

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Типография Издательства АН АрмССР, Ереван 19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

ԲՈՎԱՆՔԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Որիցիեալ եզրվածներ

Մատիեյան Ն. Ս., Մեյի՛յան Գ. Ս., Առաքելյան Վ. Ռ., Ավագյան Յ. Մ., Քաշաբով Ս. Լ., Մեջոյան Օ. Լ. Անօրգանական կատիոնների աղտորցիան զանգիւղից պարունակող երկչեւութեան թաղանթների վրա	179
Քեռոզյան Ս. Գ., Խոլզապետիյան Է. Է. Գնթ-ի թաղանթների մածուցիկ առաջնական առանձնահատկությունների կախումը հիդրատացիայից	184
Քաթուլյան Ս. Ս., Իոնների աղտորցիան ֆոսֆատիդիլիտիկ լիպոսոմներին մակերեսի վրա	187
Ալավերդյան Կ. Զ. Հեպարինի և որոշ հակահիստամինային պրեպարատների փոխազդեցության մոլեկուլայր մեխանիզմը	194
Համբարձումյան Տ. Գ., Աղամյան Ս. Յա., Մարիկյան Գ. Գ., Պետրոսյան Լ. Ս. Նատրիումի զեֆերոսիտային ազդեցությունը լիպոսոմային թաղանթի թափանցելիության վրա	200
Դյուլիսեղյան Ա. Վ. Լիպիդների զերոսիդային օքսիդացումով առաջացած K ⁺ -ի պոստ-սիվ դուպ մոլան կինետիկան Լիպոցիտներում	205
Վազանյան Ա. Գ., Դուրգալյան Ս. Ս., Հովհաննեսյան Մ. Ի. Կալիումի իոնների Δψ-ից կախված տեղափոխությունը <i>Brevibacterium flavum</i> -ի մոտ	209
Հակոբյան Է. Ս., Կարաբեկով Բ. Պ., Ալեքեևիչսկայա Վ. Ե., Փալուսյան Ա. Ա., Մուրադյան Ա. Գ., Տխուրին Յ. Ս. Լ-պրոլինի բիոսինթեզը իզոլիցինից կախված <i>Brevibacterium flavum</i> մուտանտների կողմից մնասա պարունակող միջավայրերում	213
Խաչատրյան Գ. Է., Լսգալյան Տ. Ի., Սիմոնյան Ա. Լ. Դրորմերկուրիբեկոդատի ազդեցությունը <i>Pseudomonas sp.</i> -ի L-լիզին-2-մոնոօքսիդենազայի վրա	219
Մալոյուշչիկ Վ. Բ., Ամպիլով Ն. Բ., Ոսպոնիևա Ն. Յու., Սոկոլով Ի. Ն. Հեպտոդոգիմետրիան որպես արտաքին բնույթ-հառազայթումից վնասվածքի ժանրության գնահատման մոդել	223
Ավույով Ս. Է., Խուտայան Ա. Ա., Դարբեկյան Է. Ս. Թրոմբոցիտ-անոթի պատ սխառմի ֆունկցիոնալ վիճակի փոփոխությունը հառազայթման ժամանակ	228
Բակոբյան Պ. Զ., Անտոնյան Օ. Ա. Դիբրոբրուտենային թունավորման ժամանակ պաշտպանիչ անդամայինների ազդեցության համեմատական գնահատականը	232

Համառոտ հաղորդումներ

Օհանջանյան Ե. Ս., Թոքանյան Ա. Ա. Ներբյուրի <i>рН</i> -ը և <i>Lactobacillus salivarius</i> Δ ₂₁₁ Կ բազադրամասերի վերաբաշխումը	237
Ավագյան Յ. Մ., Ավույան Գ. Մ., Լահուսմանյան Ռ. Ս. Սինթրոտրոն հառազայթման և ռենտգենյան հառազայթների ազդեցությունը <i>Crepis capillaris</i> -ի հանգստացող սերմերի վրա	239
Աբեմունի Գ. Գ., Տեր-Մարկոսյան Ա. Ս. Առնետների յարդի միտոքոնդրիումներում ՆԱԴ-կախյալ օքսիդացումը և նրա հետ համակցված ֆոսֆորիլացումը էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունից հետո	241
Մխչյան Է. Ի., Պետրոսյան Կ. Գ., Շաղոյան Կ. Գ. Արդյունաբերության տարրեր ուղղվածության հավերի արյան սպիտակուցային ոպեկտրի ուսումնասիրությունը	243

ԻՆՖԻՐԱՏՆԻՍ

Խաչկալյան Ի. Լ., Սիմոնյան Ա. Ա. ՆԱԴ-մայատղեհիդրոգենազի մոլեկուլային ձևերը հալերի ռետրոգենեզում	246
Բալասանյան Գ. Ս., Կանայան Լ. Ս., Նաոիշվիլի Ն. Ն. Մաթաթթի կալիումական ազի ազդեցությունը հալի սաղմի հեպտոցիտների միտոտիկ ակտիվության դիսմիկայի վրա	247
Մարտիրոսյան Ս. Ն., Սիմոնյան Ս. Գ., Բաղդասարյան Ա. Մ. Բուլբուրի աճի կարգավորիչ բջջազենետիկական ազդեցությունը <i>Crepis capillaris</i> -ի սերմերի վրա	248
Աֆրիկյան Ա. Բ. Մակրոէլեմենտների ազդեցությունը մոլիբդենի պարունակության վրա խաղողագրության տերմներում և չիվերում	249
Ավագյան Ա. Գ., Պալյան Ս. Ս., Տառնովա Ե. Օ. Քիմիական էլեմենտների պարունակությունը տոմատի պտուղներում՝ կախված տեսակի առանձնահատկություններից	250

ԼՐԱՏՈՒ

Ավագյան Յ. Մ., Սիմոնյան Ա. Լ. Արտադեպի կոնֆերանս նվիրված ֆերմենտատիվ կառուցիկի գործնական կիրառմանը	251
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

Матинян Н. С., Меликян Г. Б., Аракелян В. Б., Авакян Ц. М., Кочаров С. Л., Миджоян О. Л. Взаимодействие неорганических катионов с бислойми, содержащими ганглиозиды	179
Геворкян С. Г., Худавердян Э. Э. Зависимость вязкоупругих свойств пленок ДНК от гидратации	181
Тагулян С. А. Адсорбция нонов на поверхности липосом из фосфатидилхолина	187
Алавердян К. Г. Молекулярный механизм взаимодействия генаина с некоторыми антигистаминными препаратами	191
Алибарацян Т. Г., Адамян С. Я., Марикян Г. Г., Петросян Л. С. Влияние дезоксихолата натрия на проницаемость липосомальной мембраны	200
Головхандян А. В. Кинетика пассивного выхода K^{+} из эритроцитов, индуцированная перекисным окислением липидов	205
Варданян А. Г., Лургапьян С. С., Оганесян М. И. ДУС-зависимый перенос ионов калия у <i>Brevibacterium flavum</i>	209
Алиев Э. М., Карабекян Б. П., Аксеновская В. Е., Булутия А. А., Мурадян А. Г., Тхруни Ф. И. Биосинтез L-пролина изолейцинзависимыми мутантами <i>Brevibacterium flavum</i> на питательных средах, содержащих мелассу	213
Хачатрян Г. Э., Казарян Т. Р., Симонян А. Л. Влияние п-хлормеркурибензоата на L-лизин-2-монооксигеназу из <i>Pseudomonas</i>	219
Митюшин В. Б., Ампилова Н. Б., Балакина Н. Ю., Соколов Н. Н. Энзимодозиметрия как модель оценки тяжести поражения от внешнего бета-облучения	223
Акопов С. Е., Харатьян А. А., Габриелян Э. С. Изменения функционального состояния системы тромбоциты—сосудистая стенка при облучении	226
Бахадян Н. А., Антоян О. А. Сравнительная оценка влияния защитных нутриентов при дихлорбутеновой интоксикации	232

Краткие сообщения

Осанджакян Е. С., Гречукян А. А. Внутриклеточный pH и перераспределение компонентов Zn^{2+} у <i>Lactobacillus salivarius</i>	237
Авакян Ц. М., Авакян Г. М., Каграмян Р. С. Действие синхротронного излучения и рентгеновских лучей на покоящиеся семена <i>Cr. capillaris</i>	239
Арцруни Г. Г., Тер-Маркисян А. С. НАД-зависимое окисление и сопряженное с ним фосфорилирование митохондрий печени крыс после воздействия электростатического поля	241
Мельян Э. Н., Петросян К. Г., Шагоян К. Г. Изучение белкового спектра крови кур различного направления продуктивности	243

Рефераты

Личколян Т. К., Симонян А. А. Множественные молекулярные формы НАД-зависимой малатдегидрогеназы в онтогенезе кур	245
Бидасянц Д. С., Какалян Л. Р., Патишвили Н. Н. Влияние янтарата калия на динамику митотической активности гепатоцитов куриного эмбриона	247
Мартиросян С. П., Микаелян С. Г., Багдасарян А. М. Онтогенетическое действие регулятора роста растений на семена <i>Cr. capillaris</i>	248
Африкян А. Б. Влияние макроэлементов на содержание молибдена в листьях и побегах виноградного растения	249
Авакян А. Г., Папаян С. С., Тарогова Е. О. Содержание химических элементов в плодах томата в зависимости от сортовых особенностей	250

Хроника

Авакян Ц. М., Симонян А. Л. Высшая конференция по практическому применению ферментативного катализа	251
---	-----

CONTENTS

Original articles

<i>Matinian N. S., Melikian G. B., Arakelian V. B., Avagian Ts. M., Kocharlan S. L., Mnjolan O. L.</i> Interaction of Inorganic Cations with the Gangliosides on Lipid Bilayer Membranes	179
<i>Gevorkian S. G., Khudaverdian E. E.</i> Dependence of Viscouselastic Peculiarities of DNA Membranes on Hydration	184
<i>Tatullian S. A.</i> Ion Adsorption to the Surface of Phosphatidylcholine Liposomes	187
<i>Alaverdyan K. G.</i> Molecular Mechanism of Interaction of Heparin with Some Antihistamine Agents	194
<i>Hambartsumian T. G., Adamian S. Ya., Marikian G. G., Petrosian L. S.</i> Influence of Sodium Deoxycholate on the Liposome Membrane Permeability	200
<i>Gyulkhandanyan A. V.</i> Kinetics of Passive Efflux of K ⁺ from Erythrocytes Induced by Lipid Peroxidation	205
<i>Vardanian A. G., Durgaryan S. S., Oganessian M. I.</i> Δ^4 -Dependent Transfer of Potassium Ions in <i>Brevibacterium flavum</i>	209
<i>Hakobian E. M., Karabekov B. P., Aksenovskaya V. E., Bulutian A. A., Muradian A. G., Tkhrunt F. N.</i> Biosynthesis of L-Proline by Isoleucine-dependent Mutants of <i>Brevibacterium flavum</i> on Nutrient Media Containing Molasses	213
<i>Khachatryan G. E., Kazaryan T. R., Simonyan A. L.</i> Influence of p-Chloromercuribenzoate on L-Lysin-2-Monooxygenase from <i>Pseudomonas</i> sp.	219
<i>Matyushichev V. B., Ampilova N. B., Balantina N. Yu., Sokolov I. N.</i> Enzymatic Dosimetry as a Model of Estimation of Heaviness Disease from External Beta-Irradiation	223
<i>Akopov S. E., Khuratian A. A., Gabriellian E. S.</i> Alteration of the Functional State of Platelets-Vascular Wall System at the Irradiation	228
<i>Bakalian P. A., Antonian O. A.</i> Comparative Estimation of the Influence of Protecting Nutrients in Case of Dichlorbutene Intoxication	232

Short Communications

<i>Ohanjanian E. S., Trchounian A. A.</i> Intracellular pH and Redistribution of Δ_{11}^{11+} <i>Lactobacillus salivarius</i> Components	237
<i>Avagian Ts. M., Avagian G. M., Ghahramanian R. S.</i> Action of Synchrotron Radiation and Roentgen Rays on the Resting Seeds of <i>Crepis capillaris</i>	239
<i>Artseruny G. G., Ter-Markosian A. S.</i> NAD-Dependent Oxidation and Connected with it Phosphorylation in the Liver Mitochondria in Rats after the Electrostatic Field Treatment	241
<i>Mkhchian E. I., Petrosian K. G., Shagoyan K. G.</i> Study of Blood Protein Spectrum of Hens of Various Directedness of Productivity	243

Abstracts

<i>Khachkattian T. K., Simonian A. A.</i> Multiple Molecular Forms of NAD-Dependent Malaldehydehydrogenase during Ontogenesis of Hens	246
<i>Balasanian D. S., Kanalan L. R., Natishvili N. N.</i> Influence of Potassium Succinate on Dynamics of Mitotic Activity of Hepatocyte of Hen Embryo	247
<i>Martirosian S. N., Michaelian S. G., Baghdasarian A. M.</i> Study of Cytogenetic Influence of Plant Growth Regulators on the Seeds of <i>Crepis capillaris</i>	248
<i>Afriktian A. B.</i> Effect of Macroelements on Molybdenum Content in the Leaves and Shoots of Grape Plant	249
<i>Avaglan A. G., Paplan S. S., Tarosova E. O.</i> Content of Chemical Elements in the Tomato Fruits Depending on the Sort Peculiarities	250

Chronics

<i>Avagian Ts. M., Simonian A. L.</i> Departing Conference on the Practical Use of Fermentative Catalysis	251
---	-----

ՕՐԻԳԻՆԱԼ ՀՈՂՎԱԾՆԵՐ * ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Биол. ж. Армения, т. 40, № 3, 179—183, 1987

УДК 577.37

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТИОНОВ
С БИСЛОЯМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ГАНГЛИОЗИДЫ

Н. С. МАТИНЯН, Г. Б. МЕЛІКՅԱՆ, В. Б. АРАՔԵԼՅԱՆ, Ը. Մ. ԱՎԱԿՅԱՆ,
Տ. Ն. ԿՈՇԱՐՈՎ, Օ. Ն. ԱՆԺՅՅԱՆ

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР. Институт тонкой органической химии
им. А. Н. Минджояна АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Исследовано взаимодействие ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} с бислоями из фосфатидилхолина, содержащими около 6 молярных % ганглиозидов G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1b} мозга человека. Двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} адсорбируются одинаково и сильнее, чем одновалентные K^+ и Na^+ . Зависимости $\Delta\varphi$ (Igc) для каждой пары исследованных катионов практически совпадают. Обнаружено, что, несмотря на различное число зарядов в молекулах разных ганглиозидов, последние взаимодействуют со всеми перечисленными катионами в равной мере.

Անոտացիա — Հետազոտված է K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} աղաթթվերի և մոնոկոն զանգվածային պարունակող G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1b} լիպիդների բաղաձուլների վրա: Ca^{2+} , Mg^{2+} աղաթթվերն ունակությունները նմանաբար են իրար և աղերի մեծ են, քան K^+ , Na^+ զեպրում: Տարբեր զանգվածայինները, նախած տարբեր բանաձուլային լիպիդների, չուցադրում են նույնանման փոխզգեցությունները բոլորիցսլ իոնների հետ:

Abstract — The interaction of inorganic cations K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} with the phosphatidylcholine bilayers containing 6 mol per cent of gangliosides from human brain G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1b} was investigated. Bivalent cations Ca^{2+} and Mg^{2+} adsorb on gangliosides identically, but stronger than monovalent K^+ and Na^+ having the same binding constant. It was shown that gangliosides G_{D1a} and G_{T1b} interact with all investigated cations likewise the G_{M1} .

Ключевые слова: бислойные липидные мембраны, ганглиозиды мозга, адсорбция ионов.

Ганглиозиды являются важными липидными компонентами биологических мембран. Одной из основных функций ганглиозидов на поверхности клетки считается рецепторная функция, которая связана с полярной углеводной головкой молекулы ганглиозида. Так, известно, что

они связывают целый ряд физиологически активных веществ: бактериальные токсины, вирусы, гормоны, лектины и др. [6]. В литературе высказывалось также предположение, что взаимодействие ганглиозидов с ионами Ca^{2+} приводит к передаче нервного импульса по синапсам [12].

Очевидно, что детальное исследование адсорбции даже простых неорганических ионов, обычно присутствующих во внутри- и внеклеточной среде, существенно расширит понимание сложных физиологических процессов, протекающих на поверхности биомембран. Такого рода исследования на биомембранах в настоящее время невозможны. Это диктует необходимость использования модельных систем.

Многие авторы изучали взаимодействие ионов Ca^{2+} с ганглиозидами на различных модельных системах: монослоях [9], мицеллах [7], липосомах [10] и плоских липидных бислоях [14]. Однако полной ясности в вопросе связывания ионов кальция ганглиозидами пока нет. Имеется существенный разброс в значениях констант связывания, приводимых различными авторами [7, 9, 10]. Еще хуже изучено взаимодействие ганглиозидов с ионами K^+ , Na^+ , Mg^{2+} .

Нами исследовано взаимодействие бислоевых липидных мембран (БЛМ), приготовленных из смеси фосфатидилхолина (ФХ) с индивидуальными ганглиозидами (G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1b}) мозга человека, с неорганическими катионами, представляющими биологический интерес (H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Материал и методика. Для формирования мембран использовали яичный ФХ и различные ганглиозиды мозга человека — G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1b} — выделенные по описанному методу [13]. Контроль чистоты фосфолипидов и ганглиозидов проводили методом тонкослойной хроматографии [4]. Все исследованные липиды были хроматографически однородными веществами.

В качестве растворителей для мембранообразующих смесей использовали перегиляные хлороформ и декан. Высушенную под вакуумом смесь ФХ с ганглиозидом (около 6 молярных % ганглиозида) сначала растворяли в небольшом количестве хлороформа, а затем добавляли декан при слабом нагревании ($\sim 40^\circ\text{C}$) и течение нескольких минут до полного удаления хлороформа. Концентрация суммарных липидов в мембранообразующей смеси составляла 20 мг/мл. Мембраны формировали в 10–3M растворе KCl нанесением капли мембранообразующего раствора на отверстие (~ 1 см) в перегородке двухкамерной тefлоновой ячейки (объемом 10 мл).

Удельные проводимость и емкость мембран определяли по методу, описанному в [8]. Изменение граничного потенциала в зависимости от состава среды измеряли двумя методами: потенциодинамическим [1] и методом индуцированной неактивной калиевой проводимости [11]. При измерениях потенциодинамическим методом pH и концентрации электролитов KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ изменяли на одной стороне мембраны введением в ячейку небольших количеств соответствующих концентрированных растворов. При измерениях методом индуцированной неактивной калиевой проводимости в оба отделения ячейки добавляли нонактин в концентрации $1.25 \cdot 10^{-6}$ M. Изменение граничного потенциала рассчитывали по формуле

$$\Delta\varphi = \frac{2,3 RT}{F} \lg G/G_0,$$

где G_0 — проводимость БЛМ в фоновом электролите, остальные константы имеют свое обычное значение.

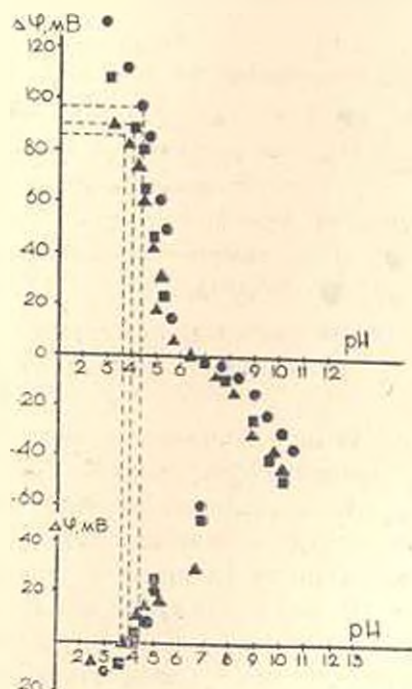
При определении изоэлектрических точек и потенциалов нулевого заряда использовали подход, описанный в [2].

Растворы готовили на дистиллированной (или бидистиллированной) воде из реактивов марки «хч». pH растворов поддерживали около $6,8 \pm 0,2$ введением небольших количеств КОН. В одинаковых условиях результаты экспериментов, полученные при использовании дистиллированной и бидистиллированной воды, совпадали. Для устранения примесей многозарядных ионов в растворе фоновый электролит в ячейку вводили 10^{-4} М ЭДТА. Ячейку термостатировали при 30° .

Результаты и обсуждение. Все исследованные ганглиозиды в смеси с ФХ образуют достаточно устойчивые мембраны. Удельное сопротивление таких мембран ниже, чем у бислоев из чистого ФХ, и составляет 10^7 — $2 \cdot 10^7$ Ом·см², удельная емкость $0,32$ мкФ/см², натяжение $0,6$ дин/см. Емкость и проводимость БЛМ практически не меняются при замене G_{M1} на G_{D1} или G_{T1} . Известно, что ганглиозиды в отличие от фосфолипидов достаточно хорошо растворяются в воде. Поэтому были проведены контрольные эксперименты, позволяющие оценить возможность выхода ганглиозидов в водный раствор. Для этого измеряли поверхностный потенциал БЛМ в ячейках разного объема (10 и $1,5$ мл), так как выход ганглиозидов в раствор должен сопровождаться уменьшением поверхностного потенциала, зависящим от объема водной фазы. Однако поверхностные потенциалы БЛМ в обоих случаях были одинаковы и не изменялись в течение $1,5$ ч.

Собственный потенциал бислоев, измеренный методом индуцированной проводимости, составил 70 — 75 мВ независимо от типа ганглиозида. При определении собственного потенциала мембран по методу точки нулевого заряда [2] значения его получаются выше 90 — 100 мВ, но практически не зависят от типа ганглиозида.

Рис. 1а). Экспериментальные зависимости $\Delta\varphi$ (pH) для мембран, содержащих 6 мольных % G_{M1} ($\blacktriangle$), 6 мольных % G_{D1} ($\blacksquare$) и 4,3 мольных % G_{T1} ($\bullet$). б). Определение изоэлектрических точек указанных БЛМ при нейтрализации протонами. (Значения символов те же, что и на рис. 1а). Разброс значений $\Delta\varphi$ в различных экспериментах невелик и не превышает 2 — 3 мВ.



На рис. 1 приведены экспериментальные зависимости $\Delta\varphi$ (pH) для исследованных бислоев (рис. 1а) и изоэлектрические точки мембран того же состава при нейтрализации ионами H^+ (рис. 1б). Как видно,

изоэлектрическая точка мембран, содержащих 6 мольных % ганглиозидов, соответствует $\text{pH} \sim 3,2-3,4$, что достаточно хорошо совпадает со значением, полученным для БЛМ из смеси 95% ФХ+5% фосфатидилсерина, содержащего, как и ганглиозиды, карбоксильную группу [3]. Следовательно, можно считать, что значение pK карбоксильной группы ганглиозида равно $\sim 2,2$, как и значение pK фосфатидилсерина [5].

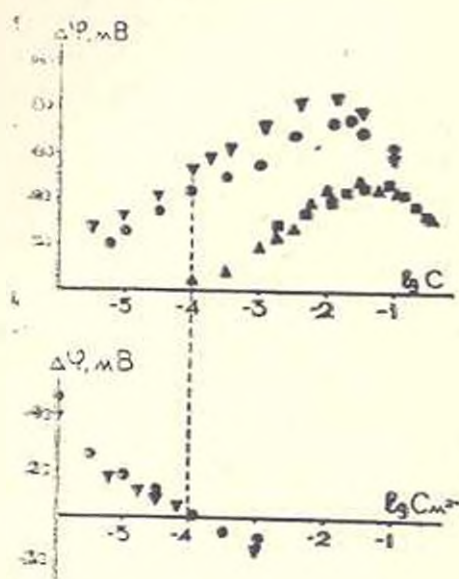


Рис. 2.

Рис. 2 а). Адсорбция на бислоях, содержащих G_{M1} , ионов Ca^{2+} (∇), Mg^{2+} ($\bullet$), K^+ ($\blacksquare$) и Na^+ ($\blacktriangle$). б). Определение изоэлектрических точек БЛМ, содержащих G_{M1} , при нейтрализации ионами Ca^{2+} (∇) и Mg^{2+} ($\bullet$). По оси абсцисс отложен десятичный логарифм концентраций соответствующих ионов.

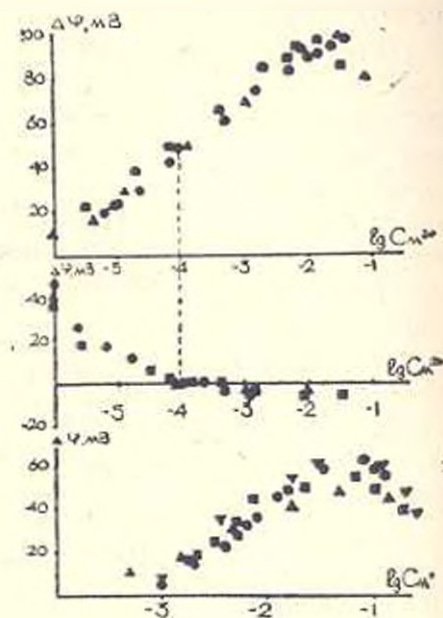


Рис. 3.

Рис. 3 а). Адсорбция ионов Ca^{2+} на G_{D1} ($\bullet$), G_{T1b} ($\blacktriangle$) и ионов Mg^{2+} на G_{D1} ($\blacksquare$). б). Определение изоэлектрических точек БЛМ при нейтрализации ионами Ca^{2+} ($\bullet$ — G_{D1} , $\blacktriangle$ — G_{T1b}) и Mg^{2+} ($\blacksquare$ — G_{D1}). в). Адсорбция однозарядных катионов на бислоях, содержащих G_{D1} ($\bullet$ — K^+ , $\blacktriangle$ — Na^+), и на мембранах, содержащих G_{T1b} ($\blacktriangle$ — K^+ , $\blacksquare$ — Na^+).

На рис. 2 приведены зависимости разности граничного потенциала от концентрации ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} на бислоях, содержащих G_{M1} , полученные потенциодинамическим методом. Те же значения получены при измерениях методом индуцированной неактивной калиевой проводимости (данные не приводятся).

На рис. 3 показаны аналогичные зависимости для БЛМ, содержащих 5 мольных % G_{D1} (рис. 3 а) и 4,3 мольных % G_{T1b} (рис. 3 б). Очевидно, что адсорбционная активность всех исследованных ганглиозидов практически одинакова.

По точкам пересечения кривой $\Delta\psi(\lg c)$ с осью абсцисс на рисунках 2б и 3б можно оценить константы связывания двухвалентных ка-

тионов [2]. Значения этих констант для разных ганглиозидов лежат в интервале 10^3 — 10^4 M^{-1} . Поскольку ионы Ca^{2+} начинают вытеснять ионы K^+ и Na^+ при концентрациях, на 3 порядка меньших, чем концентрации одновалентных катионов, константы связывания для последних могут быть оценены как 1 — 10 M^{-1} . Полученные значения констант практически совпадают с константами связывания соответствующих ионов с фосфатидилсерином [2].

Отметим, что в работе [10] получены значения константы связывания ионов Ca^{2+} в интервале 0 — 100 M^{-1} , что заметно ниже приводимых в нашей статье величин. Причину расхождения, вероятно, следует искать в различных модельных системах, на которых получены указанные данные, а также в условиях проведения эксперимента.

Очевидно, что полного понимания механизма взаимодействия ганглиозидов с ионогенными ионами можно достичь, лишь продолжив исследования в этом направлении и разработав адекватную теорию адсорбции ионов на ганглиозидах, позволяющую уточнить значения констант связывания и степень удаленности заряда ганглиозидной головки от поверхности бислоя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абидор И. Г., Айтыян С. А., Черный В. В., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 245, 977—981, 1979.
2. Абидор И. Г., Матинян Н. С. Биол. мембраны, 2, 1029—1048, 1985.
3. Иakov В. Г., Бгрестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
4. Кейтс М. Техника липидологии, М., 1975.
5. Матинян Н. С., Эрицлер Н. А., Абидор И. Г. Биол. мембраны, 1, 254—267, 1984.
6. Прохазова Н. В. Усп. биол. хим., 23, 40—60, 1982.
7. Benz J., Lehn J. FEBS Lett., 31, 197—209, 1973.
8. Chernomordik L. V., Melikyan G. B., Dubrovina N. J., Abidor I. G., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem and Bioenerg., 12, 155—156, 1984.
9. Maggio B., Cumar F., Caputto R. BBA, 650, 69—80, 1981.
10. McDaniel R., McLaughlin S. BBA, 819, 153—160, 1985.
11. McLaughlin S. In: Current Topics in Membranes and Transport. Acad Press N. — Y, 9, 70—144, 1977.
12. Rahmann H., Rosner H., Breer H. J. Theor. Biol., 57, 231—237, 1976.
13. Seyfried T. N., Ando F., Yu. R. K. J. of Lipid Res., 19, 538—543, 1978.
14. Usai C., Marchetti C., Gambale F., Robello M., Gorka A. FEBS Lett., 153, 315—319, 1983.

Поступило 28 VII 1986 г.

ЗАВИСИМОСТЬ ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ ПЛЕНОК ДНК ОТ ГИДРАТАЦИИ

С. Г. ГЕВОРКЯН, Э. Э. ХУДАВЕРДЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ, Ереванский государственный университет

Аннотация — Микрометодом Морозова были измерены динамический модуль Юнга и логарифмический декремент затухания аморфных пленок ДНК тимуса теленка и селезенки крупного рогатого скота в зависимости от гидратации при $t = 25^\circ$. Показано, что модуль Юнга влажных пленок ДНК ($E = 0.02 \pm 0.025$ Гн/м²) с уменьшением гидратации сильно увеличивается и достигает значений $E = 0.5 \pm 0.7$ Гн/м². Зависимость E от гидратации носит сложный немонотонный характер, что, вероятно, является выражением внутримолекулярных конформационных изменений ДНК.

Անոտացիա — Միկրոմեթոդով Մորոզովի նախընտրված էն Հորթի նշանն զննելից և խոշոր եղջերավոր անասունների փայծաղից անջատված ԴՆԲ-ի ամորֆ թաղանթների Յունգի մոդուլը և մարման լոգարիթմական ղեկրեմենտը՝ կախված հիդրատացիայից $t = 25^\circ$ ։ Յուրջ է տրվել, որ խոնավ թաղանթների Յունգի մոդուլը ($E = 0.02 \pm 0.025$ Գն/մ²), չորի բանալություն նվազման հետ աճում է ($E = 0.5 \pm 0.7$ Գն/մ²)։ E -ի կախումը հիդրատացիայից ունի բարդ, ոչ մոնոտոնական բնույթ, ինչն էլ, հավանաբար, հանդիսանում է ԴՆԲ-ի իներմոլեկուլյար կոնֆորմացիոն փոփոխությունների արտահայտություններ։

Abstract — Dynamical Young's modulus and logarithmic decrement of amorphous membranes of calf thymus and cattle spleen DNA were studied by Morozov method at different hydration levels at the temperature $t = 25^\circ$. Decrease of the hydration of highly hydrated membranes ($E = 0.02 \pm 0.025$ Gn/m²) was shown to cause an increase in the Young's modulus ($E = 0.5 \pm 0.7$ Gn/m²). Dependence of E upon hydration had complicated not monotonous character, which was the expression of intra-molecular conformational changes of DNA.

Ключевые слова аморфные пленки ДНК, гидратация, динамический модуль Юнга, логарифмический декремент затухания, конформация.

Одна из важных проблем физики биополимеров—это проблема изучения жесткости ДНК. Для количественного понимания макроскопических свойств ДНК, ее укладки в хромосомах и вирусных частицах, свойства кольцевых замкнутых и субспиральных ДНК этот параметр имеет важное значение [2, 13]. Изучению этой проблемы был посвящен ряд экспериментальных [7, 8] и теоретических работ [3, 5, 6]. При расчетах жесткости ДНК, основанных на экспериментальных данных, используют модель жесткой палочки, и соответственно возникает проблема персистентной длины. Насколько оправдан такой подход, обсуждается в обзоре [2]. Во всех экспериментальных работах, о которых шла речь, изучались механические свойства ДНК в растворе, и они в основном относятся к одной из конформаций ДНК—В-форме. Известно также, что в твердой фазе (пленки, ориентированные нити, кристаллы), в зависимости от внешних условий (гидратации, температуры), ДНК может находиться в различных конформационных состояниях [10].

Настоящая работа посвящена изучению жесткости аморфных пленок ДНК в зависимости от гидратации.

Материал и методика. Метод измерения динамического модуля Юнга (E) и логарифмического декремента затухания (θ) биополимеров в твердой фазе (микрометод Морозова) детально описан [1, 9]. Он основан на анализе резонансных поперечных колебаний консолидо закрепленных пластинок.

Изучали ДНК тимуса телянка и селезенки крупного рогатого скота, содержащие ~3% NaCl по весу. Пленки готовили медленным высушиванием водного насыщенного раствора ДНК на подложке из полиметилметакрилата (оргстекло) при температуре $t = +10^\circ$.

Ориентацию пленок проверяли в поляризационном микроскопе МБИ-15У. 4. 2. Изучали пленки толщиной 5 ± 20 мкм, из которых вырезали пластины прямоугольной формы длиной $0,5 \pm 2,0$ и шириной $0,05 \pm 0,1$ мм. Относительную влажность ($A\%$) в камере поддерживали растворами CaCl_2 (от 32 до 97%). Более низкие влажности (10 и 15%) поддерживали насыщенными растворами LiCl и ZnCl_2 .

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показана зависимость модуля Юнга и логарифмического декремента затухания аморфной пленки ДНК тимуса телянка от относительной влажности при температуре 25° при

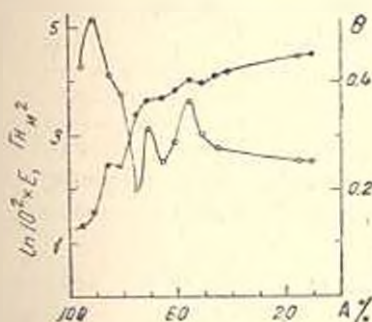


Рис. 1. Зависимость модуля Юнга E (—●—●—) логарифмического декремента затухания θ (---○---) пленки ДНК тимуса телянка от относительной влажности $A\%$.

$A = 95\%$, $E = 0,02$ Гн/м². Для сравнения отметим, что для аморфных пленок белков при той же относительной влажности $E = 1$ Гн/м² [9], т. е. на 2 порядка больше, чем у ДНК. Как видно из рис. 1, с уменьшением относительной влажности, что приводит к уменьшению гидратации, происходит существенное увеличение модуля Юнга. Это увеличение происходит через ряд переходов — в области, где E выходит на плато. По литературным данным, в твердой фазе при $A \geq 90\%$ наблюдается В-форма, а при $A \leq 75\%$ — А-форма ДНК [10]. Из рис. 1 видно, что между В- и А-формами при $A = 70\%$ существует промежуточное состояние. Вероятно, В—А переход происходит не плавно. При $A \leq 60\%$ функции $E(A)$ и $\theta(A)$ имеют ряд особенностей, что, вероятно, соответствует внутрисемейственным переходам. Такая картина наблюдалась во всех образцах (8 экспериментов), проверенных нами.

Логарифмический декремент затухания, который характеризует внутреннее трение в образце, в местах этих переходов имеет ярко выраженные экстремумы.

Была исследована также зависимость E и θ от относительной влажности пленок ДНК селезенки крупного рогатого скота (рис. 2). Видно, что в этих образцах также наблюдается сильное увеличение жесткости с уменьшением гидратации. Несмотря на то, что при высокой влажно-

сти ($A \geq 90\%$) эти пленки несколько мягче предыдущих, при низких влажностях ($A \leq 30\%$) они становятся более жесткими. Характер не-монотонного поведения этих образцов несколько отличается от такового предыдущих. Это указывает на то, что механические свойства чувствительны не только к внутримолекулярным перестройкам в макрооб-разце, но и к различиям между разными ДНК.

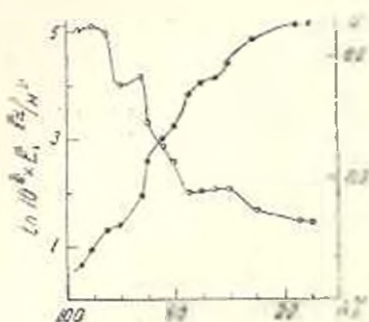


Рис. 2.

Рис. 2. Пленка ДНК селезенки крупного рогатого скота —●—●— модуль Юнга E . —○—○— логарифмический декремент затухания D .

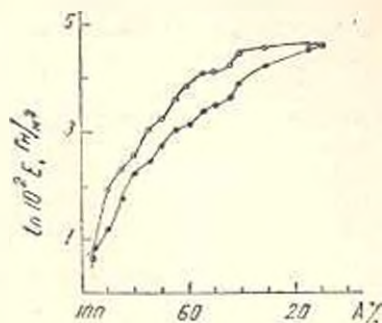


Рис. 3

Рис. 3. Пленка ДНК селезенки крупного рогатого скота: обратимость изменений модуля Юнга E . —●—●— дегидратация, —○—○— гидратация.

Была проверена обратимость процесса дегидратации (рис. 3). При обратном ходе эксперимента (гидратация) наблюдается гистерезис — E больше, чем при дегидратации. Однако все особенности прямого хода повторяются с большой точностью.

В литературе [4, 11] имеются данные о вязкоупругих свойствах пленок ДНК. Авторы работы [4] измеряли скорость распространения звука и модуль Юнга при $A=92; 75; 0\%$. Следует отметить, что пленки ДНК характеризуются большими значениями внутреннего трения, т. е. большой вязкостью. Механические свойства таких систем проявляют сильную зависимость от частоты внешних сил возмущения. Вероятно, по этой причине в работе [4] приводятся весьма большие значения модуля Юнга—19,4 и 4,6 Гн/м² при $A=92$ и 75% соответственно. Такими значениями E характеризуются оргстекла.

Таким образом, механические свойства пленок ДНК зависят от гидратации. Модуль Юнга пленок при $A=95\%$ имеет значение, равное $0,02 \div 0,025$, а при $A=75\%$ — $0,4 \div 0,5$ Гн/м². Механические свойства чувствительны к внутримолекулярным перестройкам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В. Н., Георгян С. Г. Биол. ж. Армения, 39, 3, 203—207, 1986.
2. Франк-Каменецкий М. Д. Мол. биология, 17, 3, 639—652, 1983.
3. Хуторский В. Е., Полтев В. И. Биофизика, 21, 201—207, 1976.
4. Hsklm M. B., Lindsay S. M., Powell J. Biopolymers, 23, 1185—1192, 1984.
5. Khutorsky V. E., Poltev V. J. Nature, 264, 483—484, 1976.
6. Levitt M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 640—644, 1978.
7. Millar D. P., Robbins R. J., Zewail A. H. J. Chem. Phys., 76, 2080—2094, 1982.
8. Miller K. Biopolymers, 18, 959—980, 1979.
9. Morozov V. N., Morozova T. Ya. Biopolymers, 20, 3, 451—467, 1981.
10. Pillet J. Biochemistry, 14, 1869—1876, 1975.

11. Putnam B. E., Prohofskey E. W., Van-Zandt L. L. Biopolymers, 21, 885—894, 1982.
12. Zhurkin V. B., Lysov Yu. P., Ivanov V. J. Biopolymers, 17, 377—412, 1978.
13. Zhurkin V. B., Lysov Yu. P., Ivanov V. J. Nucl. Acids. Res., 6, 1081—1096, 1979

Поступило 28.VIII 1986 г.

Биол. ж. Армении, т. 40, № 3, 187—193, 1987 УДК 541.183:541.132:547.953:537.383

АДСОРБЦИЯ ИОНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

С. А. ТАТУЛЯН

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Аннотация — Методом микроэлектрофореза исследована адсорбция катионов щелочноземельных металлов и некоторых анионов на поверхности мультисамеллярных липосом из яичного фосфатидилхолина и адсорбция ионов кальция на липосомах из димиристойл- и дипальмитойлфосфатидилхолина. Результаты описаны в рамках теории Гун-Штерна. Определены константы связывания ионов с поверхностью липосом и числа мест связывания на единицу площади.

Անոտացիա — Իրկրոէկէտրաֆորէզի մէթոդով ուսումնասիրված է ալկալիւտէղա-լիւն մէտաղների կատիոնների և որոշ ածրոնների ադսորբցիան միջ ֆոսֆատիդիլխոլին-իին մուլտիսամելլար լիպոսոմների մակերեսի վրա և կալցիումի իոնների ադսորբ-ցիան դիմիրիտոյիլ- և դիպալմիտոյիլֆոսֆատիդիլխոլինի լիպոսոմների վրա: Իրդյունքները նկարագրված են Գուի-Շտերնի տեսության շրջանակներում: Որոշ-ված են լիպոսոմների մակերեսի հետ իոնների միացման և միավոր մակերեսի վրա միացման տեղերի թվի հաստատունները:

Abstract — Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to egg phosphatidylcholine liposomes, as well as binding of calcium ions to dimyristoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes is studied by microelectrophoresis. Binding constants and surface densities of binding sites are determined for several cations and anions with the help of Gouy—Stern theory.

Ключевые слова: липосомы адсорбция ионов, поверхностный потенциал

В последнее время интенсивно исследуется адсорбция неорганических ионов на бислойных липидных мембранах, являющихся моделями клеточных мембран и представляющих в этом отношении значительный интерес. При этом имеет место существенное расхождение в параметрах адсорбции ионов, определенных разными авторами. Так, кажущаяся константа связывания (K_s) ионов Ca^{2+} с фосфатными группами фосфатидилхолина (ФХ), определенная с помощью монослойной техники, составила $6,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [18] и $3,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [12]. Величина K_s , характеризующая связывание Ca^{2+} с моно- и бислоями из яичного ФХ, составила $28,6 \text{ M}^{-1}$ [16] и $10\text{—}30 \text{ M}^{-1}$ [10]. В то же время имеются сообщения о том, что ионы Ca^{2+} не связываются с монослоями из ФХ [9].

Установленные разными методами величины $K_{\text{Ca}^{2+}}$ для мембран

из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) составляют от 19 до $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [4, 21].

Данных по адсорбции анионов на липидных мембранах в современной литературе крайне мало. Настоящая работа была предпринята с целью установления констант связывания и поверхностной плотности мест связывания ряда катионов и анионов с липосомами из разных ФХ.

Использовали яичный ФХ, выделенный хроматографически из яичного лецитина, выпускаемого Харьковским заводом по производству бактериальных препаратов. Димиристеилфосфатидилхолин (ДМФХ) и ДПФХ синтезированы А. Е. Соколовой (Институт цитологии АН СССР). Анализ использованных ФХ методом ТСХ показал, что содержание фосфатидилхолина в препаратах составляет больше 99%. Результаты ГЖХ показали, что ДМФХ содержит 99,3% остатков миристиновой кислоты и 0,7% остатков пальмитиновой кислоты, а ДПФХ—99,9% остатков пальмитиновой кислоты и 0,1% остатков неидентифицированных жирных кислот. Использовали NaCl и CaCl₂ марки о. ч., MgCl₂ и BaCl₂ марки х. ч., SrCl₂, BaBr₂ и Ba(ClO₄)₂ марки ч. д. а. (Реахим, СССР), Ba(NO₃)₂ марки ч. д. а. (Schering A. G., ФРГ), триэтоксиметил)аминометан марки ч. д. л. (Serva, ФРГ). Во всех экспериментах была использована деионизованная вода (Super Q). Способ приготовления мультислоидных липосом описан ранее [19]. Электрофоретическую подвижность липосом измеряли на приборе Parmoquant-2 (Carl Zeiss Jena, ГДР). В каждом опыте измеряли среднее значение подвижности не менее 100 липосом. Стандартное отклонение составляло 5–20% от средних значений. Величины ξ -потенциалов рассчитывали по уравнению Гельмгольца-Смолуховского:

$$\xi = \eta \epsilon_0 \epsilon,$$

где η —электрофоретическая подвижность, ϵ и η —соответственно диэлектрическая постоянная и вязкость водных растворов, ϵ_0 —диэлектрическая проницаемость вакуума.

Для описания связывания ионов с мембранами липосом использовали изотерму адсорбции Ленгмюра-Штерна [13]:

$$n = \frac{NK_1 C_0}{1 + K_1 C_0}, \quad (1)$$

где n —количество связанных ионов на единицу площади, N —число ионсвязывающих мест на единицу площади, K_1 —истинная константа связывания, C_0 —концентрация иона на границе раздела мембрана—водный раствор. Вклад в поверхностный заряд мембраны, обусловленный адсорбцией иона i , будет:

$$\sigma_{\text{адс},i} = \frac{NeziK_{i1}C_{0i}}{1 + K_{i1}C_{0i}}, \quad (2)$$

где e —элементарный заряд, z_i —валентность i -го иона с учетом знака. Ионы распределяются в электростатическом поле по закону Больцмана:

$$C_{0i} = C_i e^{-\frac{z_i \Psi_0}{kT}}, \quad (3)$$

где C_i —концентрация i -го иона в объеме раствора, $\chi = e\Psi_0/kT$, Ψ_0 —потенциал внешней плоскости Гельмгольца, k —константа Больцмана, T —абсолютная температура. Если учитывать одновременно адсорбцию катиона и аниона, то для плотности заряда, обусловленного адсорбцией ионов, можно написать:

$$\sigma_{\text{адс}} = \frac{N_k e z_k K_{k1} C_{k0} e^{-\frac{z_k \chi}{kT}}}{1 + K_{k1} C_{k0} e^{-\frac{z_k \chi}{kT}}} - \frac{N_a e z_a K_{a1} C_{a0} e^{\frac{z_a \chi}{kT}}}{1 + K_{a1} C_{a0} e^{\frac{z_a \chi}{kT}}}, \quad (4)$$

где индексы k и a относятся соответственно к катиону и аниону; валентности ионов берутся по абсолютной величине. Если мембрана заряжена независимо от адсорбции

попол и плотность собственного заряда составляет σ_0 , то суммарная плотность заряда, σ , будет составлять:

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_{\text{гс}}. \quad (5)$$

С другой стороны, согласно теории двойного электрического слоя [9, 17]

$$\sigma = \text{sign } x \cdot [2 \varepsilon_0 e N_A k T \sum C_i (e^{-x_i} - 1)]^{1/2}, \quad (6)$$

где N_A —число Авогадро; суммирование производится по всем присутствующим в среде ионам. Комбинация уравнений 4–6 дает:

$$\sigma_0 + \frac{N_k e z_k K_{lk} C_k e^{-x_k}}{1 + K_{lk} C_k e^{-x_k}} - \frac{N_a e z_a K_{la} C_a e^{x_a}}{1 + K_{la} C_a e^{x_a}} - \text{sign } x \cdot [2 \varepsilon_0 e N_A k T \sum C_i (e^{-x_i} - 1)]^{1/2} = 0. \quad (7)$$

Уравнение 7 было использовано для описания зависимости поверхностного потенциала липосом от концентрации электролита и определения параметров адсорбции ионов. При этом предполагалось, что $\zeta = \psi_0$.

На рис. 1 представлены кривые зависимости ζ -потенциала липосом из яичного ФХ от концентраций ряда электролитов. При построении теоретических кривых по уравнению 7 учитывали адсорбцию двухвалентного катиона на местах N_k и соответствующего аниона на местах N_a .

В случае с липосомами из «индивидуальных» липидов, ДМФХ и ДПФХ, наблюдается резкое смещение электрофоретической подвижно-

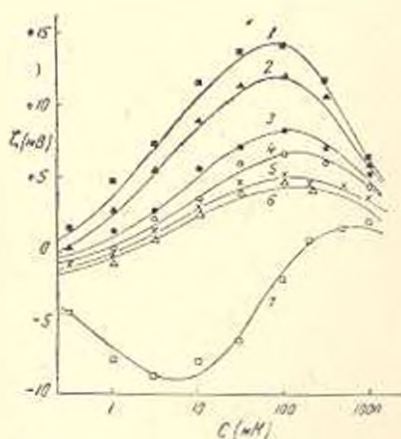


Рис. 1. Зависимость ζ -потенциала липосом из яичного ФХ от концентраций CaCl_2 , MgCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ (кривые соответственно 1—7) в присутствии 5 мМ трис-HCl (pH 7.4) при 25°. Кривые 1—4 построены с использованием $\sigma_0 = -0,2$ мКл/м², кривая 5 — $\sigma_0 = -28$ мКл/м² и кривые 6 и 7 — $\sigma_0 = -0,36$ мКл/м².

сти при температуре фазового перехода липида, что соответствует уменьшению положительного (или увеличению отрицательного) поверхностного потенциала липосом при переходе липида из состояния «гель» в состояние «жидкий кристалл» (эти данные не представлены). Рис. 2 и 3 демонстрируют зависимость ζ -потенциала липосом соответственно из ДМФХ и ДПФХ от концентрации ионов Ca^{2+} при температурах ниже (кр. 1) и выше (кр. 2) температур фазового перехода (T_c) этих ли-

пидов. Поскольку T_n смещается в зависимости от содержания Ca^{2+} в среде, при каждой концентрации Ca^{2+} выбраны температуры, наблюдаемые непосредственно «перед» фазовым переходом и «после» него. Кривые зависимости поверхностного потенциала от концентрации адсорбирующегося иона j , обнаруживающие экстремум(ы) в значениях поверхностного потенциала (рис. 1, 2, 3), позволяют определить нара-

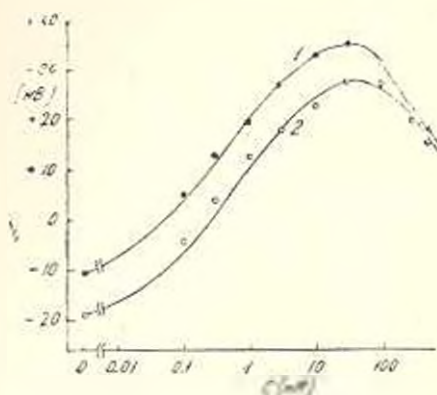


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость ϕ -потенциала липосом из ДМФХ от концентрации CaCl_2 при температурах ниже ($22-25^\circ$, кр. 1) и выше T_n ($25-28^\circ$, кр. 2). Растворы содержали 2 мМ трие- HCl , pH 7,2. При построении теоретических кривых использованы значения $\sigma_0 = -1,08$ (кр. 1) и $-1,5$ мКл/м² (кр. 2).

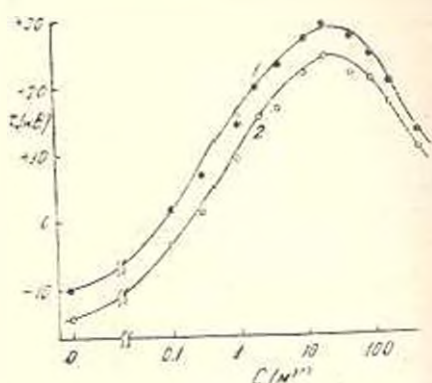


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость ζ -потенциала липосом из ДМФХ от концентрации CaCl_2 при температурах ниже ($10-43^\circ$, кр. 1) и выше T_n ($13-46,5^\circ$, кр. 2). Растворы содержали 2 мМ трие- HCl , pH 7,2. При построении теоретических кривых использованы значения $\sigma_0 = -1,05$ (кр. 1) и $-1,89$ мКл/м².

метры K_j и N_j на основании экспериментальных значений ζ_{max} и $C_{j, \text{max}}$ (ζ_{max} — максимальное по абсолютной величине значение ζ -потенциала, $C_{j, \text{max}}$ — концентрация потенциалопределяющего иона, соответствующая ζ_{max}):

$$K_j = \frac{e^{z_j \lambda}}{C_{j, \text{max}}} \quad (8)$$

$$N_j = \frac{2}{z_j e} \left\{ \text{sgn } X \left[2z_0 \varepsilon N_A kT (C_{j, \text{max}} (e^{-z_j X} - 1) + \sum_i C_{i, \text{max}} (e^{-z_i X} - 1)) \right]^{1/2} - z_0 \right\} \quad (9)$$

где $X = z_0 \varepsilon e / kT$. После определения значений K_j и N_j для соответствующих ионов по уравнениям 8 и 9 на основании экспериментальных значений $\zeta_{j, \text{max}}$, $C_{j, \text{max}}$ и ε_0 были построены теоретические кривые рис. 1, 2, 3 по уравнению 7. Найденные таким образом параметры адсорбции ионов представлены в табл. 1. Особенности кривой 7 на рис. 1 дают возможность строго определить параметры K_j и N_j одновременно для аниона (ClCl_4^-) и катиона (Ba^{2+}). При описании кривых 4, 5, 6 рис. 1 с использованием уже известных параметров K_j и N_j для Ba^{2+} найдены соответствующие параметры для ионов Cl^- , Br^- и NO_3^- на основании наилучшего совпадения расчетных кривых с эксперимен-

тальными. Адсорбция ионов Cl^- с теми же параметрами учитывается также при описании кривых 1–3, рис. 1. Теоретические кривые рис. 2, 3 построены по уравнению 7 без учета адсорбции анионов Cl^- ($K_{\text{ад}} = 0$), хотя это не исключает возможности слабой адсорбции Cl^- на мембранах из ДМФХ и ДПФХ.

Селективное связывание неорганических анионов с мембранами из разных ФХ было продемонстрировано ранее некоторыми авторами. Грасдален и соавт. [10] определяли константу связывания ионов Cl^- с везикулами из яичного ФХ: $K_1 = 0,065 \text{ M}^{-1}$. Позже были получены следующие константы, характеризующие взаимодействие анионов с мембранами из яичного ФХ: $K_1 = 0,9; 2,0$ и $8,0 \text{ M}^{-1}$ соответственно для Cl^- , Br^- и NO_3^- [22]. $K_1, \text{Cl}^- = 0,15 \text{ M}^{-1}$ [6], $K_{\text{ад}} = 1,67; 4,03$ и $23,65 \text{ M}^{-1}$ соответственно для Cl^- , NO_3^- и SCN^- [1]. В случае с мембранами из ДМФХ величины K_1 для анионов NO_3^- , Br^- , SCN^- , I^- , ClO_4^- и тринитрофенола составили соответственно 2, 3, 6, 10, 40, 222 и 5000 M^{-1} [19].

Величины констант связывания анионов Cl^- и Br^- с мембранами из яичного ФХ, определенные нами, хорошо согласуются с данными Эрикссона и соавт. [6, 22], однако константа связывания NO_3^- , установленная нами ($2,8 \text{ M}^{-1}$), ниже найденной этими авторами (8 M^{-1}) [22]. Кажущиеся константы связывания ионов Cl^- и NO_3^- с везикулами из яичного ФХ, представленные в работе Барсукова и соавт. [1], превышают истинные константы связывания этих ионов, определенные в настоящей работе. Эти различия по-видимому, связаны с тем, что авторы упомянутых работ [1, 22] использовали «озвученные» везикулы, в то время как мы работали с мультиламеллярными липосомами.

Значения констант связывания, $K_1 (\text{M}^{-1})$, и площади на поглотивающее место, $N^{-1} (\text{нм}^2)$, характеризующие связывание ионов с липосомами из яичного ФХ, ДМФХ и ДПФХ

Липид	Ион	$K_1 (\text{M}^{-1})$	$N^{-1} (\text{нм}^2)$	$t (^\circ\text{C})$
Яичный ФХ	Ca^{2+}	42 ± 5	$10,7 \pm 1,1$	25
	Mg^{2+}	30 ± 4	$10,7 \pm 1,2$	25
	Sr^{2+}	16 ± 2	$12,5 \pm 1,2$	25
	Ba^{2+}	10 ± 1	$12,8 \pm 1,5$	25
	Cl^-	$0,20 \pm 0,1$	$13,3 \pm 1,5$	25
	Br^-	$2,0 \pm 1$	$13,3 \pm 1,3$	25
	NO_3^-	$2,8 \pm 1$	$13,3 \pm 1,3$	25
ДМФХ	Ca^{2+}	70 ± 10	$16,2 \pm 1,2$	25
	Ca^{2+}	392 ± 30	$8,7 \pm 1$	22
ДПФХ	Ca^{2+}	256 ± 25	$10,3 \pm 1$	27
	Ca^{2+}	441 ± 42	$7,2 \pm 1$	41
	Ca^{2+}	190 ± 15	$7,6 \pm 1$	45

Истинные константы связывания Ca^{2+} с мембранами из ДМФХ и ДПФХ в состоянии «гель» составили соответственно 46 и 120 M^{-1} . Со-



ответствующие значения, установленные в настоящей работе, составляют 392 и 441 М⁻¹. Величины K_1 , описывающие связывание щелочноземельных катионов с мембранами из яичного ФХ, равны 0,3—5,0 М⁻¹ [8, 25]. По данным настоящей работы, соответствующие значения K_1 составляют 10—40 М⁻¹. Таким образом, найденные нами величины истинных констант связывания двухвалентных катионов с мембранами из ФХ примерно на порядок выше значений, установленных другими авторами. Для объяснения этого расхождения заметим, что авторы работ [9] определяли константы связывания по уравнению:

$$K_1 = \frac{f}{C_0(1 - mf)^m},$$

где f — часть молекул липида, участвующих в образовании комплексов с ионом, m — число молекул липида, связывающих один ион. Низкие значения констант связывания катионов с мембранами из яичного ФХ ($K_1, Ca^{2+} = 1 \text{ М}^{-1}$ [15] и $2,2 \text{ М}^{-1}$ [8]) были получены исходя из предположения, что комплексообразование происходит по стехиометрии липид:ион = 1:1, т. е. $m = 1$. Между тем для строгого определения K_1 необходимо иметь экспериментальное значение m . Как свидетельствуют наши данные (рис. 1, табл.), максимальное число ионсвязывающих мест на мембранах из яичного ФХ в среднем составляет 0,0828 нм⁻². Если учитывать, что площадь на молекулу яичного ФХ в бислойных мембранах составляет примерно 0,7 нм² [8, 22], то получим, что при насыщении адсорбции на один связанный ион приходится $m \approx 17$ молекул липида. Подставляя экспериментально найденное значение $m = 17$ в уравнение 10, получим существенно большие величины K_1 по сравнению с полученными авторами работ [8, 15] исходя из априорного значения $m = 1$. Аналогичным образом можно интерпретировать «высокие» значения констант связывания Ca^{2+} с мембранами из ДМФХ и ДПФХ, поскольку в случае с этими липидами при насыщении адсорбции на один связанный ион Ca^{2+} приходится 13—15 молекул липида.

Каким же образом можно объяснить этот нетривиальный результат?

Некоторыми авторами продемонстрировано наличие доменов плотной упаковки в бислойных мембранах из фосфолипидов и, соответственно, участков неупорядоченной организации молекул липида или структурных дефектов на границах между доменами [2, 14]. Заметим также, что как длинные оси углеводородных цепочек, так и ориентированные параллельно ламеллярной плоскости полярные группы молекул ФХ, расположены по двумерной гексагональной решетке [5, 20]. Структурные дефекты в бислоях из ФХ можно рассматривать как вакантные узлы решетки. Ясно, что каждый вакантный узел будет окружен шестью полярными группами окружающих молекул ФХ. В зависимости от соотношения полярных групп, обращенных к вакантному узлу положительным или отрицательным полюсом, в точке вакансии будет создан положительный, нулевой или отрицательный локальный электростатический потенциал, и вакантный узел может обладать сродством к аниону или катиону (см. [4]). Именно такие «вакансии» рассматриваются нами в качестве ионсвязывающих мест на мембранах из ФХ.

Согласно этой модели, количество катионсвязывающих и анионсвязывающих мест должно быть одинаковым. Данные таблицы свидетельствуют, что в случае с липосомами из яичного ФХ величина N^{-1} для четырех исследованных катионов составляет $11,5 \pm 0,8 \text{ нм}^2$, для четырех анионов $12 \pm 1,3 \text{ нм}^2$. Этот результат может служить подтверждением предлагаемой модели адсорбции ионов на поверхности мембран из цинт-терийного липида.

Считаю своим приятным долгом поблагодарить А. Е. Соколову за синтез и любезное предоставление ДМФХ и ДПФХ, а также В. Б. Аракеяна, Н. С. Матинян и Г. Б. Меликяна за обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л. И., Волкова В. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Быстров В. Ф., Бресельсон Л. Д. Биорг. химия, 3, 1355—1361, 1977.
2. Некоп В. Г., Казаков В. А., Корнев А. И. Биофизика, 29, 410—411, 1981.
3. Татулин С. А. Бюл. мембраны, 2, 383—394, 1985.
4. Akutsu H., Seelig J. Biochemistry, 20, 7366—7373, 1981.
5. Durrant D. L., Hui S. W., Strozewski C. M. J. Supramol. Str., 5, 1—14, 1976.
6. Eriksson L. E. G., Westman J. Biophys. Chem., 23, 253—264, 1981.
7. Grahame D. C. J. Chem. Phys., 21, 1051—1060, 1953.
8. Grasdalen H., Eriksson L. E. G., Westman J., Ehrenberg A. Biochim. Biophys. Acta, 469, 151—162, 1977.
9. Hauser H., Dawson R. M. C. Eur. J. Biochem., 1, 61—69, 1967.
10. Hauser H., Hinckley C. C., Krebs J., Levine B. A., Phillips M. C., Williams R. J. P. Biochim. Biophys. Acta, 468, 361—377, 1977.
11. Hauser H., Phillips M. C., Levine B. A., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 58, 133—144, 1975.
12. Kimizuka H., Kohetsu K. Nature, 196, 995—996, 1962.
13. Langmuir I. J. Amer. Chem. Soc., 40, 1351—1403, 1918.
14. Lee G. A., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C., Tran P. A., Warren G. B. Biochemistry, 13, 3699—3705, 1974.
15. McLaughlin A., Grathwohl C., McLarghlin S. Biochim. Biophys. Acta, 513, 338—357, 1978.
16. Mislowski R. L., Wells M. A. Biochemistry, 12, 967—975, 1973.
17. Müller H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1, 1—8, 1933.
18. Selmiya T., Ohki S. Biochem. Biophys. Acta, 298, 546—561, 1973.
19. Tatullian S. A. Biochim. Biophys. Acta, 732, 189—195, 1983.
20. Trauble H. Naturwissenschaften, 58, 277—284, 1971.
21. Trauble H., Sackmann E. J. Amer. Chem. Soc., 94, 4499—4510, 1972.
22. Vanderkool J., Martonosi A. Arch. Biochem. Biophys., 133, 153—163, 1969.
23. Westman J., Eriksson L. E. G. Biochim. Biophys. Acta, 557, 62—78, 1979.

Получено 3.1 1987 г.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕПАРИНА С НЕКОТОРЫМИ АНТИГИСТАМИННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

К. Г. АЛАВЕРДЯН

НИИ медицинской радиологии МЗ Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Показано образование комплексов гепарина с антигистаминными препаратами (дипразин, аминазин, супрастин и димедролом) при физиологических значениях pH (7,3) и полной силе среды, равной 0,01—0,15. Выявлено одновременное участие электростатических сил и гидрофобных взаимодействий в стабилизации устойчивой формы комплексов. Установлен экспоненциальный характер зависимости тепловых эффектов исследуемых реакций от ионной силы среды.

Անոտացիա — Տրված է տրված հեպարինի և հակահիստամինային պրեպարատների (դիպրազինի, ամինազինի, սուպրաստինի և դիմեդրոլի) միջև կոմպլեքսի առաջացումը pH (7,3) ֆիզիոլոգիական արժեքի և իոնական ուժի 0,01—0,15 տիրույթի դեպքում: Հաշտեարեմիված է էլեկտրաստատիկ ուժերի և հիդրոֆոբ ֆորսազղեցում: Բյուլների միաժամանակյա մասնակցությունը կոմպլեքսների կայուն ձևի ստարիդիզացման մեջ: Ցույց է տրված հետազոտվող ունակցիաների ջերմային էֆեկտների էքսպոնենցիալ բնույթը: կախումը միջավայրի իոնական ուժից:

Abstract — Complexes of heparin with antihistamine agents (diprasin, aminaslin, suprastin and dimedrol) were shown to be formed and survived in case of physiological values of pH (7.3) and medium ionic strength 0.01—0.15. The simultaneous participation of electrostatic strengths and hydrophobe interactions in the stabilization of constant form of complexes was revealed. The exponential character of dependence of temperature effects of the studied reactions on the medium ionic strength was established.

Ключевые слова: гепарин, антигистаминные препараты, комплексобразование

Молекула гепарина выделяется среди мукополисахаридов организма выраженной способностью образовывать комплексные соединения с различными низко- и высокомолекулярными соединениями, содержащими основные группы. Этому способствует высокая плотность отрицательного электростатического заряда и малая разветвленность его полимерной структуры. По данным ряда авторов [1, 8, 10, 11], реакционными центрами в молекуле гепарина являются отрицательно заряженные сульфо- и карбоксильные группы, взаимодействующие с положительно заряженными группами связываемого вещества. Кроме того, в ряде случаев было установлено участие в комплексообразовании, наряду с электростатическими силами, водородных связей и гидрофобных взаимодействий [2, 3, 7]. Участие слабых молекулярных сил обуславливает также комплексобразование гепарина с гистамином, его высокую лабильность ко всякого рода воздействиям и способность организма осуществлять регуляцию его распада на физиологически активные компоненты [5]. Переход гистамина из связанного состояния в свободное и повышение его содержания в организме приводит к резкому нарушению

процессов жизнедеятельности. Для предотвращения этих нарушений или их ослабления применяют антигистаминные препараты. Есть основания полагать, что наряду с их основным назначением, инактивацией свободного гистамина в организме, некоторые антигистаминные препараты обладают способностью высвобождать гистамин [4, 9]. В связи с этим представляет интерес изучение взаимодействия гепарина с некоторыми антигистаминными препаратами с целью выявления их способности конкурентно вытеснять гистамин из его комплекса с гепарином.

Материал и методика. Микрокалориметрические исследования взаимодействия гепарина с антигистаминными препаратами были проведены на проточном микрокалориметре 10700-1 FLAU фирмы LKB (Швеция). В процессе калориметрического титрования гепарина антигистаминными препаратами скорость прокачки реагентов выбиралась одинаковой и составляла 40 мл/час. Рабочая температура составляла 25°.

Использовались препараты гепарина фирмы «SPOFA» (ЧССР) и антигистаминные препараты для инъекций.

Растворы гепарина и антигистаминных препаратов готовили на фосфатном буфере с pH 7,3. Калориметрическое титрование реагентов проводили при ионной силе среды, равной 0,01. При изучении зависимости теплового эффекта реакции комплексообразования гепарина с антигистаминными препаратами от ионной силы среды последнюю варьировали в пределах 0,01—0,15.

В процессе калориметрического титрования концентрация гепарина в растворе фиксировалась и составляла $6,5 \cdot 10^{-6}$ М. Перечень исследованных антигистаминных препаратов и их концентрации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Антигистаминные препараты и их концентрации в процессе калориметрического титрования

Антигистаминные препараты	Концентрация L_0 , (моль л) $\cdot 10^4$
Дипразин	0,78; 1,56; 3,12; 6,24; 7,79; 9,35; 10,91; 12,45; 15,58; 24,93; 31,16
Аминазин	0,7; 1,41; 2,81; 5,63; 7,04; 8,4 11,26; 14,1; 16,9; 11,51; 23,14
Димедрол	3,43; 6,85; 8,57; 13,71; 17,13 21,42; 27,41; 34,27; 42,83; 55,67
Супрастин	1,5; 3,0; 6,0; 7,7; 12,3; 15,4 24,6; 30,0; 40,2

Спектральные исследования выполнены на регистрирующем спектрофотометре «SPEKORD» (ГДР) в термостатированных при 25° сантиметровых кюветках.

При изучении образования комплекса гепарин—антигистамин по исчезновению метакромазина толундинового синего (ТС) использовались растворы ТС ($1,81 \cdot 10^{-5}$ М), гепарина ($6,5 \cdot 10^{-6}$ М), аминазина ($2,8 \cdot 10^{-4}$ М), дипразина ($3,1 \cdot 10^{-4}$ М), супрастина ($1,6 \cdot 10^{-3}$ М) и димедрола ($6,9 \cdot 10^{-3}$ М).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые калориметрического титрования, полученные путем последовательного добавления растворов антигистаминов, в порядке возрастания концентраций, к раствору гепарина фиксированной концентрации и соответствующей регистрацией теплового эффекта. При этом учитывались тепловые эффекты разбавления реагентов. На основании того, что кривые титрования имеют вид, подобный изотерме Ленгмюра, было сделано предположение о независимости и однородности активных центров гепарина.

Обсчет кривых титрования по способу, предположенному Марковичем с соавт. [6], позволил определить число активных центров (n) гепарина для каждого случая взаимодействия с антигистаминами, их энтальпию

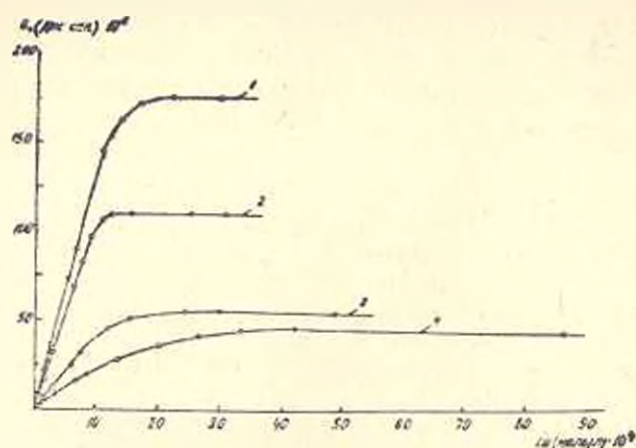


Рис. 1. Кривые калориметрического титрования гепарина аминазином (1) дипразином (2), супрастином (3) и димедролом (4), полученные при ионной силе среды 0,01 и значении рН 7,3.

взаимодействия (ΔH°) и константу связывания (K) дипразина, аминазина, супрастина и димедрола с активным центром молекулы гепарина. Исходя из полученных значений величин энтальпии взаимодействия и константы связывания, были вычислены изменения свободной энергии (ΔG°) и энтропии комплексообразования (ΔS°) для каждого из случаев взаимодействия гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Термодинамические константы реакции комплексообразования гепарина с антигистаминными препаратами

Вещество	n	$K \cdot 10^{-4} \text{ М, л/моль}$	$-\Delta H^\circ$, кДж/моль	$-\Delta G^\circ$, кДж/моль	ΔS° , Дж/(К·моль)
Дипразин	165	67.0 ± 3.5	33.4 ± 0.13	9.24 ± 0.21	80.7 ± 0.4
Аминазин	218	15.5 ± 2.3	22.9 ± 0.38	11.2 ± 0.21	62.3 ± 0.5
Супрастин	191	3.18 ± 1.0	25.9 ± 0.63	3.97 ± 0.12	73.2 ± 1.7
Димедрол	267	0.76 ± 0.5	22.3 ± 0.17	2.42 ± 0.12	66.0 ± 0.8

Зависимость тепловых эффектов реакций комплексообразования от ионной силы среды при рН (7,3) и фиксированной концентрации реагентов носит в разной степени выраженный экспоненциальный характер (рис. 2).

Взаимодействие гепарина с антигистаминными препаратами исследовалось также методом спектрофотометрии в видимой области (рис. 3) Максимум спектра поглощения ТС находится в области 650 нм, а смеси ТС-гепарин смещен в коротковолновую область. При введении в систему ТС—гепарин антигистаминных препаратов происходит восстановление максимума поглощения красителя как по длине волны, так и по интенсивности. По этому показателю дипразин, аминазин и супрастин на-

много превосходят димедрол. При ионной силе среды, равной 0,15, димедрол практически не восстанавливает спектр поглощения ТС.

В качестве контроля изучали взаимодействие всех антигистаминных препаратов и ТС. В этом случае не обнаружено изменений в спектре поглощения ТС, что вместе с полученными выше результатами свидетельствует об образовании комплексов гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами.

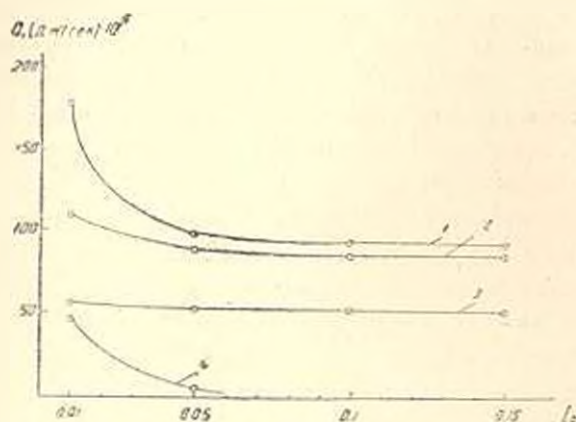


Рис. 2. Кривые зависимости теплового эффекта образования комплексов гепарина с аминазином (1), дипразином (2), супрастином (3) и димедролом (4) от ионной силы, полученные при значении pH 7,3 растворов.

Результаты проведенных исследований показали, что все изучаемые антигистаминные препараты при физиологических значениях pH (7,3) и ионной силе среды 0,04—0,15 способны вступать во взаимодействие с гепарином и образовывать с ним комплексы.

Анализ термодинамических параметров, для равновесного состояния реакций, показывает наличие нековалентных слабых связей между молекулами гепарина и антигистаминнов. Отрицательная величина свободной энергии показывает, что процесс комплексообразования гепарина с дипразином, аминазином, супрастином и димедролом является самопроизвольным.

Экзотермический эффект реакций обусловлен сближением противоположно заряженных групп гепарина и антигистаминнов с образованием связей между ними. Как известно, последнее должно приводить к некоторому уменьшению энтропии, из-за понижения числа степеней свободы взаимодействующих групп. Однако положительная величина энтропии (66,0 Дж/(К·моль)) свидетельствует о том, что преимущественный вклад в этот показатель вносят факторы, вызывающие рост энтропии. К ним можно отнести эффект высвобождения молекул воды из областей связывания, вследствие взаимной нейтрализации положительных зарядов антигистаминнов и отрицательных—гепарина. Кроме того, возрастание энтропии в ходе реакции может быть обусловлено и гидрофобными взаимодействиями между хромофорными группами исследуемых соединений.

Сопоставляя результаты микрокалориметрических и спектральных исследований, можно заключить, что реакция взаимодействия димедро-

ла с гепарином носит экзотермический характер; повышение ионной силы среды резко сказывается на их комплексообразующей способности. По всей видимости, комплексообразование гепарина с димедролом обуславливается в основном электростатическими взаимодействиями между положительно и отрицательно заряженными группами исследуемых соединений.

Взаимодействие дипразина и аминазина с гепарином, как и в предыдущем случае, также сопровождается выделением тепла. Однако повышение ионной силы среды мало влияет на их способность образовывать комплексы с гепарином. Наблюдаемое уменьшение теплового эффекта реакции взаимодействия при повышении ионной силы среды можно объяснить некоторым уменьшением вклада электростатических сил в комплексообразование.

Термодинамические параметры и результаты спектральных измерений указывают на то, что комплексообразование гепарина с дипразином и аминазином обуславливается не только электростатическими взаимодействиями, но и другими, обеспечивающими стабильность комплексов при варьировании ионной силы среды. К ним можно отнести гидрофобные взаимодействия между хромоформными группами исследуемых соединений. Положительная величина энтропии в случае взаимодействия гепарина с дипразином и аминазином (80,7 и 62,3 Дж/(К·моль) соответственно) и восстановление максимума поглощения ТС, вызванного этими соединениями при pH (7,3) и ионной силе среды 0,15, подтверждают данные суждения.

Взаимодействие супрастина с гепарином осуществляется несколько иначе. Экзотермический эффект реакции можно объяснить электростатическими взаимодействиями между положительно и отрицательно заряженными группами этих соединений. Однако зависимость его от ионной силы растворов выражена очень слабо. Можно предположить, что немалый вклад в комплексообразование гепарина с супрастином вносят гидрофобные взаимодействия между хромоформными группами этих соединений. Согласно теории гидрофобных взаимодействий, движущей силой связывания является положительное изменение величины энтропии в этом процессе (в данном случае 73,2 Дж/(К·моль). Но гидрофобные взаимодействия всегда эндотермичны. Экзотермичность теплового эффекта реакции в данном случае можно объяснить превалированием изменения энтальпии ионного связывания над эндотермичностью гидрофобного взаимодействия. Однако величина (ΔH°) вносит незначительный вклад (порядка 15%) в изменение свободной энергии комплексообразования (ΔG°).

В качестве подтверждения результатов микрокалориметрических исследований служат спектральные данные о комплексообразовании гепарина с супрастином. Супрастин одинаково хорошо восстанавливает спектр поглощения красителя при обеих величинах ионной силы раствора (0,01 и 0,15).

Полученные большие значения числа активных центров (n) при взаимодействии гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами можно объяснить следующим образом. Поскольку все исследо-

важные антигистаминные препараты являются поверхностно активными веществами, можно предположить, что они взаимодействуют с молекулой гепарина в мицеллярной форме. Вследствие этого рассчитанные значения величин (n) показывают не число активных центров на молекуле гепарина, а число молекул антигистамина, принимающих участие во взаимодействии.

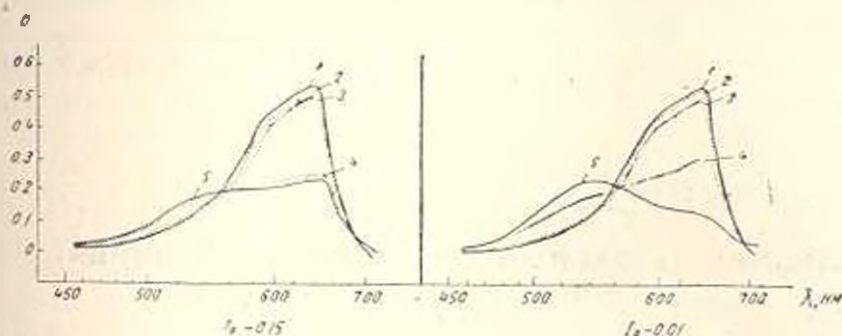


Рис. 3. Спектры поглощения ТС—кривая 1; ТС-гепарин—кривая 5; ТС-гепарин-аминазин и ТС-гепарин-дипразин—кривая 2; ТС-супрастин—кривая 3; ТС-димедрол—кривая 4; pH 7,3; ионная сила (I_0) растворов 0,01 и 0,15.

На основании проведенных исследований и аналогичных данных проведенных ранее работ [5] по изучению комплексообразования гепарина с гистамином можно сделать следующий вывод. Гепарин способен вступать во взаимодействие как с гистамином, так и с антигистаминными препаратами дипразином, аминазином, супрастином и димедролом и образовывать с ними комплексные соединения. Сравнение термодинамических параметров реакций, в частности, констант связывания ($0,7 \cdot 10^{-4}$ л/моль в случае комплексообразования гепарина с гистамином при pH 7,3 и ионной силе среды 0,01), а также результатов спектральных измерений указывает на то, что антигистаминные препараты дипразин, аминазин и супрастин лучше связываются с гепарином, чем гистамин.

В заключение следует отметить, что антигистаминные препараты дипразин, аминазин и супрастин, за счет лучшего, чем гистамин, связывания с гепарином, способны конкурентно вытеснять его из комплекса с гепарином. Не исключается, что именно в этом и заключается молекулярный механизм гистаминвысвобождающего действия антигистаминных препаратов, относящихся к неизбирательным либераторам гистамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М. Успехи совр. биол., 56, 3, 105, 1963.
2. Бычков С. М., Харламова В. И. В кн.: Биоконплексы и их значение в обмене веществ. М., 1966.
3. Губерничева Л. М., Силаев А. В. Биохимия, 29, 5, 1964.
4. Гушин И. С., Дерюгин И. Л., Каминка М. Э. Бюлл. exper. биол., 3, 329, 1978.
5. Ермаков К. Л., Алавердян К. Г., Нишин С. В., Пирозян Л. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 813, 1977.

6. Маркович М. И., Ландау М. А., Рудзит Э. А. Хим. фарм. ж., 8, 16, 1976.
7. Розенфельд М. А., Ерзичьян К. Л., Пирюзян Л. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 419, 1975.
8. Розенфельд М. А., Петросян М. Т., Пирюзян Л. А. Тез. докл. II Всесоюзн. конф. по спектроскопии биополимеров 85, Харьков, 1974.
9. Friisk-Holmberg M. Acta physiol. scand., 84, 376, 36, 1972.
10. Gorter E., Vanninga L. Disc. Farad. Soc., 13, 205, 1953.
11. Lindahl U., Roden L. J. Biol. Chem., 240, 2821, 1965.

Поступило 28 VII 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 200—204, 1987

УДК 577.352.2

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Т. Г. АМБАРУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ

Аннотация — Показано, что смешанные липосомы, образованные молекулами яичного лецитина и дезоксихолата натрия, имеют более высокую ионную проницаемость по сравнению с бездетергентными липосомами, в то же время проницаемость для глюкозы у них практически не зависит от концентрации детергента. Дезоксихолат натрия оказывает влияние на проницаемость липосомальной мембраны при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования.

Անոտացիա — Ծույց է տրված, որ ձվի լեցիտինի և նատրիումի զեգոսիխոլատի ձուլեկույներից կազմավորված խառը լիպոսոմների թափանցելիությունը իոնների համար ավելի բարձր է՝ համեմատած առանց զետերգենտի կազմավորված լիպոսոմների հետ: Միևնույն ժամանակ գլյուկոզայի համար թափանցելիությունը կախված չէ զետերգենտի կոնցենտրացիայից: Նատրիումի զեգոսիխոլատը ազդեցություն է գործում լիպոսոմային թաղանթների թափանցելիության վրա միջեկակազմավորման կոնցենտրացիայից բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում:

Abstract — It is shown that mixed liposomes egg lecithin and sodium deoxycholate are more permeable to ions than those without detergents, whereas the liposome permeability to glucose practically does not depend on detergent concentration. The sodium deoxycholate influences on the liposome membrane permeability above the critical micellization concentration.

Ключевые слова: липосомальная мембрана, ионная проницаемость, детергент.

Известно, что детергенты в высоких концентрациях используются для сольubilизации биологических мембран. При более низких концентрациях они включаются в бислой с образованием смешанных бислоев [14]. Соотношение детергент:липид, при котором происходит включение детергента в бислой с сохранением липидной бислойной структуры, зависит как от природы детергента и липида, так и от ионной силы и температуры раствора, причем в большинстве случаев это соотношение не

превышает 0,5. При более высоком соотношении (от 0,8 до 3,0) бислон переходит в смешанные мицеллы [6].

Хотя включение детергента в липид не приводит к разрушению структуры [15], однако происходящие в ней нарушения приводят к изменению проницаемости мембран [3, 7].

Ранее нами было показано, что липосомы, образованные с 10 мМ дезоксихолата натрия (ДХНа) при соотношении детергент:липид=0,2, не обнаруживают изменения проницаемости для глюкозы по сравнению с бездетергентными липосомами [1, 13]. В данной работе приводятся результаты исследования ионной проницаемости липосом, образованных с различными количествами детергента.

Материал и методика. Опыты проводили на яичном лецитине Харьковского завода гидролизатов. Очистку лецитина от лизолецитина осуществляли с помощью окиси алюминия. Сухую липидную пленку, полученную на роторном испарителе и очищенную от паров хлороформа, эмульгировали вручную в течение 15 мин в 20 мМ трис-ацетатном буфере с 130 мМ KCl и различными концентрациями детергента (от 0,6 до 20 мМ). pH раствора равен 8,2. Соотношение липид:буфер равнялось 50 мг/мл. Полученную суспензию отстаивали в течение часа для образования мультимембранных липосом. Для получения униламеллярных липосом отстоянную эмульсию озвучивали в трубчатом озвучивателе с частотой 22 Гц в течение 1,5 мин на УЗДН-2. Препарат просветлялся и хорошо опалесцировал. Если опалесценция была слабой, что бывало при низких концентрациях детергента, то препарат озвучивали несколько раз по 1,5 мин. Затем суспензия отстаивалась в течение часа для получения крупных униламеллярных липосом.

Размер липосом определяли методом светорассеяния [2] на спектрофотометри «Specord M40», (ГДР).

Для определения суммарного объема липосом при их образовании в раствор добавляли глюкозу, концентрация которой равнялась 20 мг%. Глюкозу определяли энзиматическим методом [9] на спектрофотометри «Specord M40». Суммарный объем липосом определяли по выходу глюкозы из липосом, лизированных Тритоном X-100 в концентрации 5 мМ, что заведомо превышало концентрацию этого детергента, используемого с той же целью в работе [8].

Потоки ионов из липосом определяли методом диализа. Использование диализных мешков было неудобно из-за большого количества складок целлофановой мембраны. Поэтому опыты проводили в цилиндрической камере с натянутой целлофановой мембраной с диаметром 11 мм. Количество суспензии в камере равнялось 0,1 мл. В качестве отмывающего раствора использовали трис-ацетатный буфер с эквивалентным количеством NH_4Cl . Концентрации ионов калия в отмывающем растворе определяли на плазменном фотометре ПФМ-У 4. В конце отмывки определяли концентрацию ионов в камере. Соотношение объемов суспензии и отмывающего раствора варьировало от 80 до 5000. Перемешивание раствора проводили на магнитной мешалке.

Результаты и обсуждение. При работе со смешанными липосомами, имеющими высокую мембранную проницаемость, использование диализного метода встречает определенные трудности, связанные с тем, что константа скорости выхода ионов из диализного мешка становится сравнимой с константой скорости выхода через липосомальную мембрану. В системе типа ячейка—целлофановая мембрана—наружный раствор изменение количества ионов в ячейке происходит согласно уравнению:

$$M_t = M_0 \exp(-kt).$$

где M_t —количество ионов в момент времени t , M_0 —количество ионов в

нулевой момент времени, t —время отмывки ионов из ячейки, k —наклон зависимости $\ln M_0/M$, называемый константой скорости. Даже если объем наружного раствора достаточно велик, обязательно возникает встречный поток в ячейку, который со временем уравнивает выходящий поток, т. е. измеренный поток ионов является разностным. Так как даже в условиях перемешивания у границы мембраны образуется перемешиваемый слой, то встречный поток будет пропорционален концентрации ионов в этом слое. Это означает, что определяемая константа скорости входа ионов из наружного раствора в ячейку—это эффективная, а не реальная константа. Константа выхода ионов из ячейки в наружный раствор k_{22} определялась из тех соображений, что для формирования перемешиваемого слоя нужно определенное время. При отмывке ячейки в большом объеме раствора в течение короткого времени (~ 10 с) встречный поток ничтожно мал, поэтому найденное отсюда значение k_{21} близко к истинному.

Из системы кинетических уравнений, описывающих скорость изменения количества ионов в ячейке и среде, было найдено уравнение, которое можно решить графически:

$$k_{22} + k_{32} = \frac{\ln \frac{M_0 \left(1 - \frac{k_{32}}{k_{22} + k_{32}}\right)}{M_2 \left(1 - \frac{k_{32}}{k_{22} + k_{32}} \cdot \frac{M_0}{M_2}\right)}}{t},$$

где M_2 —количество ионов в ячейке, k_{22} —константа скорости выхода ионов, M_0 —исходное количество ионов в ячейке.

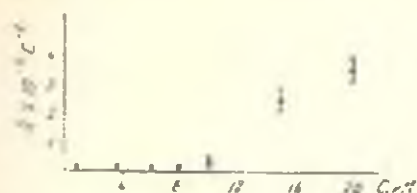
Рассматривая его относительно k_{22} , по графику пересечения левой и правой частей уравнения, можно найти искомое значение k_{32} , равное $(1,2 \pm 0,15) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Если же внутри целлофанового мешка содержится суспензия с липосомами, содержащими те же ионы, что и в омывающем их растворе, то решение системы кинетических уравнений будет следующим:

$$k_{12} = \frac{\ln \frac{M_1^0 \cdot \left(1 + \frac{k_{12} - k_{22}}{k_{22} - k_{21} - k_{12}}\right)}{M_1 + M_2 - \frac{k_{12}}{k_{22} + k_{21}} \cdot M_0}}{t},$$

где M_1^0 —количество ионов в липосомах в момент времени $t=0$, k_{12} —константа скорости выхода ионов из липосом в окружающий раствор. Полученное трансцендентное уравнение решается методом последовательных приближений. Вычисленные таким способом константы скорости выхода ионов k_{12} через липосомальную мембрану при различных концентрациях детергента представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, увеличение концентрации детергента от 0,8 до 10 мМ не вызывает изменения константы скорости выхода ионов калия, и только начиная с 15 мМ значение константы существенно увеличива-

ется. Возможно, это связано с тем, что ДХНа оказывает действие при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования [11]. Аналогичная картина наблюдалась и для лизолецитина, в то время как Тритон X-100 оказывает влияние в мономерной форме [8].



Зависимость константы скорости выхода ионов калия из липосом от концентрации дезоксихолата натрия в суспензии липосом.

Поскольку истинной характеристикой барьерной функции мембраны липосом при изменении ряда параметров является не константа скорости, а коэффициент проницаемости, то для его вычисления необходимо было определить размер липосом и количество вещества, заключенное в них, которое вычислялось по внутреннему объему липосом.

Измерение размеров липосом проводили методом светорассеяния. Экспериментально определяли оптическую плотность $D = \tau/2,3$ в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм и по тангенсу угла наклона прямолинейной зависимости $\lg \tau$ от $\lg L$ определяли n -функцию относительного размера липосом L . В работе Клемина [2] n калибровано по L и m (относительный показатель преломления) в диапазоне $1 < 25$, $1,05 < m < 1,30$, откуда берется соответствующее значение n при $m = 1,10$.

Суммарный внутренний объем липосом, определяемый по количеству глюкозы, выходящей из липосом при лизисе Тритоном X-100, лежит в пределах 9–13%. Это совпадает с величиной, полученной нами при использовании осмотического шока. Количество глюкозы определяли методом ферментного электрода [1].

Лизис липосом, вызываемый добавлением Тритона X-100, можно считать полным, так как количество глюкозы, определяемое после лизиса липосом, равно исходному количеству глюкозы в растворе, используемом для получения липосом.

Расчет коэффициента проницаемости проводили по формуле $P = 1/3 \cdot k_{12} \cdot \bar{r}$, где P — коэффициент проницаемости, $\bar{r}$ — средний радиус липосом, k_{12} — константа скорости выхода ионов.

В таблице приведены коэффициенты проницаемости мембран липосом для ионов калия при различных соотношениях детергент:липид. Размер липосом и суммарный внутренний объем определяли одновременно в каждом опыте. В таблице представлены результаты индивидуальных опытов. В большинстве опытов радиус липосом равнялся 720–840 Å. Крайние значения радиусов липосом, наблюдаемые в отдельных опытах, варьировали от 600 до 1500 Å. Приведенные в таблице значения P на 2–3 порядка выше проницаемости мелких унिलамелярных липосом с $\bar{r} = 250$ Å, полученных бездетергентным способом [13]. В то же время проницаемость липосомальной мембраны для глюкозы не зависит от включения в нее ДХНа. По-видимому, нарушения, вно-

Проницаемость липосом для ионов калия при различных отношениях концентраций ДХНа:липид.

R	$k_{12} \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$\bar{r}, \text{ \AA}$	V, %	$P_L \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$
0.016	0.15	720	13	0.36
0.075	0.16	840	9	0.46
0.12	0.14	720	6	0.34
0.16	0.13	780	11	0.34
0.20	0.30	720	11	0.72
0.30	2.5	810	10	7.0
0.40	3.5	760	10	9.1

Примечание: R — отношение концентраций дезоксихолата натрия к концентрации липида в суспензии липосом; k_{12} — константа скорости выхода ионов калия из липосом; $\bar{r}$ — средний радиус липосом; V — суммарный внутренний объем липосом в процентах от общего объема суспензии; P_L — коэффициент проницаемости липосомальной мембраны для ионов калия.

симые включением ДХНа, не влияют на проницаемость глюкозы через мембрану.

Известно, что при включении ДХНа его гидроксильные группы встраиваются в гидрофобную область бислоя [11, 12], разрушая ее, что должно существенно облегчить прохождение ионов через бислой. Кроме того, включение анионного детергента, каковым является ДХНа, должно способствовать продвижению положительно заряженного иона. Полученные результаты находятся в соответствии с предположением, что проницаемость для воды и неэлектролитов зависит в основном от прохождения этих веществ через границу липид—раствор [4, 5], а для диффузии ионов основным энергетическим барьером является липидный бислой [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Ц. М., Адамян С. Я., Ахбарцумян Т. Г., Оганесян Ж. А., Петросян Л. С., Симонян А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э. Биолог. ж. Армении, 38, 83—85, 1985.
2. Каленин В. Н., Щеголов С. Ю., Лаврушин Я. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов, 1977.
3. Ксенжек О. С., Гевод В. С., Омельченко Н. М. Электрохимия, 11, 1566—1570, 1977.
4. Demel R. A., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. M. Biochim. et Biophys. Acta, 255, 321—352, 1972.
5. Graziani Y., Liene A. I. Membr. Biol., 7, 275—284, 1972.
6. Helenius A., Simons K. Biochim. et Biophys. Acta, 415, 23—79, 1975.
7. Inoue K. J. Jap. Oil Chem. Soc., 26, 588—596, 1977.
8. Inoue K., Kitagawa T. Biochim. et Biophys. Acta, 263, 361—372, 1971.
9. Lamprecht W., Trautschold J. in: Methods of Enzymatic Analysis. H. Bergmeyer (ed.), N. Y., L, 1963.
10. Lee Y., Chan J. Biochemistry, 16, 1303—1309, 1977.
11. Lichtenberg D., Robson R., Dennis E. Biochim. et Biophys. Acta, 737, 235—304, 1983.
12. Mazer N. A., Benedek G. B., Carey M. C. Biochemistry, 19, 601—615, 1980.
13. Papahadjopoulos D., Kmetzberg H. K. Progr. Surface Sci., 4, 111—232, 1973.
14. Ribetto A. A., Dennis E. A. Biochem. et Biophys. Acta, 332, 26—35, 1974.
15. Van Zutphen H., Merola J. A., Brierley G. P., Cornwell D. G. Arch. Biochem. Biophys., 152, 755—766, 1972.

Поступило 28.VII 1986 г.

КИНЕТИКА ПАССИВНОГО ВЫХОДА K^+ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПЕРЕКИСНЫМ ОКИСЛЕНИЕМ ЛИПИДОВ

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Аннотация — Исследована калиевая проницаемость эритроцитов при индуцированном H_2O_2 усилении ПОЛ в условиях ингибирования каталазы азидом. Выход K^+ из эритроцитов происходит с лаг-периодом в 2–3 мин, причем в течение этого времени наблюдается резкое подщелачивание среды инкубации. Сделан вывод, что калиевая проницаемость мембран эритроцитов увеличивается вследствие интенсификации процессов ПОЛ, при этом выходу K^+ предшествует окисление гемоглобина.

Անոտացիա — Ուսումնասիրված է էրիտրոցիտների կալիումային թափանցելիությունը H_2O_2 առաջացրած լիպիդների զերոօքսիդային օքսիդացման մեծացման ժամանակ՝ կատալազան ազդող ինհիբիտորական պայմաններում էրիտրոցիտներից K^+ ի դուրս մղումը առկա է ունենում 2–3 րոպեանոց լագ-պերիոդով, որի ժամանակ նկատվում է ինկուբացիայի միջավայրի հիմնայնության արագ ալկալացման ճարակացված է, որ էրիտրոցիտների մեմբրանների կալիումային թափանցելիությունը մեծանում է լիպիդների զերոօքսիդային օքսիդացման պրոցեսների ինտենսիֆիկացիայի պատճառով և հեմոգլոբինի օքսիդացումը նախորդում է K^+ ի դուրս մղմանը:

Abstract — The potassium conduction of erythrocytes at increased H_2O_2 induced lipid peroxidation inhibition of catalase by azide has been investigated. The efflux of K^+ from erythrocytes takes place with lag-period of 2–3 min. During this interval rapid alkalization of incubation medium is observed. It is suggested that potassium conduction of erythrocyte membrane increases because of intensification of peroxidation processes, and oxidation of haemoglobin precedes K^+ efflux.

Ключевые слова: эритроциты, калиевая проницаемость, перекисное окисление липидов.

При перекисном окислении липидов (ПОЛ) мембран нарушаются многие важнейшие клеточные функции, что может приводить к необратимым изменениям клеток [1, 3, 14]. Известно, что перекись водорода оказывает сильное повреждающее действие на эритроциты, инициируя процессы ПОЛ [16], а также окисляя гемоглобин в Fe^{3+} -содержащий метгемоглобин [14]. В клетках существуют системы, препятствующие процессам образования перекисей и регулирующие, таким образом, их жизнедеятельность. Это и ферменты, разлагающие перекиси и ингибирующие образование активных форм кислорода [4, 8, 11], и внутриклеточные антиокислители типа α -токоферола [1, 9, 16].

Поскольку одним из показателей нарушения функций мембран является утечка K^+ , то представляет интерес исследование взаимосвязи между калиевой проницаемостью, каталазной активностью эритроцитов и окислением гемоглобина при индукции ПОЛ.

Материал и методика. Эритроциты из венозной крови человека осаждали центрифугированием, затем дважды промывали в 150 мМ NaCl в соотношении 1:5.

Изменение концентрации K^+ и H^+ измеряли пленочным K^+ -селективным и стеклянным H^+ -селективным электродами, соединенными в одной ячейке, в регистрировали с помощью pH-метров, подключенных к самописцам. Количество K^+ в эритроцитах определяли, добавляя салицил, который, образуя поры в мембранах, приводит к гемолизу [15].

ПОЛ эритроцитов изучали по образованию малинового диальдегида (МДА) при окислительной реакции с метаболитом азидовой кислоты [7]. К 3 мл среды, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ трис-HCl (pH 7.4), добавляли 0.1 мл суспензии эритроцитов и, в зависимости от цели, азид натрия (4 мМ) и H_2O_2 (5 мМ). Пробу инкубировали в течение одного часа при 37° в трясушейся водяной бане.

Каталазную активность эритроцитов определяли с помощью титрования марганцевокислым калием по методу Баха и Зубковой [2]. Исследование спектра поглощения эритроцитов проводили на спектрофотометре «Нуклеон-М». Истинный объем, занимаемый эритроцитарной массой, определяли центрифугированием суспензии эритроцитов на микроцентрифуге, и все расчеты велись с учетом этого объема.

Трис, азид натрия и фторид натрия были фирмы «Sigma» (США), остальные реактивы советского производства классификации «х. ч.» или «о. с. ч.».

Результаты и обсуждение. В эритроцитах основными ферментами, разлагающими перекись водорода до молекулярного кислорода и воды и препятствующими, таким образом, накоплению в эритроцитах радикалов $\cdot OH$, являющихся сильными окислителями [8, 10, 13], считаются каталаза и селеносодержащая пероксидаза [12, 14, 16]. При этом известно, что скорость обращения каталазы на несколько порядков выше, чем пероксидазы [4]. Для исследования влияния ПОЛ на выток K^+ из эритроцитов мы добавляли H_2O_2 , причем для нейтрализации действия каталазы суспензию эритроцитов около 10 мин предварительно инкубировали с ингибитором этого фермента азидом натрия [11, 16].

На рис. (А) показано влияние добавления H_2O_2 в присутствии азид-да на выход K^+ из эритроцитов и изменение pH. С целью более четкой регистрации pH мы оставляли систему незабуференной. Из рисунка видно, что сразу после добавления перекиси водорода происходит резкое подщелачивание среды ($\Delta pH = 0.46$), при этом визуально можно заметить быстрое потемнение суспензии эритроцитов. Затем с некоторым лаг-периодом (в пределах 2—3 мин) происходит выход K^+ . В течение 15 мин выходит приблизительно от 10 до 15% всего K^+ , содержащегося в эритроцитах (по данным 5 разных измерений).

Опыты по определению количества МДА (конечного продукта ПОЛ), образовавшегося в результате действия 5 мМ H_2O_2 при ингибировании каталазы азидом, выявили $239,33 \pm 4,78$ нмоль МДА/мл эритроцитов ($n=5$).

Отметим весьма интересную кинетику изменения pH и выхода K^+ , зависящую от сроков добавления азид-да после H_2O_2 . При одновременном добавлении NaN_3 и перекиси водорода наблюдается картина, схожая с представленной на рис., А. Добавление азид-да через 4 с после H_2O_2 (рис., Б) приводит к более медленному выходу K^+ , имеющему и больший лаг-период. Скорость подщелачивания среды не такая высокая, как в предыдущем случае, и ΔpH несколько меньше. Потемнение суспензии эритроцитов визуально заметно. Добавление азид-да через 20 с

после H_2O_2 (рис., В) приводит к еще более медленному выходу K^+ и подщелачиванию среды. Добавление азида после H_2O_2 (или только H_2O_2) через 30 и более секунд уже не приводит к сдвигу pH и вытоку K^+ (по крайней мере в течение 15—20 мин).



Кинетика выхода K^+ и изменения pH в суспензии эритроцитов под действием H_2O_2 в условиях ингибирования каталазы. 0,1 мл эритроцитов инкубировали в течение 10 мин в 150 мМ NaCl, затем добавляли: А — 4 мМ NaN_3 , через 10 мин — 5 мМ H_2O_2 ; Б — 5 мМ H_2O_2 ; через 1 сек — 1 мМ NaN_3 ; В — 5 мМ H_2O_2 , через 20 сек — 4 мМ NaN_3 .

Уменьшение количества H_2O_2 , добавленного после азида, оказывает действие, аналогичное показанному на рис., Б и В. Это дает основание утверждать, что в упомянутых выше случаях происходит частичное ферментативное разложение H_2O_2 до H_2O и O_2 , последующее же добавление азида ингибирует каталазу. Медленный выход K^+ и подщелачивание среды обусловлено действием оставшегося H_2O_2 .

При инкубации эритроцитов с другим метаболическим ингибитором — фторидом Na также наблюдается выход K^+ , правда, гораздо более слабый, чем при добавлении азида. При этом необходимо значительно увеличивать как концентрацию фторида (60 мМ), так и H_2O_2 (100 мМ). Отметим, что резкого подщелачивания в данном случае не наблюдается.

Нами были проведены опыты по изучению влияния азида и фторида на каталазную активность эритроцитов (табл.). Если принять ко-

Влияние ингибиторов на каталазную активность эритроцитов. Растворы с эритроцитами до добавления перекиси водорода 15 мин инкубировались с ингибиторами или без них (1—5). Расчет ведется на 1 мл разведенных в 1000 раз эритроцитов

Концентрация ингибитора	Количество неразложившейся в течение 30 мин H_2O_2 , мг
0	243,9±55,7
4 мМ NaN_3	1552,1±57,9
20 мМ NaF	884±8,5
60 мМ NaF	1107,1±40,3

личество неразложившейся в присутствии азида перекиси водорода за 100%, то при инкубации с 20 и 60 мМ фторида количество неразложившейся H_2O_2 составит в среднем 56,9 и 71,3%, т. е. по сравнению с азидом фторид не полностью ингибирует эритроцитарную каталазу.

Спектрофотометрическое исследование взвесей эритроцитов в NaCl (0,01 мл эритроцитов в 3 мл NaCl) показало, что если в контрольных

опытах выявляются два пика, соответствующих оксигемоглобину ($\lambda_1 = 577$, $\lambda_2 = 542$ нм), то при добавлении азиды (2 мМ) и H_2O_2 (5 мМ) эти пики практически исчезают уже в течение 2—3 мин. Чтобы получить подобный эффект с NaF и H_2O_2 , необходимо почти на порядок увеличить концентрации этих реагентов. Время исчезновения пиков также и несколько раз увеличивается. Отметим, что добавление только азиды или фторида почти не влияет на величину максимумов поглощения (по крайней мере в течение 20 мин).

Поскольку железо в оксигемоглобине находится в Fe^{2+} -состоянии, при окислении же переходит в Fe^{3+} [14], можно думать, что при разложении H_2O_2 , сопряженном с появлением ионов гидроксила, происходит переход $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$.

Чем же может быть обусловлено столь резкое изменение pH, показанное на рис., А? Можно было предположить, что образование OH^- происходит при неферментативном распаде H_2O_2 согласно реакции Фентона [6] $Fe^{2+} + H_2O \rightarrow OH + OH^- + Fe^{3+}$, а также в результате дальнейшего превращения гидроперекисей жирных кислот $ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO + OH^- + Fe^{3+}$ (H_2O_2 , атакуя двойные связи ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран, образует гидроперекиси [6], которые могут превращаться в радикалы жирных кислот. Однако добавление ЭДТА, комплексона двухвалентных металлов, не действует на изменение pH после H_2O_2 .

При геминном же катализе разложения перекиси водорода биологически активные комплексы железопорфиринов, в отличие от катализа ионным железом, действуют в качестве ферментов лишь в трехвалентном состоянии железа [5]. При этом, однако, при взаимодействии с H_2O_2 образования OH^- не должно происходить [5].

Другая возможность образования гидроксильных ионов и OH^- -радикалов может возникнуть в случае появления в системе супероксидных радикалов $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + O_2$. Однако присутствующая в значительном количестве в эритроцитах супероксиддисмутаза может нейтрализовать этот процесс, доводя концентрацию O_2 до незначительных величин [8], поскольку азид не ингибирует супероксиддисмутазу [8].

Поскольку стадии перехода электронов чаще всего сопряжены с протолитическими стадиями, обеспечивающими электронейтральность продуктов восстановления или окисления, то можно лишь предположить, что появление ионов гидроксила или, что то же самое, утилизация протонов, происходит при окислительно-восстановительных взаимодействиях перекиси водорода с металлосодержащими белками эритроцитов в присутствии азиды (но не фторида).

Резюмируя вышесказанное, можно сказать, что при ингибировании каталазы азидом перекись водорода увеличивает калиевую проницаемость эритроцитов вследствие интенсификации процессов ПОЛ в мембране. При этом выходе K^+ предшествует резкое увеличение pH среды и окисление гемоглобина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. Н. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. Дроздов Н. С., Матерянская Н. П. Практикум по биологической химии. 73, М., 1970.
3. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М., 1984.
4. Метцлер Д. Биохимия, 2, 376, М., 1980.
5. Михлин Д. М. Биохимия клеточного дыхания. 161, М., 1960.
6. Нонхубел Д., Уолтон Дж. Химия свободных радикалов. 382, М., 1977.
7. Стальная И. Д., Гуринвичи Т. Г. В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), 66—68, М., 1977.
8. Фридович И. В. В кн.: Свободные радикалы в биологии (под ред. У. Прайора), 1, 272—314, М., 1979.
9. Carrel R., Winterbourn C., Rachmilewitz E. Br. J. Haematol., 30, 259—264, 1975.
10. Halliwell B. FEBS Lett., 92, 321—326, 1978.
11. Jain S. K., Shoner S. B. Biochim. et Biophys. Acta, 642, 45—54, 1981.
12. Little C., O'Brien P. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 145—150, 1968.
13. McCord J. M., Day E. D. FEBS Lett., 86, 139—142, 1978.
14. Nicholls P. Biochim. et Biophys. Acta, 99, 286—287, 1965.
15. Segal P. Biochim. et Biophys. Acta, 363, 378—381, 1974.
16. Stocks J., Dormandy P. L. Br. J. Haematol., 29, 95—111, 1971.

Поступило 10.XI 1985 г.

И-цолот. ж. Армении, т. 10, № 3, 209—213, 1987

УДК 577.352.315+23

ΔΨ-ЗАВИСИМЫЙ ПЕРЕНОС ИОНОВ КАЛИЯ У *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

А. Г. ВАРДАНЯН, С. С. ДУРГАРЬЯН, М. И. ОГАНЕСЯН

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Аннотация — Изучен характер транспорта K^+ у аэробных бактерий *B. flavum*. Показано наличие трех фаз поглощения K^+ . Значения K_m и V_{max} для поглощения K^+ близки к характеристикам Trk системы *E. coli*. Калпиевый равновесный потенциал соответствует измеренному ΔΨ. Введение в среду протонофора приводит к реверсии процесса поглощения K^+ . В присутствии ЛЦКД не наблюдается поглощения K^+ . Арсенат натрия уменьшает вход K^+ . Предполагается, что ионы K^+ поступают в клетки *B. flavum* по градиенту электрического поля, при этом АТФ является, видимо, регулятором этого переноса.

Ստուգաթիւ — Ուսումնասիրված է K^+ -ի տրանսպորտի բնույթը *B. flavum* անոթը բակտերիաների մոտ: Ցույց է տրված K^+ -ի կլանման երեք փուլերի առկայությունը: K^+ -ի կլանման համար K_m և V_{max} -ի արժեքները մոտ են *E. coli* բակտերիաների Gtrh սրտանմի բնութագրերին: Կայունացրել հավասարակշռային պոտենցիալը համապատասխանում է չափված ΔΨ-ին: Փրոտոնաֆորի ներմուծումը միջավայր հանգեցնում է K^+ կլանման ունեւորին: N,N'-դիցիկլոհեքսիլկարբոնատի միջավայրումը իր դիտվում K^+ -ի կլանումը նաեւորումի արանատոր առաջացնում է K^+ սրտերի նվազում, ենթադրվում է, որ K^+ -ի իոնները թափանցում են *B. flavum* բջիւնների մէջ կիկտրական դաշտի գրադիենտի շնորհիւ, ընդ որում, ԱնՖ-ը հանգեցնում է այդ պրոցեսի կարգավորել:

Abstract — The character of K^+ -transport in respiring bacteria *B. flavum* has been investigated. It has been revealed the presence of three phases of K^+ -uptake. The values of K_m and V_{max} for K^+ -uptake are close to *E. coli* Trk system characteristics. The equilibrium potassium potential corresponds to the measured $\Delta\psi$. The application of protonophore with glucose available has led to a K^+ -uptake reverse. In the presence of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide no K^+ -uptake has been observed. Application of sodium arsenate has caused a K^+ -uptake decrease. It is assumed that the potassium ions enter the *B. flavum* cells by electrical field gradient, and this transfer may be regulated by ATP.

Ключевые слова: гиперполяризация мембраны, мембранный потенциал ($\Delta\psi$), ионы K^+ .

У грамположительных аэробных бактерий *Brevibacterium flavum* аппликация метаболизируемых сахаров вызывает резкий и кратковременный выброс ионов водорода и гиперполяризацию мембраны [1, 2]. Этот процесс сопровождается потоком ионов калия внутрь клеток, причем стехиометрия ионного обмена H^+ : K^+ равна единице. Эти данные являются предварительным указанием на то, что поглощение K^+ у аэробных бактерий происходит по градиенту электрического поля, в то время как анаэробы используют для транспорта K^+ энергию гидролиза АТФ [5].

В данной работе показано, что в аэробных бактериях *B. flavum* ионы калия действительно распределяются между клеткой и средой пассивно по градиенту электрического поля.

Материал и методика. В работе использовали клетки *Brevibacterium flavum* штамм АТСС 14067 [6]. Бактерии выращивали в течение 18–20 ч в мясонептонном бульоне при 30° на качалке. Дальнейшая процедура подготовки клеток к опыту описана ранее [1]. Количество жизнеспособных бактерий определяли методом посева на твердые питательные среды. Титр клеток в эксперименте достигал $3 \div 5 \times 10^9$ кл./мл. Потоки ионов и разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) определяли с помощью катионселективных электродов по описанным ранее методикам [4, 7, 9]. Внутриклеточную концентрацию ионов калия оценивали по количеству K^+ , вытекающему из клеток, обработанных толуолом в концентрации 2,0 мкл/мл. Такая обработка ведет к освобождению 95% внутриклеточного K^+ [8]. Использовали N,N'-дихлорогексикарбодимид (ДНКА), валлиномицин, арсенат натрия, карбонилизотиоид-*m*-хлорфенилгидразон (КХФГ) (все Sigma, США), тетрафенилфосфоний (ТФФ+) (Chemapol, ЧССР).

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что добавление глюкозы к суспензии клеток *B. flavum* вызывает резкую секрецию H^+ и гиперполяризацию мембраны с одновременным поглощением ионов калия, совпадающим по характеру с изменением $\Delta\psi$ [1]. Однако это совпадение не может служить достаточным доказательством того, что только наличие $\Delta\psi$ обеспечивает наблюдаемое поглощение и распределение ионов калия у *B. flavum*. Одним из основных доказательств того, что K^+ у этих бактерий распределяется пассивно между клеткой и средой является соответствие наблюдаемого распределения этих ионов с измеренной величиной $\Delta\psi$ (табл.).

Установлено также, что скорость поглощения K^+ и количество ионов, поглощенное клетками, прямо пропорционально активности этого иона в среде в пределах 0,5–5,0 мМ. Соотношение начальных скоро-

Распределение ионов калия между клеткой и средой и $\Delta\psi$ у *B. flagrum* в средах с различным содержанием K^+ в отсутствие глюкозы

$[K^+]_0$ (мМ)	$[K^+]_{in}$ (мМ)	$[K^+]_{in}/[K^+]_0$	E_{K^+} (мВ)	$\Delta\psi$ (мВ)
0.46	203	443	159	155±8
0.81	227	280	147	147±8
1.91	133	133	127	130±6

Примечание: $[K^+]_0$ — концентрация ионов калия в среде; $[K^+]_{in}$ — концентрация внутриклеточного K^+ ; величину равновесного калиевого потенциала рассчитывали по формуле

$$E_{K^+} = -\frac{RT}{F} \ln ([K^+]_{in}/[K^+]_0).$$

стей потоков H^+ : K^+ в изученной нами области концентраций K^+ близко к единице [1]. Из серии этих опытов по методу Лайнуивера-Берка определены значения $K_m = 2,4$ мМ и $V_{max} = 0,2$ мМ/мин. кл., близкие к характеристикам переноса ионов калия через Ttk систему у *E. coli*, которая представляет собой K^+ -нонофор [10].

Введение в экспериментальный раствор 10^{-5} М разобщителя окислительного фосфорилирования КХФГ приводит к реверсии процесса поглощения K^+ в присутствии глюкозы (не приведено). При этом скорость секретиции ионов водорода, обычно наблюдаемая в течение гликолиза, уменьшается после добавления КХФГ, что объясняется электродиффузионным обратным током протонов, возникающим в результате образования дополнительных H^+ -каналов вследствие обработки клеток протонофором КХФГ. Из этого опыта следует, что наличие $\Delta\psi$ необходимо для поглощения и поддержания ионов K^+ внутри клеток. Поэтому ожидалось, что в присутствии валиномицина (10^{-6} М), создающего дополнительные каналы проводимости для ионов калия в мембране, будет усиливаться поток K^+ внутрь клеток под действием электрического поля. Однако при указанной концентрации валиномицина мы не наблюдали заметного изменения потоков H^+ и K^+ по сравнению с контролем.

На рис. 1 показан характер изменения $\Delta\psi$ и соответствующих потоков ионов K^+ и H^+ после добавления глюкозы при 30° и 20°. На всех трех кривых обращает на себя внимание наличие трех фаз, строго совпадающих во времени. Первая фаза поглощения K^+ полностью соответствует характеру изменения $\Delta\psi$. Регистрируемая гиперполяризация мембран аэробных *B. flagrum*, как было показано [1, 2], создается усилением секретиции H^+ через дыхательную цепь при аппликации глюкозы. Когда мембранный потенциал у этих бактерий достигает некоторого порогового уровня, включение H^+ -АТФазы в режим синтеза АТФ ведет к небольшому падению $\Delta\psi$ с последующей его стабилизацией, очевидно, благодаря уравниванию потоков H^+ , направленных из клетки в среду и из среды в клетку, соответственно через дыхательную цепь и H^+ -АТФазу. Подтверждением последнего предположения может слу-

жить то, что, как уже было показано, в присутствии ДИКД, блокирующего H^+ -АТФазу и повышающего $\Delta\psi$, секретиция ионов H^+ после добавления глюкозы происходит без изменений скорости [2], и при этом наблюдается некоторое поглощение ионов K^+ .

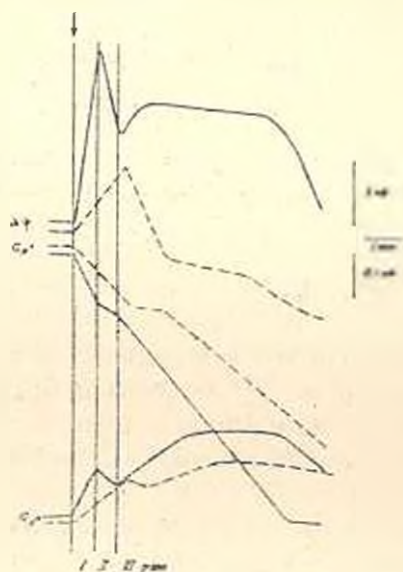


Рис. 1.



Рис. 2.

Рис. 1. Изменения активностей ионов H^+ и K^+ в среде и гиперполяризация мембраны *B. licheni* при аппликации глюкозы (G , 2,0 мМ) при 30° (сплошная линия) и 20° (пунктир). Экспериментальная среда содержала (в мМ): трис—10,0, H_2PO_4 —3,0, KCl —1,0, $NaCl$ —1,0, $MgSO_4$ —1,0, ТФФ— 2×10^{-3} (рН 7,3). Исходный уровень $\Delta\psi$ практически не зависит от температуры и составляет—145 мВ. Фазы I, II, III показаны только для кривых при 30°.

Рис. 2. Изменения мембранного потенциала и активностей ионов H^+ и K^+ в среде у *B. licheni* при аппликации глюкозы (G , 2,0 мМ) до и после добавления арсената натрия (A , 3,0 мМ). Условия эксперимента идентичны описанным в подписях к рис. 1 при 30°.

Снижение температуры приводит к замедлению секретиции H^+ , соответственно уменьшается гиперполяризация и замедляется вход K^+ (рис. 1), но при этом начальный уровень $\Delta\psi$ до аппликации глюкозы остается постоянным (—145 мВ). Для первой фазы поглощения K^+ нами определен коэффициент Вант-Гоффа Q_{10} , равный 1,3. Это значение температурного коэффициента почти совпадает со значением $Q_{10} = 1,4$ для физической диффузии [3], что еще раз указывает на неферментативный характер переноса ионов калия внутрь клеток и период первой фазы поглощения.

При аппликации глюкозы в присутствии арсената натрия амплитуда гиперполяризационных ответов увеличивается (рис. 2), хотя как скорость, так и количество выходящего H^+ уменьшаются. В этом случае уменьшается также поток K^+ внутрь, что, очевидно, можно объяснить отсутствием АТФ. Как было показано ранее [2], ионы K^+ , поступая в клетки в ответ на гиперполяризацию мембраны, уменьшают амплитуду гиперполяризации. Поэтому в отсутствие потока ионов K^+ , направлен-

ного из среды в клетку, наблюдается реальная величина амплитуды гинерполяризации—большая по сравнению с контролем (рис. 2).

Таким образом, ионы калия поступают в клетки *B. flavum* по градиенту электрического поля, но при этом АТФ, возможно, является регулятором этого переноса. Причем регуляция может быть как аллостерической, так и происходящей за счет фосфорилирования какого-то белка Trk системы, как это детально обсуждается Стьюартом и др. [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Варданян А. Г., Мартиросов С. М. Биофизика, 31, 5, 833, 1986.
2. Варданян А. Г., Гончегулян А. Е., Петросян П. К., Мартиросов С. М. Биофизика, 31, 6, 993, 1986.
3. Ленинджер А. Биохимия, 700, М., 1974.
4. Мартиросов С. М., Трчунян А. А., Варданян А. Г. Биофизика, 27, 1, 48, 1982.
5. Мартиросов С. М., Трчунян А. А. Биофизика, 31, 3, 464, 1986.
6. Штанин А. В., Лившиц В. А., Жданова Н. Н. Генетика, 17, 1419, 1981.
7. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554, 1978.
8. Eisenstadt E. I. Bacteriol., 112, 264, 1972.
9. Martirosou S. M., Petrosian L. S., Tchountian A. A., Vardanian A. G. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 613, 1983.
10. Stewart L. M. D., Bakker E. P., Booth I. R. J. Gen. Microbiol., 131, 77, 1985.

Поступило 30.IX 1986 г.

Биол. ж. Армении, т. 40, № 3, 213—219, 1987

УДК 663.1.577.112.38.2

БИОСИНТЕЗ L-ПРОЛИНА ИЗОЛЕЙЦИНЗАВИСИМЫМИ МУТАНТАМИ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ МЕЛАССУ

Э. М. АКОПЯН, Б. Н. КАРАБЕКОВ, В. Е. АКСЕНОВСКАЯ,
А. А. БУДУЛЯН, А. Г. МУРАДЯН, Ф. Н. ТХРУНИ

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Аннотация. Изучена возможность осуществления биосинтеза L-пролина изолейцинзависимыми мутантами *B. flavum* на питательных средах, содержащих в качестве источника сахара свекловичную и тростниковую мелассы. Установлено, что свекловичная меласса обладает выраженной ингибирующей активностью в отношении биосинтеза этой аминокислоты, в то время как тростниковая, наоборот, стимулирует этот процесс. Эффект от применения этих видов мелассы зависит от их содержания в питательной среде. Определены условия практического применения этих видов сырья для получения L-пролина.

Անոտացիա — Ինտենսիվորված է L-պրոլինի բիոսինթեզը *Brevibacterium flavum* իզոլեյցինից կախված մուտանտների կողմից սնուցող միջավայրում՝ որպես շաքարի աղբյուր օգտագործելով ճակնդեղի և շաքարեղեգի մելասսաները: Հաստատված է, որ այդ ամրինաթթվի բիոսինթեզի եկատամար ճակնդեղի մելասսան օժտված է արտա-հատիչ արգելակող հատկությամբ, այն դեպքում, երբ շաքարեղեղեգի մելասսան բնդհակառակն, օժտված է խթանող հատկությամբ: Այդ երկու տեսակի մելասսաների օգտագործման էֆեկտը կախված է սնուցող միջավայրում երանց պարունակությունից: Որոշված են այդ երկու տեսակի հումքերի գործնական կիրառման պայմանները L-պրոլինի ստացման համար:

Abstract — The biosynthesis of L-proline by isoleucine autotrophic mutants of *Brevibacterium flavum* on nutrient media, containing beet molasses and reed molasses as a source of sugar was studied. The beet molasses inhibited the biosynthesis of L-proline, while the reed molasses stimulated the biosynthesis of this amino acid. These effects depended on the level of two types of molasses in medium. Conditions of practical using of two types of molasses were determined for the production of L-proline.

Ключевые слова: мутанты *Brevibacterium flavum* изолейцинзависимые, меласса биосинтез пролина.

Биосинтез L-пролина аутокотрофными по изолейцину штаммами *Brevibacterium flavum* успешно осуществляется на синтетических питательных средах, содержащих источники углерода и азота, минеральные соли, витамины и ростовые факторы, многие из которых имеют нищевое значение или являются дефицитными и дорогостоящими [1—5]. Имеются данные о применении для биосинтеза L-пролина технических источников сахара, таких как тростниковая меласса [6, 12]. Однако данных о применении свекловичной мелассы для биосинтеза пролина мы не нашли. Этот вид мелассы является основным сырьем для получения L-лизина в СССР. В связи с этим представляло интерес выяснение возможности применения ее для получения аспиноксида, в частности, L-пролина.

Материал и методика. В работе в качестве продуцента L-пролина использовали изолейцинзависимый мутант III, который, кроме аутокотрофности по изолейцину, обладает резистентностью к диэтилпролину и природно нуждается для роста в тиамине и биотине. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл из расчета (п—200 об/мин), объем ферментационной среды в колбах составлял 15 мл, аэрация по сульфитному числу—2,8 г. O_2 /л. час. Посевной материал выращивали в течение 16—20 ч и вносили в ферментационную среду в количестве 0,8—1 мл. Процесс биосинтеза осуществляли в течение 72 ч. В качестве посевной среды использовали синтетическую среду следующего состава: глюкоза—3%, $(NH_4)_2SO_4$ —3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —1%, KH_2PO_4 —0,1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,001%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ —0,001%, L-изолейцин—250 мкг/мл, биотин—450 мкг/л, тиамин—500 мкг/л, (рН 7,4—7,8). При исследовании возможности использования комплексных видов сырья применяли посевную среду следующего состава (%): меласса свекловичная—6% (3% по сахару), гидролизат БВК (гБВК)—2% (аминный азот 0,02—0,025%).

В качестве ферментационной среды использовали синтетическую среду следующего состава: глюкоза—11%, $(NH_4)_2SO_4$ —5,5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,001%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ —0,001%, KH_2PO_4 —0,1%, биотин—450 мкг/л, тиамин—500 мкг/л, L-изолейцин—150 мкг/мл, $CaCO_3$ —5% [13, 14].

В качестве технических источников сахара использовали тростниковую и свекловичную мелассы. При компоновке мелассных питательных сред последний в составе синтетической среды замещали только глюкозу. Остальные компоненты среды использовали в тех же концентрациях, что и в синтетической ферментационной среде.

В качестве технического источника изолейцина применяли гидролизат БВК, который готовили следующим образом: 10%-ную суспензию БВК в 4 н H_2SO_4 автоклавировали при 125° в течение 2,5—3,0 часов. Перед добавлением в среду гБВК нейтрализовали водным раствором щелоча до рН 7,1—7,3. В питательную среду гидролизат БВК вносили вместе с сульфатом аммония, образующимся в результате реакции нейтрализации [10].

Пролин в культуральной жидкости определяли методом хроматографии на бумаге, используя систему н-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода в соотношении 4:1:1.

О количестве биомассы судили по величине оптической плотности клеточной суспензии (ФЭК-56 М, кювета 5 мм, длина волны 340 нм) с последующим пересчетом на сухой вес по стандартной кривой. Количество жизнеспособных клеток определяли методом титрования клеточной суспензии на пластинках мясо-пептонного агара в чашках Петри.

Углеводы определяли методом Бертрама [11]; аминокислотный состав мелассы и гБВК—на аминокислотном анализаторе ААА-339 (ЧССР).

Результаты и обсуждение. Изучение роста мутанта на указанных посевных средах показало, что на синтетической он растет со средней удельной скоростью (μ) $0,37 \text{ час}^{-1}$ при среднем времени удвоения (td) 1,87 ч, что позволяет ему за 24 ч культивирования при практически полной утилизации сахара пройти 12,6 генераций (n). Период адаптации мутанта к среде (лаг-фаза L_c) не превышает 6 ч (табл. 1).

Таблица 1. Динамика роста мутанта III на синтетической и мелассной посевных средах

№№ проб	Время выращивания, ч	Биомасса X (титр клеток в 1 мл)		Удельная скорость роста μ , ч^{-1}		Время удвоения td , ч		Количество генераций, n	
		глюкоза	меласса	глюкоза	меласса	глюкоза	меласса	глюкоза	меласса
1	0	$4,7 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
2	2	$5,5 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$	0,096	0,09	7,4	8,0	0,27	0,25
3	4	$6,9 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	0,095	0,64	7,4	1,09	0,27	1,84
4	6	$1,8 \times 10^7$	$5,24 \times 10^7$	0,48	0,88	1,46	0,80	1,37	2,51
5	8	$8,4 \times 10^6$	$2,55 \times 10^8$	0,77	0,81	0,90	0,88	2,2	2,28
6	10	$6,2 \times 10^8$	$3,23 \times 10^8$	0,99	0,11	0,70	6,25	2,86	0,32
7	12	$5,5 \times 10^9$	$7,81 \times 10^9$	1,09	0,45	0,64	1,56	3,12	1,28
8	14	$1,25 \times 10^{10}$	$6,43 \times 10^9$	0,41	1,05	1,77	0,66	1,18	3,02
9	16	$2,0 \times 10^{10}$	$2,51 \times 10^{10}$	0,23	0,68	2,98	1,025	0,67	1,95
10	18	$2,6 \times 10^{10}$	$3,25 \times 10^{10}$	0,13	0,12	5,26	5,7	0,38	0,35
11	20	$2,9 \times 10^{10}$	$3,71 \times 10^{10}$	0,055	0,07	12,5	9,5	0,16	0,21
12	22	$3,0 \times 10^{10}$	$4,12 \times 10^{10}$	0,017	0,05	41,7	13,3	0,05	0,15
13	24	$3,1 \times 10^{10}$	$4,14 \times 10^{10}$	0,016	0,002	41,7	346,5	0,05	0,006

Средние показатели роста за 24 ч

0,37 0,41 1,87 1,7 12,6 14,2

При применении в качестве посевной среды мелассы и гБВК вдвое сокращается лаг-фаза (L_c), несколько увеличиваются μ и другие физиологические параметры роста мутанта (td и n). Однако обращает на себя внимание диэнзимический характер динамики роста мутанта на мелассной среде (табл. 1), свидетельствующий о содержании в мелассе другого, кроме сахарозы, источника углерода в виде органических кислот (испытанные нами партии свекловичной мелассы содержали до 20 г/л молочной кислоты).

Таким образом, на основании полученных результатов можно считать, что свекловичная меласса и гБВК в примененных концентрациях хорошо обеспечивают ростовые потребности изолейцинозависимого мутанта III В. *flavum*—продуцента пролина.

Для выбора оптимального количества мелассы, обеспечивающего наибольший выход пролина у мутанта, глюкозу в синтетической фермен-

тационной среде частично или полностью замещали свекловичной или тростниковой мелассой с таким расчетом, чтобы конечное содержание сахара было на уровне 11%. На рис. 1 приведены данные, характеризующие выход биомассы, пролина и удельную продуктивность у мутанта

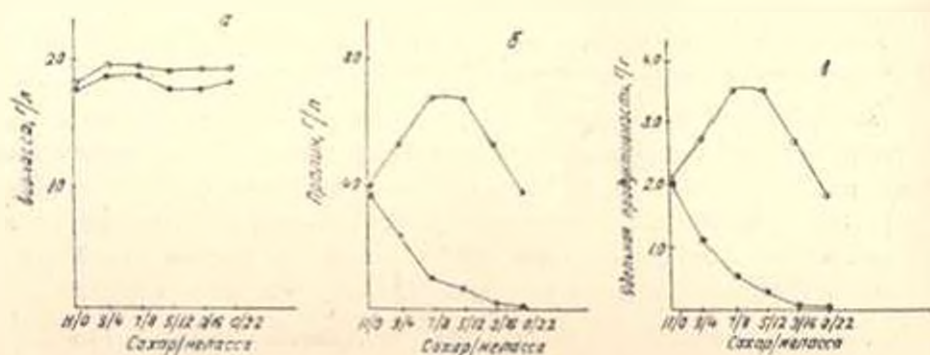


Рис. 1. Выход биомассы (а), l-пролина (б) и удельная продуктивность (в) мутанта III в зависимости от концентрации в среде свекловичной (●—●) и тростниковой (○—○) меласс. По оси абсцисс: в числителе процент сахара (глюкозы) в среде, в знаменателе процент мелассы в среде.

в зависимости от концентрации мелассы в среде. Видно, что выход биомассы при разных концентрациях мелассы в ферментационной среде по сравнению с таковой на синтетической среде (11% глюкозы) не претерпевает существенных изменений. При применении свекловичной мелассы биосинтез l-пролина резко ингибируется и при полной замене сахара на мелассу—0/22—он практически не имеет места. Напротив, применение тростниковой мелассы приводит к усилению биосинтеза l-пролина и к соответствующему увеличению удельной продуктивности мутанта, а при полной замене сахара в среде на тростниковую мелассу—0/22—уровень биосинтеза l-пролина остается такой же, как на синтетической среде—11/0.

Поскольку в литературе явление ингибирования биосинтеза l-пролина свекловичной мелассой, а также механизмы этого явления не обсуждались, мы сочли интересным выяснить его причины.

В связи с тем, что свекловичная и тростниковая мелассы отличаются друг от друга по аминокислотному составу (табл. 2), было естественно именно в аминокислотной фракции искать причину ингибирования процесса биосинтеза l-пролина свекловичной мелассой. Для этого свекловичную мелассу подвергали обработке на ионообменных смолах. Были получены две партии обработанной мелассы: одна, обработанная катионитом (КУ-2Х8), не содержала аминокислот, другая, обработанная анионитом (АВ-17), содержала все аминокислоты, присутствующие в исходной мелассе. Эти партии мелассы включали в состав синтетической среды взамен сахара (глюкозы) в двух вариантах: с исключением из состава среды солей и витаминов («микродобавки») и без изменения остального компонентного состава среды. В качестве контроля использовали синтетическую ферментационную среду. Получен-

Таблица 2. Химический состав свекловичной и тростниковой мелассы

Наименование показателей	Свекловичная меласса	Тростниковая меласса
pH	6.0—6.4	5.5—5.8
Общий сахар, вес. %	51.0—51.8	54—60
Прямой сахар, вес. %	2.6—5.6	20—28
Зола, вес. %	7.3—8.4	5—9
Сухие вещества, вес. %	72.9—74.5	70—70
Общий калий, вес. %	3.1—3.6	2—3
Общий фосфор, мг %	42.6—44.7	150—180
Кальций, мг %	645—792	500—180
Аминокислоты, мг %		
Гистидин	0—40	—
Аргинин + лизин	12—41	—
Аспарагин	12—36	4—6
Треонин	16—34	—
Серин	49—106	—
Глутамин	14.3—475	—
Пролин	20—87	—
Глицин	14—80	—
Аланин	37—89	5—10
Валин	11—93	—
Метионин	2—30	—
Изолейцин + лейцин	50—208	—
Тирозин	11—51	—
Фенилаланин	0—100	—
Триптофан	4—5	—
Витамины, мг/л		
Тиамин	1.3	8.3
Биотин	0.053	12.0
Рибофлавин	0.41	2.51
Никотиновая кислота	51.0	21.0
Пантотеновая кислота	1.3	21.4
Фолиевая кислота	2.1	0.038
Пиридоксин	5.4	6.5

ные данные подтверждают предположение о том, что ингибирующая активность свекловичной мелассы связана с ее аминокислотной фракцией и, по-видимому, с изолейцином, поскольку именно эта аминокислота у изолейцинзависимых мутантов-продуцентов l-пролина является регулятором биосинтеза. И, действительно, исключив из состава синтетической среды изолейцин при применении свекловичной мелассы, мы убедились, что ингибирующий эффект ее на биосинтез l-пролина значительно снижается, а отсутствие в среде этой аминокислоты компенсируется изолейцином мелассы. На рис. 2 для сравнения приведены данные о биосинтезе l-пролина мутантом III на синтетической ферментационной среде в зависимости от концентрации l-изолейцина в среде. Видно, что высокий выход l-пролина достигается тогда, когда в синтетической среде лишь 4—5% сахара (из 11%) заменяется свекловичной мелассой (8—10%). Полная замена сахара мелассой, по-видимому, приводит к некоторому избытку l-изолейцина в среде, о чем свидетельствует сходство профилей кривых зависимости выхода пролина от концентрации l-изолейцина в синтетической среде и от концентрации мелассы. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество изолейцина, вносимое в среду в составе свекловичной мелассы, вполне удовлетворяет потребностям мутанта для успешного осуществления биосинтеза пролина.

Таким образом, эксперименты со свекловичной мелассой в качестве источника углерода показали возможность ее использования для получения I-пролина. При этом было установлено, что концентрация ее в питательной среде не должна превышать 10% (5% по сахару). Дефицит сахара в среде в этом случае должен быть возмещен внесением чистой глюкозы (или пищевого сахарного песка).



Рис. 2.

Рис. 2. Биосинтез I-пролина из среды без изолейцина, содержащей различные концентрации свекловичной мелассы (●—●) и на синтетической среде с различными концентрациями I-изолейцина (○—○). По оси абсцисс в числителе процент глюкозы в среде, в знаменателе процент мелассы в среде.

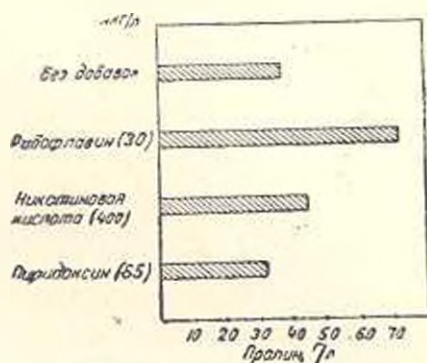


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние витаминов на биосинтез пролина мутантом III.

На основании результатов проведенных исследований была выявлена возможность и установлены условия применения названных видов меласс для получения I-пролина микробиологическим синтезом, но вопрос о причинах стимулирования синтеза этого продукта при применении более низких концентраций тростниковой мелассы оставался невыясненным.

Сравнивая химический состав тростниковой и свекловичной меласс (табл. 2), можно убедиться, что первый значительно богаче некоторыми витаминами. Для выяснения возможной роли этих витаминов была проведена серия экспериментов с использованием среды с витаминами (рис. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что стимулирующий эффект тростниковой мелассы на биосинтез I-пролина, по-видимому, в большой степени зависит от содержания в ней витаминов, в частности, рибофлавина, стимулирующая роль которого в концентрации 30 мкг/л особенно выражена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент США, № 3329577, 1967.
2. Патент США, № 3650899, 1972.
3. Патент США, № 4224409, 1980.
4. Патент ФРГ, № 1172903, 1969.
5. Патент ФРГ, № 1189941, 1970.

6. Патент Великобритании. № 2077262 А, 1981.
7. Ганчев К. Л., Жумов Г. Ш., Христова Г. Х., Мургов И. Д. В кн.: Биотехнология и бионженерия. Тез. докл., 2. Рига, 1986.
8. Мухиня Г. Р., Дунце М. Э. Обзор: Новые виды сырья для микробиологических производств. М., 1978.
9. Лисинюш Г. К., Дунце М. Э. В кн. Сырье и питательные субстраты для промышленной микробиологии. Рига, 1986.
10. Зайцева Э. М., Комбалоу Л. В. Приклад биохимия и микробиол., 22, 3, 318—355, 1986.
11. Белозерский А. И., Проскуряков Н. И. Практическое руководство по биологии растений. 12—17, М., 1951.
12. Araki K., Takasawa Y., Nakajima J. Agr. Biol. Chem., 39 (5), 1193—1200, 1975.
13. Yoshinaga F. J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 367—398, 1969.
14. Yoshinaga F., Yoshinaga Y., Okamura Sh., Katsuya H. J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 203—210, 1967.

Поступили 27.1 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 10, № 3, 219—223, 1987

УДК 577.150.2

ВЛИЯНИЕ *p*-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТА НА L-ЛИЗИН-2-МОНООКСИГЕНАЗУ ИЗ *PSEUDOMONAS* *sp.*

Г. Э. ХАЧАТРЯН, Т. Р. КАЗАРЯН, А. Л. СИМОНЯН

Ереванский физический институт ГННАЗ СССР

Аннотация — Изучено влияние *p*-хлормеркурибензоата на активность L-лизин-2-монооксигеназы из двух штаммов рода *Pseudomonas*. Показана трансформация оксигеназной активности фермента в оксидазную

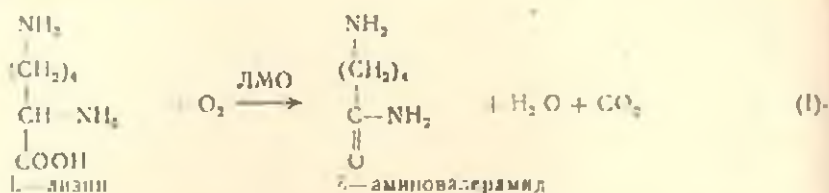
Նկատից — Ինտենսիվորեն է պարզվել *p*-հլորմերկուրինաթթվի ազդեցությունը *Pseudomonas* ճեղի երկու շտամների L-լիզին-2-մոնոօքսիգենազի ակտիվության վրա: Նույն է տրված ֆերմենտի օքսիգենազային ակտիվության վերափոխման օրինազանքին:

Abstract — The influence of *p*-chloromercurybenzoate on L-lysine-2-monooxygenase activity from two strains of *Pseudomonas* species is investigated. The transformation of oxygenase activity of enzyme into an oxidase one is shown.

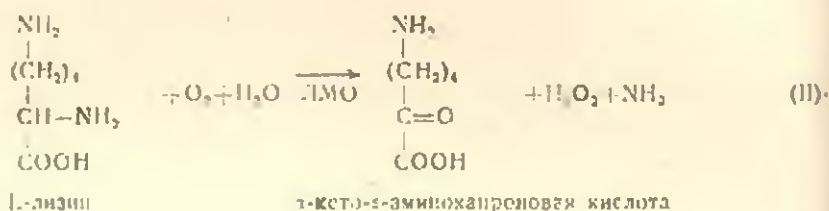
Ключевые слова L-лизин-2-монооксигеназа, трансформация, *p*-хлормеркурибензоат, *Pseudomonas* *sp.*

Химическая модификация функциональных групп молекул ферментов часто сопровождается изменением их каталитических свойств. Известно, что при некоторых патологических состояниях, например, вследствие облучения [2], происходят качественные изменения активности ферментов, т. е. трансформация. Изыскание способов избирательного блокирования таких изменений в принципе может быть использовано для создания новых лечебных средств. Кроме того, сопоставление свойств природных и трансформированных ферментов может быть интересным для решения фундаментальных проблем биокатализа [1].

1-лизин-2-монооксигеназа — ЛМО (КФ 1.13.12.2.) в пассивном состоянии является внутренней монооксигеназой [3], т. е. катализирует окисление лизина с внедрением одного атома молекулярного кислорода в структуру субстрата по схеме



Известно, что ЛМО из *Ps. fluorescens* ATCC 11250 под воздействием меркаптидообразующих реагентов в значительной степени теряет оксигеназные свойства, приобретая оксидазные. При этом молекулярный кислород расходуется на образование пероксида водорода, а кислород keto-группы α-кето-ε-аминокапроновой кислоты берется из молекулы воды по схеме



ЛМО не обнаружена ни где, кроме некоторых штаммов *Ps. fluorescens* и *Ps. putida*. Детальное исследование свойств, в том числе свойства трансформации, было проведено только для фермента из *Ps. fluorescens* ATCC 11250.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение свойств ЛМО из штаммов *Ps. putida* ВКМ В-1458Д и *Ps. fluorescens* 011 под влиянием п-хлормеркурибензоата (п-ХМБ).

Материал и методика. ЛМО выделяли из *Pseudomonas* по методу Такеда и Ганнини [3]. В каждом случае фермент очищался примерно в 200 раз и содержал незначительную белковую примесь.

В работе использовали натриевую соль п-ХМБ квалификации «ч», «Сметарол» (ЧССР); L-лизина гидрохлорид, «Reanal» (ВНР); 2-меркаптоэтанол, «Serva» (ФРГ), каталазу, «Sigma» (США). Остальные реактивы — отечественного производства высших квалификаций.

Активность фермента определяли амперометрически, оценивая убыль кислорода с помощью мембранного кислородного электрода, спектрофотометрически на спектрофотометре «Specord M-40» (ГДР), определяя изменение интенсивности окраски фенолового красного в результате смещения pH в кислую область под воздействием выделяющегося CO_2 при длине волны 558 нм. Измерения выполняли при 25° в 5 мМ калийфосфатном буфере (pH 8,0), содержащем L-лизин в конечной концентрации 20 мМ. Концентрация фенолового красного при спектрофотометрическом определении составляла 21 мкМ.

Модификацию фермента с помощью п-ХМБ проводили, инкубируя 20 нм ЛМО с п-ХМБ в концентрациях от 0,03 до 0,9 мкМ в течение 5 мин при 25°. После этого определяли ферментативную активность. Процент оксидазной активности оценивали, определяя количество пероксида водорода, добавленного в реакционную среду избытка каталазы. При этом регистрировали уменьшение поглощения кислорода, пропорцио-

нальное количество выделявшегося в ходе реакции пероксида водорода. Обратимость трансформации определяли добавлением избытка 2-меркаптоэтанол.

Результаты и обсуждение. Предполагается, что причиной появления оксидазной активности у ЛМО после обработки п-ХМБ является модификация тиоловых групп фермента [4]. В наших экспериментах при действии на фермент различных концентраций п-ХМБ наблюдалось ожидаемое уменьшение активности ЛМО. Причем, как видно из рис. 1, существенных различий в степени инактивации фермента из разных ис-

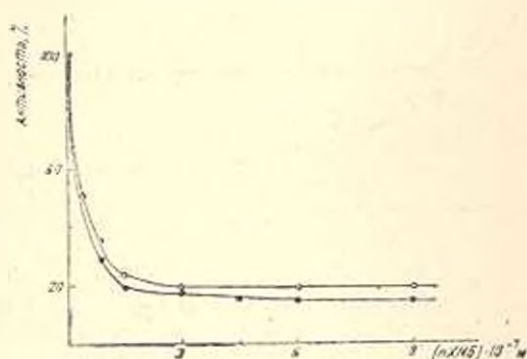


Рис. 1. График зависимости активностей ЛМО из *Ps. fluorescens* (○—○) и *Ps. putida* (●—●) от различных концентраций п-ХМБ. Время преникубации фермента с п-ХМБ 5 мин. Концентрация фермента 20 нМ.

точников не было обнаружено. Наблюдаемое резкое падение активности фермента уже при очень низких концентрациях п-ХМБ действительно может быть обусловлено связыванием последнего с SH-группами активного центра или, по крайней мере, с SH-группами, несущими ответственность за активность фермента (например, с SH-группами регуляторных центров). Свидетельством тому может также служить резкий перелом в кривой инактивации при соотношении 7—8 моль п-ХМБ на моль фермента. Последующее увеличение концентрации п-ХМБ не приводило к изменению каталитической активности ЛМО из *Ps. putida*, в то время как у ЛМО из *Ps. fluorescens* она незначительно снижалась.

На рис. 2 приведена зависимость активности ЛМО от времени преникубации фермента с различными концентрациями п-ХМБ, из которой видно, что связывание п-ХМБ с ферментом практически заканчивается за 4—12 мин и зависит от соотношения п-ХМБ/ЛМО, причем дальнейшая преникубация не приводит к изменению активности.

Модификация ЛМО из обоих источников с помощью п-ХМБ не только приводит к существенной потере каталитических свойств фермента, но и трансформирует значительную часть остаточной активности из оксигеназной в оксидазную. В таблице суммированы данные об изменении характера окислительных свойств фермента. Явление трансформации регистрировали обоими методами оценки ферментативной активности. Как видно из схемы 1, стехиометрия убыли кислорода и образования диоксида углерода в оксигеназной реакции равна 1:1. Между тем с появлением оксидазных свойств количество образующегося CO_2

должно сократиться (схема II). И действительно, наблюдалось несоответствие между определенным амперометрически количеством кислорода и количеством образовавшегося CO_2 , определенного спектрофото-

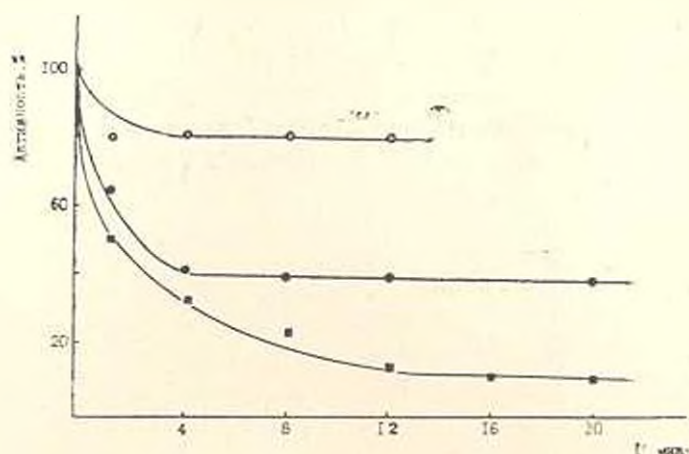


Рис. 2. График зависимости активностей ЛМО из *Ps. fluorescens* от времени при инкубации с п-ХМБ: ○ — 0,06 мкМ; ● — 0,15 мкМ; ■ — 0,3 мкМ п-ХМБ. Концентрация фермента 20 нМ.

Прицепное соотношение оксигеназной и оксидазной активностей ЛМО после модификации фермента п-ХМБ

Шаги	Состояние фермента	Остаточная активность, %		Оксидазная активность, %	
		по $[\text{O}_2]$	по $[\text{CO}_2]$	по $[\text{O}_2] - [\text{CO}_2]$	по каталазе
<i>Ps. fluorescens</i>	натив.	100	100	0	0
	модиф.	24,2	10	14,2	13
<i>Ps. putida</i>	натив.	100	100	0	0
	модиф.	26,7	18,4	8,9	10

* Модификацию проводили при инкубации 20 нМ фермента со 120 нМ п-ХМБ.

метрически. Эта разность и соответствует оксидазной активности. Последнюю определяли также с помощью каталазы. Из схемы II видно, что в оксидазной реакции образуется пероксид водорода эквимолярно расходу кислорода. Если бы вся остаточная активность была оксидазной, то в случае добавления в реакционную смесь каталазы половина поглощенного кислорода должна была вернуться в реакционную среду согласно схеме



Наблюдаемое в нашем случае отклонение от подобной стехиометрии указывает на то, что реакция ферментативного окисления протекает одновременно по двум механизмам: оксидазному и оксигеназному. Приведенные в таблице значения уровня оксидазной активности двумя методами дают неплохое совпадение. Добавление к модифицированному ферменту избытка 2-меркаптоэтанола восстанавливает оксигеназ-

ную активность ЛМО до 80%, при этом оксидазная активность полностью утрачивается.

Таким образом, ЛМО как из *Ps. putida* ВКМ В-1458Д, так и из *Ps. fluorescens* 011 действительно проявляет способность к трансформации под действием п-ХМБ.

Авторы выражают благодарность Аустре Лишман за любезное предоставление штамма *Ps. fluorescens* 011 и Н. И. Мкртчян за выполнение микробиологической части работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. Э. Мол. биология, 10, 713, 1976.
2. Зейналов Т. А. и др. Радиобиология, 15, 16, 1975.
3. Takeda H., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 241, 2733, 1966.
4. Yamauchi T., Yamamoto S., Hayashi O. J. Biol. Chem., 248, 3750, 1973.

Поступило 13.XI 1986 г.

Биол. ж. Армения, т. 40, № 3, 223—227, 1987

УДК 539.16.047:611/612

ЭНЗИМОДОЗИМЕТРИЯ КАК МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ОТ ВНЕШНЕГО БЕТА-ОБЛУЧЕНИЯ

В. Б. МАТЮШИНЧЕВ, Н. Б. АМПИЛОВА, Н. Ю. БАЛАНИНА, И. Н. СОКОЛОВ

Ленинградский государственный университет им. А. А. Жданова

Аннотация — С помощью множественного регрессионного анализа изучена связь уровней 16-ти ферментных показателей с дозой (30—100 Гр) внешнего бета-облучения крыс. Отобрана группа из 9-ти эффективных тестов. Показана перспективность использования энзимодозиметрии для отбора признаков, информативных в отношении оценки тяжести постлучевых нарушений.

Անոտացիա — Ընդմիակի ռեգրեսիոն անալիզի օգնությամբ ուսումնասիրված է 16 ֆերմենտային ցուցանիշների մակարդակների կապը արևելական արտաքին ռեյոն-համադրության դոզայի (30—100 Գր) հետ: Ընտրված է 9 էֆեկտիվ տեսակից կապված մի խումբ: Ցույց է տրվում կլինիկականորեն օգտագործման հնարավորությունը Էնզիմոդոզիմետրիայի լատենտության նկատմամբ վնասվածության գնահատման մեթոդների համակարգի ընտրության համար:

Abstract — By means of multivariate regression analysis the relationship of 16 enzymatic indices levels with the dose (30—100 Gray) of rats outward beta-irradiation has been studied. A group has been selected, consisting of 9 effective tests. The perspectiveness of enzymatic dosimetry utilization for selection of indices, informative with respect to estimation of the heaviness of postirradiation breaches, has been shown.

Ключевые слова: ферменты, бета-излучение, регрессионный анализ.

Хотя проблема биологического тестирования лучевого поражения организма еще далека от окончательного решения, признается, что значительные успехи в этой области могут быть достигнуты на путях биохимических исследований.

мического мониторинга сопутствующих изменений. Одними из наиболее перспективных радионидикаторов считаются ферментные показатели [2]. Правда, до последнего времени фактически данными для четкой и обоснованной аргументации подобной точки зрения специалисты не располагали, поскольку серьезных, систематических исследований вопроса не предпринималось. Лишь недавно в представления о диагностических возможностях энзиматического подхода была внесена определенная ясность [4]. Выявлена несостоятельность ставки на единичные признаки. Продемонстрировано, что и целом существенны не те или иные тесты сами по себе, а именно ферменты, т. е. буквально некоторая совокупность показателей, имеющая конкретную сферу применимости. Причем реализация потенциала комплексной оценки требует специальной адекватной методологии, основанной на многомерности эксперимента и анализа его результатов с обязательной дифференциацией условий лучевого воздействия. Как было с убедительностью показано, при объединении индивидуальных параметров и умелом использовании кооперативного эффекта разрешающая способность энзимондикации резко возрастает [3, 5, 6]. Общая ситуация поэтому выглядит сейчас благоприятной. Вместе с тем нельзя не отметить, что базовые исследования выполнены в плане ретроспективной оценки величин лучевой нагрузки и соответствующие выводы сделаны в предположении адекватности энзимодозиметрии характеристике тяжести поражения. Последнее допущение произвольно уже в силу заведомой нереальности создания биохимического дозиметра (как было показано, тестирующие свойства ферментных показателей изменчивы и определяются не только уровнем радиационного воздействия). В подобной обстановке для большей основательности прогностических заключений необходим завершающий штрих — подтверждение правомерности сделанных экстраполяций. По-видимому, лучший способ установления истины в данном случае состоит в параллельном анализе дозиметрических и индикаторных кондиций совокупности одних и тех же показателей. Целью настоящей работы явилось проведение именно такого сравнительного исследования.

Материал и методика. Использовали фактический материал работ [5, 6], выполненный ранее на беспородных половозрелых белых крысах-самцах, подвергнутых целенаправленному бета-облучению от криптона-85 в дозах 30–100 Гр. с интервалом 10 Гр. Напомним, что через 14 сут после лучевого воздействия (т. е. в момент, когда различия в проявлениях кожной клиники, определяющей в конечном счете судьбу особи при избранной форме облучения, становятся отчетливо заметны) животных сортировали по степеням поражения и забивали. В коже и плазме крови определяли уровни активности ряда ферментов. Полученный цифровой массив для облегчения ориентации в многомерной структуре выявленных фактов подвергали компонентному анализу. В итоге предположение о способности определенной совокупности биохимических параметров обеспечить успешную радиоэнзимондикацию получило объективное подтверждение. Были выявлены признаки, совместный учет которых позволяет охарактеризовать полностью весь диапазон клинических сдвигов в состоянии кожных и кровяных животных. В настоящем исследовании пул имеющихся первичных биохимических измерений был перераспределен по дозам облучения. На каждую из 8-ми примененных доз приходилось по 20 подопытных и 8 интактных особей. Активность, отмеченную у облученных крыс, выражали в долях от принятой за единицу средней активности в со-

ответствующей контрольной группе. Нормированные таким образом данные обрабатывали на ЭВМ ЕС-1045 по стандартной программе множественного регрессионного анализа. Оценивали параметры линейных уравнений вида: $y = b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_l x_l$, где y — средняя величина дозы при значениях $x_1, x_2, \dots, x_l$ ферментных показателей, b_0 — свободный член, $b_1, \dots, b_l$ — частные коэффициенты регрессии. Поскольку были проведены две независимые серии экспериментов (серия 1: в коже и плазме крови крыс регистрировали уровни активностей аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, дегидрогеназ пентозофосфатного пути, лактатдегидрогеназы, обозначаемые далее как АСТК, АСТП, АЛТК, АЛТП, ЩФК, ЩФП, ДПК, ДПП, ЛДГК, ЛДГП; серия 2: активности кислой ДНКазы (ДКК, ДКП), щелочной ДНКазы (ДЩК, ДЩП), альфа-амилазы (АМК, АМП), найдены характеристики двух таких уравнений связи совокупности экзогенных биохимических признаков с дозой бета-излучения.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты представлены в таблице. Видно, что оптимистическая точка зрения, сформированная

Показатели связи уровней энзиматической активности с дозой бета-излучения

Серия	Фермент	Характеристики уравнений множественной регрессии						
		b_1	b_2	b_0	r_1^2	r_2^2	R^2	$\frac{2^*R}{K}$
1	АСТП	-9.50	0.039					
	АСТК	-31.98*	0.650					
	АЛТП	4.05	0.010					
	АЛТК	7.85	0.046					
	ЩФП	7.95*	0.101	67.40	12.38	10.34	0.756	0.047
	ЩФК	0.69*	0.010					
	ЛДГП	1.22	0.003					
	ЛДГК	10.32*	0.069					
	ДПП	-5.74*	0.068					
2	ДПК	-1.52	0.004					
	ДКП	6.81*	0.152					
	ЛКК	9.21*	0.151					
	АМК	3.06	0.034	53.45	31.55	14.87	0.652	0.075
	АМП	3.16*	0.090					
	ДЩП	0.02	0.013					
	ДЩК	-22.39*	0.560					

* — $p \leq 0.05$.

ся под влиянием итогов компонентного анализа, находит в них полную поддержку. Так, достоверные величины F-критерия не оставляют сомнения в работоспособности избранных линейных моделей. Общая адекватность выведенных интерполяционных формул исходным цифрам косвенно подтверждается высокими значениями коэффициентов детерминации (R^2): для серий 1 и 2 учитывается соответственно 76 и 65% от общей дисперсии дозы, т. е. совокупность независимых биохимических переменных оценивает большую часть принятого в эксперименте варьирования лучевой нагрузки. Масштаб средних ошибок аппроксимации (е) — отклонений расчетных значений результативного признака от фактических — также говорит об удовлетворительной точности предсказания [1]: ретроспективно доза определяется с погрешностью в 10—15%. Впрочем, качественное различие двух систем показателей в индивидуальных совокупностях отчетливо видно даже невооруженным глазом:

информативность массива данных серии 1 явно выше. Возможности регрессионного уравнения, построенного на материале серии 2, выглядят скромнее не только по критериям F , R^2 , ϵ , но и по величине остаточной дисперсии (δ_2^2).

Особое внимание, естественно, привлекают значения коэффициентов b_j , позволяющие решить вопрос о вкладе отдельных энзиматических показателей в оценку лучевой нагрузки. Чем больше величина частного коэффициента регрессии, выражающего количественную зависимость уровня воздействия от переменной x_j при исключении влияния всех остальных признаков, тем значительнее степень ее участия в общей характеристике целевой функции. Прогностическая неоднородность состава апробированных совокупностей тестов несомненна. Статистически значимой связью с дозой излучения в блоке данных серии 1 обладают АСТК, ЩФП, ЩФК, ЛДГК, ДПП, а в серии 2 — ДКП, ДКК, АМП, ДЩК. Эти же констелляции выделяются и относительной долей вклада признаков в прогнозирование дозы (δ_{x_i}), для каждого из них превышающей величину $2 \frac{10}{R}$ [7]. Использование критерия δ_{x_i} позво-

ляет ранжировать показатели в соответствии с их реальной эффективностью и определить такой порядок следования в группах по снижению разрешающей способности: АСТК, ЩФП, ЛДГК, ДПП, ЩФК и ДЩК, ДКК, ДКП, АМП. Бесспорно, ведущие позиции в сериях занимают АСТК, концентрирующая 65% информационной емкости соответствующей батареи тестов, и ДЩК, берущая на себя 56% от общей результативности другой совокупности. Как легко подсчитать, суммарный реестр показателей, имеющих значение для прогнозирования дозы, включает всего 9 элементов из 16-ти фиксировавшихся в ходе проведенных экспериментов независимых переменных, т. е. остальные 7 признаков ввиду их незначительности можно исключить из рассмотрения. Поэтому не вызывает сомнения, что в рамках апробированных групп биохимических тестов достигнутая точность предсказания способна увеличиться даже за счет выбраковки засоряющих систему балластных показателей, не говоря уже о возможности использования резервов повышения дозиметрического потенциала анализа, опирающихся на механическое объединение всех 9-ти эффективных регрессоров в один кластер, а также на чисто статистические приемы.

Впрочем, в повторной обработке данных нет необходимости, убедительность выводов гарантируется и без этого. Поскольку центральные тенденции выявлены достаточно четко, введение в поле зрения каких-либо дополнительных материалов представляется излишним. Даже не прибегая к углубленному изучению редуцированных матриц первичных данных, мы вправе констатировать высокий биодозиметрический статус групповой оценки. Подобное заключение созвучно мнению о больших возможностях системного подхода к ферментной радиодиагностике. Однако важнее другое — исследование дозовой зависимости не только подтвердило перспективность использования многомерной энзимонди-кации, но и дало результаты, согласующиеся с итогами выполненного

ранее компонентного анализа пригодности ферментных показателей для характеристики в аналогичных условиях степени поражения особей.

Особенно примечательно то, что набор из 9-ти признаков, хорошо измеряющих дозу бета-излучения, по своему составу оказался идентичным обьему тестов, способных при совместном их учете полностью дифференцировать тяжесть постлучевых нарушений [5, 6]. Правда, как оказалось, в каждом из случаев при формальном тождестве компонентов прогностической системы перед нами качественно своеобразная совокупность, имеющая обособленную структуру приоритетов сингулярных показателей, особое соотношение их биоиндикаторных кондиций. И это весьма существенно, так как предохраняет от еще встречающегося отождествления биодозиметрии с регистрацией выраженности поражения индивида. Между тем поглощенная доза излучения и степень вызванных ею нарушений биологически не эквивалентны, они связаны лишь более или менее тесной корреляцией, но отнюдь не строгой функциональной зависимостью, с чем и необходимо считаться. Реакция живого объекта на одно и то же влияние — величина переменная, контролируемая рядом условий, поэтому практически следует ориентироваться на выявление именно тяжести поражения как определенного состояния организма. Конечно, характеристика дозы есть первое и наиболее строгое приближение к оценке конкретной силы воздействия, ибо уровень радиационной нагрузки позволяет с достаточной уверенностью судить об ущербе, нанесенном особи и клинически проявляющемся позднее. То, что интуитивно угадывается, априори подкреплено материалами проведенного эксперимента. При всей своей условности и ограничениях энзимодозиметрию, очевидно, можно использовать в качестве высокоадекватной модели учета общей лучевой нагрузки. Во всяком случае баланс соответствующих фактов однозначно указывает на перспективность ее использования для отбора признаков, информативных в отношении оценки тяжести пострadiационных нарушений при внешнем бета-облучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королев Ю. Г. Метод наименьших квадратов в социально-экономических исследованиях. М., 1980.
2. Мазурик В. К. Радиобиологические основы биохимической индикации лучевого поражения. В кн. Итоги науки и техники. Серия «Радиационная биология», 3, 78—102. М., 1980.
3. Матюшичев В. Б. Биолог. ж. Армения, 38, 3, 239—245, 1983.
4. Матюшичев В. Б. О возможности энзиматического тестирования радиационного поражения организма. Деп. в ВНИИТИ, № 1793-85 от 13 марта 1985.
5. Матюшичев В. Б., Корникова В. А. Биолог. ж. Армения, 35, 1, 35—41, 1982.
6. Матюшичев В. Б., Корникова В. В., Таритович В. Р., Тимофеева О. Е., Верещагина Е. М. Биолог. науки, 34, 9, 40—41, 1981.
7. Мисюк Н. С., Мистичин А. С., Кузнецов Г. Л. Корреляционно-регрессионный анализ в клинической медицине. М., 1975.

Поступило 27.11.1986 г.

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ТРОМБОЦИТЫ—СОСУДИСТАЯ СТЕНКА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ

С. Э. АКОПОВ, А. А. ХАРАТЯН, Э. С. ГАБРИЕЛЯН

Институт медицинской радиологии МЗ Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Облучение приводит к нарушениям баланса метаболитов арахидоновой кислоты в системе тромбоциты—сосудистая стенка, с развитием внутрисосудистой агрегации тромбоцитов, вызывающим гиперагрегацию и нарушение гемостаза в разгаре заболевания. Процесс может значительно усиливаться при воздействии различных биорегуляторов. Терапия геморрагического синдрома при лучевой болезни должна быть направлена не только на увеличение числа кровяных пластинок, но и прежде всего на восстановление их функциональной активности.

Անոտացիա — Քրոմոցդրոնների պատ սխառնում էառագայթումը քերում է առախրդոնային թթվի մետաբոլիտների համաառաղչոթյան խանգարման՝ զարգացնելով ներանոթային թրոմբոցիտային ագրեգացիա, որի հետ մեկտեղ զարգանում է թերագրեգացիա և աղյուսականգի խանգարում հիվանդության բուռն զարգացման յրանում: Տարբեր կենսակարգավորիչների ներգործության զնչրում այդ երևույթը կարող է բավականին ուժեղանալ: Էառագայթային հիվանդության մամանակ աղյուսանոթային համախտանիշի թերապիան պետք է ուղղված լինի ոչ միայն թրոմբոցիտների քանակի աղելագմամը, այլ նախ և առաջ նրանց շունկչրոնալ վերականգնմանը:

Abstract—The irradiation induces the alteration in the balance of arachidonic acid metabolites in platelets-vascular wall system, followed by the development of intravascular platelet aggregation, causing hypoaggregation and imbalance of homeostasis in the acute phase of disease. The application of some bioregulators, gives a rise to this process. Therapy of hemorrhagic syndrome during ray disease must be directed not only towards the increase of blood platelets number, but also to the restoration of their functional activity.

Ключевые слова: тромбоциты, сосудистая стенка, облучение, эйкозаноиды, катехоламины.

Упрощенный взгляд на механизмы развития геморрагического синдрома как следствие только тромбоцитопении постепенно уступает место созданию сложности, многокомпонентности его патогенеза, включающего не «чистую» гипокоагуляцию, а напротив, активацию системы гемостаза с развитием синдрома диссеминированного свертывания крови (ДВС) [9]. Известно, что весьма важным фактором в развитии синдрома ДВС, как и вообще любых гемостатических расстройств, являются нарушения функционального состояния тромбоцитов, однако вопрос о характере этих изменений при облучении остается малознанным и полон противоречий. Кроме того, в большинстве работ функциональное состояние тромбоцитов анализируется в отрыве от состояния сосудистой стенки, а между тем известно, что тромбоциты и сосудистая стенка образуют единую динамическую систему, равновесие в которой, связанное как с состоянием кровяных пластинок, так и антиагрегантной ак-

тивностью сосудов, определяет полноценность тромбоцитарно-сосудистого гемостаза [2]. Наконец, практически не исследованы изменения реактивности системы тромбоциты-сосудистая стенка при воздействии физиологических биорегуляторов, в частности, катехоламинов. В настоящем сообщении приведены результаты изучения этих аспектов патогенеза геморрагического синдрома при облучении.

Материал и методика. Исследования проведены на крысах линии Вистар массой 150–180 г. Острую лучевую болезнь вызвали однократным общим облучением γ -лучами ^{60}Co в дозе 6 и 8 Гр, при мощности дозы 0,33 Гр/мин, кожно-фокусном расстоянии 100 см. Кровь забирали у наркотизированных крыс из сонных артерий и стабилизировали цитратом натрия. Агрегацию тромбоцитов на агрегометре, собранном на базе спектрофотометра Specord ViV ViS (ГДР). Прибор позволяет работать при низком содержании тромбоцитов в пробе (до 90000 кл/мкл). Агрегацию тромбоцитов индуцировали АДФ (10^{-4} М), ворадреналин добавляли в пробу совместно с АДФ в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М, ацетилсалициловая кислота— $5 \cdot 10^{-5}$ М. Антиагрегационную активность сосудистой стенки оценивали по [10].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов у облученных животных (6 Гр) увеличивается уже с первых часов после облучения. Гиперагрегируемость кровяных пластинок сохраняется в 1-й и 3-й день после облучения, но к 7-му дню резко снижается. Снижение способности тромбоцитов к агрегации прогрессирует к 10-му дню, а к 14-му прослеживается слабая тенденция к увеличению агрегируемости кровяных пластинок (табл.). Параллельная оценка антиагрегантной активности зорты по-

Влияние облучения на систему тромбоциты—сосудистая стенка

Срок наблюдения	6 Гр		8 Гр	
	Степень агрегации тромбоцитов, %	Антиагрегантная активность зорты, %	Степень агрегации тромбоцитов, %	Антиагрегантная активность зорты, %
3 ч	$24.6 \pm 2.15^*$ n=17	80.4 ± 2.8 n=18	$36.0 \pm 3.2^{**}$ n=12	70.6 ± 3.4 n=12
1 день	$30.6 \pm 2.3^{**}$ n=17	$65.1 \pm 3.9^{**}$ n=19	$30.3 \pm 4.9^*$ n=12	$56.7 \pm 4.6^*$ n=12
3 день	$29.4 \pm 2.4^{**}$ n=17	$63.6 \pm 4.6^*$ n=19	$8.45 \pm 1.2^*$ n=12	$58.6 \pm 4.5^*$ n=12
7 день	13.0 ± 1.9 n=17	$49.7 \pm 4.0^{**}$ n=19	$2.6 \pm 1.2^{**}$ n=11	59.5 ± 5.2 n=11
10 день	7.03 ± 1.1 n=18	$59.7 \pm 4.3^*$ n=20	—	—
14 день	$7.65 \pm 0.95^*$ n=9	66.4 ± 7.6 n=13	—	—
Контроль	15.7 ± 1.06 n=18	84.1 ± 2.43 n=20	15.7 ± 1.06 n=19	84.1 ± 2.43 n=20

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

казала, что в первые часы после облучения существенных изменений в ней не происходит. Нужно отметить, что хотя усредненные данные не

отличаются от контрольных, они носят весьма переменный характер. у части животных наблюдалось понижение антиагрегантной активности сосудов, а у других даже повышение. В 1-й день после облучения отмечается отчетливое понижение антиагрегантной активности сосудов, прогрессирующее на 3- и 7-е сутки лучевой болезни.

Представляло интерес сравнение изменений функционального состояния системы тромбоциты—сосудистая стенка при различных дозах облучения. Оказалось, что при облучении в дозе 8 Гр агрегируемость тромбоцитов возрастает только в первые часы и 1-й день после облучения, но уже к 3-м суткам она сильно падает, а к 7-м суткам практически не определяется. Аналогичным образом антиагрегантная активность сосудистой стенки отчетливее понижается уже в первые часы после облучения, продолжая снижаться и в последующие сроки наблюдений (табл.). Таким образом, в скрытом периоде лучевой болезни наблюдается сдвиг равновесия в системе тромбоциты—сосудистая стенка в сторону увеличения агрегационного, тромбогенного потенциала. Внутрисосудистая агрегация кровяных пластинок, развивающаяся в этих условиях, по-видимому, служит основой образования обнаруживаемых иногда при радиационных поражениях внутрисосудистых тромбов [3].

Подобный сдвиг гемостатического потенциала делает весьма опасным любое эндо- или экзогенное воздействие, приводящее к изменениям функционального состояния системы тромбоциты—сосудистая стенка. В качестве одного из возможных типов воздействия нами было изучено влияние симпатомиметиков. Исследования показали, что норадrenalин в использованной концентрации, самостоятельно не индуцирующий агрегацию, потенцирует АДФ-индуцированную агрегацию у контрольных животных на 24% (рис. 1). Этот эффект норадrenalина существенно

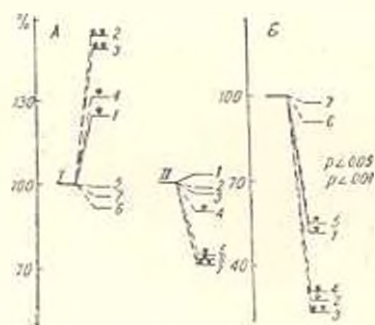


Рис. 1.

Рис. 1. А. Влияние норадrenalина на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (I) и антиагрегантную активность сосудов (II). Б. Влияние АСК на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. 1—контроль; 2—3 ч после облучения; 3—1 день после облучения; 4—3 день после облучения; 5—7 день; 6—10 день, 7—14 день. По оси ординат эффекты в процентах от исходной величины.

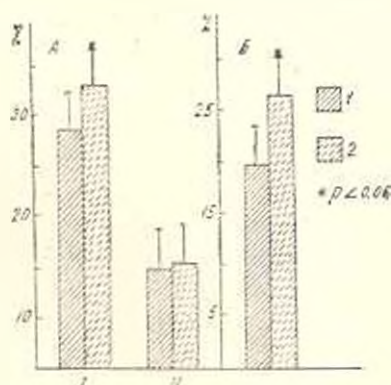


Рис. 2.

Рис. 2. А. Влияние норадrenalина на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ до (I) и после (II) обработки АСК. Б. Влияние норадrenalина на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой. 1—исходный уровень агрегации; 2—после добавления норадrenalина.

возрастает в первые часы, 1- и 3-й день после облучения, в разгаре же лучевой болезни он исчезает и появляется нечетко выраженная способность норадреналина подавлять агрегацию (рис. 1). Напротив, на антиагрегантную активность сосудистой стенки контрольных животных норадреналин не оказывает выраженного влияния. Наблюдался случай, когда этот агент как потенцировал, так и ослаблял антиагрегантный эффект сосудистых сегментов. Это соответствует результатам, ранее полученным на сосудах различных экспериментальных животных и человека [4]. В скрытом периоде лучевой болезни действие норадреналина на антиагрегантную активность аорты остается нечетким, в разгаре же заболевания проявляется заметная и достоверная ($P < 0,05$) способность его подавлять антиагрегантный эффект сосудов (рис. 1).

Прежде чем обсуждать природу выявленных закономерностей, необходимо отметить, что нарушение равновесия в системе тромбоциты—сосудистая стенка чаще всего определяется дисбалансом в каскаде арахидоновой кислоты и, в частности, изменениями соотношения между образованием тромбоксана A_2 (TXA_2) в кровяных пластинках и простагглина (PGI_2) в сосудистой стенке [2].

Имеются основания полагать, что гиперагрегация тромбоцитов в скрытом периоде лучевой болезни связана с активацией в них каскада арахидоновой кислоты [8]. Об этом же свидетельствует проведенный нами анализ особенностей влияния одного из ингибиторов арахидоновой кислоты на уровне циклооксигеназы—ацетилсалициловой кислоты (АСК). Как видно из рисунка, АСК эффективно блокирует агрегацию тромбоцитов контрольных животных. У облученных животных в первые часы, 1- и 3-й дни после облучения чувствительность клеток к АСК резко повышается ($P < 0,05$). В разгаре же заболевания эффект препарата практически исчезает (рис. 1). По-видимому, это связано с активацией метаболизма арахидоновой кислоты в скрытом периоде заболевания, преобладанием роли эйкозаноидов в процессах активации кровяных пластинок. В разгаре же заболевания арахидоновый каскад истощается, чем и обусловлено исчезновение антиагрегантного эффекта его ингибитора. Понижение антиагрегантной активности сосудов может быть связано с подавлением синтеза в них PGI_2 перекисями жирных кислот, увеличивающимися при облучении. Известно, что перекиси являются мощными ингибиторами простагглицинсинтетазы [2].

По-видимому, при облучении по мере выключения синтеза PGI_2 начинает преобладать процесс образования веществ—проагрегантов. В этих условиях норадреналин, действуя на дестабилизированную, частично редуцированную систему каскада АК в сосудах начинает проявлять отчетливую способность подавлять антиагрегантный эффект сосудов, в частности, за счет увеличения выработки проагрегантом. С другой стороны, эффект норадреналина на тромбоциты также связан с его влиянием на арахидоновый каскад. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что предварительная обработка тромбоцитов АСК приводит к исчезновению, а иногда и к усилению проагрегантного эффекта норадреналина (рис. 2). Об этом же свидетельствует способность норадреналина усиливать агрегацию, индуцированную арахидоновой кислотой

(рис. 2). Естественно, что в условиях активации арахидонового каскада в скрытом периоде лучевой болезни проагрегантный эффект порадриналина значительно возрастает. Итак, облучение приводит к нарушениям баланса метаболитов арахидоновой кислоты в системе тромбоциты—сосудистая стенка в сторону преобладания веществ—проагрегантов. Это вызывает нарушения равновесия в этой системе с развитием внутрисосудистой агрегации тромбоцитов, инициацией, процессов тромбообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В. П. Мед. радиол., 9, 25—31, 1982.
2. Габриелян Э. С., Акопов С. Э. Клетки крови и кровообращение. Ереван, 1985.
3. Гельдман Л., Лиско Г., Гофман Д. Острый лучевой синдром. М., 1981.
4. Габриелян Э. С., Акопов С. Э., Айроян Э. А. и др. В кн.: Физиология, патифизиология и фармакология мозгового кровообращения. Ереван, 39—40, 1984.
5. Габриелян Э. С., Акопов С. Э. В кн.: Поражения сосудистой стенки и гемостат. 121—124, М., 1983.
6. Даниелян С. Б., Эсенбекова С. Радиобиология, 4, 609—619, 1980.
7. Джаракян Г. К., Бутомо Н. В., Голубенцев Б. А. и др. Геморрагический синдром острой лучевой болезни. Л., 1976.
8. Лукьянова Т. Н., Козельская Л. В. Бюлл. эксперим. биол., 12, 33—35, 1983.
9. Сушкевич Г. Н. Мед. радиол., 4, 60—64, 1981.
10. McIntyre P., Pearson L., Gurdan L. Nature, 271, 6—9, 1978.

Получено 20 III 1985 г.

Биол. ж. Армении, т. 40, № 3, 232—236, 1987

УДК 615.917+577.161.3

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЗАЩИТНЫХ НУТРИЕНТОВ ПРИ ДИХЛОРБУТЕНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

П. А. БАКАЛЯН, О. А. АНТОНЯН

Ереванский государственный медицинский институт, кафедра гигиены
санитарно-гигиенического факультета

Аннотация. В условиях хронической дихлорбутеновой интоксикации изучена протекторная роль двух различных сочетаний нутриентов. Показано, что комплекс цистеин-облепиховое масло на фоне высокобелкового рациона более эффективен для поддержания уровня эндогенных антиоксидантов—витамина Е и восстановленных тиолов—и, следовательно, для стабилизации антиоксидантной системы.

Անոտացիա. — Խրոնիկական դիքլորբութենով թունաւորման ժամանակ քննարկուեց երկու տարբեր նուտրիենտների յոյս կոմպլեքսը բարձրպրոթէինային սննդամթերքի վրայ: Նկատուի, որ ցիստէին-օբլեպիխի յոյս կոմպլեքսը ավելի արդիւնատու է անտիօքսիդանտների մակարդակը պահպանելու համար: Այս կոմպլեքսը օգնում է ծերային անտիօքսիդանտների՝ վիտամինի E-ի և վերականգնելի թիոլների մակարդակը պահպանելու և, հետևաբար, անտիօքսիդանտային համակարգի կայունացման համար:

Abstract.—In case of chronic dichlorobutene intoxication the protecting role of two different combinations of nutrients are studied and it is proved that the composite of cystein-hippoghaee oil in combination with

high protein ration is more effective for supporting the level of endogenous antioxidants, i. e. vitamin "E" and restored thinks and consequently for the stabilization of antioxidant system.

Ключевые слова: дихлорбутеновая интоксикация, защитные нутриенты, антиоксиданты, липотропный эффект.

Ранее нами в условиях хронической дихлорбутеновой интоксикации было установлено нарушение процесса ассимиляции жира в организме и подавление функциональной активности антиоксидантной системы [4]. Показана также зависимость этих изменений от качественного состава рациона и, в частности, доказано определенное благотворное действие высокобелкового рациона, недостаточное, однако, для стабилизации антиоксидантной системы [2, 3, 5].

В то же время многочисленные литературные данные свидетельствуют о возможности регулирования обменных процессов и связанных с ними систем при различных промышленных интоксикациях путем экзогенного введения ряда нутриентов [1, 6—8].

Целью настоящей работы являлось изучение возможности регулирования функциональной активности антиоксидантной системы путем целенаправленного подбора нутриентов, обладающих липотропным и антиоксидантным действием и способствующих поддержанию уровня витамина Е и восстановленных тиолов—важнейших элементов антиоксидантной системы организма.

В связи с этим были испытаны витамины Е в качестве природного антиоксиданта, являющиеся источниками сульфгидрильных групп серусодержащие аминокислоты цистеин и метионин (последний обладает также выраженным липотропным действием), глутаминовая кислота, широко применяемая в профилактике и лечении профессиональных заболеваний как дезинтоксикационное средство, и облепиховое масло, природный источник антиоксидантов и биологически активных веществ.

Материал и методика. Исследования проводили на 34 белых крысах-самках с исходной массой 140 г, которым ежедневно на протяжении 5 месяцев перорально вводили 200 мг/кг масляного раствора 3,4-дихлорбутена-1. Первую контрольную группу животных составили 11 intactных крыс. По истечении 3,5 месяца от начала затравки III, IV и V группы животных были переведены на рацион с увеличенной до 25% (по калорийности) долей белка за счет добавления казеина и яичного белка, при 26% жира и 49% углеводов, а I и II группы продолжали содержать на стандартном рационе кивариума, в котором основные компоненты соответственно составляли 18, 26 и 56%. Все группы, за исключением intactной, подвергали затравке до конца эксперимента. На протяжении всего периода затравки IV группа животных ежедневно перорально за полчаса до кормления получала по 25 мг/кг глутаминовой кислоты и метионина в виде 0,5%-ного водного раствора и внутривенно—1 мг/кг витамина Е в виде 20 мг% водной эмульсии токоферилацетата, а пятая группа—перорально 2,5 мл/кг облепихового масла и 25 мг/кг цистеина в виде 0,5%-ного водного раствора.

По окончании эксперимента животных обезглавливали под эфирным наркозом, изолировали печень, мозг и кровь, в которых определяли содержание сульфгидрильных групп методом Седлака и Лидсея [11] по цветной реакции с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Фотометрию цветного комплекса проводили на СФ-4А при 412 нм. Количество восстановленных тиолов рассчитывали по коэффициенту молярной экстинкции, равному 13100, и выражали в мкмольях на граммы сырой ткани или 100 мг эквивалента крови.

Витамин Е определяли по методу Бири [9] и модификации Кавдена и Бюрисона [10], основанному на способности токоферолов восстанавливать окисное железо в закисное, дающее окрашенное комплексное соединение с α - α -дипиридиллом. От каротинов и витамина А освобождались при помощи хроматографической колонки с Al_2O_3 . Фотометрию цветного комплекса проводили на СФ-4А при 516 мμ. Результаты выражали в мкг/мл сыворотки крови или мкг/г сырой ткани.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным результатам, содержание животных на высокобелковом рационе способствует достоверному по сравнению со стандартным рационом повышению содержания витамина Е в печени на 29%, а в крови — на 36,6% (табл. 1). Дополнительное комплексное введение витамина Е, глутаминовой кислоты и метионина на фоне высокобелкового рациона способствует появлению выраженной тенденции к повышению уровня эндогенного токоферола как в печени ($t_1=1,6$), так и в крови ($t_2=1,7$).

Таблица 1. Изменение уровня витамина Е у крыс на фоне применения защитных нутриентов при хронической дихлорбутеновой интоксикации

Группы	СП	Витамин Е	
		печень, мкг/г	сыворотка крови, мкг/мл
Контроль	$M \pm m$ n	$37,4 \pm 2,2$ 7	$12,6 \pm 0,84$ 7
Затравка	$M \pm m$ p_1 n	$23,1 \pm 1,84$ $<0,001$ 7	$7,1 \pm 0,63$ $<0,001$ 7
Затравка + высокобелковый рацион	$M \pm m$ p_1 p_2 n	$29,8 \pm 2,3$ $<0,05$ $<0,05$ 7	$9,7 \pm 0,95$ $<0,05$ $<0,05$ 7
Затравка + высокобелковый рацион + вит. Е + глутаминовая к-та + метионин	$M \pm m$ p_1 p_2 n	$35,3 \pm 2,53$ $>0,05$ $>0,05$ 8	$11,8 \pm 0,9$ $>0,05$ $>0,05$ 8
Затравка + высокобелковый рацион + облепиховое масло + цистеин	$M \pm m$ p_1 p_2 n	$41,7 \pm 3,15$ $>0,05$ $<0,01$ 8	$14,1 \pm 0,72$ $<0,05$ $<0,001$ 8

p_1 — по сравнению с контролем, p_2 — по сравнению со стандартным рационом, p_3 — по сравнению с высокобелковым рационом.

Введение другого комплекса защитных нутриентов — облепихового масла и цистеина — более эффективно. У этой группы животных по сравнению с группой, содержавшейся на высокобелковом рационе, наблюдалось достоверное повышение уровня витамина Е в печени на 39,9%, в крови — на 45,4%.

При изучении содержания сульфгидрильных групп в печени, мозге и сыворотке крови в условиях дополнительного экзогенного поступления нутриентов при хронической дихлорбутеновой интоксикации выявлена аналогичная картина (табл. 2). Содержание животных на высокобелковом рационе по сравнению со стандартным приводит к появлению выраженной тенденции к повышению содержания как общих, так

Таблица 2 Изменение содержания сульфгидрильных групп в тканях крыс на фоне применения защитных нутриентов при хронической ДХБ-интоксикации

Группы	СН	Общие	Свободные	Общие	Свободные	Общие	Свободные
		печень, ммоль/г		мозг, ммоль/г		сыворотка крови, ммоль/100 мл	
Контроль	$M \pm m$ II	20,8±0,82 II	3,27±0,17 II	14,7±0,45 II	1,55±0,095 II	31,3±1,73 II	3,51±0,15 II
Затравка + стандартный рацион	$M \pm m$ p_1 II	17,5±1,07 <0,05 8	2,69±0,14 <0,02 8	13,0±0,67 =0,05 8	1,1±0,15 <0,05 8	27,2±2,1 <0,02 8	2,64±0,14 <0,001 8
Затравка + высокобелковый рацион	$M \pm m$ p_1 p_2 II	19,1±0,93 >0,05 >0,05 8	3,16±1,28 >0,05 <0,05 8	14,1±0,72 >0,05 >0,05 8	1,63±0,18 >0,05 <0,05 8	31,1±2,25 >0,05 >0,05 8	3,18±0,17 >0,05 <0,05 8
Затравка + высокобелковый рацион + витамин Е + глутаминовая кислота + метионин	$M \pm m$ p_1 p_2 II	28,3±1,24 <0,001 <0,001 10	5,29±0,36 <0,01 <0,01 10	15,9±0,41 >0,05 <0,05 10	2,16±0,21 <0,02 >0,05 10	33,8±1,9 <0,05 <0,01 10	3,89±0,2 <0,05 <0,02 10
Затравка + высокобелковый рацион + пивные + облепиховое масло	$M \pm m$ p_1 p_2 II	26,1±1,31 <0,01 <0,001 8	7,76±0,55 <0,001 <0,001 8	16,2±0,65 >0,05 <0,05 8	2,41±0,19 <0,001 <0,01 8	41,6±2,21 <0,02 <0,01 8	3,65±0,23 >0,05 >0,05 8

p_1 — по сравнению с контролем, p_2 — по сравнению со стандартным рационом, p_3 — по сравнению с высокобелковым рационом

и свободных сульфгидрильных групп в печени, мозге и крови. Дополнительное комплексное введение витамина Е, метионина и глутаминовой кислоты способствует статистически достоверному по сравнению с группой, получавшей высокобелковый рацион, повышению содержания как общих, так и свободных тиоловых групп во всех тканях в среднем на 32%.

Экзогенное поступление цистеина и облепихового масла, как и в случае с витамином Е, более эффективно и характеризуется повышением показателей контрольной группы.

Данная сравнительная оценка влияния испытанных комплексов нутриентов, можно отметить, что комплекс цистеин—облепиховое масло в сочетании с высокобелковым рационом более эффективен для поддержания необходимого при хронической дихлорбутеновой интоксикации уровня важнейших эндогенных антиоксидантов—витамина Е и восстановленных тиолов и, следовательно, для стимулирования активности и стабилизации антиоксидантной системы.

Полученные результаты отражены в методических рекомендациях по профилактическому питанию рабочих, подвергающихся в условиях производства токсическому воздействию 3,4-дихлорбутена-1, и могут быть использованы также при разработке алиментарной профилактики других патологий, патогенетически обусловленных подавлением функциональной активности антиоксидантной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонян О. А. Канд. дисс., Ереван, 1982.
2. Антонян О. А. Бюлог. ж. Армения, 38, 4, 364, 1985.
3. Антонян О. А., Бакалян П. А. Ж. экспер. и клин. мед., 25, 3, 233, 1985.
4. Бакалян П. А., Антонян О. А. Ж. экспер. и клин. мед., 24, 5, 518—521, 1984.
5. Бакалян П. А., Антонян О. А. Ж. экспер. и клин. мед., 25, 4, 322—325, 1985.
6. Бондарев Г. И., Стасенкова К. П., Виссариснова В. Я. Вопросы питания, 4, 55—58, 1976.
7. Земянская Т. А. Автореф. канд. дисс., М., 1986.
8. Стасенкова К. П., Бондарев Г. И., Магакова Н. Б. Тез. докл. Всесоюзн. конф. «Теоретические и практические аспекты изучения питания человека», 1, 382, М., 1980.
9. Rierl J., Jeets L., Belacady B., Andrews E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117, 1, 131 1964.
10. Kayden H., Bjerrum I. Ann. N. Y. Acad. Sci., 263, 127, 1972.
11. Sedlak J., Lindsay R. Analyt. Biochem., 25, 192, 1968.

Поступило 28.05.1986 г.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ pH И ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ
КОМПОНЕНТОВ $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ У *LACTOBACILLUS SALIVARIUS*

Е. С. ОГАНДЖАНИН, А. А. ТРЧУНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, внутриклеточный pH, $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, мембранный потенциал, трансмембранный градиент pH.

Как *S. faecalis* и другие грамположительные, так и грамотрицательные бактерии поддерживают постоянный внутриклеточный pH. В поддержании постоянства pH существенная роль принадлежит мембранным протонным насосам и системам сопряженного с H^+ переноса ионов и веществ [2, 3, 5, 7]. При этом на мембране существует разность электрохимических потенциалов для H^+ ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$) в форме двух компонентов: мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и трансмембранного градиента pH (ΔpH). Распределение энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ между ними зависит от условий среды и потребностей клетки [2, 3, 6].

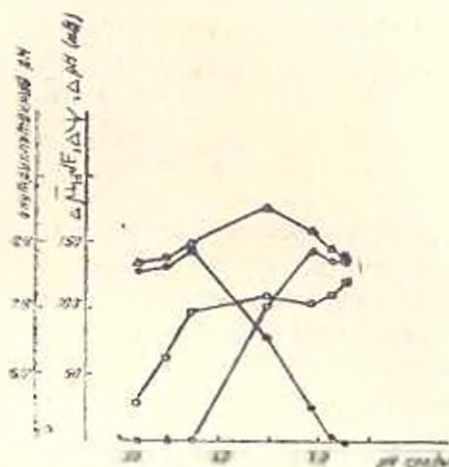
Данная работа посвящена определению внутриклеточного pH и $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ у грамположительных молочнокислых бактерий.

Материал и методика. В работе использовали бактерии *L. salivarius* ATCC 3071 из Американской коллекции типовых культур, предоставленные С. Тер-Казарьяном (Ереванский зооветинститут). Бактерии хранили в образе молока, их выращивание и подготовка к эксперименту не отличались от ранее описанных для *E. coli* [4]. Размеры бактерий определяли с помощью микроскопа «Biomet» с окуляр-микрометром: внутренний объем составлял 5.10×10^{-12} см³. Титр бактерии определяли методом фенилфосфония (TPP⁺) и салциловой кислоты (Sigma, США) между клеткой и средой соответственно, определяемым с помощью соответствующих селективных электродов, изготовленных в Вильнюсском госуниверситете им. В. Капсукаса под руководством проф. Л. Гринюса.

Результаты и обсуждение. *L. salivarius* ATCC 3071 в свежей среде поддерживают внутриклеточный pH около 7,1 при широком диапазоне значений pH среды, 4,5—7,3 (рис.). При этом ΔpH равен нулю при pH среды 7,4. Эти же бактерии в том же диапазоне значений pH обладают $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ (F —число Фарадея) в пределах 150—170 мВ. С увеличением pH среды от 3,4 до 7,6 $\Delta\psi$ и ΔpH изменяются от нуля до 140 мВ и от 134 мВ до нуля соответственно (рис.), т. е. с увеличением pH среды имеет место перераспределение энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ между $\Delta\psi$ и ΔpH . При

этом максимальные значения $\Delta\mu_{H^+}$ наблюдаются в диапазоне значений pH среды 4,5—6,9.

Отличие этих бактерий от других анаэробных грамположительных бактерий, например от *S. faecalis*, заключается в том, что дезэнергизованные *L. salivarius* в среде с pH 6,0—6,9 обладают высоким $\Delta\psi$ в 95—130 мВ, и то время как дезэнергизованные *S. faecalis* имеют $\Delta\psi$, близкий к нулю [1]. Введение экзогенного источника энергии—глюкозы приводит к незначительному возрастанию $\Delta\psi$ у *L. salivarius*, и то время как у *S. faecalis* наблюдается существенное возрастание $\Delta\psi$, до 150 мВ [1].



Величины внутриклеточного pH (□), $\Delta\mu_{H^+} F$ (Δ), $\Delta\psi$ (○) и ΔpH (●) при различных pH среды у *L. salivarius* ATCC 3071. Бактерии отмыты в растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты в концентрации 20 мМ и перенесены в экспериментальный раствор: активность K^+ 0,96 мМ, ТРР⁺ и салициловая кислота в концентрациях 10^{-6} и $6 \cdot 10^{-5}$ М соответственно. Стандартная ошибка не выходит за пределы обозначения.

Полученные данные позволяют утверждать, что молочнокислые бактерии *L. salivarius* поддерживают постоянный нейтральный внутриклеточный pH, обладают высоким $\Delta\mu_{H^+}$ и что в мембранах этих бактерий функционируют электрогенные системы, отличные от механизмов у *S. faecalis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мартиросов С. М., Варганян А. Г., Петросян Л. С. Биофизика, 27, 467—468, 1982.
2. Николс Д. Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. М., 1985.
3. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
4. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 551—560, 1978.
5. Kobayashi H., Murekami N., Unemoto T. J. Biol. Chem., 257, 13246—13252, 1982.
6. Mitchell P. J. Biochem., 97, 1—18, 1985.
7. Schuldiner S., Padan E. Membranes and Transp., 2, 65—73, N. Y., London, 1982.

Поступило 8.I 1986 г.

ДЕЙСТВИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА ПОКОЯЩИЕСЯ СЕМЕНА *CR. CAPILLARIS*

Ц. М. АВАКЯН, Г. М. АВАКЯН, Р. С. КАГРАМАНЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Ключевые слова: покоящиеся семена *Cr. capillaris*, рентгеновское излучение, синхротронное излучение, влажность, радиационное последствие.

Повышенный интерес к синхротронному излучению (СИ) вызван его уникальными свойствами — высокой интенсивностью, широким сплошным спектром энергии, импульсным характером излучения и др. [2]. — позволяющими ожидать эффекты, отличающиеся от таковых при облучении традиционными радиоизирующими излучениями. Всестороннее детальное изучение радиобиологических особенностей СИ может раскрыть новые стороны биологического действия ионизирующей радиации.

Цель настоящей работы состояла в изучении биологического действия СИ на классическом объекте радиационной генетики и радиобиологии — *Cr. capillaris*.

Материал и методика. В опытах использовали покоящиеся семена *Cr. capillaris* с содержанием воды 3 («сухие») и 10% («влажные»). Выбор семян с такой влажностью не случаен. Они представляют те области влажности, в которых наблюдается соответственно максимальное и минимальное влияние физико-химических модификаторов (кислорода, температуры, пострadiационного хранения) на радиационное повреждение семян. В этих же областях семена проявляют наибольшую и соответственно наименьшую чувствительность к действию радиации [1, 5, 6].

Облучение СИ проводили на синхротронном канале Ереванского электронного кольцевого ускорителя с энергией электронов 4,5 ГэВ. При этом (и в соответствии с конструкцией канала) СИ занимало участок энергии примерно от 1 до 30 кэВ. Для уменьшения интенсивности СИ был применен поглотитель — стеклянная пластинка.

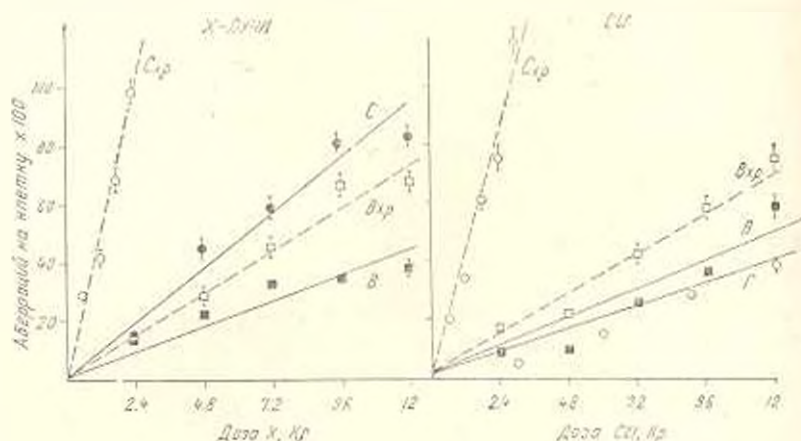
Источником рентгеновских лучей служила установка РУМ-17 с вольфрамовым анодом. Облучение проводили без фильтров при анодном напряжении 200 кВ, токе катода 15 мА. Мощность экспозиционной дозы в обоих случаях составляла 1 кР/мин. Дозы облучения измеряли клиническим дозиметром 27012 (ГДР).

После облучения семена замачивали сразу либо спустя 45 дней пострadiационного хранения в установках, обеспечивающих исходную влажность. В метафазных клетках мериستمов корешков регистрировали хромосомные aberrации по известной методике К-митога [3].

Результаты и обсуждение. На рисунке показаны зависимости частоты хромосомных aberrаций от дозы синхротронного и рентгеновского излучений. В таблице приведены коэффициенты линейной регрессии, рассчитанные для этих зависимостей по методу наименьших квадратов.

Из представленных данных следует, что начальное поражение семян при обеих влажностях после облучения СИ (варианты С и В) примерно одинаково (разница в линии регрессии статистически не значи-

ма), а при дозе 12 кР во влажных семенах хромосомных aberrаций заметно больше, чем в сухих. Между тем рентгеновское облучение повреждало хромосомы в сухих семенах в большей степени—отношение коэффициентов регрессии (ФИД) для вариантов С и В составляет 2,3. О большей чувствительности сухих семян к рентгеновскому излучению (как отмечали выше) свидетельствуют и литературные данные.



Поражение семян *St. capillaris* при облучении рентгеновскими лучами и ГЛ. С—влажность 3%; С_{хр}—С+15 дней хранения; В—влажность—10%; В_{хр}—В+15 дней хранения.

Пострадиационное поражение сухих семян (С_{хр}) было значительным после действия обоих видов излучений. Во влажных семенах (В_{хр}), как и следовало ожидать, эффект хранения слабее, поскольку

Коэффициенты линейной регрессии зависимостей доза—эффект, кР⁻¹

Варианты	СИ	Рентгеновские лучи
С	2.94 ± 0.25	7.57 ± 0.41
С _{хр}	31.0 ± 1.1	38.9 ± 1.6
В	3.63 ± 0.42	3.25 ± 0.27
В _{хр}	5.66 ± 0.26	5.70 ± 0.31

здесь он представлен только медленным компонентом [4]. Заметим, однако, что после облучения СИ этот эффект выражен больше, чем после рентгеновского излучения—ФИД равны соответственно 10,5 и 5,1. Это обусловлено лишь меньшим начальным поражением (С), а конечное поражение (С_{хр}) в обоих случаях практически одинаково.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаян Р. Р., Авакян Г. М., Каграманян Р. С. Студия Биофизика, 95, 1, 1983
2. Куяц К. (под ред.) Синхротронное излучение. Свойства и применение. М., 1981.
3. Немцева Л. С. Метафазный метод учета перестроек хромосом. М., 1970.

4. Atayan R. R. and Gabriellian J. Y. Environ. Exp. Bot., 18, 9—17, 1978.
5. Conger A. D. J. Cellular Comp. Physiol., 58, 27—32, 1961.
6. Conger B. V. Trans. ASAE, 6, 780—784, 1972.

Поступило 13.XI 1986 г.

Биол. ж. Армения, т. 40, № 3, 241—243, 1987

УДК 615.81:577.15.061

НАД-ЗАВИСИМОЕ ОКИСЛЕНИЕ И СОПРЯЖЕННОЕ С НИМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, А. С. ТЕР-МАРКОСЯН

Ереванский государственный медицинский институт, лаборатория
биофизики и молекулярной биологии ЦНИЛ

Ключевые слова: электростатическое поле, митохондрии, окислительное фосфорилирование.

Ответная реакция различных звеньев дыхательной цепи на действие того или иного экзогенного фактора в ряде случаев оказывается неоднотипной [3, 4]. Ранее [5] нами были выявлены существенные сдвиги в НАД-зависимом дыхании и сопряженном с ним фосфорилировании митохондрий печени крыс, подвергшихся действию электростатического поля (ЭСП), что выражалось в основном в разобщении окислительного фосфорилирования (длительность воздействия 1 ч) и подавлении скорости окисления сукцината (длительность воздействия 1 сут и 6 сут по 6 ч ежедневно). Для более полного представления о состоянии энергонакопительной системы митохондрий возникла необходимость исследования НАД-зависимого пути окисления после воздействия ЭСП, результаты которого приводятся в данном сообщении.

Материал и методика. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150—180 г, которых подвергали воздействию ЭСП напряженностью 2000 В/см и продолжительностью 1 ч, 1 сут и 6 сут по 6 ч ежедневно. Животных забивали сразу после воздействия ЭСП. ЭСП создавали при помощи установки конденгаторного типа [1], митохондрии выделяли из печени методом дифференциального центрифугирования [6]. Дыхательную и фосфорилирующую активности митохондрий изучали полярографическим методом [8] на полярографе IP-7 (ЧССР) при помощи модифицированной измерительной ячейки с мембранными электродами Кларка [7] при 26°.

Среда инкубации митохондрий содержала 0,25 М сахарозы, 0,1 М KCl, 0,1 М KH_2PO_4 , 0,5 М MgSO_4 (pH 7,4). В качестве субстрата окисления использовали нитрат.

Измеряли скорости дыхания «покою» (V_2), активного поглощения кислорода с фосфорилированием АДФ (V_2), «отдыха» (V_4) в микроатомах O_2 в минуту на 1 мг белка, рассчитывали время фосфорилирования (Δt) в секундах, величину дыхательного контроля (ДК) по Чапеу, коэффициент АДФ/О.

Количество белка в пробах определяли методом Итзаки [8].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования обобщены в таблице, из которой следует, что воздействие ЭСП длительностью 1 ч и 6 сут по 6 ч приводит к увеличению скорости дыхания «покою» и не ог-

Дыхание и фосфорилирование митохондрий печени крыс, подвергшихся ЭСП

V_2	мктом O_2 в 1 мин на 1 мг белка	Длительность действия ЭСП			
		Контроль	1 час	1 сутки	6 суток (по 6 ч ежедневно)
V_2		0.0205 ± 0.0017 $n=9$	0.0265 ± 0.0023 $n=10$ $t=2.95$	0.0197 ± 0.0004 $n=8$ $t=0.95$	0.0252 ± 0.0012 $n=8$ $t=2.26$
V_3		0.042 ± 0.0060 $n=9$	0.0406 ± 0.0032 $n=10$ $t=0.21$	0.0345 ± 0.0020 $n=8$ $t=1.19$	0.0450 ± 0.0042 $n=8$ $t=0.49$
V_4		0.0280 ± 0.0035 $n=9$	0.0267 ± 0.0016 $n=10$ $t=0.26$	0.0248 ± 0.0016 $n=8$ $t=1.90$	0.0300 ± 0.0017 $n=8$ $t=0.69$
ДК		1.52 ± 0.08 $n=9$	1.58 ± 0.08 $n=10$ $t=0.53$	1.39 ± 0.042 $n=8$ $t=1.41$	1.48 ± 0.64 $n=8$ $t=0.45$
АДФ:О		1.42 ± 0.09 $n=9$	1.54 ± 0.11 $n=10$ $t=0.85$	1.36 ± 0.05 $n=8$ $t=0.61$	1.35 ± 0.21 $n=8$ $t=1.35$
Ж	с/к	136.50 ± 11.03 $n=9$	128.95 ± 8.99 $n=10$ $t=0.52$	157.1 ± 7.172 $n=8$ $t=1.53$	130.70 ± 23.75 $n=8$ $t=0.40$

ражается при этом на других исследованных параметрах. При суточном воздействии обнаруживается тенденция к увеличению ΔI и уменьшению V_3 , V_4 , ДК при неизменных V_2 и АДФ/О.

Анализ полученных данных не выявил глубоких нарушений в функциональной активности цепи НАД-зависимого окисления и сопряженного с ним фосфорилирования, в то время как при окислении сукцината в аналогичных условиях [5] обнаружены значительные сдвиги в параметрах окислительного фосфорилирования митохондрий. Изложенное позволяет заключить, что ФАД-зависимое окисление более лабильно к воздействию ЭСП, чем НАД-зависимое. Это заключение хорошо согласуется с литературными данными [2, 3, 4], указывающими на лабильность сукцинатной фракции дыхания даже при небольших изменениях физиологического состояния.

Сопоставление характерных показателей ФАД- и НАД-зависимых путей окисления и сопряженного с ними фосфорилирования даст основание полагать, что наблюдаемые после воздействия ЭСП изменения в функциональной активности митохондрий происходят в основном за счет нарушений в звене ФАД-зависимого окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Г. Г. Мат-лы конф. мол. уч. посвящ. XXV съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.
2. Кондрашова М. И., Маевский Е. И., Бабаля Г. В. и др. Митохондрии, Биохимия и ультраструктура, 112, М., 1973.
3. Ликьянова Л. Д., Балмухинов Б. С., Уголев А. Т. Кислородозависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние, М., 1982.
4. Маевский Е. И., Кондрашова М. И. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние, 24, Пушкино, 1978.
5. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биол. ж. Армения, 31, 750, 1978.
6. Масолова Н. М., Горская И. А., Шольц К. Ф., Котельникова А. В. Методы современной биохимии, 52, М., 1975.
7. Estabrook R. W. Met. Enzymol., 10, 41, 1967.
8. Rzhakli R., Gill D. Analit. Biochem., 9, 401, 1964.

Поступило 11.XI 1985 г.

Биол. ж. Армения, т. 40, № 3, 243—245, 1987

УДК 636.5:591.147/436

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА КРОВИ КУР РАЗЛИЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

Э. И. МХЧЯН, К. Г. ПЕТРОСЯН, К. Г. ШАГОЯН

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

Ключевые слова: куры-несушки, фракционный состав крови, вителлогенин, липопротеид очень низкой плотности

Активность репродуктивной системы кур зависит главным образом от деятельности половых стероидных гормонов, под влиянием которых у

молодок перед началом яйцекладки увеличивается содержание белков в крови за счет появления фосфопротеидов. Перестройка белкового обмена обусловлена подготовкой организма созревающих молодок к синтезу яичных белков.

Местом синтеза большинства желточных белков является печень. Белки желтка образуются в основном из вителлогенина и липопротеида очень низкой плотности, синтез которых начинается в печени по достижении курами половой зрелости.

Цель настоящего исследования состояла в изучении фракционного состава крови кур-несушек разных пород.

Материал и методика. Исследования проводили на материнских формах трех пород (леггорн, плимутрок и ереванская) с охватом следующих их возрастных периодов в соответствии со сроками физиологического созревания каждой породы: ценополовые зрелые молодки, начало яйцекладки, интенсивность и пик яйценоскости, спад (у переемных кур). Кровь брали из подкрыльцовой вены. Форменные элементы крови осаждали 30-минутным центрифугированием при 4000 об/мин. В полученной плазме определяли общее количество (концентрацию) белка по методу Лоури [7] после двукратного осаждения 5%-ной трихлоруксусной кислотой. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma» (США). Концентрацию вителлогенина оценивали по содержанию в крови белкового фосфора методом Грибанова [2] с некоторой модификацией.

Электрофорез сывороточных белков проводили по методике Лаемли [6] в полиакриламидном геле 7%-ной концентрации, в триглицериновом буфере (pH 8,3), содержащем 0,1% додецилсульфата натрия. Количественное фракционирование белков плазмы крови несушек осуществляли методом электрофореза на бумаге [5].

Результаты и обсуждение. Результатами наших исследований установлено, что скорость накопления и утилизация вителлогенина в плазме крови кур-несушек различного направления продуктивности неодинаковы: так, у кур-несушек, яйценоскость которых не ниже 80% (леггорн), количество общего белка и белкового фосфора (вителлогенина) в плазме крови больше, чем у несушек с низкой яйценоскостью (плимутрок и ереванская).

Ко времени наступления половой зрелости (140—160 дней) в крови молодок концентрация вителлогенина повышается (145,6—188,2 мгк/мл), что можно объяснить, вероятно, насыщением ее белками, т. е. фосфопротеидами, предназначенными для «выноса». В период усиленной яйцекладки (260—320 дней), когда при поглощении растущими фолликулами из крови компонентов яйца истинная интенсивность синтеза этих компонентов искажается, концентрация вителлогенина у отдельных особей достигает 200—220 мгк/мл. В плазме крови переемных кур (420—450 дн.) концентрации общего белка и белкового фосфора понижаются, вероятно, в этот период перенос основных компонентов яйца, из которых формируются в ооците белково-липидные комплексы желтков яиц, происходит более активно.

В распределении и динамике изменений белковых фракций плазмы крови несушек наблюдается следующая картина: белковые фракции крови, синтезируемые в основном печенью, с возрастом «уходят» из крови, поступая в яичник. Это касается тех фракций, которые участвуют в образовании желточных белков. Так, начиная с 4—5-месячного возраста количество α -альбуминов понижается, причем во время пика

яйцекладки (260 дн.) содержание этого белка в плазме крови несушек наименьшее (11,9% против 16,9% в начале кладки яиц). Эта фракция белка используется в основном как пластический материал для формирования белкового комплекса желтка яиц (ооцитов). Наибольшее количество фракций— α_1 -, γ -глобулинов и α_2 -альбуминов—в 9-месячном возрасте в крови несушек указывает, по-видимому, на усиленный синтез овогенных веществ яйца, накопленных в крови, которые еще не успели реализоваться. β -Глобулиновая фракция, наоборот, уменьшается, так как она также используется в организме для формирования пластических компонентов желтка [4].

При сравнении электрофоретической картины плазмы крови несушек на полиакриламидном геле видно, что усиленный синтез вителлогенина наблюдается у кур с высокой продуктивностью. Чем выше яйценоскость, тем сильнее индукция вителлогенина и липопротенда очень низкой плотности (VLDL—B), который появляется в крови несушек раньше, чем вителлогенин, и исчезает позже.

В последние годы в литературе появились работы [8], указывающие на то, что у кур имеются 2 вителлогенина, различающиеся по антигенным свойствам и, незначительно, по размерам. Есть сведения о том, что гены, программирующие вителлогенин, имеют разные кинетики экспрессии [9].

Полученные нами данные не дают оснований для подобных утверждений, однако на некоторых наших фореграммах вителлогенин проявился двумя полосками, что, видимо, косвенно указывает на это.

Таким образом, изучение биосинтеза белковых компонентов желтка яиц представляет определенный практический интерес, так как по концентрации вителлогенина в крови кур становится возможным прогнозирование яйценоскости кур путем отбора высокопродуктивных особей в раннем возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айзенштайт Т. С. В кн: Цитология овогенеза, 143—199, М., 1984.
2. Грибанов Г. А., Сергеев С. А., Алексеев А. С. Лабор. дело, 12, 724—727, 1976.
3. Карапетян Р. В., Коршунова Э. Г., Журавлева Н. В. Сб. научн. тр. ВНИИТИП, 40—46, Загорск, 1983.
4. Циновий В. И. Мат-лы 4-й Всесоюз. конф. по физиологии и биохимии с/х животных, 2, 505—507, 1966.
5. Циновий В. И. Мат-лы 14-го Конгресса по птицеводству, 158—172, М., 1970.
6. Laemmli U. K. Nature, 227, 5, 259, 680—685, 1970.
7. Loury O. H. et al. The Journal of Chemistry, 193, 1, 265—275, 1961.
8. Wang S. G., Williams D. L. Y. Biol. Chemistry, 257, 7, 3837—3861, 1982.
9. Williams D. L. Biochemistry, 18, 1056—1058, 1970.

Поступило 18.III 1986 г.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ НАД-ЗАВИСИ- МОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ КУР

Т. К. ХАЧКАЛЯН, А. А. СИМОНЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Изучали онтогенетические сдвиги в изоферментном составе малатдегидрогеназы в тканях кур. Опыты проводили в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга и печени 20-дневных эмбрионов, 5-дневных цыплят и половозрелых кур.

Результаты проведенных исследований показали, что молекулярные формы цитоплазматической МДГ в ходе онтогенеза кур претерпевают лишь количественные изменения, в то время как ферментативно активные фракции митохондриального фермента подвергаются как количественным, так и качественным изменениям. В цитоплазме мозга нами выявлены 4 полосы с малатдегидрогеназной активностью, причем 2 из них обнаруживают существенные изменения по ходу развития. При созревании мозга содержание 2-й (анодной) фракции понижается почти в 3,5 раза, а доля 4-й фракции, обладающей наименьшей электрофоретической подвижностью, снижается в 2 раза. Несмотря на то, что повышение общей активности цитоплазматической МДГ мозга в онтогенезе достигается за счет быстрого повышения доли 2-й фракции, на всех стадиях развития основной формой фермента остается 3-я (катодная) форма (50—55% от общего содержания).

Совершенно иная картина наблюдается в митохондриях мозга. Фермент мозга эмбриона представлен 6-ю различными формами, а у взрослых кур обнаруживаются только 4 фракции, обладающие малатдегидрогеназной активностью. Несмотря на последовательное исчезновение 2-й и 3-й фракций, тенденции к повышению общей активности МДГ сохраняются в митохондриях за счет значительного возрастания уровня 4-й фракции, которая у кур составляет 50% от общего содержания.

В конце эмбрионального развития в печени кур выявляются 6 фракций с малатдегидрогеназной активностью, однако при дальнейшем развитии организма их число сокращается до 4 фракций (у взрослых кур). В митохондриях наиболее стабильными являются быстро мигрирующие к аноду фракции (1, 2, 3), которые отмечаются во все исследованные сроки, причем 3-я фракция постепенно становится основным носителем ферментативной активности. В цитоплазме печени основной формой

МДГ на всех стадиях развития является 3-я фракция (36—40% от общего содержания). 1-я, наиболее быстро мигрирующая фракция, значительно активизируется в ходе развития, а 6-я (катодная) фракция исчезает у цыплят.

Надо полагать, что количественные и качественные изменения изоферментного спектра МДГ, обнаруженные на определенных этапах эмбрионального и постэмбрионального развития, характеризуют особенности обмена веществ на этих этапах.

13 с., библиогр. 28 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИННИТИ, № 8150-В86, LXII 1986 г.

Поступили 3.1 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 247—248, 1987

УДК 577.1.636.5:612.393

ВЛИЯНИЕ ЯНТАРАТА КАЛИЯ НА ДИНАМИКУ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Д. С. БАЛАСАНИН, Л. Р. КАНАЯН, Н. Н. НАТИШВИЛИ

Ереванский зооветеринарный институт, лаборатория обмена веществ

В качестве объекта исследований взята печень как сложный многофункциональный орган, состояние которого в определенной степени отражает ход обменных процессов в организме эмбриона.

Предынкубационная обработка яиц биоактивным веществом, 0,13- и 0,15%-ным растворами янтарата калия, проводилась без нарушения целостности скорлупы.

Печень у контрольных и опытных зародышей брали на 11,5-, 18,5- и 21-е сутки эмбрионального развития. Индекс митотической активности (МА) гепатоцитов определяли путем подсчета клеток, находящихся в отдельных фазах митоза.

Результаты опытов показали, что предынкубационная обработка яиц растворами янтарата калия приводит к значительному изменению активности деления гепатоцитов в ходе развития зародыша. Используемые в опыте концентрации биоактивного вещества во всех возрастных группах статистически достоверно повышают интенсивность пролиферации ($P < 0,05$). Наиболее эффективное действие оказывает 0,13%-ный водный раствор янтарата калия, причем максимум деления клеток отмечается на 11,5 сутки инкубации. Процент делящихся клеток в опыте составлял $1,53 \pm 0,05\%$, в то время как в контроле— $0,59 \pm 0,02\%$. В поздние сроки эмбрионального развития зародыша отчетливо прослеживается тенденция к замедлению темпа пролиферации. В указанный период в опытных группах отмечается особенно большая разница в процентах делящихся клеток по сравнению с контрольным показателем. Так, если в контроле относительное число делящихся клеток составляло 0,03%, то в опытных группах—соответственно $0,3 \pm 0,04$ и $0,24 \pm 0,09\%$.

Анализ активности отдельных фаз показал, что в опыте в отличие от контроля число профазных клеток значительно выше. Повышение митотических индексов гепатоцитов опытных групп сопровождается значительным увеличением числа отдельных фаз, клетки вступают в последующие фазы и завершают начавшийся митоз, что, по-видимому, свидетельствует о стимулирующем действии янтарата калия на активность деления гепатоцитов. Возможно, янтарат калия вызывает активацию метаболических процессов в ядрах, способствуя укорочению клеточного цикла, и тем самым обеспечивает вхождение в митоз большего числа клеток.

5 с., табл. 1, библиогр. 10 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИИ, № 814-В-87 от 5.11.87 г.

Поступило 22.X 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 248, 1987

УДК 575.3

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ НА СЕМЕНА *CREPIS CAPILLARIS*

С. Н. МАРТИРОСЯН, С. Г. МИКАЕЛЯН, А. М. БАГДАСАРЯН

Ереванский государственный университет, проблемная лаборатория цитогенетики

Изучено действие синтетического регулятора роста растений, препарата А-1, на меристематические клетки корешков тест объекта *Crepis capillaris*. Препарат А-1 применяется в виде 0,001—0,005%-ного водного раствора для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур. Для анализа цитогенетической активности препарата использовали его 0,001-, 0,005-, 0,01-, 0,1%-ные водные растворы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применяемые концентрации препарата А-1 примерно вдвое подавляют энергию прорастания и общую всхожесть семян, индуцируют хромосомные нарушения в количестве, в несколько раз превышающем контроль, и способствуют числовым изменениям хромосом.

7 с., табл. 3, библиогр. 8 назв.

Поступило 15.VII 1985 г.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИИ, № 41-В-87, 5.1 1987 г.

ВЛИЯНИЕ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ МОЛИБДЕНА В ЛИСТЬЯХ И ПОБЕГАХ ВИНОГРАДНОГО РАСТЕНИЯ

А. Б. АФРИКЯН

Исследовалось влияние удобрений на содержание молибдена в листьях и побегах виноградного растения по ярусам в течение вегетации.

Обнаружены значительные колебания в содержании молибдена в зависимости от яруса, срока вегетации и внесенных удобрений.

Согласно полученным данным, листья и побеги нижнего яруса виноградного растения наименее обеспечены молибденом в начальные фазы роста и развития. Листья плодового яруса в начале вегетации испытывают недостаток в молибдене, что связано с большой потребностью растения в этом микроэлементе. Это подтверждается значительным возрастанием его количества в более поздние фазы роста и развития виноградной лозы. В течение второго периода вегетации содержание молибдена в органах плодового яруса значительно изменяется. Плодовый ярус побегов контрольных растений обедняется молибденом более чем в 15 раз (от 0,54 до 0,04 мг/кг). Это имеет место в течение всего периода роста и развития виноградного растения. Однако плодовой ярус побегов удобренных кустов наиболее богат молибденом (в 10 раз) по сравнению с контролем в последние фазы вегетации.

Интересны данные о содержании молибдена в листьях среднего яруса опытных растений. В фазы формирования и роста, начала созревания и физиологической зрелости ягод определенное влияние на количество молибдена оказывают удобрения NP , NK , NPK . Видно, азот оказывает существенное влияние на накопление этого микроэлемента, так как существует синергизм молибдена с азотом.

В листьях верхнего яруса до цветения и в период цветения количество молибдена невысокое. В период формирования и роста ягод оно увеличивается в контроле и в варианте с NK . В начале созревания ягод содержание микроэлемента снижается и возрастает в фазу физиологической зрелости ягод. В верхнем ярусе побега в начале вегетации молибден не обнаружен. В фазу формирования и роста ягод в листьях и побегах контрольных растений содержится значительное количество молибдена (1,08; 1,23 мг/кг). Под влиянием макроэлементов оно снижается в меньшей степени в листьях (1—2 раза), чем в побегах (3—5 раз).

Полученные данные дают основание полагать, что молибден является необходимым для виноградного растения микроэлементом и играет важную роль в образовательных процессах; совместное действие азота, фосфора и калия способствует более полному использованию молибдена органами виноградного растения.

7 с., библиогр. 3 назв.

Полный текст статьи деп. в ВНИИТИ, № 43-В87, 5.1 1987 г.

Поступило 4.11 1986 г.

СОДЕРЖАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПЛОДАХ ТОМАТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОРТОВЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

А. Г. АВАКЯН, С. С. ПАПЯН, Е. О. ТАРОСОВА

Республиканская селекционно-семеноводческая станция овощных и бахчевых культур Госагропрома Армянской ССР

Химические элементы участвуют в регуляции физиологических и биохимических процессов, обеспечивая нормальный рост и развитие растений. Изучение их состава и содержания в различных органах растений томатов имеет научное и практическое значение.

Содержание макро- и микроэлементов определяли химическим и спектральным методами.

В плодах томата в различные периоды плодоношения растений обнаружено 23 элемента: 8 макро- и 15 микроэлементов.

Содержание калия в золе плодов весьма высокое и колеблется в пределах 26.581—67.485 мг/кг, что объясняется высоким содержанием подвижных форм его в почве и биологическими особенностями данной культуры.

В плодах отмечен высокий уровень накопления фосфора и кальция по сравнению с другими элементами.

Наибольшее количество фосфора содержится в плодах, затем в семенах, наименьшее—в вегетативных органах.

Существует определенная коррелятивная закономерность в накоплении фосфора, магния и натрия в золе плодов. Содержание макроэлементов в плодах в основном соответствует количеству кларкового числа, за исключением кремния, содержание которого значительно ниже.

Содержание биогенных микроэлементов—марганца, меди, цинка и молибдена—низкое. Из них сравнительно больше марганца и цинка, что, возможно, объясняется биологическими особенностями данной культуры.

Максимальный вынос таких микроэлементов, как Ti, Mn, Mo, Cu и Pb, с урожаем свойствен сортам средних сроков созревания.

Содержание микроэлементов, за исключением титана, в золе плодов томата ниже количества кларкового числа.

6 с., табл. 2, библиогр. 9 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИН, № 40-В87, 5.1 1978 г

Поступило 28.XI 1986 г.

ВЫЕЗДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

2—7 октября 1986 г. в Нор-Амберге состоялась выездная сессия Совета по проблемам химической физики АН СССР (секция «Химическая физика ферментативного катализа и его моделирование»), посвященная проблемам ферментативного катализа, химическим моделям и путям их практического использования.

Организаторами сессии были Ереванский физический институт Гос. комитета по использованию атомной энергии СССР и Институт химической физики АН СССР. Кроме этих учреждений были представлены Институты биологической химии, молекулярной биологии АН СССР, МГУ им. Ломоносова, Институт биохимии АН Литовской ССР, Институты органической и биорганической химии АН УССР, биорганической химии АН БССР, химической кинетики и термодинамики биорганической химии СО АН СССР, а также Институт прикладной молекулярной биологии Минздрава СССР.

Совещание открылось вступительным словом член-корр. АН СССР А. Е. Шилова, обратившего основное внимание участников на вопросы практического использования результатов фундаментальных исследований в области ферментативного катализа и его моделирования, на работы, которые в перспективе должны привести к созданию принципиально новых технологических процессов, методов их контроля и аналитических методов. В докладе Г. Н. Лихтенштейна (ИХФ АН СССР) были изложены основные принципы и результаты комплексного подхода к изучению молекулярной динамики белков, ферментов и биомембран. Эксперименты показали экспоненциальную зависимость молекулярной подвижности в наносекундной области времен от температуры и влажности. На основе этих фундаментальных исследований были предложены экспресс-методы контроля ста-

бильности биологических препаратов (белков, ферментов, вакцин и т. д.).

А. И. Симонян (ЕрФИ ГКИАЭ) рассказал о работе по выявлению представляющих аналитический интерес ферментов, изучению их свойств и созданию на их основе ферментных анализаторов. В результате были получены два фермента — уратоксидаза и лизин-2-мемоксигеназа. Созданный с использованием этих ферментов универсальный проточный анализатор для определения концентрации лизина «АРФА» прошел предварительные испытания на предприятиях микробиологической промышленности. В дальнейшем предполагается расширить функциональные возможности анализатора для определения концентрации ряда аминокислот, представляющих интерес с медицинской и промышленной точек зрения.

В докладе Р. А. Асатуряна (ЕрФИ ГКИАЭ) сообщалось о первых в нашей стране результатах по исследованию строения активных центров модельных медьсодержащих белков методом EXAFS с применением синхротронного излучения. Одновременно ЭПР и ЯМР методами затормозили детальную информацию о природе лигандов комплекса медь-альбумин.

С. Г. Геворкян (ЕрФИ ГКИАЭ) сообщил о вязкоупругих свойствах пленок белковых макромолекул, выявленных с помощью уникальной сверхчувствительной установки.

Доклад А. Е. Шилова был посвящен проблеме химического моделирования окислительно-восстановительных ферментов. На основе молекулярных липидных пленок на поверхности ацальгамы натрия, содержащих молибденовые активные центры и производные фосфина, были предложены высокоактивные катализаторы восстановления атмосферного азота в азидоксид и гидразин.

С. Д. Варфоломеев (МГУ) сделал доклад на тему «Кинетические закономерности

сти репликации плазмид в растущих микропопуляциях.

Теоретическим и практическим аспектам каталитического действия неорганической пирофосфатазы был посвящен доклад С. М. Авазовой (МГУ). На основании фундаментальных исследований была предложена система иммуноферментного анализа. Метод был отработан на ряде вирусов с/х растений и совместно с институтами АМН СССР и Минздрава СССР использован для диагностики некоторых заболеваний.

Д. И. Метелица (Ин-т биоорганической химии АН БССР) рассказал о результатах исследования кинетики и механизма действия ферментов-оксидоредуктаз, которые могут быть эффективными маркерами в иммуноферментном анализе. Созданы иммуноферментные тест-системы для анализа сердечных гликозидов и прогестерина, которые могут быть применены в медицинской практике и ветеринарии.

Л. М. Вайлер (Ин-т химической кинетики и горения СО АН СССР) доложил о результатах исследования субстратов и их спин-меченых аналогов с активным центром цитохрома P-450. Аффинные ингибиторы P-450 использованы для продления действия лекарств, окисляемых этим ферментом.

И. К. Чанас, Ю. Ю. Кулик (Ин-т биохимии Литовской ССР) сообщили о фундаментальных результатах по изучению одно- и двухэлектронных процессов окисления флавопротеинов хинона.

А. С. Соболев, Н. Ф. Пытьева (Ин-т прикладной молекулярной биологии Минздра-

ва СССР, МГУ им. Ломоносова) на примере аденилаткилазной системы рассмотрели взаимодействие интегральных белков мембран: образование временных ассоциатов с последующей активацией фермента.

О. Н. Заврик (Ин-т биоорганической химии СО АН СССР) доложила о результатах изучения ДНК-полимеразы из плаценты человека методом аффинной модификации. Эти исследования позволяют направленно регулировать активность ДНК-полимераз.

В своем докладе А. А. Ясников (отдел химии фотосинтеза Отделения биоорганической химии ИСК АН УССР) сообщил о том, что по аналогии с биологическим фосфорилированием разработан оригинальный способ синтеза фосфорилированного крахмала и выдан регламент для опытно-промышленного производства этого препарата.

Были заслушаны также доклады М. Л. Карпейского «Инженерия белков, перспективы и ограничения» и В. К. Антонова с соавт. «Специфический гидролиз белка рекомбинантного гена этерокиназы с целью получения энкефалина».

А. М. Егоров (МГУ) рассказал об основных принципах иммуноферментного анализа, о новых тенденциях его развития и перспективах широкого внедрения в практику.

Участники сессии обсудили перспективы повышения эффективности внедрения результатов фундаментальных исследований ферментного катализа в практику и наметили план мероприятий в этой области.

АВАКЯН Ц. М., СИМОНЯН А. Л.

В статьях, представляемых в редакцию, все единицы измерений должны быть выражены в Международной системе единиц (СИ)

Величина		Единица			Обозначение рекомендуемых кратких и полных единиц	Примечание
наименование	размерность	наименование	обозначение			
			международн.	русское		
1	2	3	4	5	6	7

Основные единицы СИ

Длина	L	метр	m	м	км, см, мм, мкм, нм	
Масса	M	килограмм	kg	кг	мг, г, мкг	
Время	T	секунда	s	с	мс, мкс, нс	
Сила электрического тока	I	Ампер	A	А	кА, мА, мкА, нА, пА	
Термодинамическая температура	Θ	Кельвин	K	К	МК, кК, мК, МК	
Количество вещества	N	моль	mol	моль	кмоль, ММоль, Мкмоль	
Сила света	J	кандела	cd	кд		

Производные единицы СИ по разделам физики

1. Площадь	L ²	квадратный метр	m ²	м ²	км ² , дм ² , см ² , мм ²	Пространство и время
2. Объем, вместимость	L ³	кубический метр	m ³	м ³	дм ³ , см ³ , мм ³	
3. Скорость (линейная)	LT ⁻¹	метр в секунду	m/s	м/с		
4. Ускорение	LT ⁻²	метр на секунду в квадрате	m/s ²	м/с ²		
5. Угловая скорость	T ⁻¹	радиан в секунду	rad/s	рад/с		
6. Угловое ускорение	T ⁻²	радиан на секунду в квадрате	rad/s ²	рад/с ²		
7. Период	T	секунда	s	с		
8. Частота периодического процесса	T ⁻¹	герц	Hz	Гц	Гц, ГГц, МГц, кГц	механика
9. Частота вращения	T ⁻¹	секунда в минус пер. степени	S ⁻¹	с ⁻¹		
10. Плотность	L ⁻³ M ⁻¹	килограмм на куб. метр	kg/m ³	кг/м ³	Мг/м ³ , кг/дм ³ , г/см ³	
11. Удельный объем	L ³ M ⁻¹	кубический метр на килограмм	m ³ /kg	м ³ /кг		

1	2	3	4	5	6	7
12. Сила	LMT-2	Ньютон	N	Н	МН, кН, мн, МкН	
13. Давление	L-1 MT-2	Паскаль	Pa	Па	ГПа, МПа, КПа, мПа, мкПа	
14. Поверхностное натяжение	MT-3	Ньютон на метр	N/m	Н/М	мН/м	
15. Работа	L ² MT-2	Джоуль	J	Дж	ТДж, ГДж, МДж, кДж, мДж	
16. Мощность	L ³ MT-3	Ватт	w	Вт	ГВт, МВт, кВт, мВт, мкВт	
17. Температура Цельсия	θ	градус цельсия	°C			теплота
18. Температурный коэффициент	θ-1	Кельвин в минус первой степени	K-1	K-1		
19. Температурный градиент	L-1 θ	Кельвин на метр	k/m	к/м		
20. Теплота, количество теплоты	L ² MT-2	Джоуль	J	Дж	ТДж, ГДж, МДж, кДж, мДж	
21. Тепловой поток	L ³ MT-2	Ватт	W	Вт	кВт	
22. Теплопроводность	L MT-3 θ-1	Ватт на метр кельвин	w (m k)	Вт/м К		
23. Теплоемкость	L ² MT-2 θ-1	Джоуль на кельвин	J/k	Дж/К	кДж/К	
24. Энтропия	L ² MT-2 θ-1	Джоуль на кельвин	J/k	Дж/К	кДж/К	
25. Термодинамический потенциал (энтальпия)	L ² MT-2	Джоуль	J	Дж		
26. Количество электричества (электрический заряд)	TI	Кулон	C	Кл	кКл, мкКл, нКл, пКл	Электричество и магнетизм
27. Поверхностная плотность электрического заряда	L-2 TI	Кулон на квадратный метр	c/m ²	Кл/м ²	мКл/м ² , Кл/мм ² , Кл/см ² , мкКл/м ²	
28. Напряженность электрического поля	MT-3 I-1	Вольт на метр	v m	В/м	МВ/м, кВ/м	
29. Электрическое напряжение, электрический потенциал, разность эл. потенциалов, электродвижущая сила	L ² MT-3 I-1	Вольт	V	В	кВ, мВ, мкВ, нВ	
30. Электрическая емкость	L-2 M-1 T ² I ²	Фарад	F	Ф	МФ, МкФ, нФ, пФ	
31. Плотность электрического тока	L-2 I	Ампер на квадратный метр	A/m ²	А/м ²	МА/м ² , А/мм ² , А/см ² , кА/м ²	
32. Магнитная индукция	MT-2 I-1	Тесла	T	Тл	мТл, мкТл, нТл	
33. Индуктивность	L ² MT-2 I-2	Генри	H	Гп	мГп, мкГп	
34. Электрическое сопротивление	L ² MT-3 I-2	Ом	Ω	Ом	ТОм, ГОм, МОм, КОм, МОм, мКОм	

	1	2	3	4	5	6	7
35. Электрическая проводимость активная	$L^2 M^{-1} T^3 I^2$	Сименс	s	См	кСм, мСм, мкСм	Свет, электромагнитное излучение	
36. Энергия излучения	$^2 M T^{-2}$	Джоуль	J	Дж			
37. Энергетическая экспозиция (лучистая экспозиция)	$M T^{-2}$	Джоуль на кв. метр	J/m^2	Дж/м ²			
38. Энергетическая освещенность	$M T^{-3}$	Ватт на кв. метр	w/m^2	Вт/м ²			
39. Энергетическая яркость	$M T^{-3}$	Ватт на стерadian кв. метр	w	Вт/Ср.м ²		Акустика	
40. Световой поток	J	Люмен. сек.	Lm. s	лм. с			
41. Яркость	$L^{-2} J$	Кандела на кв. метр	cd/m ²	кд/м ²			
42. Освещенность	$L^{-2} J$	Люкс	lx	лк			
43. Период звуковых колебаний	T	Секунда	S	с	мс, мкс	Физ. химия и молекулярная физика	
44. Частота звуковых колебаний	T^{-1}	Герц	Hz	Гц	МГц, кГц		
45. Скорость звука	$L T^{-1}$	Метр в сек.	m/s	м/с			
46. Молярная масса	$M N^{-1}$	Килограмм на моль	kg/mol	кг/моль	г/моль		
47. Молярная внутренняя энергия	$^2 M T^{-2} N^{-1}$	Джоуль на моль	J/mol	Дж/моль	кДж/моль		
48. Концентрация молекул	L^{-3}	Метр в минус третьей степени	m^{-3}	м ⁻³			
49. Молярность	$M^{-1} N$	Моль на килограмм	mol/kg	моль/кг			
50. Осмотическое давление	$L^{-1} M T^{-2}$	Паскаль	Pa	Па			
51. Коэффициент диффузии	$L^2 T^{-1}$	Квадратный метр на секунду	m^2/s	м ² /с			
52. Скорость химической реакции	$L^{-3} T^{-1}$	Моль на кубический метр в секунду	mol/(m ³ .s)	Моль/м ³ .с			
53. Поверхностная плотность	$L^{-2} N$	Моль на квадратный метр	mol/m ²	моль/м ²			
54. Электрический дипольный момент	[FI]	Кулон на метр	C.m	Кл.м			
55. Проводимость электролита	$^2 M^{-1} T^3 I^2$	Сименс на метр	S/m	См/м			
56. Электродный потенциал	$^2 M T^{-2} I^{-1}$	Вольт	V	В			
57. Энергия ионизирующего излучения	$^2 M T^{-2}$	Джоуль	J	Дж	ТГр, ГГр, МГр, КГр, мГр, мкГр	Ионизирующие излучения. Атомная и ядерная физика	

1	2	3	4	5	6	7
59. Мощность поглощенной дозы излучения (мощность дозы излучения)	$J^2 T^{-1}$	Грей в сек.	Оу/с	Гр/с		
60. Активность радионуклида (радиоактивного вещества)	T^{-1}	Беккерель	Bq	Бк	ЭБк, ПБк, ТБк, ГБк, МБк, кБк	
61. Удельная активность	$M^{-1} T^{-1}$	Беккерель на кг	Bq/kg	Бк/кг		
62. Постоянная распада	T^{-1}	Сек. в минус первой степени	S^{-1}	s^{-1}		
63. Экспозиционная доза (рентгеновского и гамма излучений)	$M^{-1} Tl$	Кулон на килограмм	C/kg	Кл/кг		

Соотношение некоторых внесистемных единиц с единицами СИ

Наименование величин	Единица			
	наименование	международное	русское	соотношение с единицей СИ
1	2	4	4	5
Длина	ангстрем	Å	Å	10^{-10} м
Площадь	барн	b	б	10^{-28} м ²
Масса	центнер	ц	ц	100 kg
Телесный угол	квадратный градус	□°	□°	$3,0462 \times 10^{-4}$ Sr
Ускорение	Гал	Gal	Гал	$0,01$ м/с ²
Сила, вес	Дина	dyn	Дина	10^{-5} N
Давление	грамм-сила	gf	гс	$9,806 \cdot 65 \cdot 10^{-5}$ N
	килограмм-сила на кв. сантиметр	Kgf/cm ²	кгс/см ²	98066,5 Pa
	миллиметр ртутного столба	mmHg	мм рт. ст.	133,322 Pa
	Торр	Torr		133,322 Pa
Работа, энергия	Эрг	erg	эрг	10^{-7} J
Кинематическая вязкость	Стокс	st	Ст	10^{-4} м ² /с
Магнитный поток	максвелл	Mx	Мкс	10^{-8} wb

	2	3	4	5
Магнитная индукция	Гаусс	Gs	Гс	10^{-4}
Напряженность магнитного поля	Эрстед	Oe	Э	$(10^3/4\pi)A/m=79,517$
Количество теплоты, термодинамический потенциал (внутренняя энергия, изохорно-изотермический потенциал)	калория	Cal	кал	4,186 J
	калория термохимическая	Cal _{th}	Кал _{th}	4,1840 J
	калория 15-градуса	Cal ₁₅	Кал ₁₅	4,1855 J
Теплота фазового превращения, теплота хим. реакции				
Поглощенная доза	рад	rad, rd	рад	0,01 Gy
Эквивалентная доза излучения	бэр	rem	бэр	0,01 Sv
Экспозиционная доза фотонного излучения	рентген	R	Р	$2,58 \cdot 10^{-4} \text{ C/kg}$
Активность нуклида в радиоактивном источнике	Кюри	Ci	Ки	$3,700 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$