол., 19, 5, 60—61, 1985.
11. Close R. I. Physiol. Rev., 52, 129—197, 1972.
12. Furukawa T., Peter I. Exptl. Neurol., 36, 35—40, 1972.
13. Gorza L., Mercudier L., Schwartz K. et al. Circulat. Res., 54, 694—702, 1984.
14. Hoh I. F. FEBS Lett., 90, 297—298, 1978.
15. Hoh I. F., Mc Grath P., Halle P. J. Mol. Cell. Cardiol., 11, 1053—1056, 1978.
16. Hoh I. F., Yeon G. P. Nature, 280, 5720, 321—323, 1979.
17. Lowey S. In Plasticity of Muscle Ed. Heilman P., Berlin—N., Y., 69—81, 1980.
18. Oganessyan S. S., Zambian T. S. et al. J. Molec. Cell. Cardiol., 5, 1—24, 1973.
19. Salvati J., Betto R., Betto D. Biochem. J., 207, 261—272, 1982.
20. Schatz F. H., Bronson D. D., Mc Donald D. FEBS Lett., 122, 80—82, 1980.
21. Szilagyi T., Szöör A., Takacs O. et al. Advances physiol. Sci. 19, Gravitational Physiol. Pergamon Press., 97—103, 1980.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 15.XI 1985 г.

УДК 612.744.14

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИОННЫХ СИЛАХ СРЕДЫ

Б. А. ТИКУНОВ

Установлено двухстадийное протекание реакций суперпреинициации и АТФазы ионного актомиозина из скелетных мышц крыс. Показана возможность модулирования кинетики отдельных стадий этих реакций путем варьирования ионной силы раствора. Предполагается, что в основе проявления отдельных стадий лежат различные молекулярные механизмы, и это имеет важное значение для функционирования актомиозинового комплекса.

Արդյունքում է անհետնորի կմախքային մկաններից անջատված օսթիվ ակտոմիոզինի աու-
պերպրեցիպիտացիայի և ԱՏՖ-ազային էրկաստիճան փոփոխությունը ծաղիկ է տրված այդ օրակ-
ցիաների տարրերը աստիճանների կինետիկայի համախառնության փոփոխման ներառվորու-
թյանը լուծույթի իոնական ուժի փոփոխմամբ: Ընթացիկում է, որ առանձին աստիճանները հիմ-
նում նախն ևն դարձա տարրեր մոլեկուլայար մեխանիզմներ, որն ունի կարևոր նշանակություն
ակտոմիոզինային կոպուլցիոն դորոպություն համար:

The two stage proceeding of superprecipitation and ATPase of native actomyo-
sin from rats skeletal muscles has been established. The possibility of these reactions
different stages kinetics modulating by the way of solution ionic strength variation
has been shown. It has been supposed that various molecular mechanisms are the
foundation of two stages of SPP and it is important for the functioning of actomyo-
sin ATPase reactions.

Ключевые слова: скелетные мышцы, актомиозин, суперпреципитация, АТФаза,
ионная сила.

Известно, что в актомиозиновой суспензии при низких ионных си-
лах в процессе гидролиза АТФ может протекать реакция суперпреципи-
тации (СПП). Несмотря на многочисленные исследования, молекуляр-
ные механизмы СПП до конца не выяснены, а предлагаемые схемы по-
сят больше гипотетический характер [1, 3, 5]. Предполагается, что в
ходе СПП образуется комплекс актина с миозином и нейтрализуется
поверхностный заряд комплекса, и это приводит к выпадению белковых
хлопьев [1, 4]. В последние годы была показана возможность протека-
ния СПП в две и более стадий и выдвинуто предположение о том, что
каждая стадия отражает определенное состояние актомиозинового ком-
плекса [8].

Нами было зарегистрировано двухстадийное протекание не только
СПП, но и АТФазной реакции актомиозина и изучено влияние ионной
силы на кинетику отдельных стадий.

Материал и методика. Нативный актомиозин (НАМ) получали согласно описан-
ному методу [6] из бедренных мышц белых крыс линии Вистар. Чистоту белковых
препаратов проверяли электрофоретическим путем [9], а концентрацию актомиозина
определяли спектрофотометрически. Кинетические кривые СПП и АТФазной реакции
НАМ регистрировали синхронно на установке, собранной по схеме, предложенной За-
лашвили [2].

Поскольку даже при обычном одностадийном протекании СПП (часть кривой в
интервале t_0 , t_2 , рис. 1а) последовательно наступают две фазы — фаза просветления

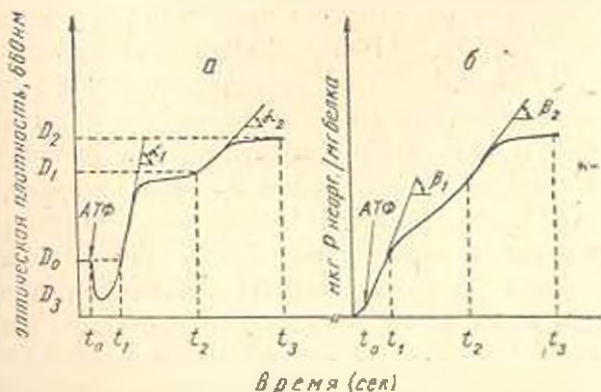


Рис. 1. Графический расчет характеристических параметров СПП (а) и АТФазы (б) по кинетическим кривым, регистрируемым при стадином про-
течении реакций. Значения t_0 , t_1 и t_2 равны на рис. (а) и (б).

актомиозиновой суспензии (интервал $t_0 - t_1$) и собственно СПП (интервал $t_1 - t_2$), — мы рассчитывали следующие параметры первой стадии реакции: глубину ($D_0 = D_0 - D_2$) и длительность ($t_0 = t_1 - t_0$) фазы просветления, степень ($D_1 = D_1 - D_2$) и скорость ($1/g_1$). Во второй стадии (интервал $t_2 - t_3$) рассчитывали время ее наступления ($t_{11} = t_2 - t_0$), степень ($D_{11} = D_2 - D_1$) и скорость ($1/g_2$). Скорость гидролиза АТФ на первой и второй стадиях измеряли по тангенсам углов β_1 и β_2 соответственно (рис. 1б).

Реакции СПП и АТФазы актомиозина изучали при 25° в сантиметровых стеклянных кюветках. Суммарный объем пробы составлял 7 мл. Инкубационная среда содержала: 20 мМ Трис-НСl (pH 7,35), 4 мМ β -меркаптоэтанол, 7 мг белка. Конечная концентрация вводимого в пробу АТФ составляла 0,5 мМ.

Результаты и обсуждение. Как следует из рис. 2, оптимальные значения ионной силы для СПП и АТФазы НАМ в первой и во второй стадиях реакций различаются примерно на 0,1 единицы.

По мере увеличения ионной силы вплоть до значения 0,125 повышение степени СПП и АТФазной активности НАМ в первой стадии не сопровождается заметными изменениями этих параметров во второй.

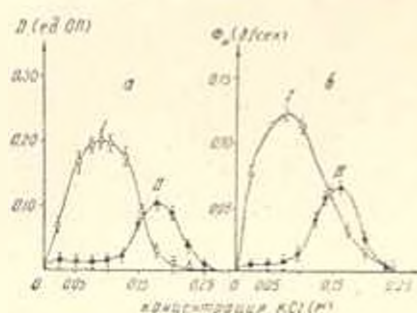


Рис. 2.

Рис. 2 Зависимость степени СПП (а) и АТФазной активности (б) НАМ бедренных мышц крыс от концентрации KCl. I и II — первая и вторая стадии реакции.

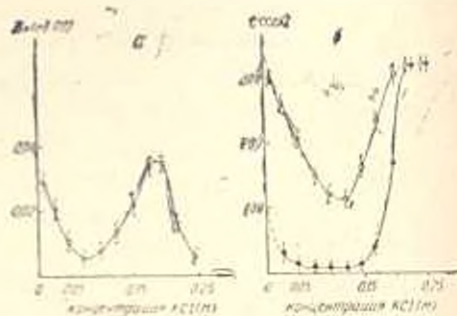


Рис. 3.

Рис. 3 Зависимость глубины (а), длительности (б, кривая 1) фазы просветления и времени наступления второй стадии (б, кривая 2) СПП НАМ бедренных мышц крыс от концентрации KCl.

При ионных силах 0,125—0,175 указанные параметры изменяются в противоположных направлениях в первой и во второй фазах соответственно. Тот факт, что точки пересечения кривых, т. е. равные значения степени СПП и активности АТФазы НАМ первой и второй фаз, наблюдаются в области физиологических значений ионной силы (порядка 0,15), наводит на мысль о том, что стадийность протекания этих реакций может играть важную роль в функционировании актомиозинового комплекса *in vivo*. Аналогичным образом при варьировании ионной силы изменялась также скорость СПП НАМ на обеих стадиях реакции.

Как видно из рис. 2, вторая стадия СПП и АТФазы НАМ значительно медленнее первой. Так, степень СПП и АТФазная активность НАМ во второй стадии почти вдвое ниже величин соответствующих параметров в первой стадии. Скорость СПП НАМ во второй стадии оказалась в 8 раз ниже, чем в первой ($0,003 \pm 0,0001$ против $0,024 \pm 0,001$).

Согласно современным представлениям, в ходе фазы просветления, предшествующей собственно СПП, происходят некоторые структурные перестройки и частичная диссоциация актомиозинового комплекса, что способствует быстрой реассоциации последнего [4]. Поэтому считается, что чем глубже фаза просветления, тем функционально выше должна быть СПП актомиозиновой суспензии.

Как показали наши исследования, такое предположение справедливо только в отношении второй стадии СПП, на которой глубина фазы просветления изменяется так же, как и степень СПП, в частности, при карыровании ионной силой раствора (рис. 3а). В противоположность этому в первой стадии реакции степень СПП НАМ изменялась обратно пропорционально глубине фазы просветления. Эти данные указывают на значительные различия в молекулярных механизмах, ответственных за протекание первой и второй стадий реакции СПП.

На принципиальные различия в молекулярной природе первой и второй стадий СПП указывает также неоднозначность зависимости степени СПП этих стадий от длительности фазы просветления суспензии НАМ при различных ионных силах среды (рис. 3б). Если степень СПП, как было показано на рис. 2а, на первой стадии реакции тем выше, чем меньше длительность фазы просветления, то рост степени СПП во второй стадии характеризуется удлинением фазы просветления.

Следует обратить внимание на то, что время наступления второй стадии СПП определяется скоростью протекания первой (рис. 3б). При этом длительность фазы просветления, резко возрастая, достигает длительности наступления второй фазы при высоких ионных силах среды. Поскольку в этих условиях степень СПП первой стадии реакции снижается до нуля (рис. 2а), фаза просветления предшествует уже не первой, а второй стадии СПП НАМ. Происходит как бы «обобществление» фазы просветления, хотя, в отличие от первой стадии реакции, на которой длительность этой фазы и степень СПП изменялись противоположным образом, во второй стадии изменения этих параметров были однозначными.

На основании полученных данных можно предположить, что за двухстадийное протекание СПП и АТФазы НАМ ответственны системы, разделенные по крайней мере двумя общими свойствами: способностью гидролизовать АТФ и изменять при этом комплексообразовательную активность. Несмотря на это, молекулярные механизмы функционирования этих систем, по-видимому, глубоко различны. Наличие же обеих стадий СПП и АТФазы НАМ при физиологических ионных силах среды указывает на важное значение их в функционировании актомиозиновой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гогоришвили Д. А., Сургуладзе Г. Т., Шрайбман Ф. О., Нацирашвили Н. Ш. В сб.: Вопросы биохимии нервной и мышечной системы, II, 146—157, Тбилиси, 1972.
2. Золашвили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности, 123—125, Тбилиси, 1971.

3. Соколов В. Ю., Богач П. Г., Зимма В. Л., Чан Минь Дон. В кн: Биофизика и биохимия мышечного сокращения, 77—81. М., 1976.
4. Hotta K., Terai F. Arch. Biochem. and Biophys., 114, 288—298, 1966.
5. Levy H. M., May Wal Won. Biochim. et Biophys. Acta, 658, 318—326, 1981.
6. Shaub M. C., Perry S. V. Biochem. J., 107, 263—269, 1967.
7. Strzeleska-Colaszewska H., Piwowar U., Pliszka B. Europ. J. Cell. Biol., 24, 116—123, 1981.
8. Szöör A., Katapos J., Csabina S., Konya L. Kiserleter Orvostudomány, 34, 303—307, 1982.
9. Weber K., Osborn M. Ibid., 244, 4106—4412.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР,
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 15.XI 1985 г.

УДК 577.391:576.8.

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО И ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО pol A1^- МУТАНТА БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* K-12

К. Ш. ВОСКАНЯН, Н. В. СИМОНЯН, Ц. М. АВАКЯН

Изучено комбинированное действие лазерного и рентгеновского, а также лазерного и α -излучений на клетки радиочувствительного pol A1^- -мутанта бактерий *E. coli* K-12. Показано, что лазерное воздействие до и после рентгеновского, а также α -облучения приводит к повышению репродуктивной способности клеток. Последующее лазерное облучение вызывает большую модификацию выживаемости клеток, чем предварительное.

Հետազոտված է լազերային ճառագայթման և ռենտգենյան ճառագայթների, ինչպես նաև լազերային ճառագայթման և α -մասնիկների կոմբինացիոն ազդեցությունը *Escherichia coli* K-12 բակտերիաների pol A1^- -ռադիոզգայուն մուտանտի վրա: Ցույց է տրված, որ լազերային ճառագայթումը ռենտգենյան, ինչպես և α -ճառագայթումից առաջ և հետո բերում է բջիջների կենսականության զգալի աճի, ինքիզացնող ճառագայթմանը հետևող լազերային ճառագայթումը հանգեցնում է բջիջների կենսականության ավելի մեծ մոդիֆիկացիայի. քան նախնական ճառագայթումը:

The combined effect of laser radiation and X-rays, as well as of that of laser radiation and α -particles on *Escherichia coli* K-12 cells of radiosensitive pol A1^- -mutant has been studied. The cells survival is shown to increase under the action of laser radiation applied before and after both X-rays and α -irradiation. Post-irradiation with laser results in a larger modification of the cells survival than pre-irradiation.

Ключевые слова: бактерии *E. coli*, лазерное и ионизирующие излучения.

Показано, что лазерное воздействие на клетки бактерий *Escherichia coli* K-12 снижает повреждающее действие ионизирующих излучений [2, 3]. Как известно, закономерности структурно-функциональной организации генетического аппарата в наибольшей степени изучены у прокариот, и прежде всего у бактерий *E. coli*. Получены суперрезистентные мутанты этих бактерий, характеризующиеся лучшей координацией работы деструктивных и ресинтезирующих ферментов [1], а

также различные изогенные репарационные мутанты, повышенная радиочувствительность которых обусловлена нарушением определенных этапов репарации ДНК [3, 4]. Все это позволяет проводить детальные исследования по влиянию генотипа клеток на эффективность модифицирующего действия лазерного излучения.

В настоящей работе приводятся результаты изучения влияния комбинированного лазерного и рентгеновского, а также лазерного и α -излучений на клетки *pol A1*-мутанта бактерий, *E. coli* K-12, дефектного по быстрой репарации.

Материал и методика. Исследовались клетки радиочувствительного мутанта P3478 (*pol A1*⁻ бактерии *E. coli* K-12 из коллекции ЛННФ Академии наук СССР. Ген *pol A1*⁻ является структурным геном ДНК-полимеразы I, которой принадлежит ведущая роль в экзизионной репарации).

Перед облучением клетки выращивали на твердой полноценной питательной среде JEPD (дрожжевой экстракт—10, NaCl—10, пептон—10, агар-агар—20 г/л) в течение 24 ч при 37°. Облучение клеток лазерным излучением (гелий-неоновый лазер ЛГ-52-3 непрерывного действия, λ —633 нм, мощность излучения 2 мВт), α -частицами (плоский ²³⁰Pu-источник с мощностью дозы 21 Гр/мин, среднее значение ЛПД α -частиц 110 кэв/мкм) и рентгеновскими лучами (установка РУМ-17, напряжение на трубке 200 кВ, сила тока 14 мА, мощность дозы 35 Гр/мин) проводили при комнатной температуре в монослое на поверхности «голодного» агара. При последовательном облучении клеток ионизирующими и лазерными лучами временной интервал не превышал 120 с. Разведения клеточной суспензии для облучения и контроля готовили с таким расчетом, чтобы в каждой чашке выросло от 100 до 300 колоний. Выживаемость клеток определяли подсчетом макроколоний, вырастающих через 2 суток при 37°. Каждый опыт повторялся 5—10 раз. Стандартная ошибка определения средних значений выживаемости клеток при усреднении результатов разных опытов, как правило, не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показана зависимость выживаемости клеток бактерий *E. coli* K-12 от продолжительности лазерного облучения. Видно, что кривая доза—эффект клеток *pol A1*⁻ мутанта,

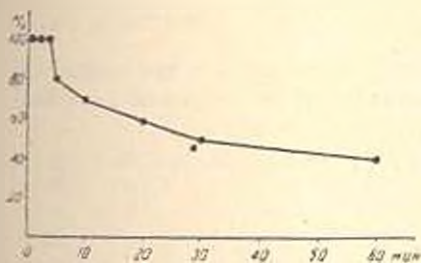


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток бактерий от времени лазерного облучения. По оси абсцисс—время облучения, мин; по оси ординат—выживаемость, %.

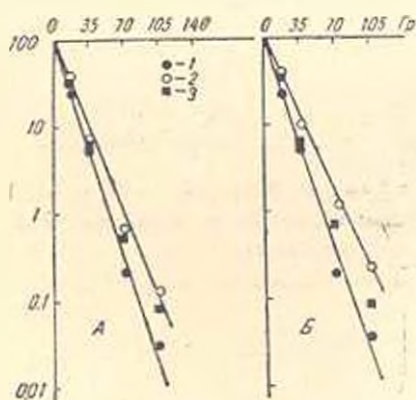


Рис. 2.

Рис. 2. Кривые выживания клеток бактерий при комбинированном облучении рентгеновским и лазерным излучениями. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %. А—лазерное излучение; Б—X-лучи+лазерное излучение. 1—X-лучи; 2—3—лазерное облучение в течение 30 и 15 с соответственно.

так же как и других штаммов бактерий *E. coli* K-12 [3], имеет по меньшей мере два качественно различающихся участка: это участки малых и больших доз. На участке малых доз летальный эффект не обнаруживается. На участке больших доз с увеличением дозы выживаемость клеток снижается. При комбинированном ионизирующем и лазерном облучениях нами были использованы дозы лазерного излучения, располагающиеся на участке малых доз кривой выживания.

На рис. 2 приведены кривые выживания клеток бактерий *E. coli* K-12, подвергшихся лазерному воздействию в разных экспозициях до и после рентгеновского облучения. Значения параметров n и D_0 кривых выживания приведены в таблице. Результаты свидетельствуют о том, что воздействие лазерным излучением до и после облучения рентгеновскими лучами повышает выживаемость клеток. Эффективность модифицирующего действия лазерного излучения зависит от последовательности облучений и времени воздействия.

На рис. 3 приведены кривые выживания клеток бактерий *E. coli* K-12, подвергшихся лазерному воздействию в разных экспозициях до и после облучения их α -частицами. Значения параметров n и D_0 этих

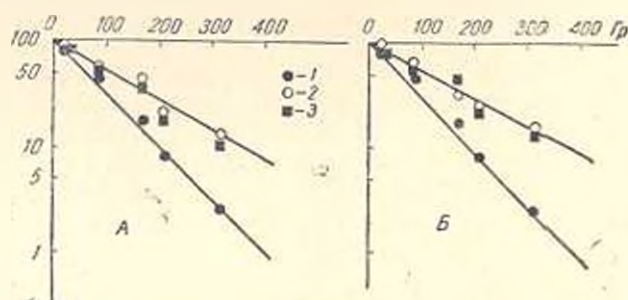


Рис. 3 Кривые выживания клеток бактерий при комбинированном облучении лазерным и α -излучениями. По оси абсцисс—доза облучения, Гр, по оси ординат—выживаемость, %. А—лазерное излучение + α -частицы; Б— α -частицы + лазерное излучение. 1— α -частицы; 2—3—лазерное облучение в течение 30 и 15 с соответственно.

кривых также даны в таблице. Видно, что излучение гелий-неонового лазера снижает повреждающее действие не только редконионизирующих

Таблица. Значения n и D_0 кривых выживания клеток бактерий при комбинированном облучении их ионизирующими и лазерным излучениями (время лазерного облучения—30 с)

Параметры кривых выживания	Вид облучения					
	X—лучи	Лазерное излучение + X—лучи	X—лучи + лазерное излучение	α -частицы	Лазерное излучение + α -частицы	α -частицы + лазерное излучение
n	1	1	1	1	1	1
D_0 , Гр	15	18	20	50	147	168

рентгеновских лучей, но и плотниононизирующих α -частиц. Данные, приведенные на рис. 2 и 3 и в таблице, позволяют сделать вывод о следующих общих закономерностях модифицирующего действия лазерного излучения на выживаемость клеток радиочувствительного pol A1^- -мутанта бактерий *E. coli* K-12 до и после воздействия ионизирующими излучениями разных энергий: последующее лазерное облучение приводит к большей модификации выживаемости клеток, чем предварительное; 30-секундная экспозиция лазерного воздействия более эффективна, чем 15-секундная. Повышение выживаемости клеток радиочувствительного pol A1^- -мутанта бактерий *E. coli* K-12 при комбинированном лазерном и ионизирующих облучениях свидетельствует о том, что блокирование системы быстрой репарации (при наличии в клетке функционирующих систем сверхбыстрой и медленной репараций) не исключает модифицирующего действия лазерного излучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е., Вербенко В. И., Калинин В. Л. Генетика, 16, 10, 1753—1763, 1980.
2. Восканян К. Ш., Симонян Н. В., Авакян Ц. М., Арутюнян А. Г. Радиобиология, 25, 4, 557—559, 1985.
3. Восканян К. Ш., Симонян Н. В., Авакян Ц. М., Арутюнян А. Г. Радиобиология, 26, 3, 557, 1986.
4. Youngs D. A., Bernstein J. A. J. Bacteriol., 113, 2, 901—906, 1973.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Научно-исследовательский институт физики конденсированных сред

Ереванского государственного университета

Получено 15.XI 1985 г.

УДК 577.3.08

ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

В. Н. МОРОЗОВ, С. Г. ГЕВОРКЯН

Описан метод измерения динамического модуля Юнга E и логарифмического декремента затухания θ кристаллов белков и аморфных пленок в интервале температур $-170 \div -25^\circ\text{C}$. Обнаружены две области температур, в которых происходит существенное изменение модуля: $-20 \div -30^\circ\text{C}$, где происходит небольшое скачкообразное увеличение модуля сильногидратированных образцов (с содержанием воды $0,2 \div 0,3$ от сухого веса белка), связанное с замерзанием относительно свободной воды, и $-40 \div -100^\circ\text{C}$, где происходит большое увеличение модуля, связанное с иммобилизацией поверхностных слоев белка и прочно связанной воды.

Նկարագրված է ապիտակուցների բյուրեղների և ամորֆ փաղանթների Յունգի դինամիկական մոդուլի E և մարման լոգարիթմական զերկրմանտի (θ) չափման եղանակը լայն ջերմաստիճանային տիրույթում ($-170 \div -25^\circ\text{C}$)։ Հայտնաբերված են ջերմաստիճանային երկու տիրույթներ, որոնք տեղի է ունենում մոդուլի էական փոփոխություն։ $-20 \div -30^\circ\text{C}$ տիրույթում տեղի է ունենում մոդուլի ոչ մեծ թռիչքանկ աճ, $-40 \div -100^\circ\text{C}$ տիրույթում տեղի է ունենում մոդուլի մեծ և՛ կապված ապիտակուցի մոլեկուլում մակերևութային շերտերի շարժունակության կորստի հետ։

The method of measuring of Young's dynamic modulus E and logarithmic decrement of shading θ of protein crystals and amorphous membranes in the temperature range of $-170 \div 25^\circ \text{C}$ has been described. Two spheres of temperatures, in which great changes of modulus take place have been found out: $-20 \div -30^\circ \text{C}$, where not great step-like increase of modulus of highly hydrated protein samples (with water content of $0,25 \div 0,3$ g/g dry weight of protein) takes place and $-40 \div 190^\circ \text{C}$, where a large increase in modulus takes place, connected with the immobilization of surface layers of protein and tightly connected water.

Ключевые слова: кристаллы белков, аморфные пленки, вязкоупругие свойства, динамический модуль Юнга, логарифмический декремент затухания.

Механические измерения могут дать представление не только об упругих силах внутри твердого образца, но и о процессах, связанных с молекулярным движением при релаксации механических напряжений в нем. Хорошо известно, что исследование температурных и частотных характеристик полимеров позволяет выявить целый набор релаксационных процессов, связанных как с движением различных сегментов главной цепи, так и с движением боковых остатков [3, 4].

Проблема внутримолекулярной подвижности в глобулярных белках имеет особое значение, так как с ней тесно связана функциональная активность белков [1]. Исследовать эту подвижность можно различными физическими методами, в том числе измерением механических характеристик твердых образцов глобулярных белков (монокристаллов, аморфных пленок) в широких частотном или температурном интервалах. В настоящей работе описан метод измерения механических характеристик и приведены данные, свидетельствующие о наличии релаксационных процессов при деформации твердых образцов глобулярных белков.

Материал и методика. Метод измерения динамического модуля Юнга и логарифмического декремента затухания (θ) в интервале частот $1 \div 100$ КГц основан на анализе электростатически возбуждаемых резонансных поперечных колебаний консолидно закрепленной кристаллической пластинки. Детальное описание метода, включающее выращивание кристаллов и изготовление образцов, необходимых для измерения, приведено в работе [7].

Для измерения в широком температурном интервале была сконструирована специальная камера, отличающаяся от описанной ранее полной герметичностью, а также тем, что в ней до минимума сведена возможность возникновения температурных градиентов. Последнее условие приобретает особую важность при работе с объектом, свойства которого зависят как от температуры, так и от влажности, так как даже небольшие температурные неоднородности внутри камеры способны вызвать существенные градиенты влажности, перераспределение воды, образование росы или высыхание образца. Кювета, разрез которой представлен на рис. 1, изготовлена из массивного куска латуни и конструктивно выполнена с двумя термостатированными стенками. Охлаждающая газовая смесь, проходящая через радиатор (5), обдувает внутреннюю стенку камеры, проходя через систему вертикальных отверстий. Затем газ обдувает верхнее и нижнее кварцевые окна (2, 6) и выходит наружу. Кювету помещали в кожух из пенопласта толщиной $1 \div 1,5$ см и ставили на столик измерительного микроскопа. Температуру в камере измеряли термометром. Воздух камеры непрерывно перемешивался в ходе эксперимента с помощью воздушной мешалки, имеющей форму язычка [7].

Процедура измерений заключалась в следующем: исследуемый образец, закрепленный в пинцете, вводили внутрь камеры, где поддерживалась температура 25°C . Степень гидратации образца задавали, поддерживая его в этих условиях в камере, на дне которой помещалась капля раствора CaCl_2 требуемой концентрации. Использовали так-

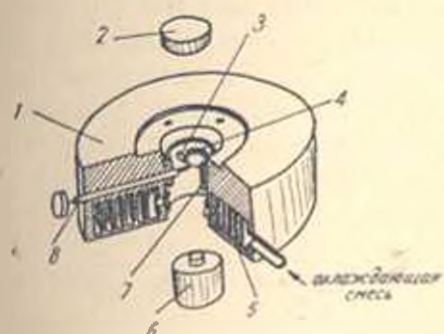


Рис. 1.

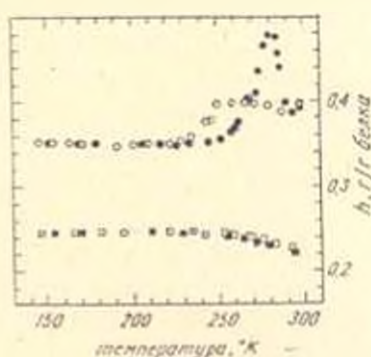


Рис. 2.

Рис. 1. Экспериментальная влажная камера для исследования вязкоупругих свойств белковых кристаллов в широкой температурной области. Обозначения см. в тексте.

Рис. 2. Изменение веса тетрагонального $\text{R}_{4,2,2}$ кристалла лизоцима из-за изменения гидратации при изменении температуры в ходе эксперимента. 1 — исходная влажность $A=90\%$ ($h=0,32$ г/г сухого веса). 2 — та же при влажности $A=60\%$ ($h=0,15$ г/г сухого веса).

же другой способ. Внутри термостатированного шкафа помещали 3—4 пробирки, заполненные раствором CaCl_2 концентрации, необходимой для создания в камере нужной влажности. Слабый ток воздуха пропускали последовательно через пробирки, насыщенный таким образом воздух подавали в камеру. Для этого в крышке были предусмотрены специальные отверстия для ввода и вывода газа. Эта процедура занимала несколько часов. По окончании ее крышку герметизировали, ставили на столик микроскопа, наден теплоизолирующий кожух, и приступали к эксперименту. Температуру камеры изменяли, пропуская через радиатор охлаждающую газовую смесь воздуха и азота. Скорость изменения температуры (1—2 град/мин) задавали, регулируя скорость потока охлаждающей смеси.

Степень изменения гидратации образцов при изменении температуры в процессе эксперимента регистрировали разработанным нами ранее прямым гравиметрическим методом [2].

В работе использовали кристаллы лизоцима куриного яич. фиксированные глутаровым альдегидом, и аморфные пленки бычьего альбумина. Методы изготовления пленок, выращивания и фиксации кристаллов и способы приготовления образцов из них описаны в работе [7].

Результаты и обсуждение. Контрольные измерения гидратации образцов были выполнены на тетрагональных кристаллах лизоцима, которые при высокой влажности содержат большое количество гидратной воды. Как видно из рис. 2, наиболее существенные изменения гидратации происходят в образцах, находящихся в условиях высокой влажности в области температур -20 — 45°C , однако и в этом случае изменения величины модуля Юнга E , вызванные изменениями гидратации в ходе опыта, должны быть малы. Приведенные на рис. 2 2%-ное увеличение массы кристалла при охлаждении соответствует 7%-ному увеличению количества гидратной воды (в соответствии с изотермой гидратации этих кристаллов [2]). Учитывая зависимость E от влаж-

ности, для этих кристаллов следует ожидать 2÷3%-ного уменьшения E в процессе охлаждения за счет изменения гидратации. Таким образом, изменение температуры во всем исследуемом диапазоне температур не приводит к сколько-нибудь значительным изменениям гидратации.

Были исследованы также температурные зависимости E и U тетрагональных $P4_32_12$ и моноклинных $P2_1$ кристаллов лизоцима и аморфных пленок бычьего сывороточного альбумина при разной степени гидратации. Типичная зависимость E ($^\circ$) для образцов с высоким содержанием воды ($h > 0.25 \div 0.3$ г/г сухого веса) представлена на рис. 3 (кр. 1).

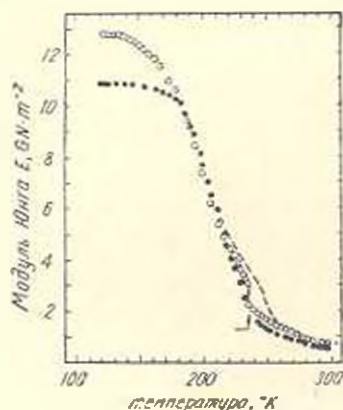


Рис. 3.

Рис. 3. Температурная зависимость модуля Юнга E тетрагональных $P4_32_12$ [направление (0,01)] кристаллов лизоцима при высокой влажности и влиянии глицерина: 1 — кристалл, вымоченный в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4,5, с 5%-ным NaCl, $A=94\%$, $h=0.37$ г/г; 2 — тот же кристалл, вымачиваемый в течение 12 ч в 50%-ном растворе глицерина на вышеуказанном буфере.

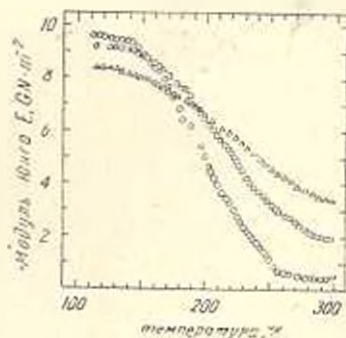


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость модуля Юнга E моноклинных $P2_1$ кристаллов лизоцима [направление (0,1)] от температуры при разных исходных влажностях: $A=97\%$ ($h=0.27$ г/г сухого веса), $A=60\%$ ($h=0.13$ г/г сухого веса), $A=0.02\%$ ($h=0.05$ г/г сухого веса).

Она характеризуется большим плавным увеличением модуля при охлаждении в области температур $-40 \div -100^\circ\text{C}$ и небольшим скачкообразным переходом в области $-22 \div -35^\circ\text{C}$ (температура, при которой происходит скачок, меняется от опыта к опыту в указанном интервале). Первый из указанных переходов, происходящий в широком температурном интервале, похож на переходы в полимерах, например, связанные с иммобилизацией боковых цепей [5]. Мы будем называть его стеклованием. Стеклование в кристаллах и пленках белков наблюдается при содержании гидратной воды $h > 0.1 \div 0.15$ г/г сухого веса белка, и только потеря этой прочно связанной воды приводит к исчезновению стеклования. Это иллюстрирует рис. 4, где показано, как с уменьшением влажности изменяется зависимость E (t) для моноклинных кристаллов лизоцима. Таким образом, стеклование в твердых образцах белков наблюдается уже при минимальных значениях гидратации и отражает, по-видимому, свойства белковых глобул и прочно связан-

ной с ними воды. Убедительно доказывает это результат опыта с кристаллом, вымоченным в 50%-ном глицерине (рис. 3, кр. 2). Как известно, около 90% всего объема кристалла белка, занятого водой, доступно небольшим молекулам растворенного вещества [6]. Свойства водно-глицериновой смеси существенно отличаются от свойств воды, и в то же время кривая, отражающая стеклование с глицерином (рис. 3, кр. 2), не отличается от таковой без глицерина (кр. 1), если не считать небольших различий в начальном и конечном уровнях модуля.

Таким образом, относительно свободная вода (2/3 от всей гидратной воды) не влияет на процесс стеклования, он связан со стеклованием в самой глобуле или в участках, включающих прочно связанную воду. Так как основной вклад в величину модуля Юнга E при комнатной температуре и высокой влажности вносит деформация глобул в области межмолекулярных контактов [7], а модуль при стекловании изменяется многократно, можно предполагать, что именно иммобилизацию поверхностных групп в белке и прочно связанной воды отражает наблюдаемое механическое стеклование.

Скачок модуля в области $-22 \pm 35^\circ\text{C}$ несомненно отражает замерзание относительно свободной воды в кристаллах. Он наблюдается только при содержании $h > 0,25 \div 0,3$ г/г сухого веса, и, как видно из рис. 3, вымачивание кристаллов в 50%-ном глицерине также приводит к его полному исчезновению. Наличие такого скачка при больших значениях гидратации хорошо коррелирует с калориметрическими данными, согласно которым пик теплоемкости за счет замерзания воды в белковых образцах удается получить только при $h > 0,3$ г/г сухого веса белка [5].

Результаты настоящей работы показывают, что при физиологических условиях отдельные области белковых глобул (скорее всего, поверхностные) обладают избыточной подвижностью, которая может быть заморожена при температурах ниже -40°C .

Авторы выражают признательность Т. Я. Морозовой, Л. В. Абатурову и Э. А. Бурштейну за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блэкфелд Л. А. Проблемы биологической физики. М., 1974.
2. Геворкян С. Г., Морозов В. Н. Биофизика, 28, 6, 944—948, 1983.
3. Ферри Дж. Вязкоупругие свойства полимеров. М., 1963.
4. Хоккинс Дж. Л., Куркоджиян С. Р. Физическая акустика, свойства полимеров и жидкой акустика. 2, ч. 15, М., 1969.
5. Kuntz J. D., Kauzmann W. Adv. Prot. Chem. 28, 239—345, 1974.
6. Loz B., Richards F. M., Berger J. E. J. Amer. Chem. Soc., 78, 1107—1111, 1956.
7. Morozov V. N., Morozova T. Ya. Biopolymers, 20, 3, 451—467, 1981.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР

Поступило 15.XI 1985 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ Cu (II)-БСА С ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ МЕТОДАМИ ЭПР И ЯМР

Р. А. АСАТУРЯН, К. С. ЛУСАРАРЯН

Обнаружено перераспределение электронной плотности в структуре комплексов Cu (II)-БСА при взаимодействии с додецилсульфатом натрия. Детергент взаимодействует с БСА полярными головками мицеллы. Обсуждается связь между спектрами ЭПР и EXAFS этих комплексов при добавлении додецилсульфата натрия.

Նաորիումի դոդեցիլսուլֆատի հետ փոխադրեցության դեպքում Cu(II)-ՑՍԱ կոմպլեքսների կառուցվածքում փոփոխություն է կենտրոնային խտության վերաբառում: ՑՍԱ-ի հետ դեռևս քննար փոխադրում է միջնային պոլար գլխիկներով: Քննարկված է Cu(II)-ՑՍԱ կոմպլեքսների էՊՐ և EXAFS սպեկտրների միջև եղած կապը՝ նաորիումի դոդեցիլսուլֆատի ազդեցությամբ, դեպքում:

Electron density redistribution is found in the structure of Cu (II)—BSA complexes at their interaction with sodium dodecyl sulphate. The detergent interacts with the BSA by micelle polar heads. The relation between the EPR and EXAFS spectra of these complexes at addition of sodium dodecyl sulphate is discussed.

Ключевые слова: метод EXAFS, g-тензор, поле лигандов, симметрия окружения.

Ранее нами [4, 5] изучалось взаимодействие Cu (II) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в широком диапазоне значений pH, что позволило выявить два типа связывающих центров. В одном из них (тип 1), имеющем в основном аксиальную симметрию окружения, центральный атом меди окружен двумя атомами азота Гис (9) и Гис (18) молекулы БСА и двумя атомами кислорода молекулы воды [2]. В другом центре (тип 2)—с ромбической симметрией окружения—он окружен четырьмя атомами азота: один из амминой группы аспарагиновой кислоты, два атома азота пептидных связей и четвертый—N (3) имидазольного кольца Гис (3). В работе [5] на основании результатов, полученных методом ЭПР, обсуждались возможные изменения спектров EXAFS в зависимости от pH.

Авторами работы [8] при исследовании взаимодействия между додецилсульфатом натрия (DDCNa) и БСА микродилатометрическим методом выявлены изменения объема последнего, вызванные конформационной перестройкой белка с последующей денатурацией. Однако структура связывающихся центров при этом взаимодействии не изучалась, что и явилось целью данной работы в связи с возможностью применения метода EXAFS к изучению изменений структуры этих центров при взаимодействии с DDCNa.

Материал и методика. Бычий сывороточный альбумин Олайнинского завода химреактивов использовался в лиофильно-высушенном виде. Соль CuCl_2 —марки «чда».

Комплексы Cu(II)-BCA готовились по методике, описанной в работе Бреслоу [6]. Ионная сила составляла $0,16 \text{ M KCl}$; концентрация $\text{BCA} = 0,32 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (2%), концентрация $\text{Cu(II)} = 1,28 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Значения pH измеряли на pH-метре типа pH-673 с ошибкой $\pm 0,025$, откалиброванном по стандартным буферным растворам. Требуемые значения pH получали добавлением малых количеств NaOH или $0,1 \text{ N HCl}$ в исходный раствор комплексов. Буферные растворы нами не использовались во избежание образования тройных комплексов Cu(II)-BCA-буфер [3].

Спектры ЭПР комплексов Cu(II)-BCA регистрировались на ЭПР спектрометре (9,0 Гц) фирмы «Varian-E-4» (США), при -190°C , мощности калетронного генератора 10 мВт и постоянной времени 0,25 сек.

Использовался додецилсульфат натрия марки «Serva» (ФРГ).

Спектры ЯМР DDCNa регистрировались в 99,8%-ном D_2O при $34 \pm 1^\circ\text{C}$ на ЯМР спектрометре (60 МГц) типа «Т-60» фирмы «Varian». Концентрация DDCNa составляла $0,4 \text{ M}$. В качестве внешнего стандарта использовали ТМС (тетраметилсилан). Ионная сила составляла $0,16 \text{ M KCl}$ в D_2O . Значение pH поддерживали равным 7.

Результаты и обсуждение. На рис. 1а представлены спектры ЭПР комплексов Cu(II)-BCA (тип 1) при pH 5,5 в зависимости от концентрации DDCNa. Спектры имеют в основном аксиальную симметрию окружения, которая изменяется незначительно при добавлении DDCNa. При 300 мМ DDCNa наблюдаются незначительные изменения в центре спектра и в области магнитного поля 3200 мТ, выявляющие плохо разрешенную суперсверхтонкую структуру, ранее идентифицированную [5].

На рис. 1б приведены спектры ЭПР комплексов Cu(II)-BCA (тип 2) при pH 9,0 и различных концентрациях DDCNa. Видно, что если при pH 5,5 на спектрах четко наблюдаются три компонента СТС,

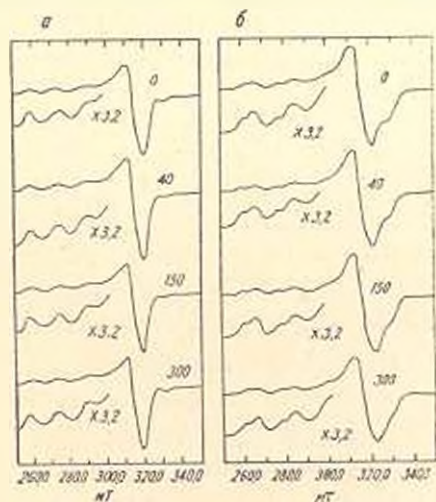


Рис. 1а. Спектры ЭПР комплексов Cu(II)-BCA при -190°C и pH 5,5. Цифры справа указывают на концентрацию DDCNa в миллимолях. В левой части спектров приведена повторная запись части спектров при усилении в 3,2 раза большем, чем для основного спектра. б. Спектры ЭПР комплексов Cu(II)-BCA при -190°C и pH 9,0.

Остальное то же.

то здесь можно выделить две основные с большой величиной расщепления, на которые наложены дополнительные компоненты от комплексов типа 1, в «чистом» виде видимые при pH 5,5 (рис. 1а).

Добавление DDCNa приводит к изменениям формы спектров в области $g_{\perp}$. Так, уже при 40 мМ DDCNa уменьшается разрешение компоненты $g_{\perp}$, а при 150 мМ и тем более 300 мМ наблюдается полное уменьшение ее разрешения. Такого типа изменения формы спектров при добавлении DDCNa могут быть результатом изменения симметрии окружения комплексов типа 2, вызванного структурной перестройкой BCA.

Эти изменения спектров ЭПР комплексов $\text{Cu(II)}\cdot\text{BCA}$ при добавлении DDCNa резко отличаются от изменений, вызванных щелочной десатурацией BCA [4].

На рис. 2а представлены значения констант СТС комплексов $\text{Cu(II)}\cdot\text{BCA}$ для каждого связывающегося центра. Значения констант СТС A_1 для комплексов типа 1 при pH 5,5 при добавлении DDCNa изменяются в пределах 16,3—15,0 мТ таким образом, что даже 20 мМ DDCNa приводит к уменьшению A_1 на 10 мТ. Добавление 80 мМ DDCNa не меняет значения A_1 относительно 60 мМ, затем эта константа растет вплоть до 150 мМ, после чего наблюдается некоторый спад ее.

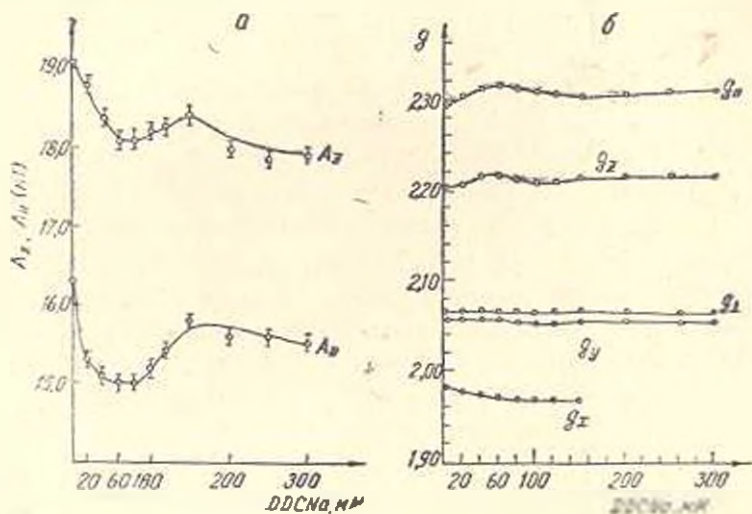


Рис. 2. а. Значения констант сверхтонкой структуры для комплексов $\text{Cu(II)}\cdot\text{BCA}$ при pH 5,5 (A_1) и 9,0 (A_2) в зависимости от концентрации DDCNa. б. Значения g-тензоров для комплексов $\text{Cu(II)}\cdot\text{BCA}$ при pH 5,5 (g_1 и g_2) и 9,0 (g_3 , g_2 и g_1) в зависимости от концентрации DDCNa.

Значения константы СТС A_1 для комплексов типа 2 (pH 9,0) при 60 и 80 мМ DDCNa практически не изменяются. При 20 мМ DDCNa значение A_2 уменьшается всего на 3,0 мТ. В дальнейшем значения константы СТС A_2 растут медленнее, чем A_1 , вплоть до 150 мМ DDCNa, а затем также наблюдается уменьшение A_2 при значениях DDCNa, выше 150 мМ.

Авторы работы [8] при добавлении DDCNa к BCA изменения объема последнего разделили условно на две стадии: первая—уменьшение объема BCA, когда концентрация DDCNa меняется в пределах 20—80 мМ, с минимумом при 80 мМ; вторая—увеличение объема, при концентрации DDCNa больше 80 мМ. Авторы при этом считают, что детергент взаимодействует с BCA, который претерпел структурные изменения. Наши данные по константам СТС подтверждают двухстадийность процесса взаимодействия между BCA и DDCNa, указывая на перераспределение электронной плотности в комплексах $\text{Cu(II)}\cdot\text{BCA}$.

На рис. 2б даны значения g-тензоров для комплексов типа 1 (g_1 и g_2) и типа 2 (g_1 , g_2 и g_3). Значения g_1 при добавлении DDCNa растут вплоть до 80 мМ, падают, а затем претерпевают незначительные изменения. Величины g_2 практически не изменяются.

Большим изменениям g_1 соответствуют и большие изменения A_1 , как для первой, так и для второй стадий этого взаимодействия. Меньшим изменениям g_2 соответствуют меньшие изменения A_2 для второго связывающегося центра. На рис. 1б уменьшение разрешения компоненты g_x коррелирует с ростом для нее поля лигандов, показанным на рис. 2б. Кроме того, с ростом концентрации DDCNa до 80 мМ и уменьшением поля лигандов для $g_{||}$ и g_z происходит уменьшение констант СТС как для A_1 , так и A_2 . Дальнейшее увеличение концентрации DDCNa приводит к росту поля лигандов для $g_{||}$ и g_z и увеличению значений констант СТС как для A_1 , так и A_2 .

Таким образом, значения g-тензоров— $g_{||}$ и g_z , а также A_1 и A_2 находятся в строгом соответствии друг с другом, указывая однозначно на изменения, которые происходят в структуре связывающихся центров на первой и второй стадиях взаимодействия между DDCNa и БСА.

На рис. 3 приведены спектры ЯМР 0,4 М DDCNa до и после добавления БСА. В контроле линию поглощения при 0,9 м. д. мы отнесли к гидрофобной CH_3 группе, при 1,3 м. д.—группе $(CH_2)_{10}$, а триплетный спектр при 4,0 м. д.—к CH_2 группе, взаимодействующей с соседней CH_2 группой и связанной с гидрофильной группой SO_4^- .

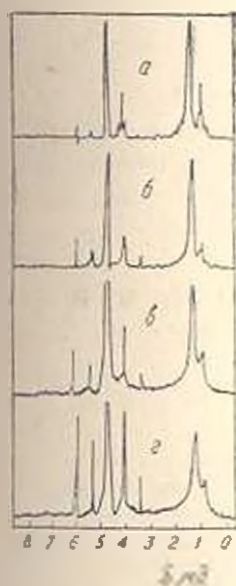


Рис. 3. Спектры ЯМР 0,4 М раствора DDCNa при 60 МГц: а—контроль; б, в и г—то же, но добавлено 1,4, 3,5 и 4,7% БСА соответственно.

Добавление 1,4%-ного БСА приводит к превращению триплетного спектра в синглетный, а 3,5%-ного БСА смещает линию поглощения от CH_2 группы влево на 0,14 м. д. и уширяет ее в 6 раз. Присутствие 4,7%-ного БСА приводит к смещению этой линии влево на 0,24 м. д. и уширению в 7,5 раза по сравнению с таковым при 1,4%-ном БСА. Наблюдаемое уширение сигнала от группы $(CH_2)_{10}$ при добавлении БСА должно быть вызвано увеличением вязкости раствора, так как не имеет место его смещение.

Известно [1], что DDCNa при концентрации 0,4 М в растворе находится в виде мицеллы, гидрофильные головки которой обращены к ее наружной поверхности, а гидрофобная часть—к центру. Приведенные выше результаты, полученные методом ЯМР, свидетельствуют о том, что DDCNa взаимодействует с БСА полярными головками мицеллы.

Описанные выше (рис. 1б) изменения спектров ЭПР, сопровождаемые уменьшением разрешения компоненты g_x и ростом поля лигандов для g_x (рис. 2б) с увеличением концентрации DDCNa, указывают на переход симметрии этого типа комплексов (тип 2) от ромбической к аксиальной.

Применение EXAFS спектроскопии позволит получить структурные данные о таком изменении симметрии окружения: до добавления DDCNa радиальная функция распределения атомов в структуре этих

комплексов при низкой температуре должна, по-видимому, представлять двугорбую кривую из-за присутствия в координационной сфере четырех атомов азота, расположенных в узлах ромба. Добавление DDCNa в соответствии с нашими данными по ЭПР приводит к превращению этого ромба в квадрат, что должно, на наш взгляд, ухудшить разрешение предполагаемого расщепления радиальной функции EXAFS спектров этих комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамсон А. Физическая химия поверхности. М., 1975.
2. Асатурян Р. А. Биол. ж. Армении, 36, 570—575, 1983.
3. Бреслоу Е. В кн.: Неорганическая биохимия, вып. 1, 274—290. М., 1978.
4. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 716 (31)—84.
5. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 717 (32)—84.
6. Breslow E. Biol. Chem., 239, 3252—3259, 1964.
7. Doniach S., Elzenberger P., Hodgson K. O. In: Synchrotron Radiation Research. New York and London, 1980.
8. Katz S., Shaw M. E., Chittag S. and Miller J. E. J. Biol. Chem., 247, 5223—5233, 1972.

Ереванский физический институт ГНАЗ СССР.

Институт тонкой органической химии

АН Армянской ССР им. А. А. Миджояни

Поступило 18.XI 1985 г.

УДК 577.352.35

ИЗМЕНЕНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТРАНСПОРТА H^+ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ Ca^{2+}

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Исследовано влияние Ca^{2+} и Mg^{2+} на индуцированные монофором двухвалентных катионов A23187 потоки K^+ и H^+ в эритроцитах крысы. При наличии в среде инкубации 150 мМ NaCl и значениях внеклеточного Ca^{2+} от 0,01 до 1 мМ 3,3 мкМ монофора вызывает сопряженный $K^+—H^+$ обмен через мембрану; при увеличении концентрации Ca^{2+} выше 1 мМ протинотранспорт K^+ и H^+ заменяется на одновременный выход этих ионов из клетки. При изменении мембранного потенциала в сторону положительных значений, так же как при снижении концентрации монофора A23187, для обращения потока H^+ необходимо увеличивать количество добавленного Ca^{2+} . Ионы магния заметным образом снижают скорости как сопряженного $K^+—H^+$ обмена, так и одновременного выхода K^+ и H^+ . Предполагается, что реверсия транспорта H^+ связана с увеличением потока Ca^{2+} внутрь эритроцитов.

Исследовано влияние Ca^{2+} и Mg^{2+} на индуцированные монофором двухвалентных катионов A23187-ով անալիզացած K^+ -ի և H^+ -ի հոսքերի վրա առնհամար էրիթրոցիտներում 150 մմ NaCl և արտաքցության Ca^{2+} -ի 0,01 մմ միջև 1 մմ արժեքների զեպրում, 3,3 մկմ մոնոֆորը անալիզացնում է համատեղ $K^+—H^+$ -ի փոխանակություն մեմբրանով: Երբ Ca^{2+} -ի կոնցենտրացիան 1 մմ-ից բարձր է, K^+ -ի և H^+ -ի հակադրանալիզը փոխարինվում է նույն իրենների միասնական կապով մղվածով դուրս: Երբ մեմբրանային պոտենցիալը փոփոխ-

վում է զրական արժեքների կողմը, ինչպես նաև իոնոֆոր A23187-ի կոնցենտրացիայի նվազման դեպքում, H^+ -ի հոսքի ուղղության փոփոխության համար անհրաժեշտ է մեծացնել ավելացվող Ca^{2+} -ի քանակը: Mg^{2+} -ը ճկատելիորեն իրենցում է ինչպես համատեղ $K^+ - H^+$ փոխա-
նակության, այնպես էլ Ca^{2+} -ի և H^+ -ի միաժամանակյա դուրս մղման արագությունները: Են-
թացրկում է, որ H^+ -ի տրանսպորտի ուներսիան կապված է Ca^{2+} -ի հոսքի մեծացման հետ
զեպի կրիթրոցիտները:

The influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on divalent cations ionophore A23187-induced K^+ and H^+ fluxes in rat erythrocytes has been investigated. In the presence of 150 mM NaCl and extracellular Ca^{2+} concentration in the range of 0.01 mM to 1 mM in the incubation medium, 3.3 μ M ionophore produces coupled $K^+ - H^+$ exchange across the membrane: by increasing Ca^{2+} more than 1 mM instead of K^+ and H^+ antiport, simultaneous efflux of these cations has been observed. In changed membrane potential to positive values, as well as decreased ionophore A23187 concentration, it is necessary to increase the amount of added Ca^{2+} to reverse H^+ flow. The magnesium ions significantly decrease the rates of $K^+ - H^+$ exchange, as well as the rates of simultaneous efflux of K^+ and H^+ . It is suggested that the reversion of H^+ flux is due to increased Ca^{2+} flow into erythrocytes.

Клико́вые крася эритроциты, ионофор двухвалентных катионов А23187, транспорт иона K^+ и H^+ , мембранный потенциал

Известно, что вход Ca^{2+} внутрь эритроцитов приводит к резкому увеличению проницаемости мембран для K^+ : активируется так называемый Ca^{2+} -чувствительный калиевый канал [4, 7, 15]. Транспорта Ca^{2+} внутрь эритроцитов можно добиться истощением эндогенного АТФ при инкубации эритроцитов в отсутствие глюкозы с добавлением различных ингибиторов метаболических процессов [4, 6] или же увеличением пассивного потока Ca^{2+} , достигаемым с помощью ионофора двухвалентных катионов А23187 [8, 13, 16].

Ранее было показано [5], что индуцированный валиномицином выход K^+ по градиенту концентрации из эритроцитов связан со входом H^+ внутрь клеток.

Нами исследованы потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов крысы, вызванные ионофором А23187, и действие двухвалентных ионов на этот процесс.

Материал и методика. Эритроциты из крови крысы популяции Вистар получали оседлением. Осадок дважды промывали в среде, содержащей 150 mM NaCl в соотношении 1:5. Концентрация Ca^{2+} , K^+ и H^+ измеряли пленочными Ca^{2+} и K^+ -селективными и стеклянным H^+ -селективным электродами K^+ - и H^+ -чувствительные электроды были соединены в одной ячейке. Регистрацию вели с помощью рН-метров, подключенных к самопишущим миллиамперметрам постоянного тока И-37 с усилителем И-37. Мембранный потенциал эритроцитов определяли по методу, основанному на измерении рН безбуферной среды инкубации до и после добавления эритроцитов [10]. При изменении рН в щелочную сторону мембранный потенциал брали со знаком «минус», в кислую — со знаком «плюс». Результаты измерений мембранного потенциала были обработаны статистически. Выделение эритроцитов и все опыты проводили при температуре, равной 22°.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показано действие ионов кальция на транспорт K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов, индуцированный ионофором А23187. При наличии в среде инкубации 0.01 mM Ca^{2+} в виде примесей (измерено Ca^{2+} -чувствительным электродом по отно-

шению к бидистиллированной воде, в которой концентрацию Ca^{2+} принимали равной 0). выход K^+ сопряжен с входом H^+ . При 5 мМ Ca^{2+} происходит реверсия потока H^+ : и H^+ и K^+ одновременно выходят из эритроцитов (рис. 1 В). Этот эффект наблюдается при концентрациях Ca^{2+} , превышающих 1 мМ; при миллимолярной же концентрации изменение рН незначительно (рис. 1 Б).

Как видно из рис. 1, при концентрациях Ca^{2+} в среде, равных 0,01 и 1 мМ, нет существенного различия в скоростях выхода K^+ .

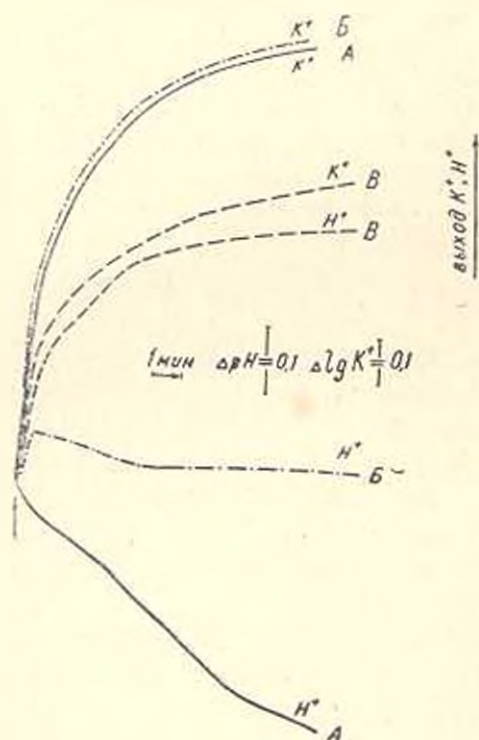


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние Ca^{2+} на индуцированные ионофором A23187 потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов. А—0,01 мМ Ca^{2+} ; Б—1 мМ Ca^{2+} ; В—5 мМ Ca^{2+} . Во всех случаях 0,1 мл эритроцитов инкубировали в течение 10 мин в 3 мл 150 мМ NaCl (рН 6,4) при соответствующей концентрации Ca^{2+} и затем добавляли 3,3 мМ ионофора A23187 (показано стрелкой).

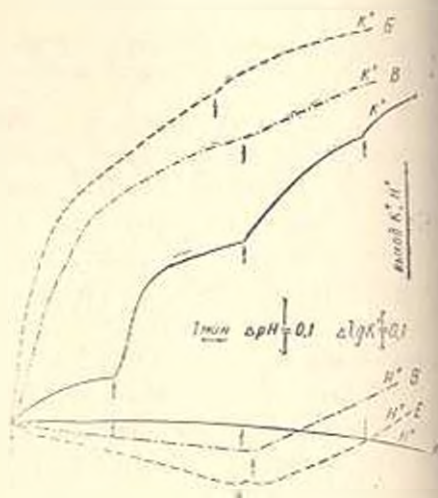


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние Ca^{2+} на потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов при низких концентрациях ионофора A23187. А—0,01 мМ Ca^{2+} ; Б—5 мМ Ca^{2+} ; В—20 мМ Ca^{2+} . Остальные условия, кроме концентрации A23187, как на рис. 1. Стрелками показаны добавки ионофора A23187 (по 0,2 мМ).

уменьшается в среднем в 2,75 раза, а скорость выхода K^+ падает почти на 20% по сравнению с таковой при 0,01 мМ Ca^{2+} (по результатам трех измерений). (Скорость рассчитывалась по средней величине изменения количества K^+ или рН в течение 5 мин, деленной на 1 мл эритроцитов). В присутствии 10 мМ магния наблюдается слабая реверсия транспорта H^+ . Отметим также, что высокие концентрации ионов магния существенно снижают скорость реверсии потока H^+ при значении Ca^{2+} , равном 5 мМ.

При индуцировании K^+-H^+ обмена переносчиком ионов калия валиномином ионы кальция и магния даже при высоких концентрациях не вызывают реверсии потока H^+ .

В чем же причина одновременного выхода K^+ и H^+ из эритроцитов? В данном случае, по-видимому, могут быть два объяснения: 1) идет обмен K^+ и H^+ на Na^+ или (и) на Ca^{2+} ; 2) катионы выходят совместно с анионом, скорее всего с Cl^- , для которого эритроцитарная мембрана хорошо проницаема [1] и который является основным малым исоосмотическим анионом цитоплазмы (концентрация Cl^- в эритроцитах крысы 82 мМ [3]).

В некоторых работах [2, 14] было показано, что с увеличением концентрации Ca^{2+} в эритроцитах повышается проницаемость мембраны и для Na^+ и усиливается противотранспорт K^+-Na^+ через мембрану.

Мы исследовали действие Ca^{2+} на транспорт K^+ и H^+ , инкубируя эритроциты в среде с хлоридом вместо $NaCl$. Однако и в этом случае при концентрации Ca^{2+} , превышающей 1—2 мМ, происходит синхронный выход и K^+ и H^+ .

Поскольку известно, что поток Ca^{2+} увеличивается с повышением концентрации А23187 [9, 17], мы провели опыты при низкой концентрации ионофора (0.2 мкМ). Из рис. 2Б видно, что при 5 мМ Ca^{2+} происходит K^+-H^+ обмен. При 20 мМ Ca^{2+} можно заметить лишь незначительный вход H^+ (рис. 2В). Добавление еще одной порции ионофора приводит в обоих случаях к резкому изменению направления транспорта H^+ . Скорость выхода K^+ при этом не изменяется. Интересная картина наблюдается при низких концентрациях Ca^{2+} (0.01 мМ). Последовательное добавление ионофора вызывает ступенчатый выход K^+ и вход H^+ (рис. 2А).

Следующим нашим шагом было исследование действия Ca^{2+} на транспорт K^+ и H^+ при разных концентрациях $NaCl$ в среде. Известно, что изменение количества Cl^- в среде сопровождается сдвигом мембранного потенциала эритроцитов [10], и это может оказать влияние на перераспределение ионных потоков.

Таблица. Значения Ca^{2+} , необходимые для реверсии потока H^+ , при разных величинах начального мембранного потенциала ($\Delta\psi$). Количество эритроцитов и ионофора А23187 как в опытах, показанных на рис. 1. При 50 и 10 мМ $NaCl$ с целью сохранения осмолярности в среду добавляли 200 и 280 мМ сахара соответственно

$NaCl$, мМ	150	150	50	50	10	10
$CaCl_2$, мМ	0.01	5	0.01	10	0.01	20
$\Delta\psi$, мВ	-65.9 ± 8.9 n=11	-72.8 ± 10 n=9	-23.6 ± 6.2 n=9	-41.1 ± 5.2 n=4	$+9.6 \pm 4.8$ n=7	-23 ± 5 n=4

В таблице представлены начальные величины мембранного потенциала эритроцитов при разных концентрациях $NaCl$ и тех значениях Ca^{2+} в среде, при которых происходит реверсия потока H^+ .

Видно, что со снижением концентрации NaCl в среде, когда мембранный потенциал уменьшается по абсолютной величине (увеличивается с учетом знака), для реверсии транспорта H^+ необходимо повышать концентрацию добавляемого Ca^{2+} . Возможно, что и при этом, как и при низких концентрациях ионофора, понижается скорость транспорта Ca^{2+} в эритроциты.

Известно, что ионофор А 23187, помимо активирования Ca^{2+} -зависимого калиевого канала, индуцирует также электронейтральный обмен Ca^{2+} на протоны [12]. В наших экспериментах с эритроцитами обмен Ca^{2+} на H^+ (и K^+), т. е. реверсия потока H^+ , происходит лишь при высоких концентрациях Ca^{2+} . При уменьшении концентрации ионофора или NaCl в среде для подобного обмена необходимо увеличивать количество добавляемого Ca^{2+} . Поэтому можно считать, что эффект реверсии H^+ обусловлен одновременным обменом Ca^{2+} на H^+ и K^+ при достаточно большой скорости транспорта Ca^{2+} в эритроциты (если движения H^+ нет, идет обмен Ca^{2+} на K^+). Необходимость для реверсии H^+ более высоких концентраций Mg^{2+} , по сравнению с Ca^{2+} , скорее всего связана с меньшей скоростью опосредованного А 23187 транспорта Mg^{2+} через мембраны [11]. Конечно, не исключено участие Cl^- в процессе перераспределения ионов. Уменьшение же скорости выхода K^+ из эритроцитов, проявляющееся уже с концентрацией Mg^{2+} порядка 0,1 мМ и при гораздо более высоких значениях Ca^{2+} , может быть следствием влияния двухвалентных ионов на структуру мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лев А. А. В кн.: Ионная избирательность клеточных мембран. Л., 1975.
2. Adragna N., Canessa M., Blize J., Solomon H., Tosteson D. C. *Clint. Sci.*, 61, 11—12, 1981.
3. Bernstein R. E. *Science*, 120, 459—460, 1954.
4. Gardos G. *Acta Physiol. Hung.*, 10, 185—193, 1956.
5. Harris E. S., Pressman B. C. *Nature*, 216, 918—920, 1967.
6. Lew V. S. *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 827—830, 1971.
7. Lew V. S. *J. Physiol. Lond.*, 206, 35—36, 1970.
8. Lew V. S., Ferreira H. G. *Nature*, 263, 336—338, 1976.
9. Lew V. S., Simonsen L. O. *J. Physiol.*, 308, 60, P, 1980.
10. Macey R. J., Adorante J. S., Orme F. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 284—295, 1978.
11. Moronne N. M., Cohen J. *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 793—797, 1982.
12. Pfeiffer D. R., Taylor R. W., Lardy H. A. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 307, 402—423, 1978.
13. Reed P. W. J. *Biol. Chem.*, 251, 3489—3493, 1976.
14. Romero P. J. *J. Membrane Biol.*, 29, 329—343, 1976.
15. Romero P. J., Whittam R. J. *Physiol. Lond.*, 211, 431—507, 1971.
16. Sarkadi B., Szasz J., Gardos G. *J. Membrane Biol.*, 26, 357—370, 1976.
17. Scharf O., Foder B., Skibsted U. *Biochim. Biophys. Acta*, 730, 295—305, 1983.

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра
хирургии АМН СССР

Поступило 22.X 1985 г.

ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ K^+ У *SERRATIA MARCESCENS*

А. Ж. ХАЧАТРЯН

Измерены потоки H^+ и K^+ и величина мембранного потенциала у грамотрицательных бактерий *S. marcescens*. Показано, что повышение осмотического давления среды ведет к усилению обмена H^+ на K^+ в присутствии глюкозы. Стехиометрия ионного обмена H^+ на K^+ у этих бактерий не сохраняется в отличие от таковой у *E. coli*. Определены кинетические характеристики исследованной транспортной системы: $K_m = 1,5 \text{ mM}$, $V_{max} = 0,4 \text{ mM} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Q_{10} для потоков H^+ и K^+ равно 2,0—2,5. Мембранный потенциал падает почти до нуля при введении в среду глюкозы, что вызвано независимым от потока H^+ входом ионов K^+ .

Մասնաշաղկապի *S. marcescens* մանրէների մոտ չափված են H^+ -ի և K^+ -ի հոսքերը և մեմբրանային պոտենցիալի մեծությունը: Ծույզ է տրված, որ գլյուկոզայի առկայությանը միջավայրի օսմոտիկ ճնշման ավելացումը հանգեցնում է H^+ - K^+ փոխանակման ուժեղացմանը: Ի տարբերություն *E. coli* բջջերի, այս մանրէների մոտ H^+ - K^+ փոխանակման ստեքիոմետրիան չի պահպանվում: Որոշված են ուսումնասիրված տրանսպորտային սխեմայի կինետիկ բնութագրերը: $K_m = 1,5 \text{ մՄ}$, $V_{max} = 0,4 \text{ մՄ} \cdot \text{գ}^{-1} \cdot \text{րոպե}^{-1}$: H^+ -ի և K^+ -ի հոսքերի համար Q_{10} ցուցանիշ է 2,0—2,5: Սիդիայարում գլյուկոզի ավելացնելիս մեմբրանային պոտենցիալի բնիկում է համարյա մինչև զրո, որն առաջանում է H^+ հոսքից անկախ K^+ իոնների մուտքով:

The flows of H^+ and K^+ and the value of the membrane potential of gram-negative bacteria *S. marcescens* are measured. It has been shown, that in the presence of glucose the increase of osmotic pressure of the medium leads to the intensive exchange of H^+ for K^+ . Unlike *E. coli* cells, the stoichiometry of H^+ - K^+ exchange of these bacteria does not remain. The kinetic characteristics of the investigative transport system are defined: $K_m = 1.5 \text{ mM}$, $V_{max} = 0.4 \text{ mM} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Q_{10} for flows of H^+ and K^+ is 2.0—2.5. When glucose is injected into the medium, the membrane potential falls to about zero, which is connected with the K^+ entry independent of H^+ flow.

Ключевые слова: бактерии *S. marcescens*, осмотическое давление, мембранный потенциал, ионы калия.

Ионы калия наряду с другими неорганическими ионами — натрия, магния, кальция, меди, марганца, железа и аммония — входят в состав минеральных веществ бактерий и необходимы для их жизнедеятельности [6, 13, 22]. Это в первую очередь относится к грамотрицательным бактериям, у которых ионы калия участвуют в осморегуляции [18, 19], поддержании внутриклеточного рН [10, 11, 29], регуляции активности ферментов [2]. Необходимая внутриклеточная концентрация ионов калия обеспечивается транспортными системами калия, способными накачивать этот ион в количествах, намного превышающих его количество во внешней среде [7, 12, 21, 32, 33]. Одной из характерных особенностей процесса поглощения K^+ у грамотрицательных бактерий *E. coli* является чувствительность потоков H^+ и K^+ к осмотическому

давлению среды [8, 18, 19]. Показано, что у *E. coli* чувствительностью к тоничности среды обладает как kdp-система, так и H^+ -АТФазный комплекс $ecF_1 \cdot F_0$ [31]. При снижении осмотического давления среды анаэробно выращенные *E. coli* не способны поглощать ионы калия [24, 25]. При анаэробном выращивании Trk-система транспорта K^+ у этих бактерий, по-видимому, структурно связывается с H^+ -АТФазным комплексом $ecF_1 \cdot F_0$, и такой суперкомплекс функционирует как H^+ - K^+ насос с устойчивой стехиометрией АТФ: $2H^+ : 1K^+$ [9, 26, 27]. В свете сказанного представляет интерес изучение природы транспорта ионов K^+ у других видов, таксономически близких к *E. coli*. С этой целью нами исследованы биоэлектрохимические характеристики транспорта ионов K^+ у *Serratia marcescens*, свидетельствующие о существенном отличии транспорта K^+ у этих бактерий по сравнению с таковым у *E. coli*.

Материал и методика. Использовались клетки *S. marcescens* (штамм ATCC 9986, липкий тип), выращиваемые при 30° до ранней стационарной фазы двумя способами: 1) в среде, содержащей пептон-2, NaCl—0,5, K_2HPO_4 —0,2, глюкозу—0,5%, без принудительной аэрации (анаэробные клетки); 2) в жидкой среде Гливера (NH_4Cl —0,5, NH_4NO_3 —0,1, Na_2SO_4 —0,2, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ —0,3, KH_2PO_4 —0,1, $MgSO_4$ —0,01, с 0,5% сульфата магния с принудительной аэрацией (аэробные клетки). После достижения ранней стационарной фазы (18—20 ч) клетки осаждались центрифугированием при 5000 об/мин, отмывались дистиллированной водой или раствором неутилизируемого сахара арабинозы необходимой концентрации (для создания соответствующего осмотического шока) и вновь осаждались. Осадок разбавлялся небольшим количеством отмывочного раствора и переносился в экспериментальный раствор следующего состава: трис-50, KCl—от 1 до 15, NaCl—1, $MgSO_4$ —0,1 мМ. Ортофосфорная кислота (11 М) добавлялась в количествах, необходимых для создания требуемого pH. Тоничность раствора регулировалась добавлением арабинозы. В течение всего опыта в ячейке поддерживалась постоянная температура (30°, 20° и 10°).

Количество биомассы определялось по оптической плотности бактериальной суспензии, сухому весу клеток в 1 мл и по титру—количеству жизнеспособных клеток в единице объема. Размеры клеток определялись с помощью микроскопа. Объем анаэробных клеток составлял $3,8 \cdot 10^{-13}$ см³, а аэробных— $2,4 \cdot 10^{-13}$ см³, что несколько отличается от ранее приведенных данных [30].

Осмотический шок для клеток—положительный или отрицательный—создавался резким повышением тоничности экспериментального раствора за счет введения неутилизируемого сахара арабинозы, либо перенесением клеток из отмывочного раствора с высокой тоничностью в экспериментальный раствор с более низкой тоничностью.

Потоки ионов рассчитывались по измеряемому неспецифическим электродами изменению активности ионов (Δa) в среде за интервал времени (Δt) $I \sim \frac{\Delta a}{\Delta t}$. Активность ионов в любой момент времени определялась уравнением Никольского [4]:

$$E = E_0 + S \lg (a_K + ka_{Na}),$$

куда кроме уже упомянутых величин входит E —регистрируемый потенциал, E_0 —потенциал асимметрии электрода, S —изменение показания данного электрода при 10-кратном изменении активности иона, равное 54 мВ, k —коэффициент избирательности электрода, равный 0,14.

Разность электрических потенциалов (РЭП) у предварительно обработанных ЭДТА клеток определялась по известной методике [20, 23].

Результаты и обсуждение. Одной из характерных особенностей ионного обмена у бактерий *S. marcescens* является чувствительность глюкозозависимых потоков H^+ и K^+ к изменению осмотического давления среды [5]. Как и у *E. coli*, поглощение ионов калия у *S. marces-*

сепс наблюдается только в присутствии источника энергии—глюкозы. Резкое увеличение тоничности внешней среды вызывает усиление поглощения K^+ и секреции H^+ у клеток, подвергнутых как положительному, так и отрицательному осмотическому шоку (рис. 1), в чем проявляется

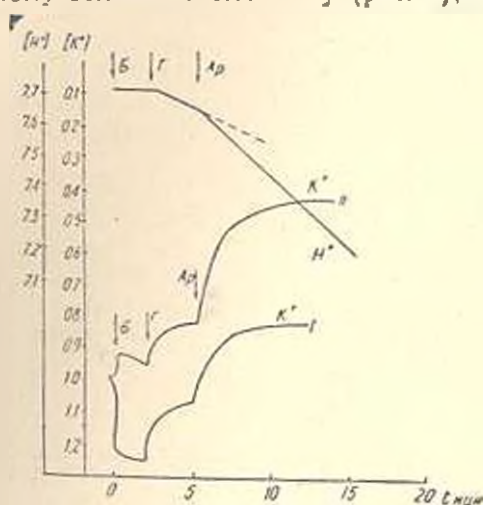


Рис. 1. Поглощение K^+ и секреция H^+ у анаэробных клеток, подвергнутых отрицательному (I) и положительному (II) осмотическому шоку. Б—бактерии, Г—глюкоза (10 мМ), Ар—арабиноза (200 мМ).

основное различие в осмочувствительности ионного обмена у *S. marcescens* по сравнению с *E. coli* [3, 14]. Кроме того, у *S. marcescens* никогда не наблюдалось двухфазного поглощения ионов калия, аналогичного обнаруженному у *E. coli* [1, 14]. У аэробно выращенных клеток *E. coli* утрачена чувствительность поглощения калия к изменению осмотического давления внешней среды [28]. У клеток *S. marcescens*, как анаэробов, так и аэробов, это свойство сохраняется.

Анализ зависимости направленного внутрь потока K^+ у аэробных и анаэробных клеток *S. marcescens* от концентрации K^+ во внешней среде позволил определить кинетические характеристики этого процесса. Для анаэробных клеток $k_m = 1,5$ мМ, $V_{max} = 0,4$ мМ·г⁻¹·мин⁻¹, что отличается от тех же параметров для *E. coli* [31]. Для аэробных клеток k_m близко к нулю. Более точные измерения этих параметров у аэробов требуют привлечения других методов.

Тщательное исследование характера ионного обмена у *E. coli* показало, что независимо от внешних условий—вида источника энергии, pH среды, ее температуры, концентрации ионов калия—осмочувствительный глюкозозависимый ДЦКД-ингибируемый обмен ионов калия внешней среды на внутриклеточные ионы водорода осуществляется с постоянной стехиометрией $2H^+ : 1 K^+$ [15, 16]. Как показано на рис. 2, у *S. marcescens* это соотношение не сохраняется, оно зависит от активности K^+ в среде и падает от 1,3 при низкой концентрации ионов калия до 0,3 при ее увеличении. Это говорит об отсутствии непосредственной структурной связи между системой транспорта K^+ и водородным АТФ-азным комплексом, не исключаяющей, однако, опосредованной связи

между ними. Вывод об отсутствии непосредственной связи между системами переноса ионов калия и водорода также вытекает из анализа потоков H^+ и K^+ при разных температурах, т. е. при сопоставлении величины Q_{10} для них.

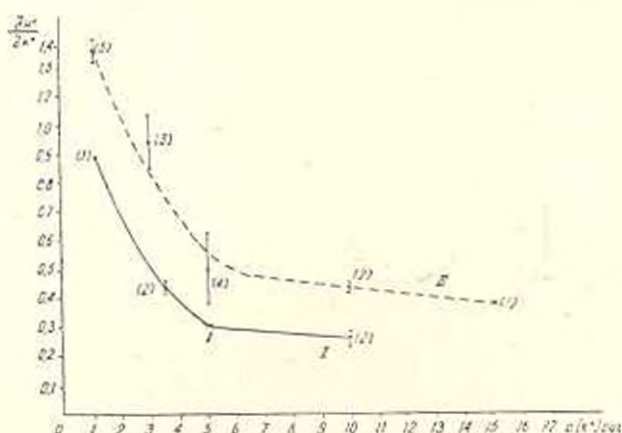


Рис. 2. Зависимость отношения потока ионов водорода и калия J_{H^+}/J_{K^+} от концентрации ионов калия в среде у аэробных (I) и анаэробных (II) клеток. В скобках указаны число измерений для каждой точки.

Измерение РЭП на мембране *S. marcescens* показало, что у аэробных клеток она составляет 175 ± 8 мВ, а у анаэробных — 130 ± 6 мВ (отрицательный внутри), и то время как потоки ионов, наоборот, у анаэробных клеток намного выше по сравнению с аэробными. Причем аппликация глюкозы вызывает снижение мембранного потенциала почти до нуля у анаэробных клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что только наличие РЭП на мембране не может быть движущей силой, вызывающей наблюдаемое поглощение ионов калия.

Таблица. Значения Q_{10} для глюкозой (H^+ и K^+) и арабинозой (H^+ и K^+) компонент потоков ионов

Вид клеток	H^+ _{гл}	K^+ _{гл}	H^+ _{ар}	K^+ _{ар}
Анаэробные	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6	2.2 ± 0.6	2.5 ± 0.7
Аэробные	2.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.2

Таким образом, сопоставление кинетических характеристик поглощения H^+ и K^+ у *S. marcescens* и *E. coli* свидетельствует о различии механизма осмотчувствительного энергозависимого ионного обмена у этих бактерий. Система поглощения K^+ у *S. marcescens* существенно отличается от kdp-системы *E. coli* [17] своими электрохимическими и кинетическими параметрами.

ЛИТЕРАТУРА

- Алиханян М. А., Миртиросов С. М., Петросян Л. С. Докл. АН АрмССР, 58, 94, 1973.

2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
3. Дургарьян С. С., Мартirosов С. М. Биофизика, 25, 654, 1980.
4. Никольский Б. П., Матерова Е. А. Ионселективные электроды. Л., 1980.
5. Хачатрян А. Ж., Дургарьян С. С., Мартirosов С. М. Биофизика, 1986 (в печати).
6. Шлегель Г. Общая микробиология. М., 1972.
7. Bakker E. P., Harold F. M. J. Biol. Chem., 255, 433, 1980.
8. Berger E. A., Heppel L. A. J. Biol. Chem., 249, 24, 7747, 1974.
9. Bourd G. J., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 10, 315, 1983.
10. Brey R. N., Beck J. C., Rosen B. P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 4, 1589 1978.
11. Brey R. N., Beck J. C., Rosen B. P. J. Biol. Chem., 255, 39, 1980.
12. Damadian R. J. Bact., 95, 113, 1968.
13. Damadian R. Biophys. J., 11, 39, 1971.
14. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 554, 1978.
15. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 561, 1978.
16. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 567, 1978.
17. Epstein W., Laimins L. Trends Biochem. Sci., 5, 21, 1980.
18. Epstein W., Schultz S. G. J. Gen. Physiol., 49, 2, 221, 1965.
19. Epstein W., Schultz S. G. In: Microbial Protoplasts, spheroplasts and L-form. Guze L. B., Baltimore, 1969.
20. Grinlavene B., Chmelauskaitė V., Girnius L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 206, 1974.
21. Heefner D. I. Mol. Cell. Biochem., 11, 81, 1982.
22. Luria S. E. In: The Bacteria, Eds. Gunstalus J. C., Stanley R. J., N.-Y., 1960.
23. Lippman E. A., Topaly V. P. Biochem. Biophys. Acta, 163, 125, 1968.
24. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 8, 605, 1981.
25. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 11, 29, 1983.
26. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 9, 459, 1982.
27. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 13, 1955, 1984.
28. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 13, 248, 1985.
29. Padan E., Zilberstein D., Rottenberg H. European J. of Biochem., 63, 533, 1976.
30. Powell E. O. Sci. Food. Agric., 1, 1963.]
31. Rhoads D. B., Waters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 325, 1976.
32. Schultz S. G., Solomon A. K. J. Gen. Physiol., 45, 355, 1961.
33. Weiden P. Senior Thesis, Harvard College, 1963.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.XI 1985 г.

«Биолог. ж. Армении» г. XXXIX, № 3, 1986

УДК 577.23

Δ_{PH} У РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЙ

А. А. ТРЧУНЯН, В. А. ТЕР-НИКОГОСЯН

Анаэробно выращенные *Escherichia coli* K-12 (r), *Salmonella typhimurium* LT-2 поддерживают Δ_{PH} около 150 мВ. Δ_{PH} у дезэнергизованных бактерий и мутантов *E. coli* AN 120, *S. typhimurium* TH-31 включает DCC⁺ — чувствительную компоненту. Глюкоза приводит к кратковременному увеличению Δ_{PH} у диких типов бактерий, не обработанных EDTA. Аэробно выращенные бактерии и аэробные *Micrococcus lysodeikticus* имеют высокий Δ_{PH}, соответствующий распределению K⁺ между клеткой и средой. Дыхательная цепь является, возможно, мощным генератором Δ_{PH}, имеющего существенное значение для регуляции функций аэробных бактерий.

Անաէրոբ պայմաններում աճեցված *Escherichia coli* K-12 (1), *Salmonella typhimurium* LT-2 բակտերիաները պահպանում են $\Delta\bar{\mu}_{H^+}/F$ մոտ 150 մՎ, $\Delta\bar{\mu}$ զինվորագրված բակտերիաների և *E. coli* AN 120, *S. typhimurium* TH-31 սոս — մու — անտների մոտ ունի զի ցիկլոֆոֆիլ կարբոդիֆիլ-գլայուն կոմպոնենտ, էթիլենդիամինտետրաքսուսաթթվով լմշակված բակտերիաների վարդի տիպերի մոտ գլյուկոզան հանգեցնում է $\Delta\bar{\mu}$ -ի կարճատև մեծացման: Անէրոբ պայմաններում աճեցված բակտերիաները և անէրոբ *Micrococcus lysodeikticus* ունեն բարձր $\Delta\bar{\mu}$, որի արժեքը համընկնում է բջջի և միջավայրի միջև ΔK^+ -ի բաշխմանը: Շնչառական շղթան հանդիսանում է $\Delta\bar{\mu}$ -ի հզոր գեներատոր, որն անէրոբ բակտերիաների ֆունկցիոնների կարգավորման համար ունի էական նշանակություն:

Anaerobically grown *Escherichia coli* K-12 (1), *Salmonella typhimurium* LT-2 have a proton-motive force $\Delta\bar{\mu}_{H^+}/F$ equal to 150 mV, $\Delta\bar{\mu}$ of bacteria and of the unc-mutants *E. coli* AN 120, *S. typhimurium* TH-31 in the media without energy source has DCC-sensitive component. Glucose leads to the short-time increase of $\Delta\bar{\mu}$ in wild types of bacteria, not treated with EDTA. Aerobically grown bacteria and aerobic *Micrococcus lysodeikticus* have the high $\Delta\bar{\mu}$ which is in good conformity with the K^+ distribution between the cells and a medium. Respiratory chain is powerful generator of $\Delta\bar{\mu}$, which has essential role for regulation of function in aerobic bacteria.

Ключевые слова: анаэробно и аэробно выращенные бактерии, $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, мембранный потенциал, градиент pH, транспорт K^+ .

Мембранная форма энергии — $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, постулированная Мэттеллом [19] в качестве энергетического посредника между дыхательной или фотосинтетической цепью мембраны и системой синтеза АТФ-Н-АТФ-синтетазой и нашедшая экспериментальные подтверждения на бактериях [3, 4, 13], состоит из двух компонентов: электрического и химического:

$\frac{\Delta\bar{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta\psi + Z\Delta pH$, где $Z = \frac{2,3 RT}{F}$ или равен 58,8 мВ при

20° и 61,1 мВ при 37°С. Распределение энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ между двумя компонентами зависит от условий среды и потребностей клетки. При перенесении *E. coli*, поддерживающих нейтральный внутриклеточный pH, в кислую среду ΔpH возрастает [20, 25]. Поглощение K^+ у *E. coli*, вызывающее рассеяние $\Delta\psi$, приводит к повышению ΔpH [1, 7].

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ играет существенную роль в энергозависимых явлениях у бактерий. Он служит источником энергии для таких процессов, как синтез АТФ, трансгидрогеназные реакции, транспорт ряда ионов и веществ, подвижность клеток и другие [1, 3, 4, 13].

Определению и исследованию $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ у различных бактерий посвящена настоящая работа.

Материал и методики. Бактерии и реактивы. Краткое описание бактерий, использованных в работе, дано в табл. 1. Использовали стандартные буферные растворы (Radiometer, Дания), трис (Reanal, Венгрия), тетрафенилфосфоний (TRP+) бромистый (Chemapol, Чехословакия), N,N'-дициклогексилкарбодимид (DCC), салициловую кислоту (Sigma, США) и другие реактивы отечественного производства.

Подготовка бактерий к эксперименту. В анаэробных условиях бактерии выращивали в 800 мл пептонной среды с глюкозой [9] в 1-литровой колбе, в аэробных — в 150 мл солевой среды с сукцинатом [11] в 1-литровой колбе, непрерывно встряхиваемой. Росли в течение 16—22 ч при 37°. *M. lysodeikticus* выращивали в 150 мл солевой среды с глюкозой [23], в 1-литровой колбе, непрерывно встряхиваемой, при 28°. Бактерии обрабатывали этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) в концентрации 10 (*E. coli*) или 20 мМ (*S. typhimurium*, *M. lysodeikticus*, *L. salivarius*).

В остальном их подготовка к эксперименту не отличалась от ранее описанной [5, 9]. Титр бактерий определяли подсчетом колоний после посева на твердые среды, титр молочнокислых бактерий *L. salivarius*—методом предельных разведений. Размеры бактерий определяли с помощью микроскопа «Биолам» с окуляр-микрометром (ЛОМО).

Таблица 1. Краткая характеристика бактерий, использованных в работе

Бактерии	Генотип	Предоставлен	Литература
<i>E. coli</i> K-12 (λ)	дикий тип	Генетическим центром в Нью-Хейвене (США)	[9]
<i>E. coli</i> AN 120	мутант ипсА		
<i>S. typhimurium</i> LT-2	дикий тип	В. Саканяном (ИИТИ аминокислот, г. Ереван)	[22]
<i>S. typhimurium</i> TH-31	мутант ипс	проф. Ф. Браггом (Британско-колумбийский университет, Ванкувер, Канада)	
<i>M. lysodeikticus</i> B-102	дикий тип	Всесоюзной коллекцией микроорганизмов (г. Москва)	
<i>L. salivarius</i> 3071	дикий тип	С. Тер-Казарьяном (Ереванский зоопланктонинститут)	

Величины $\Delta\psi$ и ΔpH рассчитывали по распределению ТРГ⁺ и салициловой кислоты между клеткой и средой соответственно, определяемому с помощью соответствующих селективных электродов, изготовленных в Вильнюсском госуниверситете под руководством проф. И. Гринюса.

Распределение K^+ между клеткой и средой рассчитывали как отношение внутриклеточной активности K^+ к его содержанию в среде. Внутриклеточную активность K^+ определяли по выходу K^+ из бактерий после их обработки толуолом в концентрации 1–2 мкл/мл, определяемому с помощью K^+ -селективного электрода.

Результаты подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение. 1. $\Delta\psi$, ΔpH у анаэробно выращенных бактерий. $\Delta\psi$ и перераспределение $\Delta\psi$ и ΔpH . Анаэробно выращенные *E. coli* K-12 (λ) и *S. typhimurium* LT-2 имеют $\Delta\psi_{H_2O}^{H_2O}$ около 150 мВ. С увеличением pH среды от 4,9 до 7,5 $\Delta\psi$ и ΔpH у *E. coli* изменяются от 72 и 90 мВ до 143 мВ и нуля соответственно (рис. 1 а),

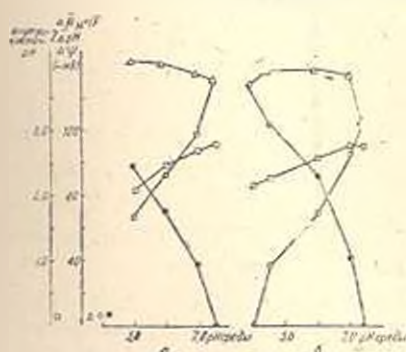


Рис. 1. Величины $\Delta\psi$ (Δ), ΔpH (●) и внутриклеточного pH (□) при различных значениях pH среды у анаэробно выращенных *E. coli* K-12 (λ) (а) и *S. typhimurium* LT-2 (б). Бактерии отмыты в растворе EDTA и перенесены в экспериментальный раствор с осмотической 430 мОсМ, активность $K^+ = 0,96$ мМ, концентрации ТРГ⁺ и салициловой кислоты 10^{-6} М и 6×10^{-5} М соответственно. Отклонения не выходят за пределы обозначений.

а у *S. typhimurium* с увеличением pH среды от 4,0 до 7,5 эти величины изменяются от нуля и 148 мВ до 124 мВ и нуля соответственно (рис. 1 б). При этом ΔpH равен нулю при pH среды 7,55 для *E. coli* и 7,47 для *S. typhimurium*, что согласуется с данными, согласно которым при

pH среды 7,5 ΔpH на интактных бактериях и везикулах *E. coli* равно нулю [20, 21, 25]. Следует обратить внимание на то, что величина ΔpH у обоих видов бактерий постоянно держится на относительно постоянном уровне, хотя значения $\Delta \Psi$ и ΔpH заметно отличаются (рис. 1).

Деэнергизованные бактерии имеют $\Delta \Psi$. Важным является тот факт, что деэнергизованные как *E. coli* K-12 (λ) и ипе-мутант *E. coli* AN 120, так и *S. typhimurium* LT2 и ипе-мутант *S. typhimurium* TH-31 имеют высокий $\Delta \Psi$, устойчивый во времени и свидетельствующий о независимости этой величины от наличия источника энергии в среде. Более того, эта величина чувствительна к DCC: она уменьшается после введения его в среду (не показано). Наличие DCC-чувствительной компоненты $\Delta \Psi$ как у диких типов деэнергизованных бактерий, так и у ипе-мутантов с нефункционирующей H^+ -АТФ-азой можно объяснить высказанным ранее предположением о том, что в мембранах бактерий имеются сквозные протонные каналы [16].

Влияние глюкозы на $\Delta \Psi$. При введении глюкозы в среду как у *E. coli* K-12 (λ) [10, 17, 18], так и у *S. typhimurium* LT-2 [5] наблюдается кратковременный DCC-чувствительный обмен $2H^+$ клетки на один K^+ среды с участием H^+ -АТФ-азы и Tgk системы поглощения K^+ . При этом установлено, что макроскопическая электронейтральность поддерживается благодаря секреции молочной кислоты в виде аниона [17].

Изменяется ли $\Delta \Psi$ при введении глюкозы и каким образом? Кратковременное увеличение $\Delta \Psi$ у *E. coli* при введении глюкозы наблюдалось ранее [2, 12, 16]. Глюкоза приводит к кратковременному увеличению $\Delta \Psi$ у *E. coli* K-12 (λ) и *S. typhimurium* LT-2, не обработанных EDTA (рис. 2, кр. 1, 2). Такой эффект совпадает во времени с перио-

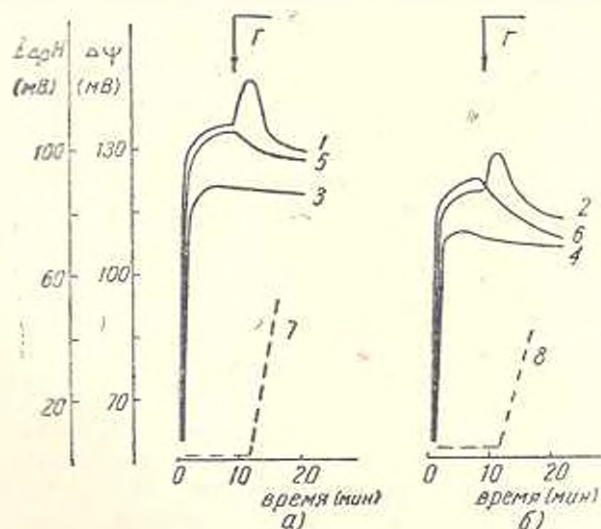


Рис. 2. Влияние глюкозы на $\Delta \Psi$ (сплошные кривые) и ΔpH (пунктир) у анаэробно выращенных *E. coli* K-12 (2.) (а) и *S. typhimurium* LT-2 (6). Бактерии отмыты в дистиллированной воде (1—4) или растворе EDTA в концентрации 10 (5,7) или 20 mM (6,8) и перенесены в экспериментальный раствор, активность K^+ 0,96 mM, концентрации TRP^+ и салициловой кислоты 10^{-6} M и 6×10^{-5} M соответственно, pH 7,6; DCC (3, 4) в концентрации $2,5 \times 10^{-4}$ M, глюкоза введена (стрелка) в концентрации 10 mM.

дом работы H^+ -АТФ-азы [17, 18] и не наблюдается в присутствии ДСС (рис. 2, кр. 3, 4). Значит, энергозависимый механизм, обменивающий $2H^+$ клетки на один K^+ среды, способен к генерации высоких значений $\Delta\psi$, но в коротком интервале времени, после чего наблюдается падение этого показателя, более выраженное у *S. typhimurium* (рис. 2, кр. 1, 2). У бактерий, обработанных EDTA, глюкоза уменьшает величину $\Delta\psi$ (рис. 2, кр. 5, 6), хотя энергозависимый обмен $2H^+$ на K^+ сохраняется. В то же время возрастает ΔpH (рис. 2). Падение $\Delta\psi$ после его кратковременного увеличения при введении глюкозы в среду связано, по-видимому, с перераспределением энергии $\Delta\bar{a}_H$ и увеличением ΔpH при обмене $2H^+$ клетки на один K^+ среды. Оно может быть обусловлено и усиленной секрецией молочной кислоты в виде аниона, в том числе после обработки бактерий EDTA.

2. $\Delta\psi$ у аэробно выращенных бактерий. Аэробно выращенные бактерии имеют большую величину $\Delta\psi$, чем анаэробно выращенные. Величина $\Delta\psi$, определенная в различных лабораториях, колеблется от 120—125 [7, 15] до 180—200 мВ [6, 14] для *E. coli* и от 110 до 150 мВ для *S. typhimurium* [24]. И это не случайно, ибо $\Delta\psi$ сильно зависит от условий роста бактерий, ионной силы раствора, содержания K^+ в среде и других факторов. Высказано предположение, что величина $\Delta\mu_{H^+}$ у аэробных бактерий может быть выше, чем у анаэробных [14].

Аэробно выращенные *E. coli* K-12 (λ) и *S. typhimurium* LT-2 имеют заметно больший $\Delta\psi$, чем анаэробно выращенные (табл. 2). ΔpH у

Таблица 2. Величины $\Delta\psi$ и калиевый равновесный потенциал у различных бактерий. Бактерии отмыты в дистиллированной воде и перенесены в экспериментальный раствор с осмотическостью 570 мосМ, глюкоза в концентрации 10 мм, pH 7,6, TPP⁺ в концентрации 10^{-4} М. Калиевый равновесный потенциал рассчитан из распределения K^+ между клеткой и средой по уравнению Нернста. Количество экспериментов 6. Отклонения даны как стандартные.

Бактерии	$\Delta\psi$ —мВ	Активность K^+ в среде, иМ	Распреде- ление K^+ между клет- кой и средой	Калиевый равновесный потенциал, мВ
Аэробно выращенные:				
<i>E. coli</i> K—12 (λ)	169 $\pm$ 3	0.51 $\pm$ 0.05	721 $\pm$ 73	175 $\pm$ 2
<i>S. typhimurium</i> LT—2	165 $\pm$ 4	0.19 $\pm$ 0.00	584 $\pm$ 50	169 $\pm$ 3
Анаэробно выращенные:				
<i>E. coli</i> K—12 (λ)	132 $\pm$ 4	0.43 $\pm$ 0.00	2529 $\pm$ 118	108 $\pm$ 2
<i>S. typhimurium</i> LT—2	110 $\pm$ 4	0.15 $\pm$ 0.00	2464 $\pm$ 161	207 $\pm$ 4

этих бактерий при pH среды 7,7 равен нулю. При этом нами учтен тот факт, что аэробно выращенные бактерии несколько уступают по своим размерам анаэробно выращенным (табл. 3). Такой вывод подтверждается и тем, что $\Delta\psi$ у анаэробных *L. salivarius* равен 125 $\pm$ 4 мВ и меньше, чем у аэробных *M. lysodeikticus*, у которых он равен 180 $\pm$ 2 мВ. Если принять, что основными генераторами $\Delta\psi$ у анаэробно выращенных бактерий являются H^+ -АТФ-аза и, возможно, сквозные протонные

или другие каналы, а у аэробно выращенных—дыхательная цепь, то на основании полученных данных можно утверждать, что дыхательная цепь генерирует $\Delta\psi$ большой величины, используемый для различных процессов. Если для синтеза молекулы АТФ H^+ -АТФ-синтетазой тре-

Таблица 3. Размеры бактерий, выращенных в анаэробных и аэробных условиях. Размеры определены после перенесения бактерий в экспериментальный раствор с осмотичностью 430 мосМ. Количество изменений 25. Отклонения даны как стандартные.

Бактерия	Длина $\times 10^{-4}$ см	Ширина $\times 10^{-4}$ см	Объем клет- ки $\times 10^{-12}$ см ³	Внутрикле- точный объем 10^{-12} см ³
<i>E. coli</i> K-12 (λ)				
анаэробно выращенные	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.23 ± 0.07	0.86 ± 0.05
аэробно выращенные	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.02 ± 0.06	0.71 ± 0.04
<i>S. typhimurium</i> LT-2				
анаэробно выращенные	2.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.33 ± 0.07	1.00 ± 0.05
аэробно выращенные	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.99 ± 0.07	0.75 ± 0.05

буется около 50 кДж энергии [3, 4], то указанная величина $\Delta\psi$ свидетельствует о том, что при синтезе АТФ у аэробных бактерий через H^+ -АТФ-синтетазу переносится, скорее всего, три H^+ .

$\Delta\psi$ и распределение K^+ между клеткой и средой. Величина $\Delta\psi$ у аэробно выращенных *E. coli* K-12 (λ) и *S. typhimurium* LT-2 хорошо совпадает с калиевым равновесным потенциалом, рассчитанным из распределения K^+ между клеткой и средой (табл. 2). Величина $\Delta\psi$ у анаэробно выращенных бактерий заметно ниже калиевого «равновесного» потенциала (табл. 2). Иными словами, $\Delta\psi$ у аэробных бактерий служит, возможно, источником энергии для поглощения и накопления K^+ в клетке.

Роль $\Delta\psi$ в синтезе АТФ, постулированная Митчеллом и доказанная множеством экспериментальных данных [3, 4, 13], и использование его в качестве источника энергии для различных процессов, в частности транспорта K^+ , могут лежать в основе феномена высоких значений этого показателя у аэробных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Драчев А. Л., Маркин В. С., Скулачев В. П. Биологические мембраны, 1, 453—477, 1984.
2. Дургарьян С. С., Мартыросов С. М. Биофизика, 25, 469—472, 1980.
3. Николс Д. Дж. Биоэнергетика. Введение в хемотротическую теорию 190, М., 1985.
4. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. 202, М., 1972.
5. Трчинян А. А., Тер-Никогосян В. А., Мартыросов С. М. Биофизика, 31, 1986 (в печати).
6. Bakker E. P. Biochim. Biophys. Acta, 681, 474—483, 1982.
7. Bakker E. P., Mangerich W. E. Biochim. Biophys. Acta, 730, 379—386, 1933.
8. Butlin J. D., Cox G. B., Gibson F. Biochem. J., 124, 75—81, 1971.

9. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554—560, 1978.
10. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 567—573, 1978.
11. Epstein W., Klm B. S. J. Bacteriol., 108, 639—644, 1971.
12. Grinluviene B., Chmellauskalte V., Grinius L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 206—213, 1974.
13. Harold F. M. Curr. Top. Bioenerg., 6, 152—222, 1977.
14. Kashket E. Biochemistry, 21, 5534—5538, 1982.
15. Kashket E. FEBS Lett., 154, 343—346, 1983.
16. Martirosou S. M., Petrosian L. S., Trchounian A. A., Vartanian A. G. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 613—620, 1981.
17. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 25—32, 1981.
18. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 605—611, 1981.
19. Mitchell P. Nature, 191, 144—149, 1961.
20. Padan E., Zilberstein D., Rottenberg H. Eur. J. Biochem., 63, 533—541, 1976.
21. Ramos S., Schuldiner S., Kaback H. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 1892—1897, 1976.
22. Rogosa M., Hansen P. A. Intern. J. System. Bacteriol., 21, 177, 1971.
23. Ryabova I. D., Gorneva G. A., Ovchinnikov Yu. A. Biochim. Biophys. Acta, 401, 109—118, 1975.
24. Shiori J., Taylor B. L. J. Biol. Chem., 259, 10983—10988, 1984.
25. Zilberstein D., Agmon V., Schuldiner S., Padan E. J. Biol. Chem., 257, 3687—3691, 1982.

Ереванский государственный университет

Поступило 15.XI 1985 г.

УДК 575.12:581.162.32

О МНОЖЕСТВЕННЫХ АЛЛЕЛЯХ ЛОКУСА S

А. М. АГАДЖАНИЯ

Высказывается точка зрения, согласно которой в процессе возникновения и развития самосовместимости в результате последовательного мутационного изменения гена самонесовместимости в направлении $S_1 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2$ серия множественных аллелей, свойственная исходному состоянию гена S_1 , в общем сохраняется для гена S_2 и, в меньшей степени, для гена S_3 . Существование множественных аллелей постулируется и для гаметофитных факторов, обнаруженных у некоторых аавтофертильных видов. Перекрестное размножение самосовместимых популяций осуществляется на основе избирательности оплодотворения, определяемой различиями в экспрессивности серии аллелей самофертильности.

Արտահայտվում է տեսակետ այն մասին, որ ինքնանախապոկչություն զննի տատրոն- նական լուսազդին փոփոխությունն բնագործում ($S_1 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2$) S զննի նախնական փրնակին բնորդ բազմություններն փմնականում արտահայտվում է S_2 և ավելի քան S_3 զննի համար ներգործում է, որ բազմությունն շարքը հասնել է նաև որոշ ինքնափրոտի տեսակներում բացահայտված զամնափրոտային ֆակտորներին. Ինքնափրոտի տեսակների խո- լանն բազմազանությունը տեղի է ունենում բնորոգական բեղմնավորմամբ, որը պայմանավորվում է ինքնանախապոկչության ալելների տարբեր էքսպրեսիվությամբ:

They voice the point of view that during mutation changes of self-incompatible gene in the direction $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3$, series of alleles, which are characteristic of initial state of S-gene, in the whole remain for S_1 and less for S_2 .

Ключевые слова: множественные аллели, самонесовместимости, избирательность оплодотворения, перекрестное опыление.

Локус несовместимости, или локус S , играет весьма важную роль в жизни растений видов. Он находится в трех качественно различных состояниях: S_1 , S_2 и S_3 . Аллели самонесовместимости, или S_i -аллели, этого локуса, как известно, контролируют перекрестное размножение популяций автостерильных видов и одновременно обеспечивают защиту их генофонда от проникновения генов самосовместимых видов. Известно также, что аллели самонесовместимости представляют множественную серию. Многоаллельностью локуса S характеризуются обе системы гомоморфной самонесовместимости—гаметофитная и спорофитная. Размах изменчивости аллелей в локусе несовместимости, вероятно, является уникальным в генетике [19]. Особенно большое число S -аллелей обнаружено у видов с гаметофитной несовместимостью, у которых оно достигает нескольких десятков или даже сотен.

Хорошо известно, что все аллели самонесовместимости обладают высокой специфичностью. Каждый такой аллель, находясь в пестике, ингибирует пыльцу, несущую идентичный аллель, и воспринимает пыльцу со всеми остальными аллелями S_i . Поэтому растения самонесовместимых видов по S -гену обычно находятся в гетерозиготном состоянии.

В настоящее время не вызывает сомнения, что самонесовместимые виды в процессе эволюции дали начало видам самосовместимым. Сначала образовались автофертильные формы или виды типа SF (S_3 —по символике Льюиса и Кроу) с невысоким уровнем самосовместимости. Эти виды еще сохраняют двусторонние связи с исходными самонесовместимыми видами. Из видов SF впоследствии образовались типичные самосовместимые виды SC .

Возникновение и развитие самосовместимости происходит в результате последовательного мутационного изменения гена S . При мутировании от аллеля самонесовместимости S_1 образуется аллель самофертильности S_3 . Разумеется, самофертильная мутация $S_1 \rightarrow S_3$ при своем возникновении находится в гетерозиготном состоянии, и лишь в дальнейшем при самоопылении образуется гомозигота по данной мутации. Одностадийная мутация от S_1 к S_3 , как справедливо отмечают Льюис и Кроу [28], не может установиться в исходной самонесовместимой популяции. Кроме того, одностадийная мутация $S_1 \rightarrow S_3$, как это показал Пандей [30] на *Trifolium repens*, оказывается летальной. Трудно, однако, предположить, чтобы в результате одного только акта мутации в локусе S и образования, скажем, аллеля S_1 внезапно возникал признак самофертильности такой силы развития, какую мы видим сейчас, например, у *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca* и др. Скорее всего, автофертильность продолжала совершенствоваться и

после мутации самосовместимости. Естественный отбор постепенно накапливал соответствующие модификаторы, подгоняя их к контролирующим размножение олигогенам. И как считает большинство исследователей, в контроле самонесовместимости и односторонней несовместимости кроме S-олигогена участвует большое число полигенов.

По схеме возникновения ступенчатого аллелизма в локусе S [28], первый этап мутации представляется следующим образом. Все аллели самонесовместимости S_i при мутировании в аллель самофертильности теряют свою специфичность, что выражается в образовании не строго определенного количества аллелей самофертильности, соответствующего числу самонесовместимых аллелей, а одного единственного аллеля S_1 , реакция которого носит общий характер как в определении самофертильности, так и односторонней несовместимости. Иначе говоря, утрата (частичная) активности любого аллеля S_i приводит к образованию аллеля S_1 , лишённого всякой индивидуальности. Формы и виды (SF), несущие этот аллель, проявляют двустороннюю совместимость с прародительскими самонесовместимыми (SI) видами. В дальнейшем в результате ещё двухступенчатой мутации от аллеля S_1 образуется сначала аллель S_2 (гипотетический), а затем аллель S_3 , свойственный типичным самосовместимым видам SC. (Заметим, что ранее [1] нами была высказана точка зрения, по которой эволюция автофертильности могла обойтись без гипотетической мутации S_2 , ввиду того, что возникающее у гетерозигот S_1S_2 межаллельное взаимодействие, как показывают эксперименты, само по себе способно привести к образованию видов с так называемой конечной стадией самосовместимости SC).

В работах других авторов [18, 23, 26, 32, 34] также предполагается существование одного лишь аллеля S_1 , не говоря уже об аллеле S_2 . Эта модель мутационного процесса, при котором от различных S_i -аллелей образуется аллель S_1 с единым поведением, в настоящее время является общепринятой. Во всяком случае все исследователи в своих теоретических расчетах придерживаются представления о наличии множественной серии и группе антостерильных аллелей S_i и отсутствии таких серий в группах автофертильных аллелей S_1 и S_2 .

Между тем имеются серьезные основания полагать, что после мутации аллелей S_i в S_1 последние не теряют своей индивидуальности. Наиболее убедительным аргументом в пользу этой точки зрения является широкое распространение явления полиморфизма растений по степени перекрестноопыляемости у самых разных видов [12, 14, 22, 31]. Неоднородность растений по степени самосовместимости обнаружена также в наших опытах [3, 4] с автофертильной разновидностью *Lycopersicon hirsutum* i. *glabratum* (образец нр. 7924) и ее гибридами с типичными самосовместимыми видами томата (при исходных скрещиваниях использована смесь пыльцы от разных растений *glabratum*). Одновременно выявлены значительные индивидуальные различия между растениями F_1 этих гибридов по реакции на пыльцу материнского компонента и других тестеров самосовместимой пыльцы [1, 13]. Определенная часть гибридных растений одной и той же комбинации воспринимала пыльцу тестеров, в то время как другая часть—отвергла

ее. Новые данные, указывающие на существование полиморфизма растений по степени перекрестноопыляемости у ботанической разновидности *glabratum*, получены при изучении линии 2970 и ее гибридов с культурным томатом сорта Арканди 45 (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Варьирование растений по проценту завязываемости плодов при самоопылении у *L. hirsutum* f. *glabratum* и ее гибридов с культурным томатом

Объект исследования	Варианты самоопыления	Число растений	Процент растений с завязываемостью плодов										
			0	0,1—10,0	10,1—20,0	20,1—30,0	30,1—40,0	40,1—50,0	50,1—60,0	60,1—70,0	70,1—80,0	80,1—90,0	90,1—100,0
<i>L. hirsutum</i> <i>f. glabratum</i>	обычное самоопыление	60	80,0	8,3	8,3	1,7	1,7	—	—	—	—	—	—
	искусственное самоопыление	60	48,3	—	6,7	1,7	1,7	5,0	8,3	6,7	5,0	8,2	8,2
F ₂	обычное самоопыление	163	42,3	16,6	16,0	12,3	8,6	2,5	1,8	—	—	—	—
	искусственное самоопыление	73	12,3	11,0	9,6	11,0	17,8	11,0	8,2	9,6	4,1	5,5	—

Таблица 2. Распределение растений по проценту завязываемости плодов при опылении пылью культурного томата у гибридов F₂ *L. esculentum* × *L. hirsutum* f. *glabratum*

Комбинации опыления	Число растений	Процент растений с завязываемостью плодов									
		0	0.1—	10.1—	20.1—	30.1—	40.1—	50.1—	60.1—	70.1—	80.1—
			10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	70.0	80.0	
F ₂ × <i>esculentum</i>	56	35.7	8.9	5.4	8.9	8.9	8.9	8.9	7.1	7.1	

Факты, по-видимому, показывают, что мутация от S₁ к S₂ скорее всего приводит не к утрате специфичности аллелей S₁, а только к ее изменению. Логичнее допустить, что множественные аллели S₁, различающиеся по степени экспрессивности, в результате мутации не могут быть инактивированы в одинаковой степени, поэтому возникающие аллели S₂ будут отличаться друг от друга по уровню своей активности. Каждый специфичный аллель S₁ образует свой специфичный аллель S₂. В результате этого возникает не вообще аллель самофертильности S₂, а конкретные аллели, скажем S_{2a}, S_{2b}, ..., S_{2n}, отличающиеся друг от друга. И поведение этих аллелей является не общим, как обычно считается, а индивидуальным.

Вероятно, однако, что различия между самофертильными аллелями выражены меньше, чем между инициальными аллелями примитивной формы S-гена, т. е. ослабляется специфика аллелей S₂, возникших после первого этапа мутации от высокоспецифичных аллелей S₁. Дума-

ется, что при дальнейшем разрушении, или, по терминологии Пандея, эрозии S-гена, существующие различия между аллелями сглаживаются, увеличиваются еще больше, но отнюдь не исчезают полностью, по крайней мере в некоторых случаях. Мы придерживаемся такого мнения, что эволюционное изменение самосовместимости от SF к SC, т. е. мутация от S_1 к S_c , в большинстве случаев не приводит к полной утрате активности S-гена, а создает аллели S_c , хотя и с очень ослабленной спецификой, но тем не менее сохраняющие индивидуальное действие. Этим, вероятно, можно объяснить факты определенной степени перекрестноопыляемости даже у самых типичных самоопылителей. Все же некоторые аллели S_1 , обладающие слабым эффектом фенотипического проявления, по всей вероятности, могут при мутации полностью утратить свою активность. Или фенотипические различия между ними бывают настолько незначительными, что доказать их существование обычными методами изучения не представляется возможным. Следовательно, часть S_c -аллелей окажется вполне эквивалентной по своей активности, вернее—поактивности. В результате этого серия S_c по числу активных аллелей, точнее изоаллелей, будет уступать сериям S_1 и S_2 .

Если ген S_1 у автофертильных видов SF и даже ген S_2 у типичных самосовместимых видов SC, подобно гену S_1 автостерильных видов SI, состоят из серии множественных аллелей, то естественно предположить, что перекрестное размножение популяции SF и наблюдающийся у видов SC контроль времени частичный аутокроссинг у видов SC контролируются также этими генами. Но сначала напомним, как размножаются автостерильные популяции. Как известно, современная теория самонесовместимости зиждется на следующем постулате: S_1 -аллели предотвращают самооплодотворение и скрещивания между растениями с одинаковым S-генотипом. Все остальные сочетания в пределах вида осуществляются совершенно случайно по законам теории вероятностей. Таким образом, явление самонесовместимости якобы органичивает панмиксию лишь частично: из процесса размножения выпадают только комбинации опыления, где пестик и пылцные зерна несут идентичные аллели S_1 . При большом наборе S-аллелей в популяции доля несовместимых сочетаний, как известно, практически равняется нулю. Нами [2] развито представление, согласно которому и автостерильных популяциях отклонение от панмиксии носит гораздо более широкий характер, чем это может иметь место при самонигибировании и ингибировании пыльца, несущей одинаковый с пестиком S-аллель. Согласно нашему тезису, и в остальных комбинациях скрещивания, хотя пестик и воспринимает любую пыльцу с неидентичным S-аллелем, оплодотворение в известной мере также носит избирательный характер. Из попавшей на рыльце растений гетеропыльцы селективным преимуществом обладает пыльца более самонесовместимая. Следовательно, панмиксия нарушается не только между разными частями видового пространства, но и в любой точке ареала. Это значит, что в самонесовместимых популяциях (забегая вперед, скажем, что в популяциях SF также) избирательное оплодотворение скорее является правилом, а панмиксическое оплодотворение—исключением. Такая избирательность, однако, не приводит к нарушению равновесного состояния S-аллелей и генотипов, так как селектив-

ная ценность любого аллеля самосовместимости в пыльце находится в обратной зависимости от его селективной ценности в пестике, т. е. общая селективная ценность S-аллеля всегда постоянна. Вероятно, именно этим компенсационным механизмом объясняются факты существования в пределах одних и тех же размножающихся в себе линий, например, *glabratum* 2970 [2], S-аллели разных типов, иногда даже с крайними выражениями признака. Можно предположить также, что вообще все S-аллели популяции имеют равную общую селективную ценность. Если это так, то и большой популяции концентрация этих аллелей должна быть примерно одинаковой. Тенденция разных S-аллелей быть представленными в популяции с равной частотой способствует и то, что S-аллель, по какой-либо причине оказавшийся в низкой концентрации, получает более широкие возможности распространения в популяции, чем аллели, находящиеся в высокой концентрации [7, 20].

Имеется много оснований полагать, что даже самые аутостерильные популяции, где самоопыление исключено у всех составляющих ее членов, характеризуются полиморфизмом растений по степени самосовместимости. Косвенные оценки показывают, что, обладая большим запасом прочности самосовместимости, S-аллели тем не менее значительно отличаются по своей экспрессивности. Можно предположить, что назначение (или одно из назначений) различной экспрессивности S-аллелей при избыточной самосовместимости заключается в обеспечении избирательности оплодотворения на основе конкуренции пылевых трубок, а конкуренция, как мы знаем, составляет основу всей эволюции.

Таким представляется и механизм перекрестного опыления автофертильных популяций SF. Разница, вероятно, только в том, что здесь табу на самоплодотворение и скрещивание идентичных S_1 -генотипов не столь полное, как в популяциях SI. Если в популяциях последнего типа этот запрет абсолютен или значителен, то в SF-популяциях имеет место только та или иная степень ограничения самооплодотворения, обусловленного тем, что при переопылении между растениями с разным уровнем автофертильности большей конкурентоспособностью обладают пылевые зерна, принадлежащие растениям с низким уровнем самосовместимости. Наоборот, в качестве женских родителей лучшей способностью скрещиваться характеризуются растения с более высокой самосовместимостью, которые оказываются и наиболее продуктивными. И только растения с относительно одинаковой выраженностью самофертильности скрещиваются между собой случайно. Иначе говоря, селективная ценность пыльцы с других растений своей популяции по отношению к собственной пыльце у SF видов меньше, чем у видов SI. Еще меньше «чужая» пыльца по конкурентоспособности отличается от пыльцы своего растения у типичных самосовместимых видов. Правда, даже столь незначительные различия в функциональной активности S-аллелей спорадически приводят к перекрестному опылению у видов SC, особенно в теплых районах, обуславливая неоднородность по этому свойству. Упомянем в этой связи лишь исследования, где в пределах разных образцов культурных и особенно диких диплоидных видов пшеницы выявлены четкие различия по реакции на самоопыление [5].

По нашей концепции, как видно, нет принципиальных различий в механизмах воспроизведения автостерильных и автофертильных перекрестноопыляющихся видов. И тут и там перекрестное размножение осуществляется на основе избирательности оплодотворения, определяемой различиями в экспрессивности аллелей в пределах разных типов гена $S-S_r, S_l$ и S_c . Заметим еще раз, что в автостерильных популяциях селективным преимуществом обладает более самонесовместимая пыльца, а в автофертильных — пыльца менее самосовместимая. Разница, следовательно, только в степени запрета на самооплодотворение.

Важно в этой связи вспомнить замечание Дарвина [6]. По его мнению, имеется так много разных средств, способных предотвратить самоопыление, включая сюда большую силу действия пыльцы от другой особи по сравнению с пыльцой собственного растения, что самостерильность представляется побочным результатом эволюции. На чем зиждется такая точка зрения? Думается, что предпочтение, которое Дарвин отдавал селективности пыльцы в оплодотворении как средству, обеспечивающему перекрестное опыление, основано на том, что здесь обязательны конкуренция и отбор, т. е. на приспособительном характере полового процесса, в то время как явление автостерильности, как это, вероятно, казалось ему и как это вытекает из современной теории самонесовместимости, исключает саму возможность конкуренции пыльниковых трубок в совместимых комбинациях опыления. В нашей же схеме, как это легко увидеть, механизмы размножения самофертильных и самостерильных перекрестноопыляющихся популяций имеют общую основу — конкуренцию пыльниковых трубок в процессе оплодотворения, что, несомненно, является важным адаптивным признаком вида. В этом, должно быть, и заключается эволюционное значение закономерности селективного преимущества при оплодотворении более самонесовместимой пыльцы в автостерильных популяциях и пыльцы менее самосовместимой в автофертильных популяциях.

Итак, гены S_l и, в меньшей степени S_c , подобно гену S_r состоят из серии множественных аллелей. Возможно, множественность характерна и для гаметофитных факторов, определяющих реакцию мужского гаметофита некоторых самофертильных видов. Вообще имеется принципиальное сходство в поведении S -генов самостерильных видов и Ga -факторов у видов самофертильных [18, 25]. Более того, имеются основания предполагать, что гаметофитные факторы являются реликтами генов несовместимости [8, 24]. Наиболее полно изучен фактор Ga четвертой хромосомы кукурузы [9, 10, 16, 27, 29, 33]. Ген Ga состоит из аллеломорфов $Ga^1, Ga^2, Ga^{2n} (ga^1)$ и ga . Доминантные аллели обнаружены только у лопающейся кукурузы, причем наиболее широкое распространение имеет самый сильный ген Ga^2 , а рецессивный фактор ga здесь крайне редок [16, 17, 21, 29]. Активные аллели фактора Ga осуществляют защиту генофонда лопающейся кукурузы от проникновения генов других подвидов кукурузы [16, 21, 27, 29, 33]. Когда сорта и линии лопающейся кукурузы гомозиготны по аллелю Ga^2 (как было сказано, разные образцы ее чаще всего несут именно этот аллель), то они вообще проявляют реакцию несовместимости в отношении пыль-

ны сортов и линий других подвидов кукурузы, даже если на рыльцах не имеется Ga^s -, Ga - или Ga^m -пыльцы (заметим, что реципрокные скрещивания удаются нормально). Сорта, гомозиготные по аллелю Ga , и тем более гетерозиготы Ga^sGa , практически также изолированы от других форм кукурузы. На этих сортах при свободном цветении ga -пыльца других подвидов кукурузы не выдерживает конкуренции с Ga -пыльцевыми трубками. Таким образом, перенепрокая перекрестная несовместимость и селективность оплодотворения обеспечивают генетическую изоляцию наиболее древнего и примитивного подвида *Zea mays* от других подвидов кукурузы.

А как осуществляется перекрестное размножение кукурузы в пределах своего подвида? По-видимому, сорта и линии лопающейся кукурузы чаще всего находятся в гомозиготном состоянии по аллелям гаметофитного фактора [11, 15, 16, 21, 29]. Во многих случаях они содержат два доминантных аллеля, например, Ga — Ga , Ga^s — Ga^m и Ga — Ga^m . Рecessивный аллель ga встречается в гомозиготном состоянии или, реже, в гетерозиготе с Ga^m [11, 15, 16]. Можно предположить, что чем больше функционально различаются между собой разные аллели гаметофитного гена, тем меньшими окажутся возможности их совместного распространения, поскольку «уживаться» они будут труднее. Остальные подвиды кукурузы, как указывалось выше, по-видимому, являются гомозиготами по recessивному аллелю ga .

Понятно, что если исходить только из этих закономерностей распределения аллелей Ga -фактора в пределах отдельных популяций, то необходимо будет прийти к выводу, что гаметофитный ген сам по себе не имеет отношения к контролю перекрестного опыления кукурузы. Трудность эту, по нашему мнению, можно обойти, если предположить, что каждый из типов аллелей Ga -фактора в свою очередь состоит из серии аллеломорфов. А сам механизм перекрестного опыления в общих чертах представляется нам аналогичным рассмотренному выше генетическому контролю перекрестного размножения у автофертильных видов SF. Таким образом, подобно S-аллелям, Ga -факторы выполняют двойную функцию — контроля перекрестного опыления популяции и ее генетической изоляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. М. Генетика, 16, 3, 493—500, 1980.
2. Агаджанян А. М. Биолог. ж. Армении, 38, 2, 134—143, 1985.
3. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Биолог. ж. Армении, 36, 4, 300—309, 1983.
4. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Биолог. ж. Армении, 36, 10, 841—850, 1983.
5. Берлянд-Кожевников В. М., Жуков В. И., Ахмедов А. Ш., Якубциязр М. М. Тр. Ин-та земледелия МСХ АрмССР (оср. «Пшеница»), 2, 62—72, 1976.
6. Дараин Ч. Соч., 6, 255—266, М.—Л., 1950.
7. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. 1—555, М., 1978.
8. Малецкий С. И. Генетика, 5, 1, 159—167, 1969.
9. Малецкий С. И. Генетика, 6, 2, 14—20, 1970.
10. Мирюта О. К. Генетика, 7, 6, 31—38, 1971.
11. Михалко С. И., Мирюта О. К. IV съезд генетиков и селекционеров Украины, 112—114, Киев, 1981.
12. Молчан Н. М. Изв. ТСХА, 3, 67—82, 1974.
13. Навасардян Е. М., Агаджанян А. М. Биолог. ж. Армении, 33, 7, 698—702, 1980.

14. Палилов А. Н., Хстылсва Л. В., Савченко А. П., Корпусенко Л. И., Анохина Т. А., Палканова Г. П., Данилов А. С. Поллиморфизм растений по степени перекрестноопыляемости. 1—247, Минск, 1981.
15. Подольская А. П. Бюл. ВИР, 60, 27—29, 1976.
16. Подольская А. И. Генетика, 17, 10, 1824—1831, 1981.
17. Свирица Б. Н., Малецкий С. Н. Генетика, 8, 2, 5—11, 1972.
18. Суриков Н. М. В кн.: Успехи современной генетики, 4, 119—169, М., 1972.
19. Уильямс У. Генетические основы и селекция растений. 1—448, М., 1968.
20. Шенпард Ф. М. Естественный отбор и наследственность. 1—216, М., 1970.
21. Шмараев Г. Е., Подольская А. П. Тр. по прикл. бот. генет. и селекции, 63, 1, 25—39, 1978.
22. Шумный В. К., Коваленко В. Н., Квасова Э. В., Колосов Л. Д. Генетика, 14, 1, 25—35, 1978.
23. Abdalla M. M. F. Egypt. J. Genetics and Cytology, 3, 1, 133—154, 1974.
24. Allard R. W. Züchter, 33, 5, 212—216, 1963.
25. Brieger F. G. Genetics, 36, 1, 57—80, 1937.
26. Crowe L. K. Heredity, 9, 293—322, 1955.
27. Emerson R. A. Genetics, 19, 2, 137—156, 1934.
28. Lewis D., Crowe L. K. Heredity, 12, 2, 233—256, 1958.
29. Nelson O. E. Genetics, 37, 2, 101—124, 1952.
30. Pandey K. K. Genetics, 41, 327—343, 1955.
31. Pandey K. K. Heredity, 24, 4, 601—619, 1969.
32. Pandey K. K. Heredity, 31, 3, 381—400, 1973.
33. Schwartz D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 36, 12, 719—724, 1950.
34. Takahashi H. Jap. J. Genet., 49, 4, 247—256, 1974.

Институт земледелия Госагропрома Армянской ССР,
отдел селекции и генетики

Поступило 20 VII 1985 г.

УДК 634.8:581.1.036.5(479.25)

ИЗМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСА ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ ПРИ НИЗКИХ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Э. А. АРУТЮНЯН, К. С. ПОГОСЯН

Изучалось влияние низких отрицательных температур на изменение импеданса и морозоустойчивость различных по происхождению сортов виноградногo растения. Показана зависимость импеданса от степени морозоустойчивости у резко различающихся по признаку устойчивости сортов винограда.

Անվանադրվել է ջածր բացասական ջերմաստիճանների ազդեցությունը տարբեր ծագում ունեցող խաղողի բույսի սորտերի ջրտադիմացկունության և իմպեդանսի փոփոխության վրա:

Ցույց է տրվել ծագական կախվածությունը ջրտադիմացկունության աստիճանից կախվածության ցուցանիշով իրարից խիստ տարբերվող խաղողի սորտերի մոտ:

The effect of low negative temperatures on the change of impedance and frost-resistance of different by origin grape varieties has been studied.

The dependence of impedance on the degree of frost-resistance in grape varieties, strictly different by their sign of stability has been shown.

Ключевые слова: виноградноe растение, морозоустойчивость, импеданс

Для оценки степени устойчивости растений к экстремальным условиям среды в настоящее время применяется метод измерения комплексного сопротивления тканей растения электрическому току, или импеданс, что позволяет определить в каждом конкретном случае уровень повреждения тканей от неблагоприятных климатических условий, в частности, от действия низких температур, а также степень их подготовки к такому воздействию. Показатель импеданса зависит от целого ряда трудно поддающихся учету внутренних и внешних факторов, в связи с чем используют сравнительные его значения для нескольких сортов, находящихся в идентичных условиях, поскольку у морозостойких форм наблюдается, как правило, более высокий показатель импеданса по сравнению с менее устойчивыми [1, 2, 4, 5]. Особенно значительна эта разница при низкочастотном определении импеданса [6].

Однако при всей изменчивости абсолютных значений импеданса в ряде исследований установлена прямая коррелятивная связь между комплексным сопротивлением тканей побегов винограда и морозоустойчивостью, ибо ряд физиологических процессов, способствующих становлению свойства морозоустойчивости, в конечном итоге повышает сопротивление растительной ткани электротоку [1, 2].

В связи с этим нами была поставлена задача выявить эту связь не только в аспекте генотипической природы различных групп сортов, но также на уровне отдельных сортов, составляющих единую группу, при изменяющихся температурных условиях в осенне-зимний период.

Материал и методика. Исследования подвергали корнесобственные сорта и гибридные формы винограда, выращенные в сходных почвенно-климатических условиях и отличающиеся по происхождению и степени морозоустойчивости: из морозоустойчивых—сорт Аркаес, гибриды 1279/7 и 1712/32 американско-европейского происхождения, сорта Бурмунк и Кармелли амуро-европейского происхождения; из числа среднеустойчивых—амуро-европейские сорта Меграбуир и Лусакерт, а также Лериату и Кахет, относящиеся к виду *V. vinifera* L., из слабоустойчивых—збориженный сорт Спитак Араксени. Все исследуемые сорта и гибридные формы, за исключением сортов Кахет и Спитак Араксени, выведены сотрудниками отдела селекции винограда НИИ ВВиП под руководством С. А. Погосяна.

Лабораторное закаливание и дальнейшее примораживание однолетних побегов с имитированием раннезимних морозов в пределах -13 , -26° , а также оттепели, с последующим резким понижением температуры проводили по методике Погосяна [3].

Измерение комплексного сопротивления тканей побегов проводили прибором конструкции Осадчего и Солохина [4] при частотах 10^3 и 10^6 Гц, для чего фиксированные иглообразные электроды, расстояние между которыми 3 мм, погружали вдоль осевой линии побега на глубину 3 мм. В соответствии с методическими требованиями замеры проводили не менее чем на 10 побегах каждого варианта; погрешность измерения не превышала 5%.

Поскольку на показатель импеданса оказывает влияние температура исследуемого объекта, оттаивание и последующее доведение их до комнатной температуры осуществляли в идентичных условиях. Учитывали также процент поврежденности основных и замещающих почек, а также степень повреждения на тканевом уровне.

Для имитирования раннезимних морозов сбор однолетних побегов винограда проводили в начале декабря. Черенки держивали в холодильных камерах в течение 12 сут при $0 + 2^{\circ}$ для полного прохождения 1 фазы закаливания. После завершения закаливания и определения импеданса побеги выдерживали по 24 ч при температурах -5 и -10° с дальнейшим их примораживанием при -13 и -18° . После оттаивания и доведения температуры образцов до комнатной измеряли импеданс.

Часть побегов после I фазы закаливания подвергали воздействию отрицательных температур с имитированием II фазы закаливания в диапазоне температур от -2 до -15° в течение 6 сут. Закаленные побеги подвергали промораживанию в течение 2,5 ч при температурах -19 и -26° .

Результаты и обсуждение. Высокий исходный показатель импеданса побегов после I фазы закаливания выявлен у сортов и гибридов американо-европейского происхождения, среди которых особенно выделялся сорт Артагес. Значительно уступали им сорта, относящиеся к виду *V. vinifera* L. После промораживания побегов при температурах -13 и -18° наблюдалось некоторое снижение импеданса. Резкое его падение отмечалось лишь у гибрида 1712/32. Необходимо отметить, что у сортов Бурмунк, Меграбуйр и Лернату показатель импеданса практически не изменялся в процессе промораживания (табл. 1). Данные о со-

Таблица 1. Импеданс осевой части побегов винограда при частотах тока 10^3 и 10^6 Гц, кОм ($M \pm m$)

Сорт и его происхождение	0 $\pm$ 2 $^{\circ}$. 12 сут		-13 2.5 ч		-18 $^{\circ}$ 2.5 ч	
	10^3	10^6	10^3	10^6	10^3	10^6
Американо-европейские						
Артагес	60.1	23.4	63.6	22.9	54.7	23.6
1712/32	46.8	13.2	36.6	12.9	35.9	12.9
1279 7	41.1	14.3	40.3	10.6	37.6	14.0
Амуро-европейские						
Кармен	47.7	15.8	42.4	15.6	39.8	17.1
Бурмунк	40.2	13.3	40.1	13.6	40.3	17.0
Лусакерт	41.3	12.4	39.0	13.6	36.3	10.7
Меграбуйр	38.4	9.6	37.7	13.1	37.4	14.3
V. vinifera L.						
Лернату	35.4	10.3	36.4	14.6	35.7	14.0
Спитак Араксени	38.1	11.4	37.4	10.1	31.9	9.7
Кахет	34.9	10.1	36.6	11.3	31.4	11.6
$\pm m$	0.40— 2.57	0.42— 1.08	0.61— 1.37	0.51— 1.02	0.78— 3.17	0.49— 1.42

хранности почек и тканей показали, что у всех сортов и гибридов повреждения на тканевом уровне отсутствовали, и лишь у сортов Лернату, Кахет и Спитак Араксени имели место слабые повреждения основных почек на уровне 4–6%.

Данные, полученные после длительного воздействия отрицательных температур, показали, что у четырех сортов винограда, обладающих наивысшими исходными показателями импеданса, наблюдалось некоторое его уменьшение после ступенчатого понижения температур, причем три из них сорта американо-европейского происхождения. У остальных

сортов существенного изменения импеданса при промораживании до температуры -15° не наблюдалось. При дальнейшем понижении температуры до -19 и -26° отмечалась резкая разница в показателях импеданса различных сортов (табл. 2).

Таблица 2. Импеданс осевой части побегов винограда при 10^3 и 10^4 Гц, после длительного воздействия низких температур ($M \pm m$), кОм

Сорт и его происхождение	-15° 24 ч		-19° 2,5 ч		-26° 2,5 ч		Оттепель и -16° 2,5 ч	
	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3	10^4
Американо-европейские								
Артагес	49.1	17.7	47.4	18.2	48.2	17.6	51.6	22.8
1712 32	35.8	11.4	34.6	8.2	27.5	8.9	40.0	14.3
1279 7	33.9	11.4	29.2	9.6	32.2	9.8	33.6	12.9
Амуро-европейские								
Кармрени	42.6	15.6	43.0	15.6	41.6	15.1	61.1	18.9
Бурмунк	38.6	19.1	37.0	17.1	38.9	11.1	46.3	16.1
Лусакерт	39.0	15.3	34.0	10.6	25.8	7.6	41.4	15.3
Меграбуйр	37.1	11.9	31.4	9.7	24.4	5.5	36.0	13.3
V. vinifera L.								
Лернату	36.0	11.6	36.9	11.7	20.9	6.1	38.4	12.3
Спитак Араксени	38.9	10.7	37.4	9.4	14.5	4.0	41.1	11.4
Кахет	35.4	11.8	32.6	11.6	18.6	5.7	42.0	12.9
Δm	0.59— 2.12	0.37— 1.23	0.59— 1.84	0.36— 0.75	0.70— 2.24	0.20— 0.93	0.62— 2.49	0.64— 1.85

У наиболее устойчивых сортов Артагес, Кармрени, Бурмунк и у гибрида 1279/7 показатель импеданса не изменялся. Причем анатомические исследования не выявили тканевых повреждений у этих сортов даже при действии температуры -26° . Во всех остальных случаях наблюдалось снижение показателя импеданса. Если у ряда сортов снижение показателя импеданса после -26° составляло 33—35% от исходного значения (Меграбуйр, Лусакерт), то у сорта Кахет, Лернату и Спитак Араксени наблюдалось резкое его падение, что коррелирует с сильной повреждаемостью клеток и области флоэмы. Минимальное значение импеданса (14,5) отмечалось у сорта Спитак Араксени, у которого были сильно повреждены флоэма, лубяная паренхима и сердцевинные лучи. В побегах остальных сортов, показатель импеданса которых после замораживания при -26° варьировал в пределах 19—26 кОм, степень повреждения сердцевинных лучей флоэмы и перимедулярной зоны была различной. Коррелирует с этими данными и показатель степени поврежденности основных и замещающих почек.

При всех указанных температурах прямая корреляция между степенью устойчивости почек, тканей побегов и показателем импеданса

проявлялась у сортов Артагес, Кармрени (высокая морозоустойчивость) и Спятак Араксени (слабая устойчивость). У остальных сортов она была менее выраженной.

Изучался показатель импеданса побегов, которые после длительного ступенчатого понижения температуры до -15° выдерживались в течение 16 ч при -3° , а также 4 ч при $1-2^{\circ}$ с дальнейшим промораживанием при -16° в течение 2,5 ч. Таким образом, в холодильниках камерах имитировались условия оттепели с последующим резким понижением температуры. Низкочастотный и высокочастотный показатели импеданса этих побегов несколько превышали приведенные во второй таблице исходные данные или находились на том же уровне. Особенно сильно повысился импеданс побегов сортов Кармрени, Бурмунк и Артагес. Поврежденность основных и замещающих почек этих сортов не превышала 9 и 5% соответственно, тогда как у сортов, уровень импеданса которых оказался идентичным исходному, поврежденность почек достигла 27-40% соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Повреждение основных и замещающих почек, %

Сорт и его происхождение	$-19^{\circ}/2,5$ ч		$-26^{\circ}/2,5$ ч		Оттепель и $-16^{\circ}/2,5$ ч	
	основные	замещающие	основные	замещающие	основные	замещающие
Американо-европейские						
Артагес	19	16	53	30	0	0
1712/32	33	30	100	91	9	5
1279/7	47	44	100	87	25	13
Амуро-европейские						
Кармрени	14	9	60	37	5	4
Бурмунк	13	9	92	65	5	3
Лусахерг	16	11	109	83	21	6
Мейрабуйр	27	13	82	67	40	27
V. vinifera L.						
Дернату	22	11	100	92	33	18
Спятак Араксени	32	13	100	100	30	12
Кахет	19	17	93	89	16	8

Согласно полученным данным, ряд сортов (Бурмунк, Кармрени, Артагес, Кахет, гибрид 1712/32) обладает высокой приспособительной способностью к повторному закаливанию после оттепелей. Это выражается в высокой выживаемости почек и тканей лозы и значительном повышении импеданса после повторного воздействия температуры -16° .

На основании приведенных данных можно заключить, что прямой корреляции между показателем импеданса и происхождением сорта или гибридной формы нет. Эта зависимость особенно выражена у резко отличающихся по признаку устойчивости к низким температурам групп

сортот. Установлено, что варьирование показателя импеданса (до и после промораживания) в пределах 5—10 кОм не коррелирует со степенью выживаемости почек и тканей.

Прямая корреляционная зависимость между показателем импеданса и степенью повреждаемости проявляется в том случае, когда изменение величины показателя импеданса до и после воздействия низких температур достигает 18—26 кОм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голодрига П. Я., Осипов Л. В. Физиология и биохимия культурных растений. 4, 6, 1972.
2. Голодрига П. Я., Осипов Л. В., Тищенко В. А. В кн.: Биофизика растений. Мат-лы I Всесоюзн. симп. по молекулярной и прикладной биофизике растений. Краснодар, 1974.
3. Погосян К. С. Лабораторный метод оценки морозостойкости виноградной лозы. Ереван, 1972.
4. Рябчин О. П., Исаенко В. В., Осадчий И. Я. В сб: Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. 184—190, Л., 1976.
5. Рябчин О. П., Осадчий И. Я. В кн.: Биофизика растений. Мат-лы I Всесоюзн. симп. по молекулярной и прикладной биофизике растений. Краснодар, 1974.
6. Weaver G. M., Jackson H. O. Canad. J. Plant Sci., 46, 1966.

Институт виноградарства, виноделия и плодородства
Госагропрома Армянской ССР

Поступило 8.VI 1984 г.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БЕНЗОКАИНА НА ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

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

Ключевые слова: местные анестетики, фосфолипидные мембраны, механизм действия.

Ранее нами было показано [2], что местные анестетики при низких концентрациях увеличивают, а при высоких уменьшают электромеханическую устойчивость бислойных фосфолипидных мембран (БЛМ).

Разработанные в последние годы методы исследования [4] и теория электрического пробоя БЛМ [4] позволяют более детально исследовать физико-химические и физические механизмы электромеханической устойчивости липидных бислоев.

В настоящей работе приводятся результаты изучения влияния бензокаина на электрическую емкость, поверхностное натяжение и электромеханическую устойчивость БЛМ и их анализа в рамках теории электрического пробоя мембран.

БЛМ формировали из 2%-ных растворов суммарных фосфолипидов мозга в н-алканзах. Нейтральный местный анестетик бензокаин был введен в виде спиртового раствора в хлороформ-метанольный экстракт фосфолипидов в различных молярных концентрациях. Методическая часть работы подробно изложена ранее [3]. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Электромеханическую устойчивость БЛМ определяли при подаче ступеньки напряжения величиной 0,6 В.

Критерием устойчивости БЛМ в электрическом поле является среднее время их жизни ($\bar{t}$) при данном потенциале, которое выражается полуэмпирической формулой:

$$\bar{t} = A \exp \left| \frac{\pi \gamma^2}{kT(z + 0,5 C_0 U^2)} \right|, \quad (1)$$

где $\bar{t}$ —среднее время жизни БЛМ при данном потенциале, A —предэкспоненциальный член, σ —поверхностное натяжение, C_0 —удельная электрическая емкость, U —величина подаваемого напряжения, γ —линейное натяжение кромки поры, k —постоянная Больцмана, T —абсолютная температура.

Из формулы (1) видно, что $\bar{t}$ БЛМ в основном определяется параметром γ . Согласно [1], $\gamma' = \pm h$, где h —толщина пленки. Зная электрическую емкость БЛМ, можно определить толщину ее гидрофобной части по формуле:

$$h = \frac{2\epsilon_0}{C_0}. \quad (2)$$

где ϵ_0 —электрическая постоянная, ϵ_m —относительная диэлектрическая проницаемость мембраны, C_0 —удельная электрическая емкость мембраны, h —толщина ее гидрофобной части. По измеренным значениям σ и h мы рассчитали значения параметра γ^* , которые даны в таблице.

Таблица. Значения параметров БЛМ при различных молярных отношениях бензокаин/липид

$\frac{\text{Бензокаин}}{\text{Липид}} \times 10^{-2}$	$\bar{t} \times 10^{-6}$ с	C_0 мкф см ²	σ дин/см	$\gamma^* \times 10^{-11}$ Н
Контроль	50	0.500	1.75	0.46
5	60	0.550	1.50	0.41
10	95	0.340	2.00	1.04
15	160	0.260	2.40	1.36
20	230	0.270	3.25	2.21
25	275	0.250	3.50	2.41
30	300	0.220	4.50	3.60
35	275	0.220	4.30	3.44
40	250	0.230	3.85	2.88
50	180	0.280	3.76	2.36

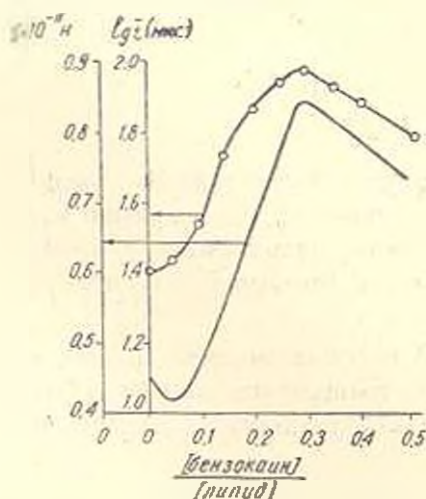
Примечание: стандартная ошибка измерений (10—15 из точки) параметров БЛМ варьирует в пределах 5—18%.

Сопоставление данных по $\bar{t}$ и γ^* показывает их качественную корреляцию. Однако учитывая относительно слабые (в пределах порядка) изменения $\bar{t}$ БЛМ в эксперименте, изменения γ^* считаем слишком большими. Более реальные значения линейного натяжения кромки поры получаются при расчете этого параметра на основании формулы [1].

$$\gamma = \sqrt{(\ln \bar{t} - \ln A) kT (\sigma + CU^2)}. \quad (3)$$

Значение $\ln A$ получено из выражения:

$$\ln A = -\ln \bar{t} - \frac{\gamma^2}{kT (\sigma + 0,5 CU^2)}, \quad (1)$$



в котором использовано значение γ для контрольной точки, равное $0,46 \times 10^{-11}$ Н.

Результаты расчета γ , а также $\lg \bar{t}$ БЛМ при различных молярных отношениях бензокаин/липид представлены на рисунке. Видно, что изменение электрохимической устойчивости БЛМ с изменением отношения бензокаин/липид сопровождается аналогичным изменением

Рис. Зависимость логарифма $\bar{t}$ БЛМ и γ , рассчитанного из уравнения (3), от отношения бензокаин-липид.

ся линейного натяжения кромки поры. Более того, диапазон изменения γ в этом случае точнее отражает степень изменения Γ БЛМ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что в основе изменения электрохимической устойчивости БЛМ при действии бензокаина лежит изменение линейного натяжения кромки поры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерягин Б. В., Гутон Н. В. Коллоидный ж. СССР, 21, 431, 1962.
2. Микаелян Л. Г., Аджян С. А., Карапетян А. К. Биолог. ж. Армении, 18, 1, 29, 1985.
3. Микаелян Л. Г., Аджян С. А. Биофизика, в печати.
4. Чамеджев Ю. А. и др. В кн.: Биофизика мембран, 2, сер. Итоги науки и техники, 161, М., 1982.

Ереванский физический институт ГИНАЗ СССР

Поступило 20.VIII 1985 г.

УДК 612.118.221:546.41

ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА КИНЕТИКУ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

А. Г. АГАМАЛЯН

Ключевые слова: эритроциты, Ca^{2+} , гемолиз.

Эритроциты являются простой и удобной моделью для изучения структуры и функций биомембран, трансмембранного транспорта и резистентности мембран к различным физико-химическим воздействиям. В эритроцитарных мембранах отсутствует $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обмен [9], что делает их выгодным объектом для исследования механизма активного Ca^{2+} -транспорта, осуществляемого действием Ca^{2+} -насоса, выводящего Ca^{2+} из клетки против концентрационного градиента (содержание Ca^{2+} в эритроцитах $1 - 2 \times 10^{-5}$ М, из которых $10^{-4} - 10^{-6}$ М в цитоплазме, а во внеклеточной среде 10^{-3} М). Функцию вывода ионов кальция из клетки осуществляет Mg^{2+} -зависимая Ca^{2+} -АТФ-аза, работающая за счет расщепления АТФ в присутствии магния и кальмодулина [7]. Незначительное увеличение внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} приводит к значительному изменению формы клеток (городчivanje эритроцитов) и увеличению жесткости мембраны. [3, 12], что вероятнее всего связано с воздействием на сократительные белки спектрин-актинового цитоскелета, прилегающего к внутренней стороне мембраны [4], хотя есть данные о кальций-зависимых изменениях в липидном составе мембран эритроцитов. Проникновение ионов кальция в эритроциты стимулируется ионофором А23187, пропранололом, увеличением рН среды и АТФ истощением [5, 6, 11].

Нами была поставлена задача изучить действие ионов кальция на процесс осмотического лизиса эритроцитов донорской крови при различных условиях среды, что может дать дополнительную информацию о некоторых аспектах трансмембранного кальций-переноса.

Материал и методика. Методика автоматической записи кинетики гемолиза подробно изложена в предыдущих публикациях [1, 2]. Метод основан на изменении светопропускания суспензии эритроцитов в гемолизирующем буфере в процессе гемолиза. В качестве анализируемых параметров были использованы общее время процесса (4) и скорость на начальном кооперативном участке кривой осмотического гемолиза (v_1). Использовали отмытые эритроциты в 0,9%-ном NaCl/15 мМ Трис-HCl буфера, а в качестве гемолизирующего раствора—0,225%-ный NaCl с pH 7,4 при 25°C. CaCl_2 в исследуемой концентрации добавляли *in vitro* в гемолизирующий раствор до начала эксперимента. При работе с высокими концентрациями Ca^{2+} (выше 10^{-3} М) рассчитывали и вводили поправку на изменение осмотического давления.

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1 а, ионы кальция в изученных концентрациях увеличивают общее время гемолиза и снижают скорость в кооперативной фазе, т. е. резистентность мембран эритроцитов к повреждающему воздействию повышается. Интересно, что в

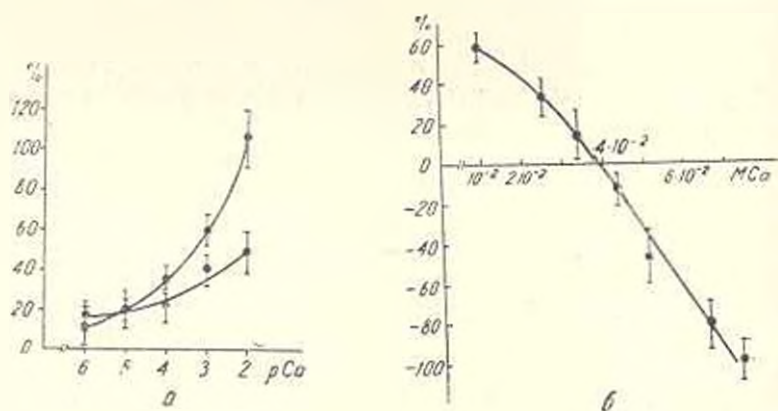
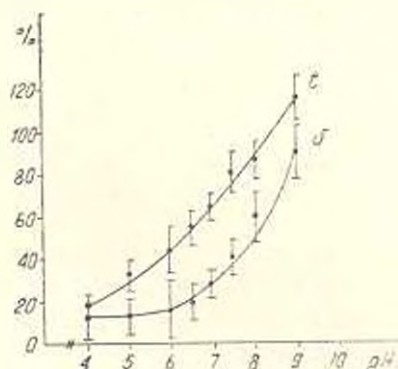


Рис. 1. Эффект различных концентраций ионов кальция на параметры кинетики осмотического гемолиза эритроцитов. По оси ординат — увеличение времени и уменьшение скорости гемолиза в процентах по отношению к контролю без кальция. pH среды 7,4, температура 25°C.

условиях длительной инкубации суспензии крови с высокими концентрациями Ca^{2+} достоверное действие на процесс гемолиза не выявлялось. Замедление гемолиза происходит лишь при добавлении кальция в кювету с гемолизирующим раствором. По всей видимости, осмотическому разрыву предшествует увеличение входа Ca^{2+} внутрь эритроцитарных клеток, что увеличивает их жесткость и прочность к разрыву. При концентрациях Ca^{2+} выше 10^{-2} М стабилизирующий эффект ионов кальция начинает понижаться и меняется на обратный, т. е. ускоряющий гемолиз (рис. 1 б). Это объясняется тем, что Ca^{2+} -насос успешно справляется со своей функцией лишь при концентрации ионов во внеклеточной среде, превышающей внутриклеточную не более чем в 10000 раз [10]. Таким образом, при высоких концентрациях Ca^{2+} в значительной степени проникает в эритроциты, вызывая кальциевую деструкцию мембраны, что, естественно, ускоряет гемолиз.

Изучена также зависимость эффекта Ca^{2+} на гемолиз от pH среды в диапазоне 4—9 (рис. 2). Повышение эффекта с ростом pH связано с увеличением входа катиона в эритроциты [6]. При повышении температуры среды от 5 до 40°C при постоянном pH действие кальция на ге-

Рис. 2. Зависимость эффекта ионов кальция на гемолиз от pH среды $t=25^\circ\text{C}$, содержание Ca^{2+} в среде $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.



молиз усиливается (от 20 до 68% по скорости), а при более высокой температуре резко уменьшается, что согласуется с данными об инактивации Ca^{2+} -помпа при температуре выше 42°C [8]. Полученные данные подтверждают предположение об увеличении проницаемости мембран эритроцитов к ионам кальция в процессе осмотического гемолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агамян А. Г., Оганесян С. С. Космич. биол., 6, 60—62, 1983.
2. Агамян К. Г., Оганесян С. С., Агамян А. Г., Саркисян М. А. Методические рекомендации «Определение кинетических параметров гемолиза крови и эритроцитов у больных методом непрерывной автоматической регистрации». Ереван, 1981.
3. Dunn M. J. Biochim. Biophys. Acta, 352, 97—116, 1974.
4. Palek I., Stewart G., Lionetti F. J. Blood, 44, 583—597, 1974.
5. Reed P. W. Fed. Proc., 32, 615, 1973.
6. Romero P. J., Whittam R. J. Physiol., 211, 481—507, 1971.
7. Sarkadi B. Biochim. Biophys. Acta, 604, 159—190, 1980.
8. Sarkadi B., Szász I., Gerlóczy A., Gardos G. Biochim. Biophys. Acta, 461, 93—107, 1977.
9. Schatzmann H. J. In Current Topics in Membranes and Transport (Brunner F. and Kleinzeller A., eds), 6, 125—169, Academic Press, New York, 1975.
10. Schatzmann H. J., Vincenzi F. F. J. Physiol., 201, 369—395, 1969.
11. Szász I., Sarkadi B., Gardos G. J. Membrane Biol., 45, 75—95, 1977.
12. Weed R. L., LaCelle P. L., Merrill E. W. J. Clin. Invest., 48, 795—811, 1969.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР.
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 15.XI 1985 г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА ПОКОЯЩИЕСЯ СЕМЕНА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Р. С. КАГГАМАНЯН, И. М. АБАКЯН, Г. М. АБАКЯН

Ключевые слова: покоящиеся семена, рентгеновское излучение, синхротронное излучение, радиационное последствие.

Известно, что СИ обладает рядом характерных особенностей, делающих его уникальным средством исследования в различных областях науки [4]. Литературные данные о радиобиологическом действии СИ ограничиваются единичными исследованиями, в которых показано большее повреждающее действие СИ по сравнению с рентгеновскими лучами [1, 5]. Очевидно, что для детального изучения особенностей СИ необходимо проведение систематических опытов с варьированием экспериментальных условий в широких пределах. Определенный интерес в этом плане представляет сравнение эффектов известных модификаторов при облучении СИ и традиционно используемыми излучениями.

Целью настоящей работы явилось исследование сравнительного действия СИ и рентгеновских лучей на покоящиеся семена *Arabidopsis thaliana*.

Материал и методика. В опытах использовали покоящиеся семена *A. thaliana* лабораторной линии *Encheim-1*, влажность которых доводили до 2,2% (сухие) и 8,3% (влажные) в установках с непрерывно циркулирующим воздухом, пропускаемым в первом случае через чистый глицерин, а во втором — через 60%-ный водный раствор его. Семена с установившейся равновесной влажностью облучали СИ или рентгеновскими лучами.

Облучение СИ проводили на синхротронном канале Ереванского электронного кольцевого ускорителя при энергии электронов 4,5 ГэВ. Конструкция канала такова, что луч СИ по пути к облучаемому объекту проходит через три бериллиевых окошки с суммарной толщиной 0,8 мм. Мощность экспозиционной дозы составляла 70 Кр/мин.

Источником рентгеновских лучей служила установка РУМ-17 с рентгеновской трубкой с вольфрамовым анодом. Облучение проводили без фильтров при анодном напряжении 200 кВ, токе катода 15 мА. Мощность экспозиционной дозы — 4,6 Кр/мин. Дозы облучения в обоих случаях измеряли клиническим дозиметром 27012 (ГДР).

Опыты проводили в двух повторностях по следующей схеме. Сначала облучали сухие семена, которые помещали на одну неделю в установку с «сухой» атмосферой для пострадиационного хранения — варианты С_{хр}. По завершении срока хранения облучали остальные две группы семян — сухие (варианты С) и влажные (варианты В). Затем семена замачивали в водопроводной воде в течение 5 ч и высевали на минеральную агаризованную питательную среду в чашках Петри. Существенным в примененной методике было то, что в каждой чашке высевали семена всех трех вариантов (С, С_{хр}, В), получившие определенные дозы облучения, и контрольные (сухие и влажные без облучения). Таким образом, все семена были посеяны в 10 чашках (5 доз СИ и 5 доз рентгеновского облучения) по 250 штук в чашке — около 50 семян на экспериментальную точку. Длину корешков измеряли после 10 дней прорастания на осветительной установке. Подробности методов лабораторных работ с *арбидопсисом* описаны [3].

Результаты и обсуждение. Как правило, начальное поражение семян и величина радиационного последствия находятся в обратной зависимости от содержания влаги в семенах. Эта зависимость наблюдается при влажности от 2—3% до тех максимальных значений ее, при которых семена еще остаются в состоянии покоя [7, 8].

На рисунке показаны зависимости подавления роста корешков от дозы синхротронного и рентгеновского излучений. В таблице приведены параметры линейных участков этих зависимостей, рассчитанные по методу наименьших квадратов. Из представленных данных следует, что хранение сухих семян как после рентгеновского облучения, так и после облучения СИ приводит почти к трехкратному усилению радиационного поражения (варианты С и С_{1р}). Аналогичный эффект неоднократно наблюдался и в предварительных опытах. В предварительных опытах с влажными семенами последствия не было обнаружено. Таким образом, примененная нами методика опытов позволила четко установить наличие радиационного последствия в семенах арабидопсиса. Наличие последствия при облучении СИ в сухих семенах и отсутствие во влажных — картина, качественно сходная с той, которая наблюдалась в исследованиях с традиционными источниками редконоизирующей радиации. Практически одинаковая величина последствия СИ и рентгеновских лучей в сухих семенах не дает оснований полагать, что при облучении СИ формирование, по крайней мере, долгоживущих начальных повреждений имеет какие-либо особенности.

Таблица. Параметры уравнений линейной регрессии $y = ax + b$ и D_{50} для зависимостей доза — эффект

Вариант	Синхротронное излучение			Рентгеновское излучение		
	a, % × Гр ⁻¹	b, %	D ₅₀ , Гр	a, % × Гр ⁻¹	b, %	D ₅₀ , Гр
С	-0.097±0.01	120±6.6	727	-0.078±0.01	106±7.2	718
С _{1р}	-0.341±0.05	122±10	211	-0.250±0.02	112±4.6	248
В	-0.152±0.02	112±7.5	411	-0.162±0.004	117±2.8	817

* D₅₀ — дозы, подавляющие рост корешков на 50%.

Иная картина выявляется при сравнении начальных повреждений семян (у семян, замоченных сразу после облучения), индуцированных СИ и рентгеновскими лучами. Приведенные на рисунке данные наглядно показывают, что при облучении СИ влажные семена повреждались значительно сильнее, чем сухие: отношение доз, подавляющих рост корешков на 50%, — ФНД — равно 1,7. Рентгеновское облучение вызывало примерно одинаковое поражение семян независимо от влажности: видна даже некоторая тенденция большего поражения сухих семян. Понять, чем обусловлен такой неожиданный эффект синхротронного излучения, пока не представляется возможным — слишком мало оно изучено в радиобиологическом аспекте. Можно было бы допустить, что к большему повреждающему действию СИ причастны различия и

спектральном распределении энергии этих излучений. Однако в опытах с семенами табака [1] и спорами бактерий [9] не наблюдалось сколько-нибудь существенной разницы в поражающем действии монохроматизированного СИ используемых длин волн. Обнаруженный феномен нельзя объяснить и высокой интенсивностью СИ, поскольку облучение при большей мощности дозы, как правило, вызывало меньшее поражение семян [2, 6]. Здесь, однако, уместно вспомнить об им-

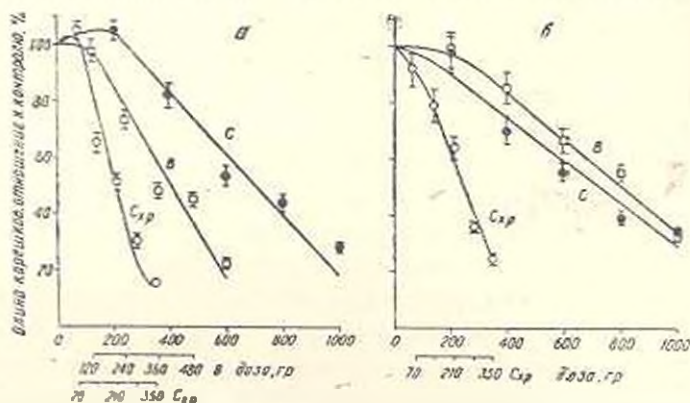


Рис. Поражение семян *A. thaliana* при облучении: а—СИ, б—рентгеновскими лучами. С—влажность 2,2%; C_{xp}—С+недельное хранение; В—влажность 8,3%.

пульсном характере СИ, благодаря которому мгновенные значения его интенсивности могут на три порядка превышать измеряемую среднюю интенсивность [4]. С такими огромными мощностями радиобиологам еще не приходилось работать, и было бы ошибочным при интерпретации эффектов СИ безоговорочно исходить из существующих представлений о влиянии мощности дозы на лучевое поражение семян. Очевидно, что изучение феномена более сильного повреждающего действия СИ является предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Ц. М., Геворкян С. Г., Карагезян А. С., Корхмязян М. М. Биол. ж. Армении, 32, 11, 1979.
2. Гудков Н. Н. Радиобиология, 9, 5, 1969.
3. Иванова В. И. Радиобиология и генетика арабидонсиса М., 1974.
4. Кунц К. (ред.) Синхротронное излучение. Свойства и применение. М., 1981.
5. Минасян М. А., Авакян Ц. М., Семерджян С. П. Радиобиология, 18, 5, 1978.
6. Царанкин Л. С., Царанкина К. А. Радиобиология. Инф. бюлл., 10, 79, 1967.
7. Conger A. D. J. Cellular Comp. Physiol., 58, 27—32, 1961.
8. Constantin M. J., Conger B. V., Osborne T. S. Radiat. Bot., 10, 539—549, 1970.
9. Steber V. K., Munro I. H. and Tallentire A. Int. J. Radiat. Biol., 45, 5, 539—540.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР

Поступило 30.IX.1985 г.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ФАД- И НАД-ЗАВИСИМОГО ДЫХАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОФУНКЦИИ ОКОЛОЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ

А. С. ТЕР-МАРКОСЯН, Г. Г. АРЦРУНИ, Р. С. ОВСЕЯН

Ключевые слова: гипопаратиреоз, митохондрии, окислительное фосфорилирование.

Ранее [7] нами изучалось ФАД-зависимое окисление и сопряженное с ним фосфорилирование в митохондриях печени и головного мозга крыс при гипопаратиреозе, что было вызвано существенными функциональными нарушениями в этих органах. Однако для получения полной информации о функциональном состоянии энергонакопительной системы митохондрий необходимо было исследование также НАД-зависимого пути окисления при этой патологии.

В данном сообщении приводятся результаты сравнительного анализа состояния обоих путей митохондриального окисления у паратиреопрививных животных.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самках массой 150—200 г. Электрокоагуляцией частично удаляли околощитовидные железы. О развитии паратиреоидной недостаточности судили по понижению содержания кальция в сыворотке крови, определяемого общепринятым спектрофотометрическим методом.

Животных забивали через 5, 12 и 30 дней после операции. Извлекали печень и головной мозг, из которых методом дифференциального центрифугирования [6] изолировали митохондрии. Дыхательную и фосфорилирующую активности митохондрий изучали полярографическим методом [10] на полярографе ЛР-7 при помощи модифицированной измерительной ячейки с мембранными электродами Кларка [9] при 26°C.

Контролем служили митохондрии, выделенные из печени и головного мозга ложнопериоперированных крыс.

Среда инкубации содержала для митохондрий печени (М): 0,25—сахарозы, 0,1—KCl, 0,1— KH_2PO_4 , 0,5— MgSO_4 (рН 7,4), а для митохондрий мозга 0,29—сахарозы, 0,01—трис-HCl, 0,0002—ЭДТА, 0,01—KCl и 0,05— KH_2PO_4 (рН 7,4). В качестве субстрата окисления использовали сукцинат и изонитрат.

Измерили скорости дыхания «покоя» (V_2) и активного поглощения кислорода (V_3) в микроатомах O_2 в минуту на 1 мг белка, рассчитывали время фосфорилирования (Δt) в секундах, отношение утилизированного АДФ (в микромолях) к поглощенному кислороду (в микроатомах)—АДФ:О.

Количество белка в пробах определяли методом Итзаки [11].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования приведены в таблице и на рисунке. Как следует из таблицы, сдвиги в дыхательной активности митохондрий изученных тканей крыс с гипопаратиреозом при окислении сукцината и изонитрата неодинаковы и более четко выражены в первом случае. Окисление по ФАД-зависимому пути характеризуется общей активацией с максимумом изменений в митохондриях печени на 5-й день после операции и мозга—на 12-й день. При исполь-

Таблица. Дыхание митохондрий печени и головного мозга и содержание кальция в сыворотке крови крыс в различные сроки после удаления околощитовидных желез

Объект исследования		Субстрат окисления	Контроль	Время после операции, дни				
				5	12	30		
V ₂	микрон 0 в 1 мин на 1 мг белка	митохондрии печени	сукцинат	0.056±0.0024 n=9	0.070±0.0027 n=7, t=4.0	0.068±0.0026 n=7, t=3.43	0.060±0.0024 n=7, t=1.1	
			изоцитрат	0.022±0.0012 n=6	0.020±0.0024 n=6, t=0.83	0.022±0.0010 n=7, t=0.00	0.026±0.0029 n=6, t=1.82	
		митохондрии мозга	сукцинат	0.018±0.001 n=9	0.016±0.0004 n=7, t=1.10	0.015±0.0003 n=7, t=2.10	0.015±0.0006 n=7, t=2.00	
			изоцитрат	0.023±0.0023 n=6	0.013±0.0014 n=6, t=3.33	0.012±0.0011 n=6, t=3.93	0.020±0.0060 n=6, t=0.63	
V ₄		микрон 0 в 1 мин на 1 мг белка	митохондрии печени	сукцинат	0.144±0.0072 n=9	0.220±0.0128 n=7, t=5.42	0.183±0.0036 n=7, t=4.85	0.148±0.0092 n=7, t=0.34
				изоцитрат	0.052±0.0040 n=5	0.040±0.0028 n=6, t=2.80	0.035±0.0040 n=7, t=2.32	0.044±0.0030 n=3, t=1.60
			митохондрии мозга	сукцинат	0.032±0.0071 n=8	0.038±0.0020 n=7, t=0.86	0.051±0.0020 n=7, t=2.60	0.036±0.0030 n=7, t=0.53
				изоцитрат	0.034±0.0032 n=6	0.031±0.0028 n=6, t=3.00	0.016±0.0021 n=6, t=7.50	0.045±0.0032 n=6, t=0.50
Ca, mM	Сыворотка крови			2.05±0.04 n=8	1.10±0.03 n=7, t=22.35	1.31±0.03 n=7, t=17.22	1.77±0.03 n=7, t=5.78	

зовании же изоцитрата в качестве субстрата окисления имеет место подавление дыхания митохондрий печени и мозга. Причем в отличие от сукцинат-зависимого дыхания сдвиги в скорости окисления изоцитрата в митохондриях мозга в этом случае проявляются как на 5-й, так и 12-й день после операции. К 30-му дню происходит восстановление параметров ФАД- и НАД-зависимого дыхания митохондрий обеих тканей.

Сравнительно близкие по характеру сдвиги выявлены при изучении эффективности фосфорилирования митохондрий, сопряженного с окислением сукцината и изоцитрата. Они выражаются в уменьшении коэффициента АДФ/О (рис.). Этого нельзя сказать в отношении времени фосфорилирования, которое в основном сокращалось при сукцинат-зависимом окислении и, наоборот, увеличивалось при окислении изоцитрата.

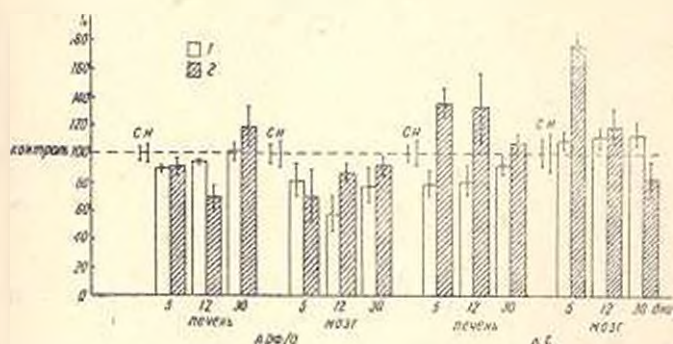


Рис. Показатели окислительного фосфорилирования (в процентах к контролю) митохондрий печени и головного мозга крыс в различные сроки после удаления околощитовидных желез. 1—сукцинат, 2—изоцитрат.

Таким образом, при гипопаратиреозе происходит активация ФАД-зависимого и подавление НАД-зависимого дыхания митохондрий печени и мозга крыс. Интересно отметить, что подавление НАД-зависимого дыхания митохондрий имеет место и при других формах судорожной активности [12], являющейся основным характерным признаком недостаточности околощитовидных желез.

Разнонаправленный характер изменения скоростей окисления ФАД- и НАД-зависимых субстратов может быть результатом гипоксии, наблюдаемой при гипопаратиреозе [8]. Возможность такого допущения основывается на исследованиях Кондрашовой [1, 2, 5] и Лукьяновой [3, 4], которыми установлено, что сукцинатная фракция дыхания является наиболее чувствительной даже при небольших изменениях физиологического состояния и что в гипоксических условиях дыхание переключается на использование янтарной кислоты. Окисление же НАД-зависимых субстратов митохондриями затрудняется по кинетическим причинам. По-видимому, активация окисления сукцината при гипопаратиреозе является компенсаторно-приспособительной реакцией дыхательной цепи, направленной на поддержание энергетической функции митохондрий в случае частичного блока первого пункта фосфорилирования при ограниченном НАД-зависимом окислении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондрашова М. Н. Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. 169, М., 1972.
2. Кондрашова М. Н., Масвский Е. И., Бабаян Г. В. и др. Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. 112, М., 1973.
3. Лукьянова Л. Д. Биохимия гипоксии. 22, Горький, 1975.
4. Лукьянова Л. Д., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М., 1982.
5. Масвский Е. И., Кондрашова М. Н. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние. 24, Пушкино, 1978.
6. Мосолова И. М., Горская Н. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии. 52, М., 1975.
7. Овсепян Р. С., Тер-Маркосян А. С., Худавердян Д. Н. Проблемы эндокринологии. 27, 75, 1981.
8. Худавердян Д. Н., Арируни Г. Г. Журн. эксп-р и клинич. медицины. 18, 36, 1978.
9. Шольц К. Ф., Островский Д. Н. Методы современной биохимии. 52, М., 1975.
10. Estabrook R. W. Meth. Enzymol., 10, 41, 1967.
11. Itzhaki R., Gilb E. Analit. Biochem., 9, 401, 1964.
12. Lotman E., La Manna J. C., Cordingley G. Brain Res., 68, 15, 1975.

Ереванский государственный медицинский институт, ИЦИЛ Поступило 6.III 1985 г.

УДК 612.35.014.22:576.315.42

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ХРОМАТИНЕ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЕГО АКТИВАЦИИ

А. О. ВАРДЕВАНЯН, С. Г. ТИРАЦУЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН,
Г. А. ПАНОСЯН

Ключевые слова: гидрокортизон, хроматин.

Повышение матричной активности хроматина при стимулировании гидрокортизоном синтеза РНК в ядрах печени крыс сопровождается активацией функции эухроматина [4]. Фракционирование хроматина на транскрипционно активный и неактивный—один из надежных подходов в изучении экспрессии генов эукариот. При этом применение метода должно как можно меньше влиять на структуру хроматина.

Целью настоящей работы являлось изучение изменений в активном хроматине под действием гидрокортизона при ограниченном гидролизе хроматина микрококковой нуклеазой.

Материал и методика. Использовались белые беспородные крысы массой 100—150 г. Введение гидрокортизона, выделение ядер и хроматина из клеток печени крыс проводили как описано ранее [1]. Расщепление хроматина микрококковой нуклеазой осуществляли по методу Георгиевой и др. [2], а дальнейшее фракционирование на активный (S_2) и неактивный участки по Готтесфелду [5]. Гетальный хроматин и фракции S_2 плавили в термостатируемых ячейках спектрофотометра Unicam SP 8-100. Во всех экспериментах время обработки ферментом составляло 2 мин.

Результаты и обсуждение. Достоверность получения активного хроматина при обработке микрококковой нуклеазой была проверена

методом тепловой денатурации тотального хроматина и фракции S_2 . Выявлено, что дифференциальные кривые плавления фракции S_2 значительно смещены относительно таковых хроматина в сторону низких температур [1]. Это характерно для активного хроматина, который имеет большое количество монопуклеосом [3].

Далее было установлено (табл.), что при сравнительно небольшом исходном содержании хроматина в контроле с увеличением дозы микрококковой нуклеазы и количества хроматина выход фракции S_2 увеличивается, достигая насыщения при концентрации фермента 10 ед в 1 мл и исходном количестве хроматина 20 О. Е. при длине волны 260 нм. В случае же хроматина из печени гормонинъектированных животных это насыщение, по-видимому, достигнуто уже при всех исследуемых условиях.

Таблица. Выход фракции S_2 в процентах в зависимости от количества микрококковой нуклеазы и исходного хроматина.

Количество микро- кокковой нуклеазы в единицах актив- ности фермента	Выход фракции S_2							
	5		10		20		30	
	К	ГК	К	ГК	К	ГК	К	ГК
0.5	5.0±0.1	36.0±1	6.5±0.2	40.0±2	8.0±0.1	44.0±1	12.0±0.5	44.0±2.4
1.0	7.0±0.3	39.5±1.2	10.2±0.8	46.5±2.4	—	—	12.3±0.9	47.6±2.3
2.0	8.7±0.5	35.6±1.5	9.3±0.7	39.7±1.7	12.2±0.6	43.1±2.7	15.4±0.8	46.3±3
5.0	12.8±0.7	34.8±2.0	13.2±0.8	35.7±1.8	9.5±0.4	32.5±1.5	15.9±1.1	39.7±2.5
10	16.0±0.3	35.0±2.2	16.3±0.6	36.2±2.7	8.1±0.7	27.7±1.3	8.5±0.3	40.5±2.3
30	15.2±0.8	34.5±1.6	16.3±0.9	35.2±1.7	12.4±0.6	33.2±2.4	10.1±0.4	30.8±2.2

К — контроль, ГК — фракция S_2 из хроматина печени крыс, которым вводили гидрокортизон.

* Количество исходного хроматина в оптических единицах при $\lambda = 260$ нм на мл препарата.

При введении гидрокортизона независимо от концентрации хроматина и фермента выход фракции S_2 значительно увеличивается по сравнению с контролем, что, несомненно, связано с возрастанием количества активного хроматина под действием гормона.

Таким образом, метод фракционирования хроматина позволяет получить фракцию, обогащенную активным хроматином. Выход этой фракции в контроле зависит от количества микрококковой нуклеазы и исходной концентрации тотального хроматина. Гидрокортизон весьма существенно увеличивает его.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение выхода фракции S_2 из хроматина печени обработанных животных связано с возрастанием матричной активности хроматина, что может служить критерием активации генома.

1. Вардеванян А. О., Мигинян К. С., Вардапетян Р. Р. и др. Вопросы мед. химии, 3, 156—158, 1984.
2. Георгиева Е., Носиков В. В., Пашев Н. Г. Мол. биол., 16, 2, 392—397, 1982.
3. Паносян Г. А., Тирацунян С. Г., Вардеванян П. О., Вардапетян Р. Р. ДАН СССР, 265 3, 765—768, 1982.
4. Ananthakrishnan R., Kulkarni S. B., Pradhan D. S. Biochem. & Biophys. Res Commun., 88, 3, 1111, 1979.
5. Gottesfeld J. M., Bagi G., Berg B., Bonner J. Biochemistry, 15, 11, 2472—2483 1976.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,
Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 27 X 1984 г.

УДК 615.917+612.015.33:613.2

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОГО РАЦИОНА НА НЕКОТОРЫЕ СТОРОНЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ 3,4-ДИХЛОРБУТЕНОМ-1

М. П. ЕРЗНКАЦЯН

Ключевые слова: 3,4-дихлорбутен-1, интоксикация, белок, азотистый обмен

Ранее нами было установлено [4], что хроническая интоксикация 3,4-дихлорбутеном-1 приводит к значительным нарушениям в азотистом обмене экспериментальных животных, выражающимся в снижении уровня остаточного азота и азота мочевины в сыворотке крови, а также повышении азота α -аминокислот в сыворотке крови и моче.

Известно, что в регулировании азотистого обмена в организме важное значение имеет питание. В литературе имеется много данных, свидетельствующих о регулирующей и защитной роли обогащенного белком питания при различных промышленных интоксикациях [1, 2 и др.]. Показано регулирующее влияние повышенного содержания белка в рационе на показатели азотистого обмена при хлоропреновой интоксикации [3]. Однако установлено, что при воздействии некоторых хлорированных углеводородов и, в частности, четыреххлористого углерода, обогащение пищевого рациона белком, наоборот, усиливает токсический эффект этих веществ [8, 9]. 3,4-дихлорбутен-1 также является хлорированным углеводородом. В связи с этим представляло интерес выяснение влияния изменения количества белка в рационе на азотистый обмен при интоксикации 3,4-дихлорбутеном-1 с целью дальнейшего использования полученных данных при решении вопросов профилактического питания рабочих, контактирующих с этим промышленным ядом. В доступной нам литературе соответствующих данных нет.

Материал и методика. Опыты проводили на 30 беспродных белых крысах-самках с исходной массой 140—150 г. Экспериментальную модель хронического отравления

воспроизводили 5-месячной пероральной заправкой 3,4-дихлорбутеном-1 в количестве 200 мг/кг 6 раз в неделю. В течение всего периода заправки животные содержались на стандартном рационе вивария, в котором белки, жиры и углеводы составляли соответственно 18,26 и 56% общей калорийности. По истечении 3,5 месяцев с начала заправки животные, кроме первой группы, которая продолжала получать стандартный рацион вивария, были переведены на разбалансированные по белку изокалорийные рационы и содержались на них в течение 1,5 месяца, продолжая подвергаться заправке. Одна группа животных получала высокобелковый рацион, в котором количество белка доводилось до 25% по калорийности за счет добавления творога и яичного белка, а количество жиров и углеводов соответственно составляло 26 и 49%. Другая группа животных получала малобелковый рацион, в котором количество белка составляло 7%, а жиров и углеводов—соответственно 26 и 67%.

По истечении срока заправки исследовали сыворотку крови животных. О физиологической эффективности различных рационов судили по некоторым интегральным показателям азотистого обмена, в определенной мере отражающим состояние обмена белков в организме [5, 7].

Общее содержание белков определяли рефрактометрическим методом на универсальном рефрактометре марки РИУ, остаточный азот—диффузионным в чашках Коуея после сжигания исследуемого материала по методу Кьельделя, мочевины—по Марш и др. [10], а α -аминный азот—по Сентирмай и др. [11].

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали (рис.), что структура питания влияет на сдвиги, наблюдаемые при 3,4-дихлорбутеновой интоксикации. У группы животных, подвергавшихся хронической заправке 3,4-дихлорбутеном-1 и находившихся на малобелковом рационе, по сравнению с группой, содержащейся на обычном рационе вивария, наблюдаемые при интоксикации сдвиги углубляются: в сыворотке крови снижается содержание белкового азота на 26%

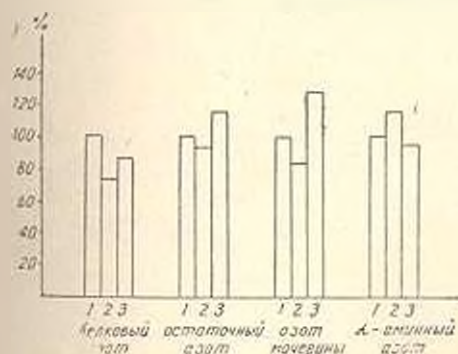


Рис. Изменение некоторых показателей азотистого обмена в сыворотке крови крыс, находившихся на различных изокалорийных рационах при хронической интоксикации 3,4-дихлорбутеном-1 (1—стандартный рацион, 2—малобелковый рацион, 3—высокобелковый рацион).

($P < 0,01$). Отмечается тенденция к снижению остаточного азота и азота мочевины, а α -аминный азот повышается на 13%. У группы животных, получавших обогащенный белком рацион, несколько нормализуются эти показатели: белковый азот достигает почти нормального уровня (94 мг%, в контроле—100 мг%); по сравнению с группой, содержащейся на стандартном рационе вивария, повышается содержание остаточного азота и азота мочевины соответственно на 17 и 25% ($P < 0,05$).

Необходимо отметить, что изменение количества остаточного азота в сыворотке крови при различных рационах происходит параллельно с изменением количества азота мочевины. При этом у животных, находившихся на высокобелковом рационе, отношение азота мочевины к остаточному азоту (коэффициент $urea-ratio$) значительно выше (40,5%), чем у группы животных, получавших малобелковый рацион (33,6%).

что свидетельствует о значительной нормализации мочевинообразовательной функции печени [6].

Характерные изменения претерпевает суммарное содержание α -аминокислот, а именно α -аминый азот. Хотя содержание α -аминого азота при различных рационах претерпевает незначительные изменения, доля его в остаточном азоте сыворотки крови оказывается различной у разных групп животных: так, если у животных, получавших малобелковый рацион этот показатель составлял 59,6%, то у группы животных, содержавшихся на высокобелковом рационе, он снижался до 36,3%, что, на наш взгляд, свидетельствует о благоприятном влиянии высокобелкового рациона.

Таким образом, при хронической 3,4-дихлорбутеновой интоксикации повышение доли белка в рационе подопытных животных приводит к улучшению показателей азотистого обмена, выражающемуся в нормализации уровня белкового и остаточного азота сыворотки крови, доли азота мочевины и α -аминого азота в остаточном азоте. Следовательно, высокобелковый рацион может играть определенную роль в предотвращении развития патологических сдвигов в азотистом обмене при токсическом воздействии 3,4-дихлорбутена-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакалян И. А. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1972.
2. Виссарионовы В. И., Бондарев Г. И. и др. Вопросы питания, 6, 3, 1978.
3. Ерзнкацян М. П. Дисс. канд., Ереван, 1982.
4. Ерзнкацян М. П. Журн. экспер. и клинич. медицины, 25, 2, 1985.
5. Капланский С. Я. Руководство по патофизиологии, 2. М., 1966.
6. Колб В. Г., Камишников В. С. Клиническая биохимия, Минск, 1976.
7. Фердман Д. Л. Биохимия, М., 1966.
8. McLean A. E. M. The Brit. J. of Exp. Pathol., 48, 6, 632, 1967.
9. McLean A. E. M., Voschlauren H. Brit. J. Exp. Pathol., 1—2, 22, 49, 1969.
10. Marsh et al. Методические указания по применению унифицированных клинических методов исследований. Под ред. В. В. Меньшикова М., 1973.
11. Szentliranyi A. et. al. Биохимические методы исследования в клинике. Под ред. А. А. Покровского. М., 1969.

Ереванский медицинский институт,
кафедра гигиены санитарно-гигиенического факультета

Получено 22.X 1985 г.

УДК 616.127—005.8+577.15:577.161.3

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА В КОМБИНАЦИИ С НУКЛЕИНАТОМ НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ КРОЛИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

А. А. ЕНГИБАРЯН, А. А. АГАЯН, С. А. КОСЯН, В. В. ОРДЯН

Ключевые слова: инфаркт миокарда, α -токоферол, нуклеионат натрия

В настоящее время известно, что креатинфосфокиназа (КФК), являясь энергетическим буфером, выступает также и роли соединения,

транспортирующего энергию в кардиомиоциты [10, 15, 17] и осуществляющего метаболический контроль над функцией миокардиального сокращения путем воздействия на ряд биохимических реакций, играющих важную роль в регуляции сократительной активности мышечных клеток [7, 12, 14]. В связи с этим выдвинуты представления о том, что креатинфосфокиназная система функционирует как регуляторный механизм, благодаря которому согласуются темпы сократительной функции сердечных клеток и ресинтеза АТФ [8]. Все это свидетельствует о непосредственном участии КФК в приспособительных процессах миокарда при его инфаркте. Однако, если активность КФК сыворотки крови и ее изоферментов при инфаркте миокарда как энзиматический тест на величину очага поражения [1—4 и др.] изучена достаточно обстоятельно, то динамика активности КФК и его изоферментов в различных участках миокарда экспериментальных животных с моделированным коронароокклюзионным инфарктом миокарда, а также их участие в формировании адаптационной реакции этого органа в указанных условиях освещены весьма недостаточно. Имеются сведения [14], отрицающие количественные отклонения активности КФК в сердечной мышце вне зоны инфаркта, в то время как проницаемость сарколеммных мембран кардиомиоцитов, особенно в области перинифарктных зон, оказывается повышенной [5, 11]. Умозрительно можно предположить, что из таких клеток КФК и ее изоферменты должны выбрасываться в кровь, хотя этот вопрос, на наш взгляд, нуждается в дополнительном изучении. В настоящей работе сделана попытка проследить динамику изменений суммарной активности КФК и ее изоферментов в гомогенате миокарда перинифарктных зон с одновременным комплексным использованием для лечения инфаркта антиоксиданта α -токоферола и предшественника нуклеиновых кислот—нуклеината натрия.

Материал и методика. Опыты ставили на 30 кроликах породы Шиншилла массой 2—2,5 кг. Инфаркт миокарда вызывали перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на строго постоянном уровне. Подопытным животным с 1 по 15-й день ежедневно внутримышечно вводили нуклеинат натрия в дозе 25 мг/кг и α -токоферол в дозе 2 мг на кг массы животного. Другая группа оперированных кроликов была контрольной. Животных забивали на 7-й и 15-й дни после операции.

Изменение активности КФК миокардиальных гомогенатов в направлении синтеза АТФ определяли по методике, предложенной Эннором и Розенбергом [10], в модификации С. Н. Лилсовой. С целью сепарирования изоферментов КФК—разделение на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 с последующим спектрофотометрическим анализом ферментной активности—пользовались модифицированным методом Меркера [6].

Результаты и обсуждение. Результаты определения суммарной активности креатинфосфокиназы в гомогенатах сердца кроликов представлены на рис. Как видно из приведенных данных, на 7-й день после моделирования инфаркта миокарда в участках миокарда левого желудочка, находящихся вне зоны инфаркта, активность КФК по сравнению с таковой у интактных животных снижается на 22,34% ($P < 0,05$). При введении кроликам α -токоферола с нуклеинатом натрия активность фермента по сравнению с нелечеными животными повышается на 34,39% ($P < 0,05$), превышая нормальный уровень на 4,37% ($P < 0,05$).

К 15-му дню этот показатель у оперированных нелеченых кроликов возрастает и составляет 99% от нормы. В опытах с применением α -токоферола с нуклеинатом натрия суммарная активность фермента из 20.4% превышала нормальный уровень.

Изучение изоферментного спектра КФК показывает (таблица), что через 15 дней изоферменты ММ, МВ и ВВ составляли соответственно 76,9; 16,7 и 6,1%. После перевязки коронарной артерии в отдаленных от очага некроза участках миокарда содержание ВВ-изофермента почти не изменяется, в то время как после коарктации аорты у крыс компенсаторная гиперфункция приводит к резкому возрастанию его активности [12].

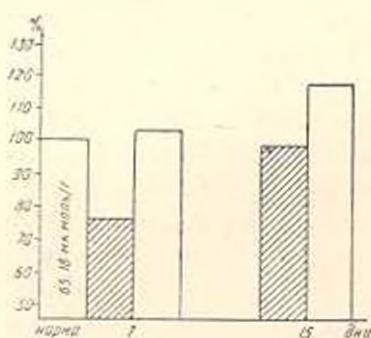


Рис. Суммарная активность (% к норме) в гомогенате миокарда в неинфарктных зонах сердца кроликов при введении α -токоферола (2 мг/кг) с нуклеинатом натрия (25 мг/кг). 1—инфаркт, 2—инфаркт + α -токоферол с нуклеинатом натрия.

Основные сдвиги обнаруживаются в активности изоферментов ММ и МВ, причем активность ММ изофермента по сравнению с нормой повышается на 13,2%, а МВ—снижается на 13%. При введении кроликам α -токоферола и нуклеината натрия активность обоих изоферментов приближается к норме. Следует отметить, что ВВ КФК, который синтезируется быстрее [13], в условиях компенсаторной перегрузки сердца, когда содержание макроэргов в миокарде снижено, может эффективно функционировать [4]. На основании этих данных можно предположить, что при инфаркте миокарда интенсивность синтеза и расхода ВВ-изофермента в неинфарктных участках миокарда балансируются, и активность его сохраняется на стабильном уровне. Только у нелеченых кроликов этот показатель незначительно (4,16%) превышает нормальный уровень.

Таблица. Изменение активности изоферментов КФК в неинфарктных зонах миокарда на 7-й день после моделирования экспериментального инфаркта и при введении α -токоферола совместно с нуклеинатом натрия, % от суммарной активности фермента

Изоферменты КФК	Группа кроликов				
	интактная (норма)	инфаркт миокарда	разность, % к норме	инфаркт + α -токоферол + нуклеинат натрия	разность, % к норме
ММ	63.73	76.92	+13.2	62.36	-1.34
МВ	29.67	16.66	-13.0	26.38	-2.19
ВВ	6.59	6.47	-0.12	10.75	+4.16

Если принять, что вслед за повышением проницаемости сарколем кардиомиоцитов как при инфаркте, так и при других патологиях сердца МВ КФК выбрасывается в кровь, то можно допустить, что снижение на 13,01% активности МВ-изофермента через 7 дней после моделирования инфаркта миокарда связано именно с изменением проницаемости мембран мышечных клеток. Но такому предположению противоречат данные о снижении до нормы активности сывороточной МВ КФК к 72-му часу.

Для выяснения механизма снижения активности МВ-изофермента в миокарде в сравнительно поздние сроки развития инфаркта необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, коронароокклюзионный инфаркт сопровождается уменьшением суммарной активности КФК в внеинфарктных участках миокарда в основном за счет снижения активности МВ-изофермента. На этом фоне сравнительная активность ММ-изофермента повышается. α -Токоферол с пуклениатом натрия способствуют сохранению и даже увеличению суммарной активности КФК, что очень важно для энергетического обеспечения гиперфункции интактных зон миокарда в условиях перегрузки и повышения адаптационной способности миокарда.

Л И Т Е Р А Т У Р А

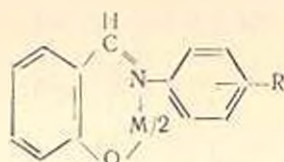
1. Ашуров Б. М., Сапрыгин Д. Б., Асиджанова Л. П. Кардиология, 11, 53, 1982.
2. Барт Б. Я., Гей А. К. Кардиология, 6, 82, 1968.
3. Воронков Ю. И. Автореф. канд. дисс., М., 1977.
4. Меерсон Ф. З., Вядых М. Ф. Вопросы мед. химии, 6, 1960.
5. Митин К. С. Электронно-микроскопический анализ изменений сердца при инфаркте. М., 1974.
6. Мкртчян З. С., Газарян М. Г., Нерсисова Л. С., Акопян Ж. И. Биолог. ж. Армении, 2, 153, 1978.
7. Розенштраух Л. В., Сакс В. А., Шаров М. В. и др. Метаболизм миокарда, 88, М., 1981.
8. Сакс В. А., Розенштраух Л. В., Шаров В. Г. и др. Метаболизм миокарда, 215, М., 1979.
9. Филиппов Н. К., Тугов В. Н., Острогорский Ю. М. и др. Кардиология, 7, 85, 1982.
10. Enner A. H., Rosenberg H. Biochem. J., 51, 606, 1952.
11. Hoffstein S., Gennaro D. E., Fox A. C. et al. Am. J. Path., 79, 1975.
12. Nagle S. Klin. Wschr., 48, 332, 1970.
13. Perry S. V. Neurol. Sci., 12, 298, 1971.
14. Jacobus N. E., Lehninger P. L. J. Biol. chem., 248, 4803, 1973.
15. Seraydarian M. N., Abbot B. C. J. mol. cell., cardiol., 8, 1976.
16. Saks V. A., Lipina N. V. et al. Arch. Biochem. biophys., 173, 34, 1976.
17. Saks V. A., Chernousova G. B. et al. FEBS Letters, 62, 293, 1976.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ХЕЛАТОВ Ni, Pd, Cu

А. А. ЧАЧОЯН, Б. Т. ГАРИБДЖАНЫН, Л. И. САГРАДЯН

Ключевые слова: хелатные соединения, противоопухолевая активность, токсичность.

В последние годы в работах по поиску новых типов биологически активных веществ большое место отводится координационным соединениям переходных металлов. Последние представляют большой интерес в качестве химических катализаторов. Задачей настоящей работы явилось изучение противоопухолевой активности водорастворимых хелатных соединений переходных металлов, которые получены путем введения сульфогруппы и анилиновый фрагмент салицилальдиминатов Ni, Pd и Cu.



- I. R = n — SO₃H, M = Cu; II. R = n — SO₃H, M = Ni;
III. R = n — SO₃H, M = Pd; IV. R = n — SO₃Na, M = Pd.

В воде хорошо растворяются как сульфопроизводные хелатных соединений, так и их натриевые соли. В литературе указанные соединения описаны как катализаторы, работающие в водной среде в процессе олигомеризации алкинов [1].

Материал и методики. Химиотерапевтические эксперименты осуществляли на белых беспородных животных (96 крыс и 120 мышей) обоего пола по общеизвестной методике [2].

Изучению противоопухолевых свойств соединений предшествовали опыты по определению их острой токсичности (ЛД₁₀₀ и МПД) на мышах (18—21 г) при однократном внутрибрюшинном введении. Противоопухолевую активность определяли на крысах (90—120 г) с перевивной саркомой 15, лейкозом Швеппа и мышах (18—21 г) с асцитной карциномой Эрлиха.

Соединения (I—IV) вводили крысам (8 раз) и мышам (6 раз) внутрибрюшинно ежедневно 1 раз в день, в дозах 1/20 и 1/10 от ЛД₁₀₀ соответственно. О терапевтическом эффекте судили по проценту торможения опухоли (Т%) или по их способности продлевать жизнь подопытных животных (УПЖ, %). Полученные результаты статистически обработаны по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение. Полученные данные позволили выявить некоторую зависимость токсичности и противоопухолевой активности от химического строения испытанных веществ (табл.).

Установлено, что токсичность (ЛД₁₀₀) водорастворимых хелатных соединений (I—IV) в зависимости от металла, входящего в комплекс,

колеблется в пределах 75—280 мг/кг. Из них сравнительно токсичным оказалось медьсодержащее соединение (I), ЛД₅₀ которого составляет 75 мг/кг. Летальная доза никель (II)- и палладийсодержащих соединений (III, IV) почти одинакова и составляет 250—280 мг/кг. Водорастворимые хелатные соединения на рост использованных экспериментальных опухолей оказывают неодинаковое ингибирующее действие, что, возможно, зависит от металла, входящего в комплекс. Так, на сарко-

Таблица. Токсичность и противоопухолевая активность водорастворимых хелатов Ni, Pd и Cu

Соединение	ЛД ₅₀	МПД	Доза, мг/кг	Торможение роста опухоли, %	
	мг. кг			саркома 45	лейкоз Швеша
I	75	40	2	24.5 ($\alpha < 0.95$)	36 ($\alpha < 0.95$)
II	250	200	10	34 ($\alpha < 0.95$)	51 ($\alpha > 0.95$)
III	250	200	10	65 ($\alpha > 0.95$)	0
IV	280	150	12	54 ($\alpha > 0.98$)	32 ($\alpha = 0.95$)

му 45 и лейкоз Швеша хелатное соединение меди (I) оказывает слабое угнетающее действие—на 24,5 и 36% соответственно. При замене меди никелем активность полученного соединения (II), особенно в случае лейкоза Швеша, значительно повышается ($T\% = 51$). Сравнительно сильное угнетающее действие на саркому 45 оказывает сульфированное хелатное соединение палладия (III, $T\% = 65$). Натриевая соль последнего (IV) проявляет близкую с ним активность в отношении данной опухоли. На лейкоз Швеша в отличие от соединений III она оказывает незначительное влияние (32%). Асцитная карцинома Эрлиха оказалась нечувствительной к действию указанных соединений.

Таким образом, среди испытанных хелатных соединений сравнительно активным в противоопухолевом отношении оказались водорастворимые комплексы палладия, что коррелирует с их каталитической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чухаджан Г. А., Элибекян Т. С., Саградян Л. Н., Матосян В. А. Арм. хим. ж., 35, 4, 252—255, 1982.
2. Методы экспериментальной химиотерапии. 357, М., 1971.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Миндзояна, АН Армянской ССР,
Греванский политехнический институт им. К. Маркса

Поступило 5.VI 1985 г.

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ МАЛОРЕСНИЧНЫХ ИНФУЗОРИЙ

А. С. ГЕВОРКЯН, Г. А. СЕМЕРДЖЯН

Изучались некоторые кинетические свойства (K_m , K_i) и молекулярный вес изоферментов аргиназы малоресничных инфузорий.

Величину K_m определяли методом Лайнуивера-Бэрка, K_i — графическим методом Диксона. L-аргинин для обоих изоферментов применяли в концентрациях 50 и 150 мкмоль. В качестве ингибиторов аргиназы использовали L-лизин и L-орнитин в количестве 1—20 мкмоль на пробу.

Молекулярный вес изоферментов аргиназы определяли методом гельфильтрации на сефадексе G-200 на основе элюционного графика белков с известными молекулярными весами.

Установлено, что первый изоэнзим аргиназы имеет молекулярный вес 125000, второй — 40000. Второй изофермент является редко встречающейся в природе низкомолекулярной формой аргиназы.

Резко различающиеся по молекулярному весу изоферменты аргиназы имеют высокое сродство к L-аргнину.

Для обоих изоферментов L-лизин является конкурентным ингибитором, а L-орнитин — неконкурентным.

10 с. илл. 4. библиогр. 18 назв.

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

Поступило 1.11 1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ, 1531-B86, от 13.11 1986.

СОЗДАНИЕ ПЧЕЛИНЫХ МИКРОСЕМЕЙ И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕ ПЧЕЛ ПРИ ВАРРОАТОЗЕ

Л. А. НАРИМАНЯН

Разработан метод создания пчелиных микросемей, которые по функциональным особенностям имитируют обычные пчелосемьи.

Проведены серии опытов по изучению действия различных доз гамма-излучения на больных варроатозом пчелиные микросемьи и обычные

пчелосемьи в целях разработки радиогенетического метода борьбы с этим заболеванием. Результаты этих опытов оказались идентичными. Это свидетельствует о том, что созданные нами пчелиные микросемьи могут найти применение и самых различных экспериментах. Их можно использовать в радиобиологических, физиологических и других экспериментальных исследованиях на медоносной пчеле. Микросемьи могут оказаться чрезвычайно удобным объектом при испытании новых акарицидных средств и других факторов, применяемых против клеща Варроа. Использование микросемей взамен обычных пчелосемей позволит сократить подопытный материал более чем в 20 раз, что свидетельствует об экономической целесообразности предлагаемого метода.

Опытами выявлено, что гамма-облучение в дозах 2400—1500 рад губительно действует на ход развития яиц открытого и печатного расплодов, а также сокращает продолжительность жизни рабочих пчел и снижает их работоспособность. Оно приводит к нарастающему сокращению численности пчел и гибели пчелосемей, что указывает на нецелесообразность использования гамма-лучей в дозах выше 2400 рад для разработки радиогенетического метода борьбы с варроатозом пчел.

Полученные нами данные согласуются с литературными.

11 с., рис. 3, библиогр. 7 назв.

Институт зоологии АН Армянской ССР

Поступило 29.X 1984 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ, 937-В 86 от 11.11 1986 г.

УДК 619:616.2—07:546.223:636.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОФЛОРЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ТЕЛЯТ К ТРИМЕРАЗИНУ И СУЛЬФАДИМЕТОКСИНУ

Г. С. ГРИГОРЯН, А. В. МАНАСЯН, А. Н. НИКОГОСЯН,
П. С. ГАЛОЯН, С. И. МИНАСЯН

Для успешного проведения лечения больных бронхопневмонией животных аэрозолем сульфадиметоксина и тримеразина необходимо предварительно определить степень чувствительности к ним микроорганизмов, вызвавших заболевание. Материал для исследования (мокроту) брали тампоном из трахей в стерильную пробирку. В ту же пробирку добавляли 1,5—2 мл физиологического раствора.

Наиболее простым, быстрым и доступным методом определения чувствительности микроорганизмов к препаратам является исследование с помощью бумажных дисков, содержащих испытуемые препараты. Диски готовили сами, пропитав их различными растворами и высушив в вакууме. Такие диски могут сохраняться 2—8 месяцев.

В поисках оптимального раствора мы испытывали несколько разных веществ, растворяя в них сульфадиметоксин и тримеразины в отдельности.

Одним из лучших растворителей оказался 1%-ный раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO_3).

Зоны задержки роста микробов дают и сульфадиметоксин, и тримеразины (15—20 мм), растворенные в 1%-ном растворе гидрокарбоната натрия, однако наилучшие зоны задержки роста (25—30 мм) отмечаются при их комбинированном применении в том же растворе.

8 с, 2 табл., библиогр. 3 назв.

*Ереванский зоопетеринарный институт,
кафедра терапии и клинической диагностики*

Поступило 13.V 1984 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ, 1066—В 86 от 13.II 1986 г.

УДК 581.14:634.11(479.25)

ВЛИЯНИЕ РЕТАРДАНТОВ НА РОСТ И ПЛОДОНОШЕНИЕ ЮВЕНИЛЬНЫХ ДЕРЕВЬЕВ ЯБЛОНИ

М. М. САРКИСОВА, Р. С. ОГАНЕСЯН, А. З. ДЖЕРЕДЖЯН

Изучалось действие и последствие синтетических ретардантов — хлорхолнхлорида (ССС) и флордимекоа (этрел) на рост побегов текущего года, габитус деревьев, закладку репродуктивных органов и плодоношение молодых, ювенильных деревьев яблони сортов Айдаред, Присила и Мелроз.

Установлено, что ретарданты способствуют ускоренному выходу растений из ювенильного состояния, что приводит к более раннему вступлению их в пору товарного плодоношения. Они вызывают ингибирование роста побегов, которое происходит за счет сокращения длины междоузлий и утолщения диаметра побегов, а также увеличение окружности штамба. Степень ингибирования роста побегов находится в прямой зависимости от концентрации раствора ретарданта и кратности обработки. Деревья, обрабатываемые ретардантами в течение 3-х лет, отличаются от контрольных компактностью кроны, низкорослостью и урожайностью. Эти отличия сохраняются и в первые два года последействия препаратов. Ретарданты никаких ростовых аномалий и формативных изменений на деревьях или плодах не вызывают. Средний урожай с обработанных деревьев в 2—3 раза превышает контроль.

Считаем, что обработку деревьев яблони ретардантами необходимо применять в садах интенсивного типа как мероприятие, способствующее ускорению вступления ювенильных деревьев в пору товарного

плодоношения. На взрослых плодоносящих деревьях ретарданты можно применять с целью повышения урожайности.

10 с., табл. 3, библиогр. 14 назв.

*Институт виноградарства, виноделия и плодоводства
Госагропрома Армянской ССР*

Поступило 15.III.1981 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИГи. 1521-В 86, от 5.III.1986 г.

УДК 612.534+658.3

РОЛЬ НОЦИЦЕНТИВНОЙ ЭМОЦИИ В ГИПОКСИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ ОЗВУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

С. А. АКОПЯН, А. О. ОГАНЕСЯН

Цель настоящей работы состояла в выяснении роли импульсной электроболевой эмоции пороговой и сверхпороговой силы в гипоксичувствительности (ГЧ) и гипоксиустойчивости (ГУ) озвученных кроликов. ГЧ и ГУ оценивались по некоторым показателям сердечно-дыхательных систем (ритму сердечной деятельности и дыхания, продолжительности систолы, систолическому показателю по Фогельсону-Черноголову, продолжительности миокарда и т. п.). Объектом исследования служили кролики. Опыты проводились в трех сериях.

Сразу после 80-минутного озвучивания (114 дБ, 1500 Гц) наблюдается подавление деятельности сердечно-дыхательных систем. Почти у всех кроликов отмечается низкий уровень изучаемых показателей по сравнению с исходными данными. На таком фоне болевое раздражение как пороговой, так и сверхпороговой силы вызывает повышение чувствительности изучаемых систем.

По сравнению с контрольными группами, животные, подвергающиеся озвучиванию и болевому раздражению, становятся более гипоксичувствительными. Так, при постепенном «подъеме» в специальной барокамере, в условиях высотной гипоксии, отсутствовали начальные реакции адаптации симпатического характера. Более того, начиная с 1000 м «высоты» у большинства подопытных кроликов замедлялся ритм сердечной деятельности и дыхания, значения которых на максимальной «высоте» (7500 м) были ниже исходных соответственно на 44 и 41%.

В начале максимальной высотной экспозиции отсутствовал эффект порогового болевого раздражения, в ответ же на сверхпороговое отмечалось удлинение латентного периода, восстановление исходных показателей наступало позже.

В конце десятиминутной высотной экспозиции наблюдалось явление адаптации. На этом фоне болевые воздействия вызывали различные ответные реакции: а) и пороговые, и сверхпороговые болевое раздражения вызывали гиперреакцию сердечной деятельности; б) при от-

сутствии реакции на раздражения пороговой силы тока отмечался пороговый эффект от сверхпороговой силы раздражения. Следовательно, проявлялись противоположные эффекты: повышение или понижение возбудимости регуляторных систем сердечной деятельности. Дыхательная система, в отличие от сердечной, подвергается более значительным изменениям: в начале высотной экспозиции имело место извращение ответных реакций, а в конце—пороговая реакция при раздражении сверхпороговой силы, т. е. существенное снижение возбудимости регуляторных систем дыхания.

В некоторых опытах в течение высотной экспозиции болевое раздражение (особенно сверхпороговое) вызывало снижение потолка гипоксической устойчивости подопытных животных. Очевидно, в механизме влияния экстремальных факторов существенную роль играют исходное функциональное состояние организма и типологические особенности нервной системы.

Это предположение подтверждается в проводимых нами в настоящее время экспериментах на крысах и мышах, в которых учитывается степень исходной аудиогенной реактивности.

9 с., библиогр. 19 назв.

Ерванский государственный университет

Поступило 17.VI 1983 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ

УДК 577.15.591.8

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ, ПОЧЕК И МОЗГА ЛЯГУШКИ

Ф. И. НИКОГОСЯН, Р. Р. ПЕТОЯН

В нашей лаборатории было установлено, что в гомогенатах печени, почек и мозга лягушки *Rana ridibunda* проявляется активность как D-, так и L-аминокислотной оксидазы. В настоящей работе приводятся данные об оптимальных условиях проявления активности L-аминокислотной оксидазы органов лягушки.

Впервые в лаборатории Грина из тканей печени и почек крыс была выделена оксидаза, катализирующая дезаминирование 12 природных аминокислот. Позже было показано, что optimum pH этого фермента равен 10.0 и при физиологических значениях pH среды его активность в 10 раз ниже. Отсюда был сделан вывод о незначительной роли оксидазы L-аминокислот в процессе дезаминирования природных аминокислот у млекопитающих. Изучены некоторые свойства L-аминокислотной оксидазы почек крысы, яда и тканей змей, микроорганизмов и бактерий.

Полученные нами данные показали, что L-аминокислотная оксидаза печени и почек лягушки *R. ridibunda* является цитоплазматическим

ферментом. Наилучшей средой для ее экстракции является 0.25 М раствор сахарозы. Оптимальной средой инкубации фермента из печени и мозга является 0.1 М К-фосфатный буфер с pH 7.4, а из почек—0.2 М К-фосфатный буфер (pH 7.4). Максимальная активность L-аминокислотной оксидазы проявляется при температуре 40° и присутствии 50 мкмоль субстрата для фермента печени и почек и 75 мкмоль субстрата (L-аланин)—мозга, соответственно K_m составляет $6.0 \cdot 10^{-3}$, $5.8 \cdot 10^{-3}$, $2.3 \cdot 10^{-3}$ М.

Обобщая полученные данные, можно заметить, что L-аминокислотная оксидаза органов лягушки *Rana ridibunda*, обнаруженная нами, по своим физико-химическим свойствам значительно отличается от соответствующего фермента печени и почек крыс. Эти ферменты различаются по оптимуму pH. Если оптимум pH фермента органов крыс равен 10, то для лягушки он—7.4, т. е. последний функционирует при физиологических значениях pH.

9 с., библиогр. 15 назв.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 6.I 1986 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИГН

УДК 572.79

ПЕРИОДИЗАЦИЯ ПЕРИПУБЕРТАТНОГО ЭТАПА ОНТОГЕНЕЗА МАЛЬЧИКОВ: МНОГОМЕРНОЕ СТАТИСТИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

Л. М. ЕПИСКОПОСЯН

На модельной системе 26 соматометрических признаков представительной выборки детей от 7 до 17 лет с использованием последовательного ряда многомерных статистических методов построена схема возрастной периодизации перипубертатной стадии онтогенеза мальчиков. Выделенные в результате классификации возрастные интервалы отличаются по интегральным показателям телосложения и совокупности информативных критериев соматического развития в наблюдаемом этапе онтогенеза. В рамках пошагового дискриминантного анализа вычислены линейные дискриминантные функции (ЛДФ) для реклассификации детей по периодам развития. Диагностическая способность ЛДФ—процент верного распознавания объектов исследования составила в среднем 79.2%, что находится в пределах, установленных при решении задач классификации с использованием признаков соматического развития.

12 с., библиогр. 8 назв.

Ереванский государственный медицинский институт,
НИЛ кафедры гигиены санитарно-гигиенического факультета

Поступило 24.X 1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИГН 8668-В от 16.XII 1985 г.

С. С. ОГАНЕСЯН

(к 60-летию со дня рождения)

Исполнилось 60 лет со дня рождения и 35 лет научно-педагогической и общественной деятельности заведующего отделом теоретической кардиологии Института кардиологии Минздрава Армянской ССР, профессора кафедры молекулярной физики и биофизики Ереванского государственного университета, доктора биологических наук Спартак Сарибековича Оганесяна.

С. С. Оганесян родился в 1925 г. в г. Ленинкане. Научную деятельность начал со студенческой скамьи, выполнив ряд работ, одна из которых, опубликованная в 1948 году, была посвящена изучению кровеносных сосудов. Окончив с отличием Ереванский зооветеринарный институт был направлен в аспирантуру, где под руководством выдающегося советского физиолога Х. С. Кошоянца защитил в 1952 г. кандидатскую диссертацию, посвященную вопросам биофизики мышц. Полученные результаты целиком вошли в книгу Х. С. Кошоянца «Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция», которой в 1953 году была присуждена Лениносовская премия АН СССР.

Вернувшись в Ереван, в Институте физиологии АН Армянской ССР С. С. Оганесян приступил к разработке и внедрению методов изучения структурных и физико-химических свойств мышечных белков. Успешное развитие этого направления послужило основанием для создания первой в СССР лаборатории биофизики и биохимии миокарда по специальному постановлению Президиума Академии наук Армении в 1962 г., которую возглавлял С. С. Оганесян (ныне лаборатория молекулярной кардиологии). Результаты исследования

белков мышц и миокарда в условиях патологии были обобщены в виде докторской диссертации, которую С. С. Оганесян успешно защитил в 1968 г. в Москве. Под руководством С. С. Оганесяна коллектив лаборатории развернул работы по изучению молекулярно-биологических основ патологии сердца. Начатые в нашей республике исследования в этом направлении легли в основу развития в СССР новой области современной медицины — молекулярной кардиологии. Наиболее важным являлось выдвинутое новое представление о белковой трансформации и генетическом репрограммировании клеток миокарда при изменении режима работы сердца. Оно вызвало широкий интерес кардиологов во многих странах, так как раскрывает биологические основы приспособления сердечной мышцы к новым условиям деятельности при сердечно-сосудистой патологии, и нашло подтверждение в дальнейшем в работах многих исследователей. На основе представления о молекулярно-генетической трансформации мышц и миокарда в настоящее время уже разработаны и применены методы частичной хирургической коррекции сердечной мышцы при аутотрансплантации «перевоспитанных» скелетных мышц в миокардиальную ткань. Признанием больших заслуг коллектива лаборатории в этой области явилось избрание проф. С. С. Оганесяна в 1972 г. членом редколлегии международного журнала «Молекулярная и клеточная кардиология», издаваемого в США и Англии. В том же году он был избран членом Международного союза исследования сердца и Европейского общества изучения мышц.

Результаты исследования молекулярных основ приспособления мышечной ткани к новым условиям работы послужили основанием для приглашения сотрудников лаборатории участвовать в работах по космической биологии и медицине, проводимых в Институте медицинских и биологических проблем МЗ СССР. В течение 11 лет лаборатория, руководимая проф. С. С. Оганесяном, ведет широкие исследования на животных, экспонированных на биоспутниках. Результаты изучения молекулярно-генетических особенностей обратимого приспособления мышц к факторам космического полета, в частности на кораблях «Космос-605» и «Космос-1129», опубликованы во многих странах. В 1985 году проф. С. С. Оганесян был избран членом-корреспондентом комиссии по гравитационной биологии Международного союза физио-

логов. Он многократный участник различных международных конгрессов и симпозиумов, выступал с лекциями по молекулярной кардиологии в университетах ряда городов Европы. С. С. Оганесян автор более 170 научных работ, под его руководством защищены 16 кандидатских и докторских диссертаций. С 1963 года он ведет педагогическую работу в Ереванском государственном университете. С. С. Оганесян ведет также большую общественную работу, являясь членом Научного совета по проблемам биологической физики АН СССР, редколлегии научных журналов, в обществе «Знание». Имеет правительственные награды.

Редколлегия и редакция «Биологического журнала Армении» поздравляют юбиляра, желают ему здоровья и творческих успехов на благо отечественной науки.

