

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
ՀԱՆԴԵՍ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ
АРМЕНИИ

Журнал издаётся с 1946 г., выходит 12 раз в год
на армянском и русском языках.
Айастанн кенсбазакаан индес

«Հայաստանի կենսաբանական ճանգնար» հրատարակվում է Հայկական ՍՍՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և տարածվում է հոգիվածներ բուսաբանության, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաֆիզիայի, կենսաֆիզիկայի, մանեկաբանության, գենետիկայի և ընդհանուր ու կիրառական կենսաբանության այլ բնագավառները վերաբերյալ:

Թաժանդդադինն է ճ. 8. 40 կ. Թաժանդդադդդդդդդն ընդունվում է Արտագրկաաթի բոլոր լրաժանտուններում:

«Биологический журнал Армении» — научный журнал, издаваемый Академией наук Армянской ССР, публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, биофизике, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии.

Подписная цена за год 8 руб. 40 коп. Подписку на журнал можно приобрести во всех отделениях Союзпечати.

Խմբագրական կոլեգիա՝ է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ս. Մ. Աղաջյան, Վ. Ն. Աղևաթյան, Յու. Բ. Աղաթանյան, Հ. Գ. Բախչաճյան, Ս. Ա. Գալստյան, Ժ. Բ. Հակոբյան, Ե. Ս. Հարությունյան (պատասխանատու բարձրագույն), Ռ. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Հովսեփյան, Ֆ. Ա. Դանդիկյան, Կ. Գ. Հարաջյան, Ս. Մ. Սոփիություն (գլխավոր խմբագրի տեղակալ):

Խմբագրական խորհուրդ՝ է. Գ. Աֆրիկյան (նախագահ), Ն. Ն. Աղաթանյան, Վ. Ն. Աղաթանյան, Հ. Ա. Աղևաթյան, է. Ս. Զարրիկյան, Ա. Ա. Կապրյան, Ա. Կ. Բախչաճյան, Պ. Ա. Կարապետյան, Ժ. Գ. Հովսեփյան, Է. Է. Հովսեփյան, Է. Ա. Հովսեփյան, Ա. Ա. Մարտիրոսյան, Մ. Ն. Չալաֆյան, Կ. Ս. Պողոսյան:

Редакционная коллегия: Э. К. Африкян (главный редактор), Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Аконян, Ю. Г. Алексанян, Е. С. Арутюнян (ответственный секретарь), Р. М. Арутюнян, О. Г. Баклаваджян, Н. А. Гандилян, М. А. Давтян, В. О. Казарян, К. Г. Карапетян, С. О. Мовсисян (заместитель главного редактора).

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. И. Акримовский, Э. И. Габриелян, А. А. Галоян, Л. С. Гамбарян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осянյан, К. С. Погосян, А. Л. Тахтаджян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чаялхян.

Ответственный за номер С. О. Мовсисян Технический редактор Л. А. Азизбекян

Տվումս և լսծոր 11.03.1988 թ. Սոժիկսոն և ևոոոոն 23.05.1988 թ. ՅՓ 05541.
Բոմաթ Ա 2, 70X108, 11. Մոկոկոն ևոոոոն, Սոո. ևոո. 5.13. Մոո. ևոո. ևոո. 7.18.
Մոո. ևոո. 6.02. Կոոոոո 030. Զոոո. 220. Սոո. ևոո. 7358.

Издательство Академии наук Армянской ССР, Ереван,
пр. Маршала Баграмяна, 24-г.

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

ԲՈՎԱՆՆԱԿԱՆ ԹՅՈՒՆ

Հազվածներ

Մառնյան Ն. Ա., Մելիքյան Գ. Բ., Առաքելյան Վ. Բ., Ավագյան Խ. Մ., Մոչալով Ա. Լ., Մելյան Ս. Լ. Օրգանական և տնտեսական բույսերի պարզագույն գոնզիոգիկ պարունակող երկչորոթ թաղանթների վրա	249
Հայրապետյան Վ. Հ., Մանասյան Տ. Ս. Կիթյանով Գ. Լ. Թերմոքիլայզմի ԴՆԹ-ի վրա արևելքում մկան և բլիթների չորմառների առանձնահատկությունները	278
Ասատուրյան Ռ. Ա. Պղնձի (II) նեո գլոստամերի-թթվի կոմպլեքսների առանձնահատկությունը էՊՌ-ի մեթոդով	283
Գևորգյան Է. Ա., Ցավադյան Ժ. Վ., Փառայան Գ. Հ. Առևտրի յարգի մի շարք կորիզային առարկաների սպիտակուցային կազմի փոփոխությունները հիդրոգերատիզմի ազդեցության ժամանակ	299
Աղաքալյան Ա. Ա., Ավագյան Մ. Մ., Խոյսյան Ս. Պ., Դուրգարյան Կ. Ա., Կարապետյան Հ. Վ., Ուրմանյան Ա. Լ., Խաթիկյան Ս. Շ., Կալաբուրյան Գ. Է. ԵԱԲՖԱ-ի ֆերմենտային անալիզատորի սպեկտրային լիգենդի խառնվածքի որոշման ավտոմատացված համակարգ	294
Գրիգորյան Ա. Պ., Աղաքալյան Ա. Ս., Խաթիկյան Ն. Ն., Խաթիկյան Մ. Ա. Կանաչ չրի մուսկերի <i>Chlorella pyrenoidosa</i> արգիտ-զույի ինդուկցումը	308
Խուլափուրյան Է. Է., Գևորգյան Ս. Գ. Զերմային գեղատեսչության ազդեցությանը ԴՆԹ-ի թաղանթների մառնիկ-առանձնական հատկությունները և հիդրատացիայի վրա	303
Ղուկասյան Զ. Դ., Աղաքալյան Ա. Ս., Պրոխորի Կառաբուրյան (ԵՊՌ) ռեզակների բեզեզերում <i>Alcanthoscelidus obtectus</i> Say	307
Սիմոնյան Ն. Վ., Զանգվարյան Ն. Լ., Առաքելյան Լ. Գ. Զիտանամիների և զիտանամիների ազդեցությանը <i>E. coli</i> բլիթների վրա առարկի էներգիաների զեպիկի կարգումը հասարակական ղեկավարում	312
Համարաբուրյան Տ. Գ., Աղաքալյան Ս. Ցա., Մաթիկյան Գ. Գ., Պետրոսյան Լ. Ա. Լեցիտինային լիպոսոմների միկրոմառնիկային արդյունք հատարումի գեզաբուխույանի առարկի կոնցենտրացիաների ղեկավարում	318
Կարապետյան Մ. Ա., Մելիքյան Լ. Գ. Էրիթրոցիտների թթվային նեոնիդր. ժուրպրոմագիների ազդեցությանը	322
Արաքալյան Ս. Շ., Գևորգյան Է. Ս., Վաղանյան Պ. Հ., Փառայան Գ. Հ. Թրոմատիկի մեղացորդային ֆրակցիայի գերմակայանության փոփոխությունը լաբորատորի ազդեցության տակ	326
Համառոտ հազարգումներ	
Առաքել Գ. Գ., Տեր-Մարկոսյան Ա. Ս., Կրկունյան Ս. Գ., Կրկունյան Կ. Գ. Առևտրի և արգի միկրոսոմների շեղանկային էլեկտրոստատիկ գալտի ազդեցությանը ներքին	331
Մկրտչյան Ռ. Դ., Մկրտչյան Յ. Ս., Առաքելյան Գ. Պ., Կրկունյան Ռ. Գ. Առաքելյանի բացահայտումը լիթթրոցիտները բացահայտումը արդևի գիթրակատերիՊարոմանրիայի մեթոդով	333
Ունեկաններ	
Համարաբուրյան Մ. Ա., Կալապետյան Լ. Ա. Աղաքալյան ինդուկցորիաների կոնսերվացումը լիպոմիթաներով հերմոնիկ	336
Գրիգորյան Ա. Զ. Հայկական ՍՍՀ Լուրի Փամբակի գետի խնամքի և տանձնի, հիմնական թաղանթների գեղատեսչության պարագիտները	337
Խոյսյան Պ. Ա., Հայրապետյան Ս. Բ. Սեռա լիթ Գլանիայի ափի Լառերի և թիթերի	338
Մանասյան Կ. Մ. Վարդապետի կառարանատի (ՀԱՆՔԱՐԱՆԻՆԱՅ ԲՈՅՈՒՆ ԵՎ ԼՈՒՂ) տեր և զարգացումը սեղանայանության մակրոնիմաների առարկի պարունակության ղեկավարում	339

Քեզարյան Ն. Գ., Տափրյան Օ. Խ. Գործընկերո՞ւմ ցորենի սերմերի նախացանցային մշակման արդյունքները	339
Բաբայան Կ. Լ., Կառապետյան Փ. Գ. Գնդի տերևների և չիճիկի քիմիական կազմի ներկայացումը	340
Մանուկյան Կ. Կ. Տեղեկություններ կարճընթացիկ <i>Lactis cristatus</i> տեսակի <i>Bact. licheniformis</i> գերաբերյալ	341
Մանուկյան Կ. Կ., Մխիթարյան Ս. Փ. Կովկասյան ձեռքի <i>Fissier domestica caucasicus</i> Բոգո Մարմարի գետի գետատեղում	341
Լեռնյան	
Անդրեյ Երեմյե Եղեկյան Կ. Կ.	342

СОДЕРЖАНИЕ

СТАТЬИ

Митичян Н. С., Меликян Г. Б., Аракелян Б. Б., Авакян Ц. М., Кочаров С. Л., Мхачишян О. А. Азербайджан органических и неорганических ионов на титанополидиседржающих биологов	269
Айрапетян В. О., Мхачишян Г. А., Кирьянов Г. Н. Особенности структуры хроматина 1 клеток мыши, образующихся на недометилированной ДНК	276
Асатурян Р. А. Изучение комплексов металлов (III) с гуаниновой кислотой методом ЭПР	283
Геворкян Э. С., Назарян Ж. В., Паносян Г. А. Изменения в составе белков некоторых ядерных структур печени крыс при воздействии гидрокортизона	289
Агабибян А. А., Авакян Ц. М., Биккян С. Н., Дурбарян К. С., Карпетян А. Б., Симонян А. Т., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э. Автоматизированная система определения концентрации лигнана с помощью ферментного анализатора «АРФА-III»	294
Григорян А. Н., Асаджанян А. К., Тамблян Н. Н., Дагян М. А. Индуцирование аргинина у зеленых водорослей <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	298
Худавердян Э. Э., Геворкян С. I. Влияние тепловой денатурации на вязкоупругие свойства и гидратацию пленок ДНК	303
Гукасян Дж. Г., Агаджанян А. X. Катаболизм пролина у жуков фасолевой зерновки <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say	307
Симонян Н. В., Джалалоглян Н. Т., Степанян Л. Г. Влияние цистеина и глицерина на клетки <i>E. coli</i> при действия излучений с разной линейной передачей энергии	312
Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Маркян Г. Г., Петросян Л. С. Определение микровязкости мембраны липидных липосом при различных концентрациях дезоксиполатата натрия	318
Корджанян М. М., Микаелян А. Г. Кислотный гемолиз эритроцитов. Влияние адреналина	322
Абрамян А. Ш., Геворкян Э. С., Варлеванян Н. О., Паносян Г. А. Изменение термостабильности «остаточной» фракции хроматина при воздействии эргостерола	326

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Аркуни Г. Г., Гер Маркисян А. С., Хурцян М. Г., Киракосян А. Г. Дыхание микросом печени крыс после воздействия электростатического поля	331
Чирчян Г. Г., Мхоян Ф. А., Саркисян Г. П., Хлебоник Р. Г. Выявление агиметрии в расщеплении эритроцитов по размерам методом дифрактометри	332

ЛИТЕРАТУРА

Амбарцумян М. А., Тамблян А. А. Культивирование свободноживущих инфузий при подкормке леикоцитамин	336
Григорян А. Дж. Паразиты основных жующих вредителей яблони и груши в Лори-Памбакской зоне Армянской ССР	337

Хирундян П. А., Айрапетян С. Б. Деревья и кустарники Гюмрийского побережья оз. Севан	338
Макасян К. С. Рост и развитие катарантуса <i>Catharanthus roseus</i> G. Don в зависимости от содержания макроэлементов в питательном растворе	339
Бегларян Н. П., Гаджирян О. У. Результаты предпосевной обработки семян пшеницы гиббереллином	339
Бабилян Г. Л., Карапетян Ж. Г. Оводошники листьев и побегов персика в зависимости от густоты посадки	340
Манучарян Г. Г., Мхитарян М. Ж. Кавказский домовый воробей <i>Passer domesticus caucasicus</i> Bosc. и южнее р. Мармарик	341
Манучарян Г. Г. Данные по экологии дятла <i>Lanius cristatus colchicus</i> Bat. в Армении	341

ХРОНИКА

Андрей Алексеевич Яценко-Хвостовский	342
--------------------------------------	-----

CONTENTS

ARTICLES

Matinian N. S., Melikian G. H., Asatellian V. B., Avakian Ts. M., Kocharov S. L., Mnjoyan O. L. Adsorption of Organic and Inorganic Ions on Ganglioside-containing Vectors	269
Halrapetyan V. O., Manamshyan T. A., Krikorian G. I. Structural Peculiarities of Mouse L-cells Chromatin Formed on Undermethylated DNA	276
Asaturian R. A. ESR Study of Copper (II)-Glutamic Acid Complexes	283
Gevorkyan L. S., Yavruyan Zh. V., Panayan O. H. Changes in Protein Content of Some Nuclear Structures of Rat Liver during the Hydrocortisone Action	289
Aghababian A. A., Avakian Ts. M., Barakian S. P., Dargarian K. S., Karapetian H. V., Simoniyan A. L., Taitelian S. Sh., Khachatryan G. E. Automated System of Determination of Lysine Concentration with the Help of Enzymatic Analyser "Atla-1"	291
Grigorian A. P., Aghajanian A. Kh., Tambian V. N., Davtian M. A. Induction of Arginase in Green Seaweeds <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	298
Khudaverdian E. E., Gevorgian S. G. Influence of Thermal Denaturation on Viscous-Elastic Properties and Hydration of the DNA Membranes	303
Ghukasyan J. G., Aghajanian A. Kh. Autolysis of Proline in Haricot Beetles <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say	307
Simoniyan N. V., Jangoladun N. L., Stepanian L. G. Effect of Cysteamin and Glycerol on <i>E. coli</i> Cells against Radiation of Different LET	312
Hambartsumian T. G., Adamian S. Ya., Murikyan G. G., Petrosyan L. S. Determination of Microviscosity of Lipid Membranes of Various Concentrations of Sodium Hexafluoride	318
Korkhmazian M. M., Mikaelyan L. H. ³² P-Labelled Hemolysis of Erythrocytes Influence of Chlorpromazine	321
Abramian A. Sh., Gevorgian E. S., Vardanian P. O., Panayan G. A. Change of Thermostability of "Residual" Fraction of Chromatin during Ethanol Action	328

SHORT COMMUNICATIONS

Artsruni G. G., Ter-Markosyan A. S., Khachatryan M. G., Karakosyan K. G. Respiration of Microtomes of Rats Liver after the Influence of Electrostatic Field	331
Mkrtchian R. G., Mkroyan T. A., Sarkisyan G. P., Khachaturyan R. G. Revelation of Asymmetry in the Distribution of Erythrocytes according to Dimensions by the Method of Diphraeoerythrometry	332

ABSTRACTS

<i>Hambarsumian M. A., Lalayan I. A.</i> Cultivation of Freelyliving Infusoria during Feeding with Leucocytes	336
<i>Grigorian A. J.</i> Parasites of Main Scale-Winged Pests of Apple Tree and Pear in Lori-Pambak Zone of the Armenian SSR	337
<i>Khurshudian H. A., Hatzapetian S. B.</i> Trees and Shrubs of Glacial Shore of the Lake Sevan	338
<i>Manasian K. S.</i> Growth and Development of Rose <i>Catharanthus</i> (<i>Catharanthus roseus</i> G. Don) during Various Contents of Macroelements in Nutritious Solution	339
<i>Beglarian N. P., Tajirian O. Kh.</i> Results of Presowing Treatment of Wheat Seeds with Gibberellin	340
<i>Bakayan G. A., Karapetian Zh. G.</i> Water Content of Leaves and Shoots of Peach in Dependence on Planting Density	340
<i>Manucharian G. G.</i> Data on the Ecology of <i>Lantana cristatus corymbiflora</i> (Rt.) in Armenia	341
<i>Manucharian G. G., Mkharitarian M. Zh.</i> Caucasian Domestic Sparrow <i>Passer domesticus caucasicus</i> Boga. in the Marmaris River Valley	341

CHRONICS

<u>Andrei Alekseyevich Yatsenko—Khmelevskii</u>	342
---	-----

ՀՈԴՈՒՄՆԵՐ • СТАТЬИ

Бислог. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.37

АДСОРБЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ НА ГАНГЛИОЗИДСОДЕРЖАЩИХ БИСЛОЯХ

И. С. МАТИНЯН, Г. Б. МЕЛНИКЯН, В. Б. АРАКЕЛЯН, Ц. М. АВАКЯН,
 С. Э. КОЧАРОВ, О. Л. МИДЖОЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Миджояна АН Арм.ССР

Исследовано взаимодействие неорганических катионов и серотонина с бислоями из ФХ, содержащими ганглиозиды GM_1 , GM_3 , GT_7 мозга человека и GD_3 коровьего молока. Показано, что зависимости изменения разности граничных потенциалов от концентрации различных ионов описываются моделью Гун-Чампера в случае адсорбции однозарядных катионов и моделью Гун-Штерна при адсорбции двухзарядных катионов и серотонина. В обоих случаях необходимо учитывать удаленность зарядов ганглиозидов на некомпьюре расстоянии от поверхности бислоя. Показано также, что ганглиозиды GD_3 и GT_7 активнее связывают серотонин, чем GM_1 , GM_3 и фосфолипиды.

Հետազոտված է անօրգանական իոնների փոխազդեցությունը ֆոսֆատիդիլխոլինի երկշերտ թաղանթների հետ, որանք պարունակում էին GM_1 , GM_3 , GT_7 մարդու ուղեղի և GD_3 կաթի փոշու զանգվածային Ստացված պո-տենցիալների տարբերության կախումը կատիոնների կոնցենտրացիայից նկարագրվում է Գուն-Չամպերի մոդելի շրջանակներում միազիցը կատիոնների ադսորբցիայի դեպքում և Գուն-Շտերնի մոդելով՝ երկզիցը կատիոնների և սերոտոնինի ադսորբցիայի դեպքում: Բոլոր դեպքերում անհրաժեշտ է հաշվի առնել, որ զանգվածայինների լիցքը դուրս է գտնվում թաղանթի ներքին մասից:

Ապացուցված է, որ GD_3 և GT_7 զանգվածայինները շատ ավելի ակտիվ են կապվում անօրգանական իոնների հետ, քան GM_1 , GM_3 զանգվածայինները կամ ֆոսֆոլիպիդները:

The interaction of inorganic cations and serotonin with the phosphatidylcholine bilayers, containing gangliosides GM_1 , GM_3 , GT_7 from human brain and GD_3 from buttermilk has been investigated.

Сокращения: ФХ—фосфатидилхолин, ГСХ—тонкослойная хроматография.

The dependences of boundary potential difference on the cation concentration can be satisfactorily described in terms of Gouy—Chapman model for monovalent cations adsorption and in terms of Gouy—Stern model for bivalent ones and serotonin. In both cases we have supposed that the gangliosides charges have been removed from the membrane surface for some distance.

The gangliosides Gm_1 and Gm_2 more actively bind the serotonin than Gm_1 , Gm_3 or phospholipids.

Взаимные липидные мембраны ганглиозидов—серотонин—адсорбция.

Одной из основных функций ганглиозидов в клетке является рецепторная. Ганглиозиды специфически связывают бактериальные токсины, вирус Сендай, лектины, гормоны и др. физиологически активные вещества [3]. Однако для некоторых веществ, в частности для серотонина, рецепторная функция ганглиозидов однозначно не доказана.

Впервые Вудли и Гомми [19] показали, что обработка мышечной кишок желудка крысы нейрампидазой приводит к потере чувствительности к серотонину, а последующая инкубация ее с ганглиозидами восстанавливает сократительную активность. При этом наибольшей активностью обладал ганглиозид Gm_2 [7]. В работе [5] показано, что свиные эритроцитарные мембраны способны связывать серотонин с высокой константой ассоциации. Однако авторы считают, что серотонин связывается в основном с мембранными гликопротеинами. Бутанольная фракция нервных окончаний связывает серотонин с константой около 10^6 M^{-1} [14], но при попытке выделить и очистить рецептор активность утрачивается. Следовательно, рецептор серотонина имеет, скорее всего, комплексную природу и может содержать ганглиозиды в качестве ко-рецептора [11, 16, 18]. Этот вывод подтверждается также исследованиями на модельных системах [7, 10, 13, 18]. Несмотря на противоречивость данных, большая часть их свидетельствует о низких константах связывания серотонина с ганглиозидами. Более того, имеет место неспецифическое электростатическое взаимодействие серотонина с ганглиозидами и кислыми фосфолипидами [13].

В свете сказанного представлялось целесообразным проведение дополнительного исследования связывания серотонина с ганглиозидоносными плоскими бислоями. Необходимо подчеркнуть, что сами по себе ганглиозидоносные бислои изучены недостаточно. Число работ, посвященных адсорбции простых неорганических катионов на таких бислоях, невелико, а полученные данные противоречивы [4, 9, 12]. Ранее нами было исследовано взаимодействие ганглиозидов с неорганическими катионами (кальцием, натрием, кальцием, магнием), что позволило охарактеризовать свойства плоских бислоев с ганглиозидами [2]. В настоящей работе представлены результаты дополнительного исследования электрохимических свойств ганглиозидоносных бислоев, теоретическая обработка которых позволила описать адсорбцию неорганических ионов на бислоевых липидных мембранах.

Материал и методика. Для формирования мембран использовали яичный ФХ и ганглиозиды мозга человека Gm_1 , Gm_2 , Gm_3 , выделенные по методу, описанному в работе [15], а также Gm_2 , выделенный по методу [6] из молочного порошка. Все

исследованные фосфолипиды и ганглиозиды, судя по ТСХ, были хроматографически однородными веществами. Серотонин в виде соли с креатинисульфатом («Calbioscience», USA) и гидрохлорид серотонина («Calbioscience», USA) содержали ничтожные количества примесей. В работе использовали соли KCl («хч»), NaCl («осч»), а также перекристаллизованные соли CaCl_2 и MgCl_2 .

Растворы неорганических солей готовили на дистиллированной воде. pH растворов электролитов и мяточного раствора серотонина (1 мМ раствор серотонина и 1 мМ растворе KCl) поддерживали около $6,8 \pm 0,2$ введением 1 М раствора KOH. В качестве фонового раствора использовали 1 мМ раствор KCl.

Способ получения липидных бислоев, содержащих ганглиозиды, а также методы измерения граничных потенциалов этих бислоев подробно описаны в [2].

Результаты и обсуждение. На рис. 1а показаны экспериментальная и теоретическая зависимости $\Delta\varphi$ от концентрации K^+ и Na^+ для бислоев из смеси ФХ/ГМ₁ (5,5 мол % ГМ₁ в мембранообразующем растворе). Контрольные эксперименты показали, что связыванием этих

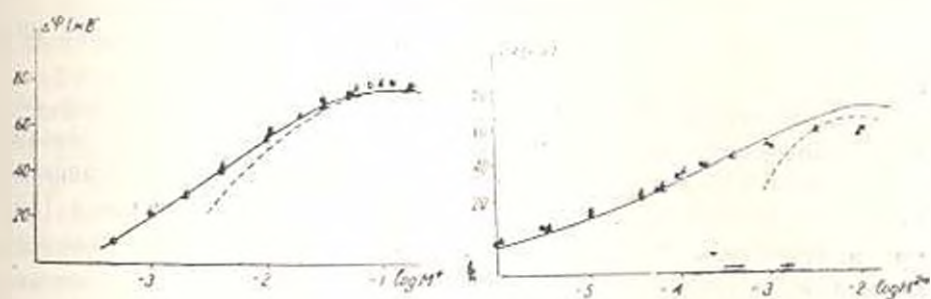


Рис. 1. а) Зависимость разности граничных потенциалов от концентрации K^+ ($\blacktriangle$) и Na^+ ($\bullet$) для бислоев из смеси ФХ/ГМ₁. Экспериментальные точки являются средними значениями из 2—3 измерений. Концентрация фонового электролита 1 мМ KCl. Сплошная теоретическая кривая построена в рамках модели Гуи-Чапмена с учетом вынесенности заряда ($a=1,5$ нм) по формуле (2), $\sigma=-0,0119$ К/м². Пунктирная кривая рассчитана по формуле (1). Пояснения в тексте. б) Зависимость разности граничных потенциалов от концентрации Ca^{2+} ($\bullet$) и Mg^{2+} ($\blacktriangle$) соответственно для бислоев из смеси ФХ/ГМ₁. Теоретические кривые получены в рамках модели Гуи-Нтерна с учетом вынесенности заряда $a=1,5$ нм, $\sigma=-0,0119$ К/м², $K=500$ М⁻¹. Зависимость, показанная пунктирной линией, рассчитана по формуле (1).

катионов с ФХ можно пренебречь. Обращает на себя внимание практически полное совпадение зависимостей $\Delta\varphi$ от концентрации K^+ и Na^+ . Пунктирная теоретическая кривая получена в рамках модели Гуи-Чапмена с учетом удаленности заряда полярных головок ганглиозидов от поверхности мембраны [8, 12], т. е. когда плоскость адсорбции вынесена в раствор на расстояние a . Картина распределения потенциалов в этом случае приведена на рис. 2.

Зависимость $\Delta\varphi$ от концентрации однозначных катионов в области малых потенциалов описывается по формуле (см. также [16]):

$$\Delta\varphi = \varphi_0 - \frac{\sigma e^{-\kappa x}}{\epsilon \epsilon_0 \kappa}, \quad (1)$$

где κ^{-1} — Дебаевская длина в растворе электролита, a — расстояние от поверхности бислоя до заряженной плоскости, σ — плотность зарядов

на заряженной плоскости ($\sigma = -0.0119 \text{ К/м}^2$), φ_0 — собственный потенциал на поверхности бислойа в 1 мМ растворе KCl ($\varphi_0 = -80 \text{ мВ}$), ϵ и ϵ_0 — диэлектрические проницаемости воды и вакуума соответственно. Формула (1) верна лишь для области малых потенциалов ($\sigma/\epsilon\epsilon_0\kappa < 25 \text{ мВ}$), поэтому при низких концентрациях катионов теоретическая

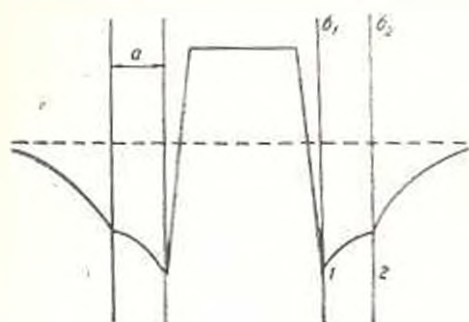


Рис. 2. Распределение потенциала на границе раздела мембрана/раствор для бислоя из смеси фосфолипидов с ганглиозидом: 1 — плоскость локализации головок фосфолипидов, 2 — плоскость локализации головок ганглиозида, b — расстояние между двумя плоскостями, σ_1 и σ_2 — поверхностные плотности зарядов этих плоскостей. В случае с бислоями из смеси ФХ/СМ $\sigma_1 = 0$, $\sigma_2 = -0.0119 \text{ К/м}^2$.

кривая хуже ложится на экспериментальные точки (пунктирная кривая).

Аналитическое решение уравнения Пуассона-Больцмана для случая с вынесенным зарядом в общем виде отсутствует [8, 17]. Численное решение этого уравнения связано с громоздкими вычислениями [17], поэтому мы воспользовались подходом, предложенным в [16]: при построении сплошной кривой на рис. 1 вынесенность заряда приближенно учитывали по формуле

$$\varphi = \varphi_0 - \varphi_1 \quad (2)$$

где φ_0 — потенциал на заряженной плоскости. Иными словами, мы делали поправку на уменьшение потенциала на поверхности мембраны относительно φ_0 за счет экранирования заряда в растворе. Сплошная кривая на рис. 1 описывает экспериментальную зависимость во всем диапазоне концентраций достаточно хорошо.

Заметим, что в нашем случае $\varphi_0 > 25 \text{ мВ}$ и определяется из обычного уравнения, связывающего потенциал с плоскостью заряда σ

$$\sigma = 2\epsilon\epsilon_0 RT \sum_i (\exp(-z_i \chi) - 1) \quad (3)$$

где $\chi = F\varphi_0/RT$; C_i , z_i — концентрация и заряд i -го иона, а суммирование производится по всем присутствующим в среде ионам. При $\varphi_0 < \text{мВ}$ формула (2) совпадает с формулой (1).

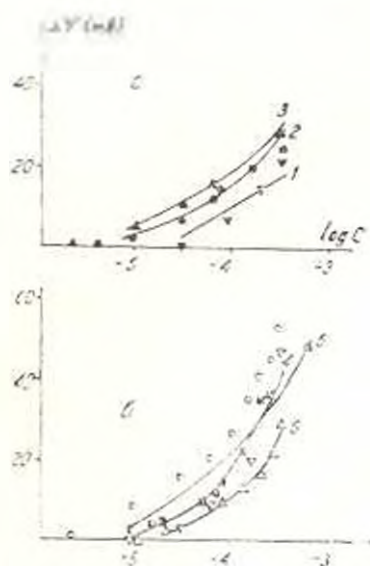
На рис. 1 б показаны зависимости $\Delta\varphi$ от концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} для бислоев из смеси ФХ/СМ, а также теоретические кривые адсорбции этих катионов. При теоретическом описании зависимостей, представленных на рис. 1 б, в рамках модели Гун-Штерна, мы пренебрегали адсорбцией на ФХ. При стехиометрии связывания $\text{Ca}^{2+}/(\text{СМ})$ 1:1, $\sigma = -0.0119 \text{ К/м}^2$, $\varphi_0 = -80 \text{ мВ}$, $a = 1.5 \text{ нм}$ константа связывания равна 500 М^{-1} . Пунктирная кривая получена по формуле (1) с учетом специфического связывания с константой $K = \sigma_0 / (\text{КС}_{\text{Ca}} - 1) \text{ КС}_{\text{Ca}}$, где σ_0 — объемная концентрация Ca^{2+} в растворе. Сплошная кривая получена по вышеуказанному методу пересчета измеремого потенциала φ_0 в

потенциал вынесенной в раствор заряженной плоскости φ_0 по формуле (2). Первый способ описания адсорбции позволяет достоверно определить константу связывания, но описывает экспериментальные данные лишь в узком диапазоне концентраций (область малых потенциалов). Метод пересчета потенциала при том же значении константы удовлетворительно описывает экспериментальные точки во всем диапазоне концентраций.

Константы связывания G_{M1} с Ca^{2+} и Mg^{2+} , судя по рис. 1б, практически совпадают. Это означает отсутствие Ca/Mg -специфичности. Отметим, что значения констант связывания, определенные по методу изоэлектрических точек [2], несколько выше. Теоретическая обработка всей зависимости $\Delta\varphi(\log C)$ позволила уточнить константы связывания и, скорее всего, более адекватно описать адсорбцию на ганглиозидсодержащих бислоях.

Мы исследовали связывание серотонина с бислоями из смесей ФХ с ганглиозидами. Серотонин, добавленный в виде соли с креатининсульфатом и в виде гидрохлорида, дает совпадающие зависимости $\Delta\varphi$ от его концентрации (данные не приводятся). Следовательно, можно считать, что креатинин специфически не взаимодействует с ганглиозидами. Контрольные эксперименты показали, что серотонин специфически адсорбируется на ФХ. Теоретическая обработка зависимости, показанной на рис. 3а (∇ , кр. 1), в рамках модели Гуи-Чапмена дает значение константы связывания $40 M^{-1}$. Сложность теоретического описания одновременной адсорбции на вынесенной в раствор плоскости и поверхности бислоя, а также низкое значение константы связывания на ФХ вынудили нас пренебречь адсорбцией на ФХ при описании взаимодействия серотонина с ганглиозидами.

Рис. 3. Экспериментальные и теоретические зависимости разности граничных потенциалов от концентрации серотонина. а) для бислоев из ФХ (∇ , кр. 1) и смесей ФХ/ГМ ($\bullet$, кр. 2), ФХ/ГД (Δ , кр. 3). б) для бислоев из смесей ФХ/ГМ (∇ , кр. 4), ФХ/ГД ($\blacksquare$, кр. 5), ФХ/кардиолпин (Δ , кр. 6) и ФХ/смесь ганглиозидов мозга ($\circ$). Плотность поверхностного заряда для всех ганглиозидсодержащих бислоев считали равной $-0,0119 K/m^2$, за исключением ФХ/ГД, ($\sigma = -0,006 K/m^2$, а для ФХ/кардиолпин $\sigma = -0,028 K/m^2$).



Как видно из рис. 3а, зависимости $\Delta\varphi$ от концентрации серотонина для бислоев, содержащих G_{M1} и $(G_{M1})_2$, практически совпадают. Теоретическая обработка экспериментальных данных дает значения $K = 150 M^{-1}$ для G_{M1} и $K = 200 M^{-1}$ для $(G_{M1})_2$ при стехиометрии связыва-

ния 1:1 в обоих случаях (кр. 2 и 3). Экспериментальную зависимость адсорбции серотонина не удастся описать при стехиометрии связывания 2:1 (т. е. 1 молекула серотонина на 1 сиаловую кислоту).

Существенно большее сродство обнаружено при взаимодействии серотонина с G_{13} и G_{15} (рис. 36, ■ и □). Характер зависимостей, приведенных на рис. 36, свидетельствует о кооперативном связывании серотонина с этими ганглиозидами и кардиолипином (Δ). Действительно, теоретические кривые 4 и 5 наилучшим образом описывают экспериментальные точки при стехиометрии связывания серотонин/ G_{15} 3:1 ($K = 10^3 M^{-1}$) и серотонин/ G_{13} 2:1 ($K = 10^4 M^{-1}$), если предположить возможность кооперативного связывания трех или двух молекул серотонина соответственно. Расчет аналогичной зависимости для мембран из смеси ФХ кардиолипина (5 мол. %) дает $K = 500 M^{-1}$ при стехиометрии 2:1 (кр. 6). На рис. 36 приведена также зависимость A_p от концентрации серотонина для биослов из смеси ФХ со смесью G_{15} , G_{13} и G_{17} , которая имеет форму, аналогичную кривым 4 и 5.

Результаты изложенных выше экспериментов свидетельствуют об отсутствии специфического связывания однозарядных катионов с ганглиозидами, что согласуется с данными других авторов [8, 12]. Константа связывания ганглиозидов с двухзарядными катионами невысока: $500 M^{-1}$. Это значение близко к величине $0-100 M^{-1}$, полученной для Ca^{2+} в работе [12]. Определенная нами константа связывания Ca^{2+} с ганглиозидами даже ниже, чем соответствующая константа связывания с кислыми фосфолипидами [1]. Это обстоятельство, наряду с отсутствием $Ca-Mg$ -специфичности, противоречит предположению о рецепторной функции ганглиозида по отношению к Ca^{2+} [14].

В отличие от двухзарядных неорганических катионов сродство серотонина к исследованным в данной работе ганглиозидам существенно отличается. Так, G_{15} и G_{13} связывают серотонин с константами 150 и $200 M^{-1}$, тогда как для G_{17} и G_{11} константы равны $10^3 M^{-1}$ и $5 \cdot 10^3 M^{-1}$ соответственно. В основе теоретического описания адсорбции серотонина на G_{17} (стехиометрия 3:1) лежит тетрамолекулярная, а на G_{11} (стехиометрия 2:1) — трехмолекулярная реакция. В результате размерность соответствующих констант отличается от обычной размерности констант связывания — M^{-1} . Для того, чтобы иметь возможность сравнить полученные константы, мы теоретически оценили концентрацию серотонина, при которой он свяжется с половиной молекул ганглиозида при данном значении констант связывания, т. е. когда плотность заряда уменьшается вдвое. Обратная этой концентрации величина может, на наш взгляд, характеризовать сродство G_{17} и G_{11} к серотонину и позволит сравнить с константами прочих ганглиозидов. Такая оценка дает для G_{17} $K = 4000 M^{-1}$, а для G_{11} $K = 7800 M^{-1}$. В случае с кардиолипином получается низкая константа $100 M^{-1}$.

Таким образом, специфичность связывания серотонина в значительной степени зависит от положения сиаловых кислот в олигосахаридной части их молекул. Дистальная сиаловая кислота ганглиозида G_{15} , по-видимому, не связывается с серотином, поэтому стехиометрия его связывания с G_{15} и G_{13} совпадает. Однако более высокая константа ассоциации с G_{13} свидетельствует скорее всего в пользу уча-

ствия дистальной синаловой кислоты и связывании серотонина с проксимальной синаловой кислотой.

Высокие константы связывания серотонина с G_{D1} и G_{D2} позволяют предположить, что наибольшим сродством к нему обладают связанные друг с другом синаловые кислоты, присутствующие в полярных головках обоих ганглиозидов.

Обращает на себя внимание существенное различие в константах связывания серотонина с G_{D1} и G_{D2} , которые отличаются как раз положением синаловых кислот в полярной головке. Было бы интересно сравнить полученные данные с адсорбцией серотонина на бислоях, содержащих G_{D1b} . Это дало бы информацию об участии остатков концевой галактозы и N-ацетилгалактозамина в связывании серотонина.

Интересно, что обработка нейраминидазой не влияет на связывание серотонина с синаптическими мембранами [5]. Это означает, что дистальные остатки синаловых кислот ганглиозидов и синалогликопротеинов, по-видимому, не участвуют в связывании серотонина, но неизвестным пока способом могут быть необходимы для проявления его физиологического эффекта [5, 18].

Согласно нашим оценкам, наибольшим сродством к серотонину обладает G_{D1} , то согласуется с данными Вулли и Гомми [19]. К сожалению, G_{D1} по-видимому, плохо экстрагируется в плоские бислои из ФХ и заметно снижает их электрическое сопротивление при повышении ионной силы окружающего мембрану раствора. Поэтому для уточнения данных по адсорбции серотонина и Ca^{2+} на бислоях с G_{D1} необходимы дальнейшие исследования. Известно, что G_{D1} повышает также проницаемость мембран *in vivo* [16]. Это свойство может быть непосредственно связано с его функциями в клеточной мембране. Что касается рецепторной роли ганглиозидов и, в частности G_{D2} , то полученные нами значения констант свидетельствуют скорее всего против такого предположения, так как эти константы не достаточно высоки.

Авторы выражают глубокую признательность Н. Г. Абидору, Л. В. Черномордику, С. А. Татуляну и Г. М. Авакяну за ценные обсуждения и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абидор Н. Г., Матиян Н. С. Биол. мембраны, 2, 1029—1048, 1985.
2. Матиян Н. С., Меликян Г. Б., Арзакян В. Б., Авакян Н. М., Кочарян С. А., Мнджоян О. А. Биол. ж. Армении, 40, 3, 179—183, 1987.
3. Adv. Exp. Med. Biol. Structure and function of gangliosides ed. L. Svennerholm, 123, Plenum Press, N. Y., London, 1985.
4. Behr G. A., Lehn J. FEBS. Lett. 31, 297—299, 1973.
5. Delle G. A., Wesemann W. Experimentia, 31, 9, 1152—1153, 1974.
6. Hautecoeur B., Sonnet S., Chindent R. Biochim. et Biophys. Acta, 833, 303—317, 1985.
7. van Heyningen W. E. Nature, 249, 416, 115—117, 1974.
8. Hill M. W., Lester R. Biochim. et Biophys. Acta, 282, 15—20, 1972.
9. Maggio B., Cummar C., Caputto R. Biochim. et Biophys. Acta, 51, 10, 69—80, 1981.
10. Marcus A. J., Hiltman H. L., Safier L. B. J. Cell. Invest. 51, 10, 2612—2612, 1972.
11. Marchbanks R. M. J. Neurochem., 13, 12, 1481—1491, 1966.

12. McDaniel R., Sharp K., Erock D., McLaughlin A. C., Winkler A. P., Cafiso D., McLaughlin S. *Biophys. J.*, 49, 741—752, 1986.
13. Geha E. L. M., Bangham A. D. *J. Neurochem.*, 29, 6, 1103—1106, 1976.
14. Rahmann H., Rosner H., Breer U. *J. J. Theoret. Biol.*, 57, 231—237, 1976.
15. Seyfried T., Ando F., Yu R. K. *J. Lipid Res.*, 19, 538—543, 1978.
16. Seyfried T. A., Yu R. K. *Mol. and Cell Biochem.*, 68, 1, 3—10, 1985.
17. Sharp K. A., Brooks D. E. *Biophys. J.*, 41, 563—566, 1985.
18. Tamir H., Bruner W., Casper D., Raffort M. M. *J. Neurochem.*, 34, 6, 1719—1724, 1980.
19. Wooley D. W., Gommi B. W. *PNAS USA*, 61, 3, 959—963, 1964.

Поступило 19.VI 1987 г.

Бiolог. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 591.813:612.018

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА L-КЛЕТОК МЫШИ, ОБРАЗУЮЩЕГОСЯ НА НЕДОМЕТИЛИРОВАННОЙ ДНК

В. О. АНРАПЕТЯН, Т. А. МАНАМЬЯН, Г. Н. КИРЬЯНОВ

Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова,
межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Бекетовского

Показано, что на недометилованной в ходе репликации ДНК формируется хроматин с аномально повышенной нуклеазочувствительностью и нарушенным межнуклеосомным взаимодействием. Эти особенности структуры сохраняются и после репликации.

Յուշտ է արված, որ սեպիրկացիայի ընթացքում թերմեթիլացված ԴՆԻ-ի վրա համապատասխան է նուկլեոզոմների նկատմամբ անսովոր բարձր զգայնությունը քրոմատինի, որում բախտված է և միկրոնուկլեոզոմային փոխազդեցությունները փրոմոտորի կայունացվածության այն ապահովող մեխանիզմները պահպանվում են նաև սեպիրկացիայից հետո:

The chromatin assembled on DNA, undermethylated during replication, is demonstrated to have an anomalously high sensitivity to nucleases. These peculiarities are still maintained after replication.

Хроматин—5-азациитидин—метилирование ДНК.

В последние десятилетие получены многочисленные экспериментальные свидетельства вовлеченности энзиматического метилирования ДНК эукариотических клеток в процессы регуляции экспрессии генов. На примере ряда генов показано, что недометилованность отдельных сайтов гена, прежде всего в 5-области, является необходимым условием экспрессии гена [1]. Характер метилирования тотальной ДНК клетки и определенных последовательностей генома моделируется в онтогенезе, обладает выраженной тканевой и клеточной специфичностью. Главным, хотя, вероятно, и не единственным, механизмом изменения характера метилирования ДНК является модуляция уровня метилирования

Сокращения: 5-аздс—5-азациитидин

потенциально узнаваемых ДНК-метилазами сайтов модификации в ходе репликации ДНК [8]. Ясно, что в процессе направленного изменения характера метилирования отдельных генов должны принимать участие какие-то факторы, регулирующие сам процесс метилирования. К сожалению, сегодня о таких механизмах можно говорить только как о гипотетических. В то же время возможно экспериментально изменить (снизить) уровень метилирования ДНК в клетке, используя такой ингибитор метилирования, как 5-аза-С. Этот аналог цитидина включается в ДНК в виде трифосфата обычного СТР, но не способен метилироваться. Кроме того, в процессе репликации ДНК образуется стабильный комплекс ДНК-метилазы с 5-аза-С-содержащей ДНК, что еще больше снижает уровень метилирования ДНК [8]. Включение 5-аза-С в ДНК приводит к активизации экспрессии многих генов [11]. Показано, что вызванное 5-аза-С недометилирование ДНК определенных генов является не директивным сигналом для экспрессии, а детерминирующим фактором. Иными словами, недометилирование гена в некоторых сайтах определяет переход его из неактивного состояния в активированное, состояние «готовности» к экспрессии [1].

Невыясненным остается вопрос о реализации особенностей метилирования ДНК определенного гена, механизмах сопряжения характера метилирования ДНК и экспрессии гена. Ранее нами было высказано предположение, что посредником в этом сопряжении может быть модуляция структуры хроматина таким образом, что локальные изменения метилирования ДНК приводит к локальным или генерализованным изменениям структуры хроматина. В настоящей статье приводятся результаты исследования структуры хроматина, формирующегося на недометилированной ДНК, синтезированной в клетках мыши в присутствии 5-аза-С.

Материал и методы. L-клетки фибробласты мыши выращивали на поверхности стеклянных флаконов на питательной среде, состоящей из среды 199, (45%) 0,5%-ного гидролизата лактальбумина, (45%) сыворотки крупного рогатого скота с добавлением 100 ед./мл пенициллина и 0,2 мкг/мл стрептомицина (10%). Культуру выращивали до средней плотности ($3 \cdot 10^5$ кл./см²).

В экспериментах с включением радиоактивного изотопа клетки инкубировали с метил-³H-тиминидином ($5-10$ мкКи/мл) с удельной радиоактивностью 13,4 Ки/мм (СССР) или 24,4 Ки/мм (ЧССР).

В инкубационную среду добавляли также ингибитор метилирования 5-аза-С в концентрации 20 мМ на 4–6 часов. Ядра L-клеток выделяли, как описано ранее [6].

Хроматин и состав ядер гидролизуют микрококковой нуклеазой («Boehringer», ФРГ) в растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,5 мМ MgCl₂, 0,5 CaCl₂. Инкубацию проводят в течение 10 мин при 37° с разными количествами фермента. Реакцию останавливают быстрым охлаждением до 0° при одновременном добавлении ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ. Далее хроматин суспендируют с помощью ультразвука (дезинтегратор MSE, Англия) 15 с при максимальной мощности и центрифугируют при 1500 g в течение 10 мин. В супернатанте определяют долю экстракционной и растворимой фракций гидролизата хроматина (т.е. ДНК) [6]. Радиоактивность определяют в диоксановом сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляторе Mark-III («Tracor», Егора, Нидерланды). Эффективность измерения (³H) в данной системе составляла 15–30%.

Электрофорез частиц хроматина проводили в трубках в 5% ПААГ [6]. Гели после электрофореза окрашивали в течение 45 мин 0,1%-ным Кумасси R-250 («Serva», ФРГ) в смеси метанол—вода—лимонная уксусная кислота (45:45:10). Невязавшийся краситель отмывали 7%-ной уксусной кислотой. Гели сканировали на спектрофотометре Gilford-250 (Франция), затем замораживали, разрезали на диски по 0,2 см и после растворения в 1 мл H_2O_2 с 1%-ным NH_3 при 60° в течение ночи определяли их радиоактивность. Смесь нейтрализовали 0,1 М HCl (10—30 мМ), добавляя к ней 10 мл диоксанового сцинтиллятора и определяли радиоактивность, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Для выявления возможных изменений в структуре хроматина, формирующегося на недометилированной ДНК, 1-клетки инкубировали в присутствии 5-аза-С в концентрации 20 мкМ. Клетки, растущие со «средней» плотностью, в слое активно делятся, так что при инкубации в течение 4—6 ч с 3H -тимидином и 20 мкМ 5-аза-С около 50—80% клеток радиоактивно мечены и, следовательно, включают 5-аза-С в ДНК. При такой длительности инкубации преобладающая часть меченой ДНК выходит из вилки репликации, и хроматин, сформированный на ней, уже лишен тех транзиторных свойств, которыми характеризуется вновь образованный хроматин. Таким образом, при такой постановке опыта особенности структуры хроматина, если таковые будут обнаружены, определяются уже только включением 5-аза-С и недометилированием ДНК, входящей в его состав. Одним из общепотребительных тестов на состояние хроматина является его нуклеазочувствительность. Повышенной нуклеазочувствительностью, как известно, обладает хроматин в вилке репликации в течение нескольких минут после завершения синтеза данной последовательности ДНК [7], а также хроматин активно транскрибируемых генов [6, 9].

Кривая гидролиза ДНК в хроматине микрококковой нуклеазой (рис. 1) показывает, что хроматин, сформированный при инкубации клеток в присутствии 5-аза-С (кривая 1—по радиоактивности), значительно более нуклеазочувствителен, чем суммарный хроматин (кривая 2—по ультрафиолету) в этих же клетках. Различия в доступности, оцениваемые по выходу в процессе гидролиза растворимой фракции, т. е. по степени нуклеазной солиubilизации хроматина, а также по выходу кислоторастворимой фракции, т. е. по глубине гидролиза, выявляются при всех избранных соотношениях ДНК и фермента. Как начальная скорость расщепления ДНК (5-аза-С-содержащей хроматин), так и глубина расщепления в среднем в 1,5—3 раза выше, чем в контроле (суммарный хроматин).

Такие значительные различия в доступности ДНК в составе хроматина, количественно близкие таковым в степени доступности для нуклеазы между суммарным хроматином и хроматином репликации [4], должны соответствовать существенным различиям в структурной организации хроматина.

Информативным в этом плане является анализ продуктов расщепления хроматина при их фракционировании электрофорезом в геле. На рис. 2 представлены электрофореграммы частиц хроматина солиubilизируемых при нуклеазной обработке ядер. Ранее нами было показано, что хроматин ядер, выделенных в присутствии тритона X-100, фрагментируется преимущественно с выщеплением динуклеосом, из которых самой представительной является хромосома—частица с длиной ДНК 320 пар оснований, а также одна из моонуклеосом с длиной ДНК 100 пар оснований [5]. Анализ набора высвобождаемых частиц, дина-

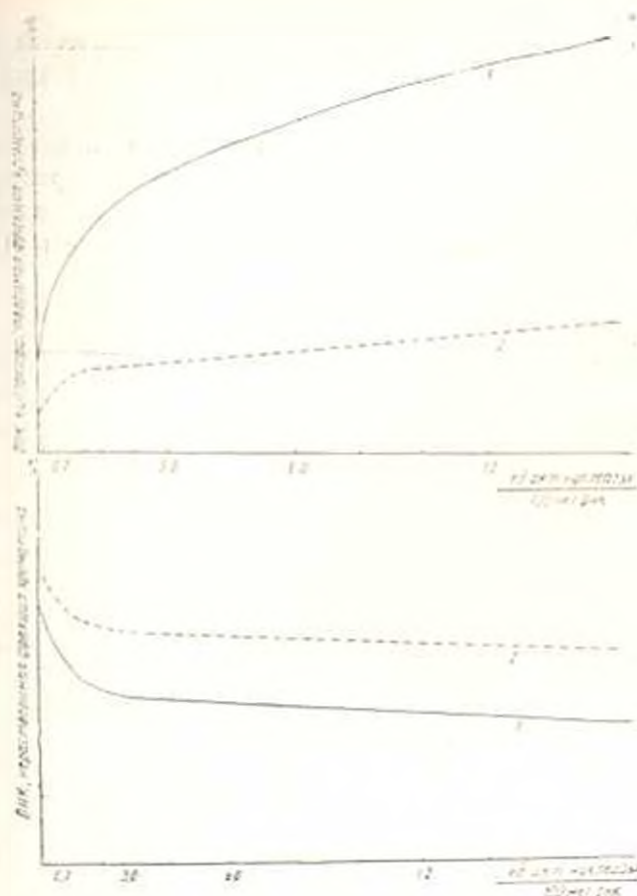


Рис. 1. Гидролиз микросомальной нуклеазой хроматина алланта, инкубированных с 5-азациитидином в течение 6 ч. а. выход кислоторастворимой фракции; б. солюбилизация хроматина (увеличение нерастворимой фракции). 1—кривая по радиоактивности ^3H тимидина. 2—кривая по УФ определению.

мики нуклеазного гидролиза и белкового состава частиц хроматина привел к заключению о том, что динуклеосомный характер расщепления (дихроматосомный) отражает специфическое межнуклеосомное взаимодействие в наднуклеосомной фибрилле. Одной из ярко выраженных особенностей гидролиза хроматина ядер, выделенных в присутствии тритона X-100, является отсутствие в наборе субчастиц кор-частицы даже при достаточно жестких условиях гидролиза. Набор частиц, выделяемых из хроматина, сформированного в клетках, инкубированных в присутствии 5-аза-С (6 ч), резко отличается от описанного выше. В условиях достаточно мягкого гидролиза преимущественная часть тотального хроматина (рис. 2, кр. 1) фрагментируется на крупные блоки, соответствующие фрагментам нуклеосомной цепи из 4 и более нуклеотидов, а ди- и моонуклеосомы представляют собой минорную фракцию. В то же время весь хроматин, сформированный на метилированной ДНК расщепляется главным образом до моонуклеосом (рис. 2, табл. 1). Аналогично этому, хроматин, сформированный на ДНК клеток, инкубированных в присутствии 5-аза-С в течение 24 ч, т. е. в условиях, когда в клетках, включивших 5-аза-С в ДНК, завершена S-фаза, характеризуется такой же степенью доступности для нуклеазы и таким же характером фрагментации. В обоих случаях обращает на се-

бля внимание факт наличия довольно большого количества материала с подвижностью, соответствующей коровой частице, а также субкоровых фрагментов.

Все это позволяет заключить, что повышенная нуклеазная чувствительность хроматина, синтезированного в клетках в присутствии 5-аза-С, обусловлена как нарушением межукусомных взаимодействий, так и, возможно, большей степенью экспонированности ДНК в самой корчастице хромосом.

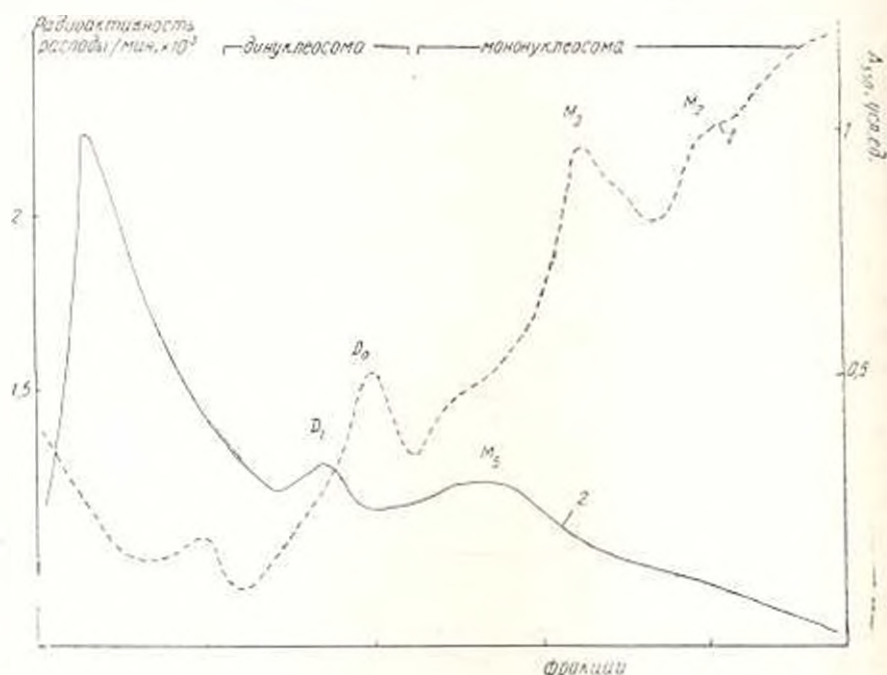


Рис. 2. Электрофореграмма фракций растворимого хроматина, полученной нуклеазным гидролизом ядер клеток, инкубированных с 5-азацитидином в течение 6 ч. 1—радиоактивность; 2—окраска «Кумасси-250».

Оставляя пока в стороне вопрос о причинах изменений структуры хроматина, наблюдающихся в опыте, рассмотрим более подробно модель опыта. Как известно, эффект недометилирования ДНК и активации транскрипции наблюдается, как правило, через два цикла репликации ДНК, т. е. по достижении состояния полной недометилированности сайта (ранее метилированного) в обоих нитях дуплекса ДНК [11]. Мы поставили задачу изучить те изменения структуры хроматина, которые возникают одновременно с заключением 5-аза-С в ДНК и, следовательно, с возникновением полуметилированного сайта. Нельзя исключить, что эти изменения могут быть транзиторными и не поддерживаются в хроматине в дальнейшем, после завершения первого этапа репликации ДНК. Для оценки этой возможности мы анализировали структуру хроматина в клетках в условиях чейз-эксперимента (смена среды) спустя 24 и 48 ч после инкубации клеток с 5-аза-С.

В табл. 1 приведены результаты анализа нуклеазочувствительности хроматина в таких условиях. Видно, что различия в доступности ДНК

для гидролиза, хотя и уменьшаются, но остаются существенными. В целом, уровень доступности метилированной ДНК и хроматин клеток после 24—48 ч роста на нормальной среде в 1,5—1,8 раза выше, чем для тотального хроматина клеток этой же культуры, и то время как аналогичные значения для хроматина клеток, инкубированных с 5-аза-С в течение 24 ч, составляют 1,6—2,5 (табл. 1). При анализе электрофореграмм растворимой фракции хроматина видно, что и спустя 24 и 48 ч после переноса клеток в среду без 5-аза-С сохраняются резкие различия в наборе субчастиц хроматина, высвобождаемых при нуклеазном гидролизе. В то время как тотальный хроматин (рис. 3, кр. по окраске) расщепляется на крупные блоки, соответствующие частицам крупнее, чем моно- и динуклеосома (большая часть материала локали-

Таблица 1. Относительная доступность к нуклеазе хроматина с 5-аза-С замещенной ДНК (радиоактивность) и суммарного хроматина (УФ определение) в разных условиях гидролиза

Условия инкубации	УФ-радиоактивность ДНК растворимой фракции УФ ДНК растворимой фракции		
	мягкий гидролиз	средний гидролиз	жесткий гидролиз
24 ч 5-аза-С	1.6	1.8	2.5
24 ч 5-аза-С + 48 ч отмывки	1.3	1.3	1.8

зован на старте геля). хроматин, сформированный в клетках, инкубированных с 5-аза-С, расщепляется на моно- и динуклеосомы. Хроматин из клеток, инкубированных с 5-аза-С 24 ч. (рис. 3), представлен в геле главным образом моонуклеосомной фракцией, которая составляет от 80 до 90% всего материала (табл. 2), при этом доля кор-частиц и субкоровых фрагментов варьирует в зависимости от глубины гидролиза в пределах 50—80%. Инкубирование таких клеток после смены среды несколько стабилизирует структуру хроматина. Так, через 24 ч после смены среды доля моонуклеосом составляет 60—80%, а кор-частиц и субкоровых фрагментов—25—60%. Близки к этим данным и результаты анализа хроматина клеток после 48 ч кейз-эксперимента. После смены среды в клетках наблюдается также некоторая стабилизация моонуклеосом, уменьшается доля субкоровых фрагментов, более четко выделяется кор-частица, увеличивается представительность других типов моонуклеосом, в частности, наблюдается появление хромосом. В зоне динуклеосом, однако, практически единственной выделяемой частицей является Д0, которая соответствует безопейсерности динуклеосоме как было определено нами ранее [5]. Только в клетках, инкубированных в течение 48 ч после удаления 5-аза-С из среды инкубации, в зоне динуклеосом нуклеазного гидролизата выявляется типичная динуклеосома—Д1.

Таким образом, основные особенности структуры хроматина, возникшие в ходе репликации ДНК в клетках в присутствии 5-аза-С, со-

храняются и после завершения первого цикла репликации ДНК, а также после прохождения клеткой второй S-фазы.

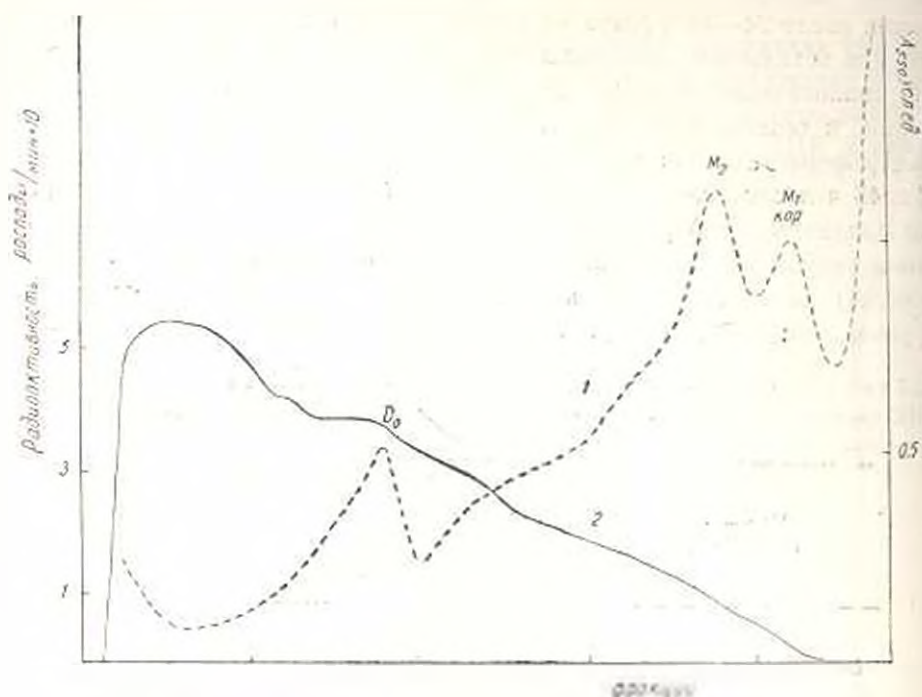


Рис. 3. Электрофореграмма фракции растворимого хроматина, полученной нуклеазным гидролизом ядер клеток, инкубированных с 5-азацианом 24 ч + 24 ч после смены среды. 1—радиоактивность; 2—окраска «Кумасси-250».

Таблица 2. Глубина гидролиза микрококковой нуклеазой хроматина клеток, инкубированных с 5-аза-С в разных условиях

Условия инкубации клеток	Условия гидролиза			Относительная доля частей во фракции растворимого хроматина, %
	мягкой	средней	жесткой	
24 ч 5-аза-С	17 19 54	21 17 62	7 11 82	Динуклеоиды Мононуклеоиды Короткие частицы и сульфидная фракция (К+СК)
24 ч 5-аза-С + 24 ч смены среды	35 47 55	27 25 48	16 31 53	ДНП МНС К+СК
24 ч 5-аза-С + 48 ч смены среды	34 21 56	25 33 51	31 14 53	ДНП МНС К+СК

Выявленные особенности структуры хроматина, сформированного в клетках, инкубированных с 5-аза-С, в принципе, близки тем, которыми характеризуется хроматин активно экспрессируемых генов. Декомпактизация хроматина, снятие динуклеосомной структуры являются, по-видимому, обязательным условием его перехода из неактивного со-

стояния в активное. Результаты настоящей работы позволяют сделать вывод, что структурный переход хроматина в активированное состояние может определяться в ходе его сборки на синтезирующейся клетке цедометилированной ДНК. Исследование белкового состава хроматина, сформированного на цедометилированной ДНК, может пролить свет на причины аномалий в его структуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурьянов Я. Н., Кирьянов Г. Н. Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», М., 23, 1987.
2. Ванюшин Б. Ф. Успехи совр. биологии, 77, 68—90, 1974.
3. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Исеева Л. В., Ванюшин Б. Ф., Бурьянов Я. Н. Биохимия, 46, 1487—1495, 1991.
4. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Маналиян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 11, 1855—1863, 1987.
5. Кирьянов Г. Н., Смирнова Т. А., Маналиян Т. А., Ходосовская А. М. Биохимия, 52, 12, 983—990, 1987.
6. Ходосовская А. М., Исеева Л. В., Смирнова Т. А., Маналиян Т. А., Кирьянов Г. Н., Ванюшин Б. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол., 268—275, М., 1986.
7. Hildebrand C. E., Walters R. A. Biochem., Biophys. Res. Commun., 72, 1—4, 1976.
8. Jones P. A., Taylor S. M. Nucl. Acids Res., 9, 2941—2947, 1981.
9. Kuo M., Mandel J., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2107—2111, 1979.
10. Mandel J. L., Chambon P. Nucl. Acids Res., 7, 2081—2103, 1979.
11. Taylor U., Guntaka R. V., Erlanger B. F., Miller O. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 435—440, 1981.

Поступило 3.II 1988 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 539.263 + 546.562 + 386.543.253

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ (II) С ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ МЕТОДОМ ЭПР

Р. А. АСАТУРЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР, лаборатория радиационной биологии

Методом ЭПР изучали комплексобразование между медью (II) и глутаминовой кислотой в связи с известной по данным литературы противоопухолевой активностью их на штаммах саркомы S-37 животных. В зависимости от pH выделены и идентифицированы три типа комплексов, два из которых лабильны, а третий стабилен при нейтральных и щелочных значениях pH. Противоопухолевой активностью могут обладать и основном комплексе типа III. Высказывается предположение, что применение метода EXAFS спектроскопии при изучении структуры этих комплексов позволит непосредственно наблюдать эффект Яна-Теллера.

ЭПР-ի մեթոդով ուսումնասիրվել է պղնձի (II) և գլուտամինաթթվի կոմպլեքսագոյացումը, որը համաձայն գրականության տվյալների, ցուցաբերում է հակառակուսացային ակտիվություն սարկոմա S-37 շտամով ուռուցքաիրի կենդանիների համար:

pH-ից կախված սահմանվել է որոշվել են կոմպլեքսների էներգիայի, որոշվել էրկար շարժունակ էն, իսկ էրարգր կալուն է՝ pH-ի ընդոս և ֆունկցիոնալ զննվել էր:

Հակառակորդային ակտիվությունը կարող է օժտված լինել հիմնականում երրորդ փուլի կոմպլեքսը: Ենթադրվում է, որ EXAFS սպեկտրոսկոպիայի մեթոդի կիրառումը այդ կոմպլեքսների կառուցվածքի ուսումնասիրության համար հնարավորություն կտա անմիջականորեն դիտել Յան-Քելլերի էֆեկտը:

The formation of copper (II)—glutamic acid complexes has been studied by the ESR method in connection with the literature data on their antitumour activity on animal tumour strains of sarkoma S—37. Depending on pH there have been extracted and identified three types of complexes, two of which are labile and the third one is stable with pH being neutral and alkaline. Antitumour activity can have mainly complexes of type 3. It is presumed that the study of the structure of these complexes by the method of EXAFS spectroscopy will allow to observe directly the Jahn—Teller effect.

EXAFS спектроскопия—*g-тензор—суперсверхтонкая структура спектров ЭПР—эффект Яна-Теллера*

Известно [16], что некоторые комплексные соединения платины, в частности, $\text{cis-Pl}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, обладают противоопухолевыми свойствами. Однако сильное побочное действие—почечная недостаточность—ограничивает их применение. Поиски новых противоопухолевых средств с менее выраженными побочными действиями привели к синтезу комплексов меди (II) с фенилантрапиновой кислотой и ее производными [4, 5, 10], а также с аминокислотами [6—8]. Координационным соединением меди (II) с α -аминокислотами придается большое значение, так как они, являясь липидорастворимыми, могут транспортировать медь (II) через плазматическую и другие мембраны [7, 9]. Кроме того, эти комплексы являются модельными системами для большинства активных центров медьсодержащих белков и ферментов [7]. В работе [6] представлены данные о противоопухолевой активности комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой на штаммах саркомы S-37 животных, вызывающих торможение роста опухоли на 40—60%. Механизм этого эффекта неясен. Для понимания функции этих комплексов важно изучить их структуру. Первый шаг в этом направлении сделан [3] при теоретическом изучении электронной структуры комплексных соединений меди (II) с α -аминокислотами.

Целью наших исследований являлось изучение методом ЭПР структуры комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой и применение затем метода EXAFS спектроскопии для получения структурных параметров этих комплексов, как это было сделано нами для комплексов медь (II)—альбумин [11, 12].

Материал и методика. Использовали L-глутаминовую кислоту («Reanal», Венгрия) «4» и соль $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ «чда». Исходный раствор меди (II) готовили в смеси диетилат: метанол с объемной стехиометрией 1:1 и концентрацией 5 мМ. Комплексы готовили при 50° на магнитной мешалке и имели молярную стехиометрию медь (II): глутаминовая кислота, 1:2.

Измерения pH проводили на стандартном pH-метре типа pH-673 с ошибкой измерения ± 0.025 , откалиброванном по стандартным буферным растворам. Буферные

растворы для исходных комплексов не использовали во избежание комплексообразования меди (II) с компонентами буфера. Необходимые значения pH получали добавлением малых количеств 0,1 N HCl и 0,6 N NaOH.

Спектры ЭПР регистрировали на ЭПР спектрометре «Varian»-E-4 при комнатной температуре и -190° .

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены спектры ЭПР при комнатной температуре (спектры а, б, в, г, д, е) и при -190° (спектры а', б', в', г', д', е') комплексов меди (II) с глутаминовой кислотой при различных значениях pH. При pH меньше изоэлектрической точки глутаминовой кислоты (pI 3,08), равном 2,2 (спектр а), наблюдается синглетный спектр шириной около 14,0 мТ.

На первый взгляд можно предположить, что это сигнал гидратированной меди (II). Однако запись этого же образца при -190° (спектр а') показывает присутствие четырех компонент СТС (отмечены цифрами 1, 2, 3 и 4) с величиной $A_{\parallel} = 11,2 \pm 0,1$ мТ и значениями $g_{\parallel} = 2,427 \pm$

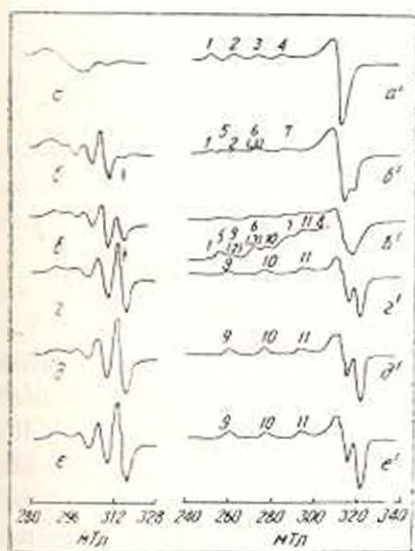


Рис. 1.

Фиг. 1. Спектры ЭПР комплексов меди (II)-глутаминовая кислота при комнатной температуре (спектры а, б, в, г, д, е) и -190° (спектры а', б', в', г', д', е'). Значения pH: а, а'—2,2; б, б'—3,6; в, в'—5,1; г, г'—7,5; д, д'—10,4; е, е'—12,5. Цифры над спектрами указывают на компоненты сверхтонкой структуры. Часть спектра а' повторно записана при усилении в 4 раза больше. Стрелки под спектрами б и в указывают на компоненту спектра, которая растет с увеличением pH.

Рис. 2. Значения g-тензоров комплексов меди (II)-глутаминовая кислота для I, II и III типов комплексов в зависимости от pH.

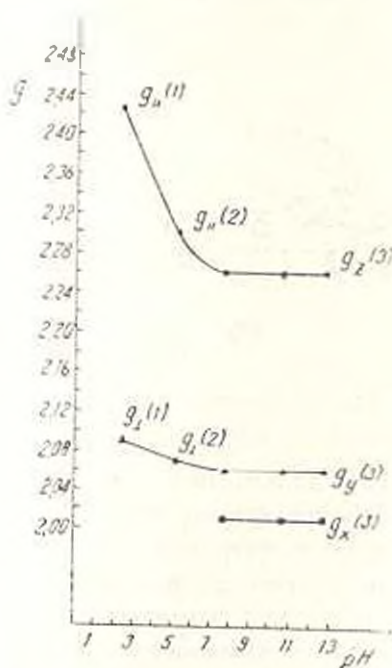


Рис. 2.

0,001 и $g_{\perp} = 2,094 \pm 0,001$ (рис. 2). Расщепление компонент СТС в области магнитного поля, когда ось комплексов меди (II)-глутаминовая кислота параллельна направлению магнитного поля, указывает на иммобилизацию меди (II). На это указывает также запись того же рас-

творя при комнатной температуре, в спектре которого (спектр *а*) виден пик в области магнитного поля 312 мТ, связанный с незначительной иммобилизацией меди (II) глутаминовой кислотой. Эта точка зрения подтверждается и малой величиной константы СТС, равной 11,2 мТ, и большими значениями $g_{\parallel} = 2,427 \pm 0,001$ и $g_{\perp} = 2,094 \pm 0,001$ (рис. 2). В соответствии с данными работы [14] по исследованию комплексов кобальт (II)—гистидин методом ЯМР авторы при значении pH, равном 1, когда изоэлектрическая точка гистидина равна 7,6, считают, что кобальт (II) наряду с пятью лигандными молекулами воды должен быть координирован с атомом кислорода карбоксильной группы в качестве шестого лиганда. Кроме того, учитывая приведенный в этой же работе эмпирический ряд, в соответствии с которым кобальт (II) с ростом pH вначале предпочитает связываться с молекулами воды, а затем, по мере роста pH, с карбоксильными и аминными группами, можно считать, что при pH ниже изоэлектрической точки глутаминовая кислота координирована с медью карбоксильной группой в аксиальном положении (рис. 3а). Обозначим их в виде комплексов типа I.

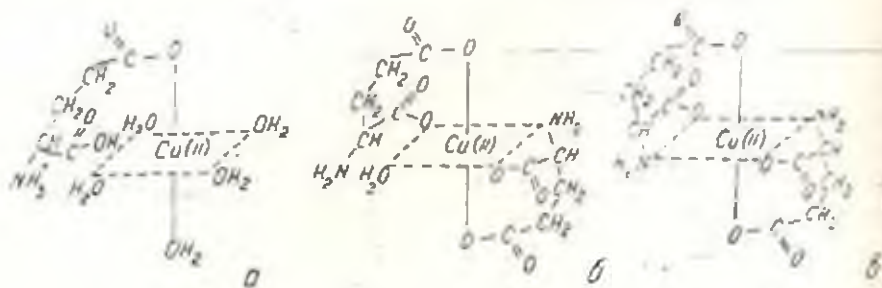


Рис. 3. Схематические структуры комплексов меди (II)—глутаминовой кислоты: а—комплекс типа I, б—типа II, в—типа III.

При дальнейшем повышении pH в спектре ЭПР при комнатной температуре (спектр *б*) появляется сверхтонкая структура с величиной изотропного сверхтонкого взаимодействия, равной 5,7 мТ. При -190° спектр *б'* этого же раствора изменяется таким образом, что компоненты СТС 1 и 2 комплексов типа I уменьшаются и, наряду с ними, появляются компоненты СТС—5,6 и 7. Кроме того, в области магнитного поля около 320 мТ появляется дополнительный пик. Такое изменение спектров говорит о том, что при увеличении pH от 2,2 до 3,6 появляется другой тип комплексов наряду с комплексами типа I, причем соотношение их концентраций примерно равное.

При повышении pH до 5,1 в спектре при комнатной температуре происходят резкие изменения: сильно увеличивается интенсивность правой крайней компоненты (она отмечена на спектрах стрелкой), на которой появляется суперсверхтонкая структура из трех компонент с величиной расщепления $1,0 \pm 0,05$ мТ (число компонент и величину расщепления удалось обнаружить в специальных условиях записи спектров ЭПР). Значение изотропного g-фактора равно 2,114, а изотропное сверхтонкое расщепление равно $6,0 \pm 0,05$ мТ. Запись этого же раствора при -190° (спектр *в'*) показывает полную трансформацию предыдущего спектра

б'. Запись сигнала ЭПР в области, когда ось комплекса параллельна направлению внешнего магнитного поля при большем усилении, показала, что в спектре а' наблюдаются компоненты СТС от трех типов центров: соотношение между их концентрациями таково, что максимальную из них имеет центр, у которого компоненты СТС имеют номера 5, 6, 7 и 8; компоненты СТС с номерами 9, 10 и 11 и тем более 1, 2 и 3 имеют явно меньшую интенсивность. В связи со сказанным в спектр а' основной вклад вносит новый тип комплексов с компонентами СТС 5, 6, 7 и 8.

Значение $A_{\parallel}$ этого типа комплексов (тип II) равно уже 15,7 мТ. В перпендикулярной ориентации комплексов наблюдается суперсверхтонкая структура тоже из трех компонент с величиной расщепления $A_{\perp} = 2,3 \pm 0,1$ мТ. Спектр имеет аксиальную симметрию с $g_{\parallel} = 2,313 \pm 0,001$ и $g_{\perp} = 2,074 \pm 0,001$ (рис. 2). Увеличение константы СТС до 16,7 мТ, уменьшение $g_{\parallel}$ от 2,427 до 2,313 и $g_{\perp}$ от 2,094 до 2,074 (рис. 2), а также число суперсверхтонких компонент как в изотропном спектре при комнатной температуре, так и в перпендикулярной ориентации при -190° указывают на такую структуру, в которой один из экваториальных лигандов должен быть атомом азота. Кроме того, в соответствии с требованиями упомянутого выше эмпирического ряда при данных значениях pH медь (II) должна связываться с большим количеством карбоксильных групп, чем с молекулами воды. Учитывая, что данная структура комплексов медь (II) — глутаминовая кислота должна быть не очень стабильной, так как она сохраняется в очень малом интервале значений pH (от 4 до 5), мы можем предложить структуру комплексов типа II в виде, приведенном на рис. 3б.

Дальнейшее увеличение pH до 7,5 приводит к полной трансформации спектров как при комнатной температуре (спектр а), так и при -190° (спектр а'). При комнатной температуре резко изменяется соотношение между компонентами сверхтонкой структуры, возникающей в результате взаимодействия неспаренного электрона атома меди (II) со своим ядром ($I = 3/2$): происходит их уширение с уменьшением магнитного поля. Причины этого явления были рассмотрены Мак Коннели еще в 1956 г. [15].

Детальная запись спектра ЭПР в специальных условиях показала, что на самой интенсивной компоненте СТС появилась суперсверхтонкая структура из 5 компонент с величиной расщепления $1,05 \pm 0,05$ мТ. Кроме того, увеличилась изотропная константа сверхтонкого взаимодействия от 6,0 мТ до 6,9 мТ и изменилось значение изотропного g-фактора от 2,114 до $2,125 \pm 0,001$.

В спектре ЭПР этого же раствора при -190° присутствуют в основном компоненты СТС с номерами 9, 10 и 11. В области магнитного поля несколько больше 320 мТ появилась дополнительная компонента, свидетельствующая о анизотропии g-тензора по осям x и y. Значение константы СТС в параллельной ориентации ($A_{\parallel}$) увеличилось от $15,7 \pm 0,1$ до $17,0 \pm 0,1$ мТ, а значение $g_{\parallel}$ уменьшилось от $2,313 \pm 0,001$ до $2,261 \pm 0,001$, что указывает на рост лигандного поля (рис. 2). Анизотропные значения g-тензора по осям x и y имеют значения: $g_x = 2,011$ —

0,001 и $g_{\parallel} = 2,062 \pm 0,002$ (рис. 2). В перпендикулярной ориентации комплексов медь (II) — глутаминовая кислота, то есть когда ось комплексов перпендикулярна внешнему магнитному полю, наблюдается 5 суперсверхтонких компонент спектра с величиной расщепления $A_{\perp} = 1,1 \pm 0,1$ мТ. Эта величина примерно в два раза меньше, чем $A_{\parallel}$ для комплексов типа 2, для которых $A_{\parallel} = 2,3 \pm 0,1$ мТ.

Эти данные, наряду с количеством компонент суперсверхтонкой структуры, позволяют однозначно считать, что спектры α и α' должны соответствовать таким комплексам медь (II) — глутаминовая кислота, в которых медь (II) взаимодействует с двумя эквивалентными аминными группами этой кислоты.

Такое предположение подтверждается также требованием эмпирического ряда работы [14], в соответствии с которым с ростом pH медь (II) должна предпочитать связываться с аминной группой больше, чем с карбоксильной и тем более с молекулами воды. Кроме того, повышение pH от 7,5 до 12,5, как это видно из спектров $\alpha, \alpha', \delta, \delta', \epsilon, \epsilon'$ (рис. 1), приводит к увеличению концентрации этих комплексов, т. е. в диапазоне pH, когда концентрация ионов водорода увеличивается в 100 000 раз, никаких изменений в структуре этих комплексов не происходит. Это говорит о том, что в этом диапазоне pH должны образовываться очень устойчивые и стабильные комплексы типа III, что, по-видимому, связано с необходимостью принимать состояние с минимальной энергией. Для сравнения комплексы типа I и II являются очень нестабильными, так как они сохраняются в очень малых интервалах значений pH (рис. 2).

Таким образом, требования стабильности к предполагаемой структуре комплексов типа III, эквивалентного взаимодействия с двумя симметричными атомами азота двух аминных групп, которые должны находиться в экваториальной плоскости, а также требование эмпирического ряда [14] позволяют считать, что структура комплексов типа III имеет вид, представленный на рис. 3в.

Противоопухолевая активность комплексов медь (II) — глутаминовая кислота при нейтральных значениях pH в отношении различных штаммов перевиваемых клеток саркомы S-37 (на 40—60% торможение роста опухоли) [6] должна быть обусловлена, на наш взгляд, активностью только комплексов типа III, так как комплексы типа I и II нестабильны и существуют лишь при кислых значениях pH.

Можно предположить, что комплексы типа III являются «ловушками» свободных супероксидных радикалов, находящихся в избытке в раковых клетках [13], чем и может быть обусловлена их противоопухолевая активность.

Анализ спектров ЭПР α' и α'' (рис. 1) при низкой температуре показывает, что произошло превращение спектра α' с аксиальной симметрией окружения в спектр α'' с ромбической симметрией окружения, т. е. симметрия окружения понизилась с повышением pH от 5,1 до 7,5. Такой конфигурационный переход, на наш взгляд, должен быть обусловлен «динамическим эффектом Яна-Теллера» [1, 2], приводящими октаэдрические комплексы меди (II) к тетрагональному искажению из-за

увеличения расстояния между аксиальными лигандными атомами кислорода двух симметричных карбоксильных групп по вертикальной оси Z и центральным атомом меди (II).

Такой эффект Яна-Теллера можно прямо наблюдать методом EXAFS спектроскопии [12] с использованием синхротронного излучения накопителя электронов на комплексах типа III.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альтшулер С. А., Козырев Б. М. Электронный парамагнитный резонанс соединений элементов промежуточных групп, М., 1972.
2. Берсухер И. Б. Эффект Яна-Теллера и вибрарные взаимодействия в современной химии. М., 1987.
3. Будников С. С., Дону С. В., Чапурина А. Ф., Берсухер И. Б., Дьяков Н. А. Тез. докл. XV Всесоюз. Чугаевск. совещ. по химии комплексных соединений, 3—5 сент., 212, Киев, 1985.
4. Крист Е. Е., Григорьева А. С., Яцимирский К. Б. Журн. неорг. химии, 21, 175—181, 1976.
5. Крист Е. Е., Гарничкая О. Г., Григорьева А. С., Коханович Н. Ф., Петренко Е. С., Филалов Ю. А. Хим.-фармац. журн., 17, 567—571, 1983.
6. Низова Н. А., Антошина Г. М., Краснов В. П., Алексеева Л. В. Тез. докл. XV Всесоюз. Чугаевск. совещ. по химии комплексных соединений, 3—5 сент., 451, Киев, 1985.
7. Трешакина Е. М., Коновалова Л. Л., Преснов М. А., Чапурина А. Ф., Белачук Н. Н., Дьяков Н. А. Докл. АН СССР, 248, 1273—1275, 1979.
8. Чапурина А. Ф., Дьяков Н. А., Дону С. В., Будников С. С. Проблемы современной бионеорганической химии, Новосибирск, 1986.
9. Яцимирский К. Б. Теор. экстер. химии, 13, 643—647, 1982.
10. Яцимирский К. Б., Крист Е. Е., Григорьева А. С. Докл. АН СССР, 221, 153—156, 1975.
11. Asaturian R. A. Gen. Physiol. Biophys., 5, 105—108, 1985.
12. Asaturian R. A., Avakian Ts. M., Ershov V. P., Agayan A. L., Kostan M. A. J. Physique, 47, C8—1245—1249, 1986.
13. Georgieff K. K. Science, 173, 137—139, 1971.
14. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 85, 3736—3742, 1963.
15. McConnell H. I. Chem. Phys., 25, 749—771, 1967.
16. Rosenberg B., Camp L. V., Troxen J. E., Mansour V. N. Nature, 222, 385—386, 1969.

Поступило 22.VII 1987 г.

Биол. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 591.813:612.013

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА

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

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Изучен белковый состав ядерных мембран, фракции поровых комплексов и ядерного матрикса клеток печени крыс при воздействии гидрокортизона. Более существенные изменения в белковом составе наблюдаются во фракции поровых комплексов и ядерном матриксе. Примечательно, что гидрокортизон вызывает уменьшение содержания средней полосы ламин-

ной триады, универсальной для трех ядерных структур (А, В и С)-лампы В во всех изученных фракциях. Обсуждается возможная роль гормончувствительных белков ядерных структур в процессе гидрокортизоновой активации генома клеток печени крыс.

Ուսումնասիրվել է առնչությամբ լյարդի բջիջների կորիզաթաղանթի, ապարանի կոմպլեքսներով և մարուստ ֆրակցիայի և կորիզային մատրիքի ապիտակացման կողմից իդրոկորտիզոնի տզդեցության ժամանակ, Առավել էական խոխորտություններ ապիտակացման կազմում եկաովել և կորիզային մատրիքի և ապարանի կոմպլեքսներով և մարուստ ֆրակցիայում: Հետաքրքրական է, որ իդրոկորտիզոնը առաջացրել է երկր կորիզային ստրուկտուրաների համար բնդհանուր լամինային (Ա, В և С) եզակի միջին շերտի՝ В լամինի քլաջում ուսումնասիրված բոլոր ֆրակցիաներում: Քննարկվել է կորիզային ստրուկտուրաների հորմոնեզգայուն ապիտակացման և մարուստը զերր առնչությամբ զենածի իդրոկորտիզոնային ապիտակացման արդյունքում:

The protein content of nuclear membranes, nuclear pore complexes and nuclear matrix fractions of rat liver cells during the hydrocortisone action has been investigated. More essential changes of protein content may be observed in nuclear pore complexes and nuclear matrix fractions. It is noteworthy that hydrocortisone causes decrease in the content of the middle band of lamines A, B, C — lamine B in all observed nuclear structures. The possible role of hormone-sensitive nuclear proteins in the processes of hydrocortisone activation of rat liver cell genome has been discussed.

Гидрокортизон—ламине—ядерная мембрана—ядерный матрикс—ядерные поровые комплексы.

Согласно классической модели механизма действия стероидных гормонов, стероид-рецепторные комплексы, образуясь в цитоплазме, трансформируются, активируются и проникают в ядро, где специфически и высокаффинно взаимодействуют с его акценторными участками. В литературе имеются данные о наличии акценторных для стероидных рецепторов сайтов в хроматине и его фракциях [12], во фракции ДНК [4], ядерной мембране [9], рибонуклеопротеидной фракции ядра [13], ядерном матриксе [7]. Разноречивость этих данных объясняется как различиями в методических подходах, возможной межфракционной кофракционацией белков при выделении, так и универсальностью определенных белковых фракций в различных ядерных структурах.

В настоящем сообщении сделана попытка выявить и сравнить изменения в белковом составе ядерной мембраны, фракции поровых комплексов и ядерного матрикса клеток печени крыс при гидрокортизоновой активации генома.

Материал и методы. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах обоего пола. Гидрокортизон фирмы «Sigma» (США) вводили внутривенно в количестве 5 мг на 100 г массы животного. Животных убивали через 4 ч после введения гормона. Ядра и ядерные мембраны клеток печени крыс выделяли по описанному ранее методу [1], фракцию ядерных мембран, обогащенную поровыми комплексами, — методом [6]. Препараты ядерного матрикса получали по Березину и др. [5]. Содержание белка в полученных препаратах определяли методом Лоури и др. Электрофоретическое разделение белков указанных фракций проводили в системе додецилсульфат натрия—полиакриламидный гель [11]. Молекулярную массу белков определяли по методу Вебба и Осборна [15].

Результаты и обсуждение. На рис 1 представлены электрофореграммы фракционирования белков трех изученных ядерных структур печени крыс. В препаратах ядерных мембран обнаруживается 36 белковых зон, имеющих молекулярную массу в диапазоне 15—260 кД. Среди них можно выделить высокомолекулярные полипептиды, белки со средними значениями молекулярной массы и электрофоретической подвижности и низкомолекулярные, высокоподвижные полипептиды. Известно, что малоподвижные высокомолекулярные полипептиды ядерных мембран представлены в основном гликопротеинами, присущими данной мембранной структуре, а низкомолекулярные полипептиды—гистонподобными белками. Истинными ядерномембранными белками счи-

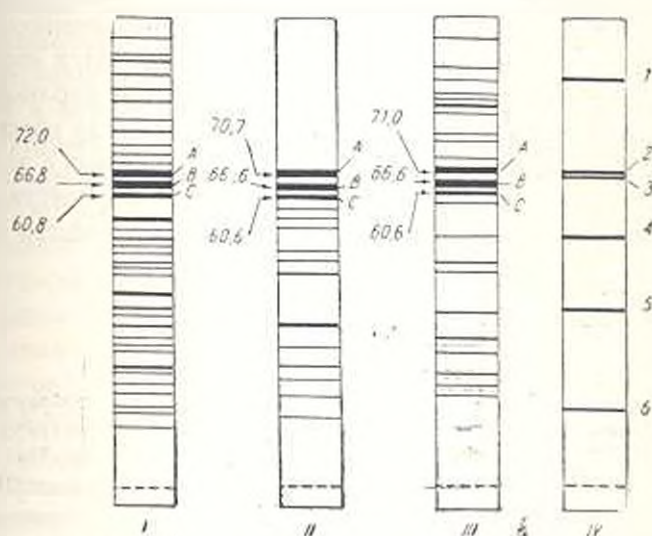


Рис. 1 Схематическое изображение электрофореграмм белков препаратов ядерных мембран (I), фракции поровых комплексов (II) и ядерного матрикса (III) клеток печени крыс. Стрелками указаны молекулярные массы (в кД) главных полипептидов ламинарной фракции—ламинах А, В, С. Справа приведено схематическое изображение электрофореграммы разделения стандартных белков для определения молекулярной массы: 1—эрганаза (м.м.=140 кД), 2—бичий сывороточный альбумин (м.м.=68 кД), 3—гемоглобин (м.м.=67 кД), 4—яичный альбумин (м.м.=45 кД), 5—трипсин (м.м.=23 кД), 6—РНКаз (м.м.=13 кД).

таются полипептиды со средней электрофоретической подвижностью, среди которых выделяются три полипептида с молекулярной массой 60—80 кД, называемые ламинами А, В и С [2]. Интерес к этим белкам обусловлен тем, что они входят в ламинарную фракцию, которая, с одной стороны, контактирует с хроматином, а с другой—с внутренней ядерной мембраной, в то же время представляет периферический участок ядерного матрикса. Вместе с тем ламинны А, В и С сильно гидрофобны и локализованы именно в поровых комплексах [8]. Наличие этих полипептидов как в составе фракции порового комплекса, так и в ядерном матриксе продемонстрировано также на рис. 1. Примечательно, что для препаратов ядерного матрикса, где обнаруживаются более 20 белковых зон, и для фракции поровых комплексов (16 зон) характерны

также полипептиды с молекулярной массой 60—70 кД [2, 8]. Ламинны А, В и С универсальны для трех исследованных ядерных структур, и их изменение при воздействии гидрокортизона может отражать структурно-функциональную перестройку ядра в процессе стероидной активации генома. Показано, что гидрокортизонавое воздействие приводит к заметным изменениям белкового состава всех трех изученных фракций (рис. 2). В наиболее гетерогенном белковом составе ядерных мембран достоверному изменению подвергается средняя полоса ламинной триады—ламин В с молекулярной массой 66,8 кД, количество которого резко уменьшается, в то время как ламинны А и С остаются неизменными. Незначительные изменения наблюдаются также в количестве некоторых других полипептидов, однако из-за высокой гетерогенности белков ядерномембранной фракции и возможностей примененного методического подхода, эти небольшие сдвиги не представляются достоверными. Более существенные изменения в белковом составе наблюдаются во фракциях порового комплекса и ядерного матрикса, где после воздействия стероида подвергаются достоверному изменению в количестве (или же появляются на электрофореграммах) 4—5 полипептидных зон (рис. 2). Примечательно, что среди них ламин В, количество которого,

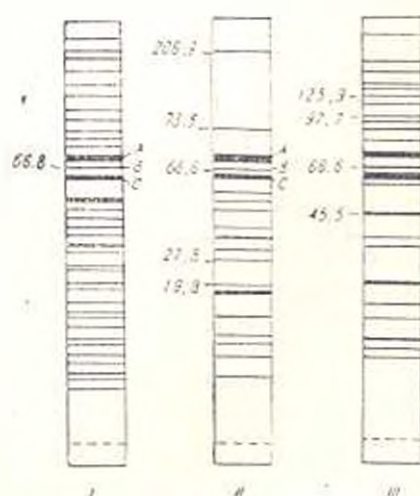


Рис. 2 Схематичное изображение электрофореграмм белков препаратов ядерных мембран (I), фракции порового комплекса (II) и ядерного матрикса (III) клеток печени крысы после воздействия гидрокортизона. Стрелками указаны молекулярные массы полипептидов, претерпевших количественные изменения после воздействия стероида.

как и в препаратах ядерных мембран, резко уменьшается, и он едва обнаруживается на электрофореграммах. В составе белков фракции ядерного порового комплекса появляются высокомолекулярные полипептиды (206,9 и 78,5 кД) и высокоподвижные полосы (27,5 и 19,8 кД), а в ядерном матриксе обнаруживается новый полипептид (97,7 кД) и изменяется количество еще двух полипептидов (125,9 и 45,5 кД) (рис. 2). Обнаруженные статистически достоверные (принесены усредненная картина 8—10 серий экспериментов) сдвиги в белковом составе этих внутриядерных структур отражают структурно-функциональные изменения, видимо, имеющие место при транслокации гидрокортизон-рецепторного комплекса из цитоплазмы в ядро и взаимодействии там с его акцепторными участками. Разумеется, представленные результаты не позволяют идентифицировать полипептиды, ответственные за непосред-

ственные специфическое связывание с рецепторами стероида. Однако, основываясь на литературных данных об идентификации основных полипептидов ядерных мембран и ядерного матрикса [2, 10], можно предположить, что заметное уменьшение содержания ламин В в трех изученных структурах ответственно скорее всего за неспецифические структурно-функциональные изменения, происходящие в ядрах при активации транскрипции стероидным гормоном, механизм которых пока не ясен. Имеется предположение, что ламинарная фракция, где в основном локализован ламин В, являясь компонентом внутренней ядерной мембраны, опосредует ее связывание с хроматином [12]. Более существенным нам представляются сдвиги в составе белков ядерного матрикса, тем более что в последние годы были получены данные о специфическом связывании стероидов с матриксом [3], ассоциации транскрипционно активных генов с матриксом [14], о локализации рецепторов стероидов в нем [7]. Хотя ламинарная область ядерного матрикса также содержит акценторы стероидных рецепторов, однако высокоаффинное и специфическое связывание имеет место во внутриядерном матриксе—в рибонуклеопротеиновой сети [3]. С этой точки зрения примечательно появление на электрофореграммах после воздействия гидрокортизона полипептида с молекулярной массой 97,7 кД (рис. 2).

Приведенные результаты свидетельствуют о возможном участии определенных белка немембранных структур ядерной оболочки (ламинного слоя), поровых комплексов и внутриядерного матрикса в процессе гидрокортизоновой активации генома клеток печени крыс. Их вклад в этот процесс может быть неодинаков: одни могут опосредованно способствовать проникновению и взаимодействию стероид-рецепторного комплекса в ядро, другие могут непосредственно принимать в нем участие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Э. С., Тайевосян Ю. В., Яворян Ж. В., Геворкян Г. А. Биохимия, 51, 1630—1633, 1986.
2. Збарский И. Б. Биополимеры и клетка. I, 26—31, М., 1985.
3. Barrack E. R., Coffey D. S. J. Biol. Chem., 255, 7261—7277, 1980.
4. Baxter J. D., Rousseau G. G., Benson M. C., Garcea R. L., Ho J., Tomkins G. M. Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 1892—1896, 1972.
5. Bereznay R., Coffey D. S. Adv. Enzyme Regul., 14, 63—100, 1976.
6. Dwyer N., Blobel G. J. Cell Biol., 70, 51—91, 1976.
7. Epperly M., Donofrio J., Barham S. S., Venzelle C. M. J. Ste. Biochem., 20, 691—697, 1981.
8. Gerace L., Blum A., Blobel G. J. Cell Biol., 79, 536—566, 1978.
9. Jackson V., Chalkley R. J. Biol. Chem., 249, 1611—1626, 1974.
10. Kaufmann S. H., Gibson W., Shaper J. H. J. Biol. Chem., 258, 2710—2719, 1983.
11. Laemmli U. K. Nature, 227, 680—682, 1970.
12. Lan N. C., Karin M., Thai N., Weiss A., Birnbaum M. J., Eberhardt N. L. Baxter J. D. J. Steroid Biochem., 29, 77—88, 1981.
13. Liao S., Liang T., Tymoczko J. L. Nature New Biol., 211, 211—213, 1973.
14. Robinson S. L., Nelkin M. D., Vogelstein B. Cell, 28, 99—106, 1982.
15. Weber K., Osburn M. J. Biol. Chem., 244, 4466—4472, 1969.

Получено 15.IX 1987 г.

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИЗИНА С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗАТОРА «АРФА-Л1»

А. А. АГАБАБЯН, Ц. М. АВАКЯН, С. П. БУЮКЯН, К. С. ДУРГАРЬЯН,
А. В. КАРАПЕТАН, А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН

Ериванский физический институт ГКАЗ СССР

Разработан комплекс аппаратных и программных средств на основе микро-ЭВМ типа «Электроника 60» для автоматизации определения концентрации лизина в сложных многокомпонентных растворах с помощью ферментного анализатора «АРФА-Л1». Реализуются два режима работы: «калибровка» и «определение». В режиме «калибровка» на основании входных данных методом кусочно-линейной аппроксимации строится калибровочная кривая, а в режиме «определение» вычисляется значение неизвестной концентрации лизина. Результаты измерений выводятся на дисплей и термопечать. Опытная эксплуатация системы показала ее высокую надежность и удобство в работе.

Բարդ բազմակամպոնենտ լուծույթներում «ԱՐՖԱ-Լ1» ֆերմենտային անալիզատորի օգնությամբ լիզինի խտության որոշումը ավտոմատացնելու համար «Էլեկտրոն-60»-ի տիպի միկրո-ԷՄ-ի հիման վրա մշակված է ֆրագրային և սարքային միջոցների համակարգ: Իրականացվում է ալգորիթմի երկու սկզբն. «Տրամաշափում» և «Որոշում»: «Տրամաշափում» սկիզբում մուտքային աղյուսների հիման վրա համաձայնագրային ապրոքսիմացիան մեթոդով կառուցվում է տրամաշափիչ կոր, իսկ «Որոշում» սկիզբում հաշվվում է լիզինի անհայտ խտության արժեքը: Չափման արդյունքները պատկերվում են գծային վրա և պրոյեկցիոն ջերմատպի: Սարքի օգնությամբ Միասնի փոփոխական լուծույթումը ջուլը է ազել ալգորիթմներով Էրա Բարձր Հետազոտությունը և հարմարությունը:

A complex of hardware and software on the base of microcomputer of "Electronica-60" type for the automation of determination process of lysine concentration in multi-component solutions is developed. Two regime of operation, such as "Calibration" and "Determination" are realized.

On the base of input data by the piecewise linear approximation method during the "Calibration" regime a calibration curve is plotted, and during the "Determination" regime the value of lysine concentration is calculated.

The results of calculations are displayed or printed on. The experimental exploitation of the system shows its high reliability and serviceability.

Ферментный анализатор — лизин — микро-ЭВМ.

Определение концентрации лизина в сложных многокомпонентных растворах весьма актуально в микробиологической промышленности, медицине, научных исследованиях. Существующие до настоящего времени методы определения имеют ряд недостатков: длительные время анали-

Сокращения: ФА — ферментный анализатор, ФЭ — ферментный эталон, ЦВ — цифровой вольтметр, ВОМ — волоконно-оптический модуль, ПАП — передатчик-преобразователь, ПОК — волоконно-оптический кабель, ПМП — приемник-преобразователь, АЗД — алфавитно-шаковый дисплей, ПЧМД — персональный компьютер на гибком магнитном диске.

за, невысокая селективность, использование или сложной и дорогостоящей аппаратуры, или токсичных реактивов. Ферментные анализаторы, разработанные как у нас в стране, так и за рубежом [1, 2], позволяют существенно упростить и ускорить процедуру определения концентрации лизина, повысить точность определения. В анализаторе «АРФА-Л1» время отклика составляет около 30 с, при этом тратится 70 мкл образца, не требуется его предварительная обработка.

Цель нашей работы состояла в создании на основе микро-ЭВМ типа «Электроника-60» аппаратных и программных средств автоматизированного определения концентрации лизина в многокомпонентных растворах.

При введении в анализатор образца, содержащего L-лизин, происходит ферментативная реакция, в результате которой концентрация кислорода в буферном растворе уменьшается. Это уменьшение в определенном диапазоне концентраций L-лизина прямо пропорционально концентрации лизина в образце. Изменения концентрации кислорода регистрируются с помощью кислородного электрода, сигнал от которого поступает на вход электронного блока. Амплитуда сигнала при этом пропорциональна концентрации лизина в образце.

Для построения калибровочной кривой необходимо зарегистрировать амплитудные значения сигналов, получаемых при введении в анализатор образцов, содержащих различные известные концентрации лизина. Калибровочная кривая строится в координатах сигнал—концентрация.

Блок-схема аппаратных средств автоматизации измерений ФА приведена на рис. 1. Выходной сигнал ФД в виде напряжения регистри-

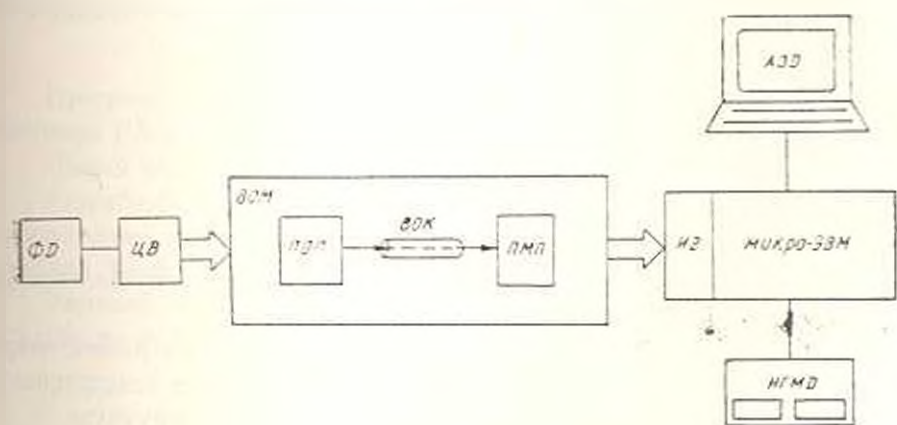


Рис. 1. Блок-схема автоматизированной системы измерений ферментного анализатора «АРФА-Л1»

руется ЦВ типа Ф218—1/2, работающим в автоматическом режиме. Выходной сигнал ЦВ в виде 16-разрядного двоично-десятичного кода подается на вход ВОМ типа «Электроника МС-4101», включающего в себя ПДП, ВОК и ПМП. С помощью ПДП исходный код преобразуется в последовательность световых импульсов, передаваемых по ВОК на ПМП. В ПМП восстанавливается исходный код, который посредством

устройства параллельного ввода/вывода типа И2 вводится в микро-ЭВМ марки «Электроника МС 1201.1». АЗД типа «Электроника 15ИЭ-00-013» служит для визуализации информации и создания контакта пользователя с системой. ИГМД типа «Электроника ГМД-7012» служит для хранения программ функционирования системы и накопления результатов измерения.

Такая схема передачи сигнала является высокопомехоустойчивой, что особенно важно в случае, когда датчик сигнала и регистрирующая аппаратура разнесены на большие расстояния.

Разработанное программное обеспечение предусматривает два основных режима работы: режим «калибровка» и режим «определение».

В режиме «калибровка» в систему вводятся следующие параметры: количество калибровочных точек (до 10), повторяемость измерения для каждой точки (до 5), допустимая величина флуктуаций максимального значения напряжения, значение вводимой в анализатор калибровочной концентрации C_k , на основании которого определяется максимальное значение V_{max} . Если повторяемость больше единицы, вычисляется среднее V_{max} для каждой калибровочной точки.

На основании этих данных (значения калибровочных концентраций лизина и величины соответствующего отклика анализатора в виде напряжения) вычисляются коэффициенты калибровочной кривой. Поскольку зависимость амплитуды сигнала от концентрации лизина не линейна во всем диапазоне измеряемых концентраций, калибровочная кривая строится методом кусочно-линейной аппроксимации, считая зависимость $V_{max} = f(C)$ линейной между двумя последующими точками ($V = ac + b$). Вычисляются коэффициенты уравнения отрезков калибровочной кривой для каждой пары точек, которые выводятся на дисплей и термопечать в виде таблицы:

$$V_1 - V_2 \quad a_1, b_1$$

$$V_2 - V_3 \quad a_2, b_2$$

$$\vdots \quad \vdots$$

$$V_i - V_{i-1} \quad a_i, b_i$$

Автоматически осуществляется переход в режим «определение», о чем выдается соответствующее сообщение оператору.

В программе предусмотрена возможность перехода в режим «определение», минуя режим «калибровка». В этом случае коэффициенты a_i, b_i и соответствующие значения V_i, V_{i-1} вводятся вручную.

В режиме «определение» производится подсчет сигнала V_{max} , поступающего от анализатора, выбирается соответствующий участок $V_i \leq V_{max} \leq V_{i+1}$ и осуществляется определение неизвестной концентрации C_x по формуле

$$C_x = \frac{V_x - b_i}{a_i}.$$

Полученная величина выводится на дисплей и термопечать. Если полученное значение V_{max} превышает наибольшее значение калибровоч-

ных сигналов или меньше наименьшего, то выдается сообщение о том, что концентрация пробы выше или соответственно ниже допустимой. Блок-схема программы приведена на рис. 2.

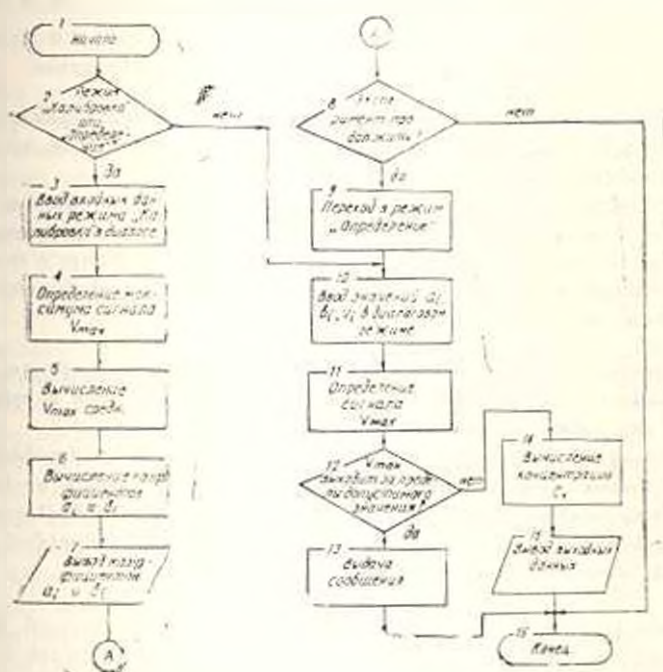


Рис. 2. Блок-схема программы.

Программа написана на языке Макроассемблер и отлажена в Т5 мюлькоре РАФОС-2 на ЭВМ СМ 1407.

Общий объем программ — 3,2 Кбайт.

Разработка аппаратных и программных средств осуществлена в лаборатории электроники, реализация системы — в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ.

Опытная эксплуатация системы показала ее высокую надежность и удобство в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симонян А. Л., Хачатрян Г. Э., Татикян С. Ш., Авакян Ц. М., Биол. ж. Армении, 39, 7, 555, 1986.
2. Romisz J. J., Yang J. S., Karschke H., Thomas D. Biotech and Bioeng., 25, 257 1983

Поступило 15.VII 1987 г.

ИНДУЦИРОВАНИЕ АРГИНАЗЫ У ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

А. П. ГРИГОРЯН, А. Х. АГАДЖАНЫН, Н. Н. ТАМБЯН, М. А. ДАВТЯН

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

У зеленых водорослей *Ch. pyrenoidosa* обнаружена слабо выраженная активность аргиназы. До 7-го дня выращивания она повышается, после чего на 10-й день совсем исчезает.

Осуществлено индуцирование аргиназы аргинином и другими соединениями. Смесь аргинина с глутаматом значительно усиливает индукцию аргиназы по сравнению с аргинином, в то время как глутамат в отдельности не вызывает индуцирующего эффекта. Биосинтез фермента подвергается катаболической репрессии глюкозой и пролином.

Ch. pyrenoidosa փոքր քանակությամբ արգինազի ակտիվությունը հայտնաբերվել է արգինազային խառնուրդում և արգինինի առկայության ժամանակ: 7-րդ օրը այն մեծանում է, որից հետո 10-րդ օրը լրիվ անհետանում է:

Կատարվել է արգինազային ինդուկցում արգինինով և այլ միացություններով: Արգինինի և գլուտամատի խառնուրդը նշանակալիորեն ուժեղացնում է արգինազային ինդուկցումը արգինինի համեմատ, միևնույն պայմանում առանձին վերջրած ինդուկցող ազդեցությունն չի ունենում: Ֆերմենտի բիոսինթեզը ենթարկվում է կատարվել սկզբնական փուլից առկա և պրոլինով:

In green seaweeds of *Ch. pyrenoidosa* slightly expressed activity of the arginase was discovered. It constantly increased up to the 7th day, and after that it disappeared on the 10th day. The induction of arginase with arginine and other combinations was held. The glutamate and arginine mixture to a great extent intensified the induction of arginase in comparison with arginine, while the glutamate separately could not cause an induction effect.

The enzyme biosynthesis was exposed to catabolic repression by glucose and proline.

Водоросли *Ch. pyrenoidosa*—аргинин—аргинин—глутамат

О наличии аргиназы у хлореллы имеются противоречивые данные. Бейкер и Томсон [8] показали, что голодающие по азоту клетки *Chlorella vulgaris* осуществляют ряд реакций этого цикла, но обнаружить аргиназу у хлореллы им не удалось. В связи с этим было сделано предположение, что хлорелла расщепляет аргинин с помощью аргининдегидриазы. В нашей же лаборатории у хлореллы была обнаружена хотя и очень слабая, но достоверная активность аргиназы [2]. По-видимому, для ее обнаружения существенные значения имеют фазы развития этой культуры.

Интересно, что хлорелла не содержит уреазы, но прекрасно усваивает мочевину. При росте на мочевины в клетках *Ch. pyrenoidosa* накапливается значительное количество аргинина и аргининянтарной кислоты [15].

Роон и Левенберг [13] показали, что у некоторых видов хлореллы происходит зависящее от АТФ расщепление мочевины. Эта точка зрения была подтверждена результатами работ других авторов [14], выделивших два фермента утилизации мочевины, первый из которых катализирует синтез аллофаната, а второй расщепляет его на CO_2 и NH_3 .

Нами исследована активность аргиназы в разные дни роста культуры *Ch. pyrenoidosa* и осуществлена субстратная индукция фермента.

Материал и методика. Объектами исследования служили одноклеточные водоросли *Ch. pyrenoidosa*-82, полученные из Института агрохимических проблем и гидропоники АН АрмССР. Хлореллу выращивали на аппарате УНВ [5]. В течение опыта поддерживалась температура в пределах 28–30°. Культура продувалась увлажненным воздухом, содержащим 2–3% CO_2 .

Для выращивания хлореллы использовали питательный раствор Тамия, содержащий (г/л): KNO_3 —5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —2,5, KH_2PO_4 —1,25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —0,003 и EDTA—0,037. Исходный показатель pH 5,5. Первоначальная плотность—1 млн клеток/мл.

Индукирование аргиназы. После выращивания клетки центрифугировали, промывали дистиллированной водой и переносили в свежую среду Тамия, содержащую индуктор. Инкубация в этой среде продолжалась в течение 24 ч в ростовых условиях. Затем клетки центрифугировали, 3 раза промывали дистиллированной водой. Полученную пасту использовали для индукции фермента. Для индукции аргиназы в среду выращивания водорослей вносили $3 \cdot 10^9$ клеток. Гомогенизацию проводили в 0,05 М глициновом буфере (pH 9,5). Бесклеточный экстракт получали при центрифугировании 27.000 г на центрифуге с рефрижератором. Активность аргиназы определяли по методу Ратнера [12] / мочевины—по Аринбальду [7], деаминазную активность—по методу Огнеского [11].

Гельфильтрацию белков проводили на сефадексе G-150.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты изучения активности аргиназы у хлореллы в разные дни выращивания.

Таблица 1. Активность аргиназы в разные дни выращивания *Ch. pyrenoidosa* ($n=5$)

Сроки выращивания, сутки	Число клеток, млн/мл	Активность аргиназы мкМ на 1 г сырой биомассы
1	1	$0,46 \pm 0,06$
3	50	$1,6 \pm 0,06$
4	200	$2,3 \pm 0,12$
7	500	$4,56 \pm 0,14$
9	500	$1,37 \pm 0,10$
10	400	0

Заметная активность аргиназы обнаруживается у семидневной культуры водорослей, а на 10-й день она полностью исчезает.

Исследования показали также (табл. 2), что при инкубации 7-дневной культуры в присутствии L-аргинина индуцируется аргиназа, активность которой наиболее выражена на 24-м часу инкубации водорослей.

В следующей серии экспериментов исследовали аргининдеаминазный путь катаболизма аргинина у *Ch. pyrenoidosa*, т. е. возможность

Таблица 2. Влияние сроков инкубации на индукцию аргиназы *Ch. pyrenoidosa* (индуктор L-арг $5 \cdot 10^{-2}$ М)^{***} (n = 5)

Время инкубации, ч	Активность аргиназы, мкМ на 1 сырой биомассы
0	4.56±0.43
4	8.00±1.11
10	9.9
24	14.75±1.21
49	5.97±0.85

^{***} В сериях, посвященных изучению субстратной индукции аргиназы, была использована 7-дневная культура водорослей.

образования цитруллина из аргинина и далее генерации АТФ за счет катаболизма цитруллина. Катализирующие эти две последовательные реакции ферменты (аргининдеминаза и цитруллингидролаза) не были обнаружены.

Таким образом, изученный нами вид водорослей отличается от водорослей *Ch. vulgaris*, которые, согласно данным литературы, обладают аргининдеминазным механизмом распада аргинина [8].

Применение в качестве индуктора L-аргинина (табл. 3) показывает, что по мере увеличения его концентрации индукция аргиназы усиливается и достигает максимума при концентрации 10^{-1} М. При этом активность аргиназы возрастает примерно в 3 раза. Дальнейшее увеличение концентрации индуктора приводит к снижению активности аргиназы.

Таблица 3. Индуцирование аргиназы *Ch. pyrenoidosa* L-аргином (n = 5)

Концентрация аргинина, М	Накопление биомассы, мг	Активность аргиназы, мкМ на 1 сырой биомассы
Контроль	223	4.54±0.57
10^{-4}	473	5.57±0.31
10^{-3}	532	6.33±0.42
$3 \cdot 10^{-3}$	543	7.87±0.59
$5 \cdot 10^{-3}$	534	9.45±0.88
$6 \cdot 10^{-3}$	623	11.55±1.03
10^{-1}	632	13.49±1.16
1	512	9.8±0.56

Пролин оказывает репрессирующее влияние на аргиназу водорослей, примерно в два раза снижая как имеющуюся активность, так и активность после субстратной индукции (табл. 4)

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что изученная культура водорослей обладает механизмом индукции аргиназы аргинином и репрессии пролином. Репрессия аргиназы пролином указывает на возможность ее функционирования в системе биосинтеза пролина из аргинина. Ранее было установлено, что и у аэробных инфузо-

Таблица 4. Репрессия активности аргиназы пролином у *Ch. pyrenoidosa* (инкубация 24 ч с аргинином и пролином и без них (n=5))

Концентрация, М	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Контроль (без арг и про)	4.54±0.57
с про $6 \cdot 10^{-2}$	2.26±0.42
с арг $6 \cdot 10^{-2}$	11.5±1.03
с арг: $6 \cdot 10^{-2}$ и про 10^{-2}	5.49±0.38

рий *Paramecium multimicronucleatum* аргиназа подвергается репрессии пролином [6].

Серия экспериментов была посвящена изучению распределения фермента между растворимой и нерастворимой фракциями клеток водорослей. С этой целью после субстратной индукции клетки гомогенизировали и подвергали центрифугированию при 27 000 g 30 мин. Активность определяли в осадке и надосадочной фракции гомогената.

Таблица 5. Распределение индуцированной аргиназы между растворимой и нерастворимой фракциями клеток водорослей *Ch. pyrenoidosa* (n=5)

Фракция	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Целый гомогенат	11.51±1.06
Надосадок	1.68±0.33
Осадок	12.63±1.29

Полученные данные показали, что аргиназа локализована в основном в осадочной фракции (90%), тогда как в растворимой обнаруживается менее 10% общей активности аргиназы целого гомогената. Многочисленные процедуры (гомогенизация в различных солевых растворах, замораживание и оттаивание гомогената, применение бутанола, глицерина и др.) для перенесения фермента в растворимое состояние не дали положительных результатов.

Изучена также возможность индукции аргиназы некоторыми другими соединениями и ее репрессии глюкозой. Результаты суммированы в табл. 6.

Данные таблицы показывают, что индукция аргиназы протекает более интенсивно, когда в среде наряду с аргинином присутствует один из следующих компонентов: глутамат, глутамин, аспарагин и сукцинат. Индуцирование аргиназы смесью аргинин+глутамат установлено также у *Bacillus licheniformis* [10]. Авторы предполагают, что индукция аргиназы происходит пирролин-5-карбоксилатом, являющимся общим промежуточным продуктом на пути распада пролина, аргинина и орни-

тина. По их данным, орнитин индуцирует аргиназу лучше, чем аргинин.

Индуцирование аргиназы аргинином, орнитином, α , γ -дiamiнобутиратом, лизином, гомоаргинином показано также у *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Таблица 6. Индукция и репрессия аргиназы у *Ch. pyrenoidosa* ($n=5$)

Соединения и концентрации, М	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Контроль	4.47 $\pm$ 0.36
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	11.47 $\pm$ 1.05
D-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	0
DL-арг 3 $\cdot$ 10 $^{-2}$	8.11 $\pm$ 0.45
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ + Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	34.22 $\pm$ 1.43
Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	4.30 $\pm$ 0.28
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ + Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, глюкоза 7 $\cdot$ 10 $^{-1}$	5.63 $\pm$ 0.54
Глюкоза 7 $\cdot$ 10 $^{-1}$	3.56 $\pm$ 0.52
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, глутамин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	42.48 $\pm$ 0.50
Глутамин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	30.00 $\pm$ 1.15
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, аспарагин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	21.00 $\pm$ 1.27
Аспарагин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	13.04 $\pm$ 0.85
L-орн 10 $^{-2}$	12.11 $\pm$ 1.14
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ и сукцинат 6.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	19.80 $\pm$ 1.06
Сукцинат 6.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	4.52 $\pm$ 0.64
Мочевина 10 $^{-2}$	1.62 $\pm$ 0.71

Глюкоза, как следует из табл. 6, довольно сильно подавляет индукцию аргиназы, что свидетельствует о катаболической репрессии расщепления аргинина.

Что касается влияния различных аминокислот, а также мочевины на активность индуцируемой аргинином аргиназы целого гомогената, то все они, за исключением орнитина и пролина, почти также ингибируют аргиназу водорослей, как и у других организмов, изученных в этом плане. Однако орнитин и пролин проявляют стимулирующее влияние на аргиназу хлореллы. Подобное влияние этих аминокислот на аргиназу — редко встречающееся явление. Согласно многочисленным исследованиям, орнитин для аргиназы различного происхождения является классическим ингибитором. Стимулирование активности аргиназы орнитином обнаружено лишь в проростках кукурузы [4].

Что касается пролина, то он также является ингибитором аргиназы некоторых организмов [1, 2] и сведения относительно его стимулирующего действия на этот фермент отсутствуют.

Фракционирование гельфильтрацией на сефадексе G-150 бесклеточного экстракта хлореллы для изучения изоэнзимного спектра индуцированной аргиназы выявило два пика активности в 8.9-й и в 18-й фракциях. Константа Михаэлиса (K_m) высокомолекулярного изоэнзима составляет 6,75 мМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х. Биолог. ж. Армения, 34, 845, 1985.
2. Аракелян Г. В., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 27, 94, 1974.
3. Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 36, 43, 1983.
4. Варданян Дж. А., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 37, 1, 1984.
5. Владимирови М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных микроорганизмов. М., 1962.
6. Заробян Т. Я. Канд. дисс., Ереван, 1977.
7. Archibald R. M. J. Biol. chem., 156, 121, 1944.
8. Baker J. E., Thomson J. F. Plant Physiol., 37, 618, 1962.
9. Dubois E. Revue des fermentations of des industries alimentaires, 30, 6, 1975.
10. Zalshtey E. J., Berlohr R. W. J. Bacteriol., 95, 322, 1968.
11. Oginsky R. J., Gerrig R. F. J. Biol. Chem., 198, 791, 192.
12. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183, 1949.
13. Roan R. J., Levenberg B. J. Biol. Chem., 243, 5213, 1968.
14. Thomson J. F., Muenster A. M. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 43, 1049, 1971.
15. Walker J. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 561, 1952.

Поступило 23.VII 1987 г.

Биолог. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 547.963.3

ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ НА ВЯЗКОУПРУГИЕ СВОЙСТВА И ГИДРАТАЦИЮ ПЛЕНОК ДНК

Э. Э. ХУДАВЕРДЯН, С. Г. ГЕВОРКЯН

Ереванский государственный университет,
Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что модуль Юнга денатурированных пленок ДНК селезенки крупного рогатого скота больше, чем у нативных. Все особенности изменения модуля Юнга и логарифмического декремента затухания нативных пленок ДНК, которые наблюдаются при изменении гидратации, у денатурированных исчезают. Изотермы гидратации пленок нативного и денатурированного ДНК различаются и зависят от способа денатурации.

Ցույց է տրվել, որ խոշոր կզերազոր կենդանիների փայծաղի ղկնատուրացված ԳԾԻ-ի թաղանթների Յունգի մոդուլը ավելի մեծ է, քան նատիվ ԳԾԻ-ի թաղանթների: Նատիվ ԳԾԻ-ի թաղանթների Յունգի մոդուլը և մարման լոգարիթմական ղկրեմենտի փոփոխության բոլոր առանձնահատկությունները, որոնք եկառուվում են հիդրատացիայի փոփոխության ժամանակ՝ ղկնատուրացված թաղանթների հետ անհետանում են: Նատիվ և ղկնատուրացված ԳԾԻ-ի թաղանթների հիդրատացիայի իզոթերմները տարբերվում են իրարից և կախված են ղկնատուրացման ձևից:

It has been shown that Young's modulus of denaturated membranes of the spleen of big horned cattle is greater than of native ones. All the properties of dependence of Young's modulus and logarithmic decrement of shading of native membranes during hydration disappear for denaturated membranes. The isotherms of hydration of native and denaturated films are different and depend on the means of denaturation.

Как известно, стабильность спиральной структуры ДНК определяется различными внутри- и межмолекулярными силами взаимодействия на которые в свою очередь влияют гидратация [5, 10], температура [6—8]. Ранее [2] нами были получены значения модуля Юнга и логарифмического декремента затухания пленок нативной ДНК, показана немонотонность зависимости E и D от гидратации; сделано предположение, что эти особенности обусловлены в основном внутримолекулярными конформационными изменениями, которые происходят при изменении гидратации.

В настоящей работе представлены результаты изучения вязкоупругих свойств пленок ДНК, денатурированных теплом. Так как гидратация пленок ДНК зависит от температуры [6], содержания солей [3], молярного соотношения анионов и катионов [12], нами были получены также изотермы гидратации пленок изучаемых препаратов ДНК.

Материал и методы. В работе использовали нативные и денатурированные препараты ДНК селезенки крупного рогатого скота с молекулярным весом 10^6 . Содержание солей — 3% по весу. Метод изготовления пленок описан [2]. Денатурацию проводили в твердой фазе (выдерживанием сухих пленок при разных температурах и течение часа) и в растворе (кипячением ненасыщенного подкислого раствора ДНК).

Метод измерения динамического модуля Юнга и логарифмического декремента затухания (микрометод Морозова) подробно описан [11]. Микрометод, позволяющий изучать гидратацию образцов весом 0,1—0,01 мг с точностью 0,1%, был разработан нами ранее [1]. Метод основан на анализе резонансных поперечных колебаний консоли закрепленного микростержня, к свободному концу которого прикреплен исследуемый образец. В работе были использованы стержни с прямоугольным поперечным сечением из сплава бронзы. Такие стержни толщиной 10 мкм, шириной 200 мкм и длиной 1—2 мм имеют собственную резонансную частоту поперечных колебаний 1—1,5 Гц. Изучаемые пленки ДНК готовили прямо на свободном конце стержня, на нем растворяя ненасыщенный водный раствор ДНК.

Относительную влажность (А%) в термостатированной камере ($t=25^\circ$) создавали: от 95 до 32% — водными растворами CaCl_2 разной плотности, 15 и 10% — насыщенными водными растворами LiCl и ZnCl_2 соответственно.

Точку $A=0\%$ (сухой образец) получали нагреванием микростержня с образцом в присутствии силикагеля до 150° и выдерживанием их при этой температуре около 30 мин. Процедуру высушивания производили в камере, описанной в [4]. Для нагрева в радиатор камеры подавали (с помощью компрессора) нагретый воздух. Так как при таких температурах ДНК денатурирует, то изучение изотерм начинали с высоких влажностей, переходя далее к низким (дегидратация), а точку $A=0\%$ использовали для расчета сухого веса ДНК. Этот же образец использовали для изучения изотермы гидратации денатурированных в твердой фазе пленок ДНК. Денатурированные в растворе образцы готовили отдельно.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены изотермы гидратации нативной и денатурированной теплом (в твердой фазе и в растворе) ДНК селезенки крупного рогатого скота. Разница в содержании воды (h) при высокой влажности ($A=95\%$) свидетельствует о том, что молекулы ДНК упакованы по-разному в трех разных пленках, так как при высокой влажности вода сорбирует в основном в микропорах межмолекулярными. Но если изотерма гидратации денатурированной в рас-

творе ДНК остается ниже изотермы нативной, то изотерма денатурированной в твердой фазе ДНК пересекается со второй и при влажностях ниже $A=75\%$ лежит выше обеих изотерм. Как известно, при низких влажностях происходит заполнение поверхностных слоев сорбции. Следовательно, разница в содержании сорбированной воды при влажностях ниже $A=40\%$ говорит о том, что свободная от молекулярных контактов поверхность в описанных трех случаях разная. На механические

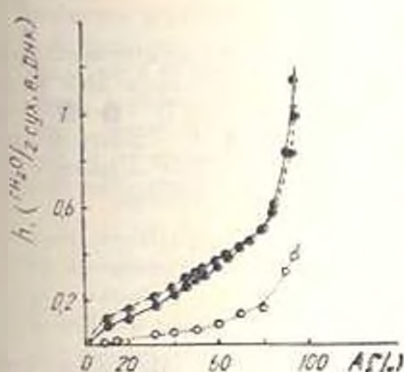


Рис. 1.

Рис. 1. Изотермы гидратации пленок ДНК при $t=25^\circ$: 1) —●—●— нативной; 2) —●—●— денатурированной в пленке; 3) —○—○— денатурированной в растворе

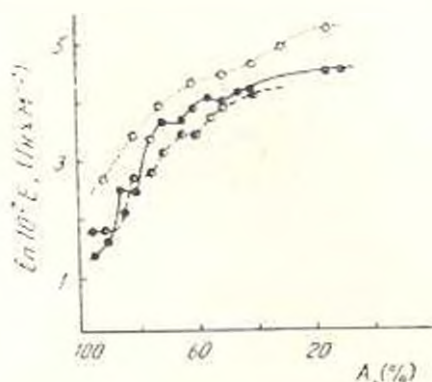


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость модуля Юнга пленок ДНК от относительной влажности при $t=25^\circ$: 1) —●—●— нативной; 2) —●—●— денатурированной в пленке; 3) —○—○— денатурированной в растворе.

свойства пленок биополимеров (в данном случае ДНК) влияет и жесткость межмолекулярных контактов. Знание вклада каждой из этих составляющих даст возможность из измеренных механических свойств пленки оценить жесткость самой молекулы ДНК. На рис. 2 приведена зависимость модуля Юнга E от относительной влажности. При высоких влажностях ($A \geq 90\%$) модуль Юнга пленок нативной ДНК меньше, чем у денатурированных. Все особенности поведения модуля Юнга нативных пленок при изменении влажности у денатурированных пленок не наблюдаются. Поведение денатурированных в растворе пленок напоминает аналогичную зависимость для глобулярных белков (11) и по порядку значения их модулей Юнга близки: при $A=95\%$ и $t=25^\circ$ $E \approx 0,2$ Гн/м², а для белков $E \approx 0,5-1$ Гн/м².

Глобулярные биополимеры, вероятно, характеризуются большими значениями модуля Юнга, чем спиральные. Исчезновение всех особенностей $E(A)$ при денатурации еще раз указывает на то, что это проявление внутримолекулярных конформационных изменений. На это указывает и сглаживание кривых логарифмического декремента затухания при денатурации (рис. 3). Как известно, внутреннее трение в пленках пропорционально 0, и внутримолекулярные перестройки отражаются на нем. Денатурация в твердой фазе (кр. 2 на рис. 2 и 3) при температурах $t \approx 70^\circ$ не происходит полностью. На это указывает сходство кривых 1 и 2 на рис. 2 и 3. Межмолекулярные контакты в сухих плен-

ках не дают молекулам полностью свернуться в клубок и упаковаться плотнее, как это имеет место при денатурации в растворе.

Таким образом, механические свойства пленок характеризуют состояние ДНК. Денатурированные пленки имеют модуль Юнга больше, чем нативные. При денатурации происходит сглаживание всех осо-

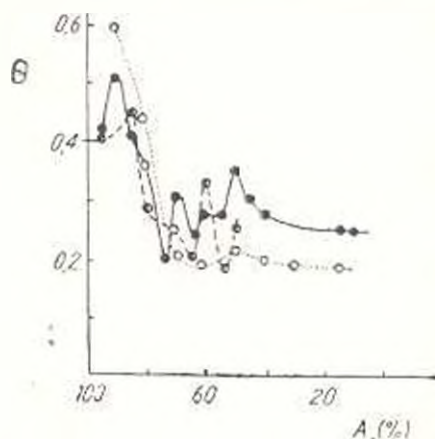


Рис. 3. Зависимость логарифмического decreмента затухания пленок ДНК от относительной влажности: 1) —●—●— нативной; 2) —■—■— денатурированной в пленке; 3) —□—□— денатурированной в растворе.

бенностей изменения E и D при изменении гидратации. Межмолекулярные контакты в пленках стабилизируют молекулу ДНК, что приводит к неполной денатурации молекулы. Это проявляется и на изотермах гидратации образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян С. Г., Морозов В. Н. Биофизика, 28, 6, 944—948, 1983.
2. Геворкян С. Г., Худавердян Э. Э. Биолог. ж. Армении, 49, 3, 184—187, 1987.
3. Козлова Л. А., Сухоруков Б. Н. Журн. физ. химии, 48, 8, 2063—2065, 1986.
4. Морозов В. Н., Геворкян С. Г. Биолог. ж. Армении, 34, 3, 203—207, 1986.
5. Новиков И. А., Сухоруков Б. Н. Молекулярная биология, 11, 3, 521—530, 1977.
6. Семенов М. А., Малеев В. Я., Сухоруков Б. Н. Биофизика, 23, 1097—1098, 1978.
7. Семенов М. А., Малеев В. Я., Сухоруков Б. Н., Шабарчина Л. И. Биофизика, 24, 2, 210—216, 1979.
8. Семенов М. А., Сухоруков Б. Н., Малеев В. Я., Шабарчина Л. И. Биофизика, 24, 4, 611—619, 1979.
9. Сухоруков Б. Н., Машковский Ю. Ш., Биофизика, 18, 3, 294, 1963.
10. Falk B. M., Hartman K. A., Lund R. C. J. Amer. Chem. Soc., 85, 387—394, 1963.
11. Morozov V. N., Morozova T. Ya. Biopolymers, 20, 3, 461—463, 1981.
12. Semenov M. G., Holtuch T. V. Soviet Biophysics, 87, 213, 227—228, 1982.

Поступило 12 VIII 1987 г.

КАТАБОЛИЗМ ПРОЛИНА У ЖУКОВ ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ
ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY.

Дж. Г. ГУКАСЯН, А. А. АГАДЖАНИЯ

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

Ферменты катаболизма пролина жуков фасолевой зерновки локализованы в митохондриях. Их активность увеличивается в процессе развития жуков более чем в 60 раз. Все испытанные аминокислоты (за исключением глицина), особенно аргинин, стимулируют процесс окисления пролина, а пировуват, лактат, α -глицерофосфат, ПХМБ и гидроксилламин, наоборот, ингибируют его превращение в глутамат через пирролин-5-карбоновую кислоту. Идентифицированную методом бумажной хроматографии.

Հորի, ընդհանրիկ բնական, պրոլինի կատաբոլիզմի ֆերմենտները տեղակայված են միտոքոնդրիումներում, որոնց ակտիվությունը բնական զարգացման ընթացքում ավելանում է շուրջ 60 անգամ: Փորձարկված բոլոր ամինաթթուները (բացառությամբ գլիցինի) և առանձնապես արգինինը խթանում են պրոլինի օքսիդացման պրոցեսը, իսկ պիրուվատը, լակտատը, α -գլիցերոֆոսֆատը, ՊՅՄԲ և հիդրոքսիլամինը, ընդհակառակը, ընկճում են այդ պրոցեսը: Պրոլինի փոխարկումը գլուտամատի կատարվում է պիրոլին-5-կարբոքսիլատի միջոցով, որը է բնորոշվել է իդրային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով:

Enzymes of proline catabolism of haricot beetles are localized in mitochondria. Their activity increases in the process of beetles development for more than 60 times. All the examined amino acids (with the exception of glycine), especially arginine, stimulate the process of proline oxidation, whereas pirovate, lactate, α -glycerophosphate, PKHMB and hydroxylamine, on the contrary, inhibit its transformation into glutamate through pyrroline-5-carboxylic acid, which is identified by paper chromatography.

Зерновка фасолевая — пролин — пролиноксидаза — пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа — аргинин.

Пролин включается в метаболический путь через глутамат [1]. Его окисление у животных происходит ПО и П5КД. Процесс нуждается в кислороде, а акцептором электронов служит цитохром с. Кофактором вюрора фермента является НАД⁺.

У растений и некоторых микроорганизмов нередко [11, 12] первым ферментом распада пролина является пролиндегидрогеназа, коферментом которой является НАД⁺. С окисленной НАДФ реакция не протекает.

В летательных мышцах *Pisornia regina* при полете пролин окисляется в 130 раз интенсивнее, чем остальные аминокислоты. В летательные мышцы этих насекомых проникает пролин, α -глицерофосфат и пировуват, но не глутамат и другие субстраты цикла Кребса [13]. В начале полета увеличивается концентрация пировувата, который затем интен-

Сокращения: ПО — пролиноксидаза, П5КД — пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа, ОПРО — оксипролин.

сивно превращается в аланин. При этом увеличение последнего находится в отрицательной коррелятивной зависимости с содержанием пролина [14]. Установлено также, что при полете колорадского жука количество аланина в его митохондриях, образовавшегося в результате окисления пролина, равно количеству использованного пролина [15].

ПО и П5КД являются митохондриальными ферментами как у животных [5], так и у микроорганизмов [4]. Попытки перевести их в растворимую фракцию у *E. coli* [4] не увенчались успехом. В летательных мышцах *Phormia regina* для ПО строгим ингибитором является лактат и несколько более слабым — пируват [13].

У *Salmonella typhimurium* [3] ПО и П5КД индуцируются пролином и подвергаются катаболической репрессии; предполагается, что гены, контролируемые ПО и П5КД, находятся в одном опероне. У *Clostridium sporogenes* [10] катаболизм пролина, как и у растений, осуществляется пролиндегидрогеназой, активность которой не ингибируется L-глутаматом. Гидроксилламин (0,5 мМ) не оказывает влияния на активность этого фермента, в то время как активность редуктазы ингибируется полностью.

Настоящая работа посвящена изучению ферментов распада пролина и некоторым их регуляторным свойствам у жуков фасоловой зерновки.

Материал и методики. Объектом исследования служили жуки *A. oblectus*, откладывающие яйца на бобах фасоли. Самка начинает откладывать яйца через 2—3 ч после выхода из куколки в течение 10—12 дней. Активность ПО и П5КД определяли в гомогенатах и ее нерастворимой фракции. Жуков гомогенизировали в 0,1 М калий фосфатном буфере (рН 8,0). Гомогенаты центрифугировали при 3000 об/мин 20 мин. Надосадок удаляли, осадок растворяли в 4 мл 0,01 М трис-HCl буфере, содержащем EDTA (рН 8,2), и центрифугировали при 15.000 об/мин в течение 30 мин. Эту процедуру повторяли 3 раза. В последний раз к осадку добавляли 10%-ный этиловый спирт, замораживали, оттаивали и центрифугировали при 15.000 об/мин 30 мин. Растворенный в 0,01 М трис-HCl буфере (с EDTA, рН 8,2) осадок применяли как ферментный препарат.

Определение активности ПО и П5КД. Инкубационная среда в 1,9 мл содержала: 53 мМ калий фосфатного буфера (рН 8,0), 0,2 мМ L-пролина, 1,6 мМ цитохрома c, 0,01 мМ НАД+. Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 96%-ного холодного этилового спирта в соотношении 1:1. Осадок удаляли центрифугированием при 10.000 об/мин в течение 10 мин. Об активности ПО и П5КД судили по синтезированному глутамату, количественное содержание которого определяли методом бумажной хроматографии — проявлением 0,2%-ного раствора нингидрина в этиловом спирте. Пятно элюировали 5 мл 0,05%-ного CaCl_2 в 40%-ном этиловом спирте. Плотности окраски определяли путем фотометрирования на фотокалориметре типа КФК-2 с зеленым фильтром.

Результаты и их обсуждение. Изучение активности ПО и П5КД показало, что по мере развития жуков активность ферментов окисления пролина повышается и на 12-й день почти в 40 раз превышает таковую у вылупившихся жуков. По-видимому, в последние дни развития у них повышаются энергетические потребности, что компенсируется распадом пролина и включением метаболитов в цикл Кребса. Субстратом для ПО и П5КД может служить также Опро, хотя их активность в этом

случае незначительна. Интересно, что указанные ферменты абсолютно не проявляют активности, когда субстратом служит DL-пролин. Очевидно, D-форма не только не является субстратом для этих ферментов, но и наличие ее в инкубационной среде подавляет ПО активность в отношении природного субстрата.

Таблица 1. Динамика активности ПО и П5КД в разные дни развития жуков фасольной зерновки

Субстраты, М	Дни развития жуков	Активность, мкМ/г на 1 г ткани (п-5)
L-про 2·10 ⁻⁴ М	1	1.44±0.17
	3	15.76±0.47
	5	19.62±0.65
	8	46.60±1.25
	12	63.71±1.32
Опро 2·10 ⁻⁴	12	1.85±0.28
DL-про 2·10 ⁻⁴	12	0
DL-про 4·10 ⁻⁴	12	0

Таблица 2. Влияние L-аргинина на активность ферментов окисления пролина в осадке гомогената жуков фасольной зерновки (2-й день развития)

Концентрация аргинина 10 ⁻⁶ М	Активность ПО и П5КД, мкМ/г на 1 г ткани (п-6)
Контроль	12.38±0.42
5	102.42±2.39
10	69.74±1.35
20	28.21±0.96
30	12.82±0.76
50	10.50±0.78
100	0
200	0

Изучено распределение ферментов окисления пролина в растворимой и в нерастворимой фракциях гомогената после центрифугирования в течение 20 мин. при 18000 об/мин. Указанная активность в целом гомогенате жуков составляет 64.42±1.73, в осадке—63.38±1.41 мкМ, в то время, как в надосадке она полностью отсутствует. Таким образом, как и у других организмов [6] ферменты окисления пролина у жуков локализованы исключительно в осадочной фракции, очевидно, в митохондриях. В дальнейших экспериментах использовали осадок гомогената, полученный способом, описанным в методической части. Установлена оптимальная концентрация субстрата для проявления максимальной активности ПО и П5КД. Она составляет 200 мкМ.

Из литературы известно индуцирование ПО аргинином у *Bac. licheniformis* [8]. Разумеется, у эукариотов отсутствует возможность субстратной индукции. Однако мы задались целью выяснить влияние аргинина на активность ПО у жуков (табл. 2).

Данные таблицы показывают, что при низких концентрациях аргинина значительно стимулирует процесс окисления пролина. Максимальное стимулирование достигается при концентрации 10⁻⁶ М. При дальнейшем увеличении концентрации аргинина активность снижается и при концентрации 10⁻⁴ М полностью подавляется. Очевидно, аргинин является модулятором ПО, причем положительным—при низких концентрациях и отрицательным—при высоких.

В табл. 3, 4, 5 приведены результаты изучения влияния НАД⁺, цитохрома с, некоторых аминокислот, кетокислот и ряда ингибиторов на процесс окисления пролина.

Данные приведенных таблиц показывают, что при окислении пролина глутамат в значительном количестве образуется и без добавления в реакционную среду цитохрома с. Это объясняется тем, что в це-

Таблица 3. Влияние НАД⁺ и цитохрома с на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (12-й день развития)

Кофакторы (по $5.25 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Полная система:	76.37 ± 1.27
Система (с НАД ⁺ и цитохромом с)	7.15 ± 0.59
Система (без цитохрома с)	39.75 ± 0.81
НАД ⁺ заменен НАДФ ^H	4.72 ± 0.11
НАД ⁺ заменен НАДФ ⁺	5.79 ± 0.18
НАД ⁺ заменен НАДН	3.12 ± 0.10

Таблица 4. Влияние аминокислот и некоторых других соединений на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (5-й день развития)

Аминокислоты (по $2.1 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)	Аминокислоты (по $2.1 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Без эффлектора	19.40 ± 0.86	Гли	11.41 ± 0.54
Лей	26.37 ± 1.15	Пис	33.59 ± 1.06
Ала	29.29 ± 1.05	Гутатин	31.51 ± 1.12
Вал	22.35 ± 0.99		

Таблица 5. Влияние ингибиторов на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (5-й день развития)

Ингибиторы	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Без эффлектора	19.11 ± 1.05
Пируват, $2 \cdot 10^{-3}$ М	0.84 ± 0.04
Лактат, $2 \cdot 10^{-3}$ М	1.81 ± 0.05
α-глицерофосфат $2 \cdot 10^{-3}$ М	5.14 ± 0.10
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-4}$ М	19.57 ± 1.05
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-5}$ М	3.18 ± 0.10
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-6}$ М	0
Гидроксимини 10^{-4} М	1.27 ± 0.07

рых гомогенатах содержится достаточное количество цитохрома с для нормального протекания процесса окисления пролина [2]. Полученные данные свидетельствуют также о том, что кофактором для ПБКД является окисленный НАД. Процесс окисления пролина фактически не протекает в присутствии окисленного НАДФ. Из испытанных аминокислот на окисление пролина ингибирующее влияние оказывает глицин, остальные аминокислоты в разной степени стимулируют этот процесс.

Согласно данным литературы [9], L-формы серина, лейцина, глицина, валина и аланина в отдельности (при концентрации 40 мкМ в 3 мл) подавляют активность П5КД митохондрии коркового слоя почек быка на 11,4; 24,2; 31,6; 60,3 и 70,9% соответственно. Смесь этих аминокислот оказывает кумулятивное ингибирующее действие на активность П5КД, степень которого достигает 91,5%. Таким образом, изученный нами фермент в отношении влияния на него аминокислот значительно отличается от соответствующего фермента почек быка. Так, если для фермента жуков испытанные аминокислоты (кроме глицина) являются положительными эффекторами, то для фермента почек быка — отрицательными.

Данные показывают также, что окисление пролина в высокой степени подавляется пируватом, лактатом и α -глицерофосфатом. В этом отношении процесс ферментативного окисления пролина у жуков близок к таковому у других организмов [6]. Данные табл. 5 показывают, что ПХМБ в концентрации 10^{-6} М и выше способен подавлять активность ферментов окисления пролина. По-видимому, ПХМБ оказывает ингибирующее влияние на активность П5КД, которая, как известно из литературы [6], является тиоловым ферментом. Гидроксилламин также подавляет активность ферментов окисления пролина при более высоких концентрациях (10^{-3} М).

Для изучения механизма окисления пролина, а именно возможности его предварительного превращения в пирролин-5-карбоксилат, первоначально создавали полную систему окисления пролина в глутамат, а затем исключали из среды НАД⁺, предотвращая переход пирролин-5-карбоксилата в глутамат. Накопившийся при этом пирролин-5-карбоксилат определяли хроматографически (табл. 6).

Таблица 6. Образование глутамата и пирролин-5-карбоксилата из пролина у жуков фисоловой зернопки (12-й день развития) $n=5$

Варианты	Образование глутамата из прол. мкМ на 1 г ткани	Образование пирролин-5-карбоксилата из прол. мкМ на 1 г ткани
Полная система	66.74 $\pm$ 1.85	0.60 $\pm$ 0.07
Система без НАД ⁺	5.53 $\pm$ 0.28	2.55 $\pm$ 0.25
Система без НАД ⁺ и цинкохрома	4.69 $\pm$ 0.24	4.74 $\pm$ 0.41

Полученные данные показывают, что при отсутствии восстановленного НАД образовавшийся из пролина пирролин-5-карбоксилат не восстанавливается в глутамат. Образование глутамата в системе без НАД объясняется наличием эндогенного кофактора в гомогенате. Таким образом, включение пролина в метаболический путь осуществляется через промежуточный продукт пирролин-5-карбоксилат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмур Н. Метаболизм насекомых, М., 1968.

2. Brusemer R. W., Veerabhadrappa P. S. Biochem. Biophys. Acta, 110, 102, 1965.
3. Dendinger S., Brill W. J. J. Bacteriol., 103, 144—152, 1970.
4. Frank L., Ranhand B. Arch. Biochem. Biophys., 107, 325—333, 1964.
5. Hertfeld A., Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J, 166, 95—102, 1977.
6. Jonson A. B., Strecker H. J. Biol. Chem., 237, 1876—1882, 1962.
7. Kowaloff E. M., Phang T. M., Granger A. S., Downings, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5368—71, 1977.
8. Laishley E. J., Bernter R. A. J. Bacteriol., 96, 322, 1968.
9. Lundgren D., Ogur M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 147—149, 1972.
10. Monticello D. J., Costiloz R. V., Cao J. Microbiol., 27, 942—948, 1981.
11. Namer A. D., Stewart C. Plant Physiol., 53, 440—444, 1974.
12. Rena A. B., Splittstoesser W. F. Phytochemistry, 13, 2081—2084, 1974.
13. Sacter B., Chidress C. V. Arch. Biochem. Biophys., 124, 583—588, 1967.
14. Sacter B., Wernsler—Sacter E. J. Biol. Chem., 241, 624, 1966.
15. Woods E., Kort C. A. D., Beenackers A. M. Insect Biochem., 10, 305—311, 1980.

Поступило 5.VIII 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.3991.61

ВЛИЯНИЕ ЦИТЕАМИНА И ГЛИЦЕРИНА НА КЛЕТКИ *E. coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИИ С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ

Н. В. СИМОНЯН, Н. Л. ДЖАННОЛАДЯН, Л. Г. СТЕПАНИАН

Ереванский физический институт ГКАЗ

На клетках *E. coli* K-12 разных генотипов показано, что защитное действие цитеамина и глицерина при действии γ -излучения и рентгеновых лучей генетически детерминировано: при использовании цитеамина это выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае применения глицерина—в возрастании протекторного влияния в ряду излученных штаммов *E. coli*: *rec A*-мутант—клетки «дикого типа»—*rol A*-мутант. Глицерин защищает клетки дикого типа и *rec A*-мутанта и от летального действия ускоренных ионов углерода, а то время как цитеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным.

Տարբեր ղեկավարվող *E. coli* K-12 բջիջների վրա զոլվել է տրված, որ դիր-գերիներ և ցիտեամինի պաշտպանողական ազդեցությունը γ -առաքայլիների և ունեղեղեյան ճառագայթման ղեկարում ղեկավարվող ղեկավարվողների և Զիստեմ-միների օգտագործման ղեկարում զուտ արտահայտվում է մուտանտների համար պաշտ-պանողական էֆեկտի բացակայությամբ, իսկ գերիջիները օգտագործման ղեկարում՝ ղեկավարվող ղեկավարների պաշտպանողական նախնական անվճ հետևյալ հաջար-գակներով։ *rec A*-մուտանտ—սփայրի տիպի բջիջներ—*rol A*-մուտանտի բջիջները պաշտպանում է սփայրի տիպի բջիջները և *rec A*-մուտանտի բջիջները արագագործում իոնների լետալ (մահացու) ազդեցությունը։ Զիստեմինի օգտա-գործումը բջիջ վրա ծանր իոնների ազդեցության ղեկարում էֆեկտիվ չէ։

Сокращения: ОР—однонитевые разрывы, ДР—двунигетевые разрывы, ЭДР—энди-матические двунигетевые разрывы, ПДР—прямые двунигетевые разрывы, Л—линейная передача энергии, ФУД—фактор уменьшения дозы.

It is shown on *E. coli* K-12 cells of different genotypes that the protecting effect of cysteamine and glycerol against γ -radiation and X-rays is genetically determined: there is no protection by cysteamine in repair deficient mutants, while the protective effects of glycerol increase among studied strains of *E. coli*: *rec A*⁻-mutant $\rightarrow$ "wild type" cells $\rightarrow$ *pol A*⁻-mutant. Glycerol protects wild type cells and *rec A*⁻-mutant from lethal action of accelerated carbon ions, whereas cysteamine does not influence the effect of heavy (carbon) ions in *E. coli* cells at all.

Бактерии *E. coli*—радиочувствительность—цистеамин—глицерин.

Результаты изучения протекторного влияния аминотиолов и многоатомных спиртов на выживаемость бактерий *E. coli* при γ -облучении свидетельствуют о неоднозначной зависимости их радиозащитного эффекта от генотипа клеток. Выяснено, что многие мутации, повышающие радиочувствительность бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, снимают защитное действие аминотиолов и индоллилалкиламинов [2, 7]. В присутствии указанных радиопротекторов снижается выход ЭДР ДНК—основных летальных событий у клеток «дикого» типа, поскольку активность эндонуклеаз, производящих инцизию фермент-лабильных сайтов, угнетается [6, 7]. Вследствие того, что у чувствительных мутантов летальными являются не только ДР, но и другие типы повреждений ДНК, возникающие в большем количестве, чем ДР, лучшая сбалансированность процессов деградации и ресинтеза ДНК при влиянии аминотиолов и индоллилалкиламинов не реализуется в виде радиозащитного эффекта. Глицерин—представитель класса многоатомных спиртов—эффективно защищает от летального действия γ -лучей не только клетки «дикого» типа, но и *rec A*⁻, *pol A*⁻-мутанты [1]. Показано, что он реализует свое защитное действие не на уровне ферментативной репарации, а на уровне первичных физико-химических процессов [1]. С учетом указанных обстоятельств можно полагать, что при действии на клетки *E. coli* излучений с высокой I_0 , когда возрастает выход ПДР ДНК и ОР, не восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией [3, 5], эффективность защитного действия аминотиолов и многоатомных спиртов будет проявляться по-разному: резко снижаться при влиянии цистеамина и в меньшей степени—в присутствии глицерина. При этом радиозащитный эффект глицерина должен иметь место не только при облучении клеток «дикого» типа, но и чувствительных мутантов. Для проверки этих предположений и была выполнена настоящая работа.

Материал и методика. Использовали следующие штаммы бактерий *E. coli* «дикой» тип АВ 1157, чувствительные мутанты АВ 2463 (*rec A*13⁻), Р3478 (*pol A*1⁻) и суперрезистентный мутант Gаип-441. Выращивание бактериальных культур проводили в стационарной фазе (2—3.10⁸ клеток в 1 мл) либо на твердой питательной среде, либо на основе аминопептида, либо на среде МЕР. В качестве радиопротекторов использовали цистеамин (фирма «Sigma», США) и глицерин в концентрациях соответственно равных 2.10⁻² и 1 М. После выращивания клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 g). Культуру ресуспендировали в 1/3 объема М-буфера и к части образцов добавляли протекторы в необходимой концентрации. Инкубацию образцов с протекторами осуществляли в течение 30 мин перед облучением. Условия аноксии создавали путем барботирования суспензии азотом в течение 30 мин перед облучением.

Эксперименты с ускоренными ионами углерода с энергией 7,5 Мэв/нуклон проводили на ускорителе тяжелых ионов У-200 ЛЯР-200 ЛЯР ОИЯИ на специально созданной установке с комплексом электронно-физической аппаратуры. Клетки облучали в моностое на поверхности 2%-ного голодного агара. Мощность дозы облучения составляла 1,5 Гр/с.

Источником γ -лучей являлась установка с γ -источником ^{137}Cs . Облучение клеток рентгеновыми лучами проводили с использованием аппарата РУП-200-20-5 (нефильтрованное излучение, напряжение на трубке 200 кВ, сила тока 14 мА). Мощность дозы γ и рентгенооблучения составляла 0,58 Гр/с. В опытах с γ и рентгеновыми лучами облучение клеток проводили во флакон объемом 10 мл. Специально поставленные эксперименты показали, что способ облучения (на поверхности агара или в суспензии) не влияет на величину радиочувствительности клеток.

Опыты повторяли 3–5 раз. Полученные результаты подвергали статистической обработке на ЭВМ [1].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые выживания клеток АВ 1157, АВ 2463 и Р 3478 при γ -облучении их в обычных условиях и в присутствии цистеаминна. Видно, что цистеамин эффективно защищает клетки «дикого» типа с ФУД, равным $2,28 \pm 0,35$. Од-

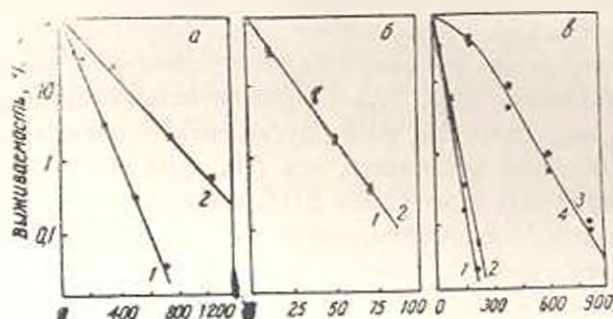


Рис. 1. Влияние цистеаминна на выживаемость клеток АВ 1157 (а), АВ 2463 (б) и Р 3478 (в) при γ -облучении: 1 — без протектора; 2 — с цистеаминном; 3 — в условиях аноксии без цистеаминна, 4 — с цистеаминном. По оси абсцисс — доза облучения.

Гр; по оси ординат — выживаемость, %.

нако его радиозащитный эффект практически исчезает при облучении клеток гес А- и *rol* А-мутантов. Величина ФУД в этом случае соответственно составляет $1,00 \pm 0,04$ и $1,39 \pm 0,21$. Аналогичная картина наблюдается и при облучении гес А-мутанта рентгеновыми лучами (рис. 2). В отличие от клеток «дикого» типа, где величина ФУД составляет $2,31 \pm 0,18$, у гес А-мутанта $\text{ФУД} = 0,91 \pm 0,14$.

Анализ материалов, представленных на рис. 1, 2 и в таблице, показывает, что не только мутации гес А и *rol* А, повышающие радиочувствительность клеток, снимают радиозащитный эффект цистеаминна, но и мутация *Gam*₁ 444, уменьшающая радиочувствительность клеток. Аналогичные наблюдения сделаны и другими авторами [3].

Таким образом, полученные нами материалы свидетельствуют о генетической детерминированности радиозащитного влияния цистеаминна при γ -облучении клеток *E. coli*, что согласуется с литературными данными [27]. Указанная детерминированность выражается и резком уменьшении величины радиозащитного эффекта у чувствительных и суперрезистентного мутантов, свидетельствующем о том, что реализа-

ция протекторного действия цистеаминна осуществляется на уровне ферментативной репарации ДНК [2, 3, 7]. В этой связи следует обратить внимание на незначительное модифицирующее влияние цистеаминна при облучении клеток Р 3478 (рис. 1). Действительно, если бы защитное

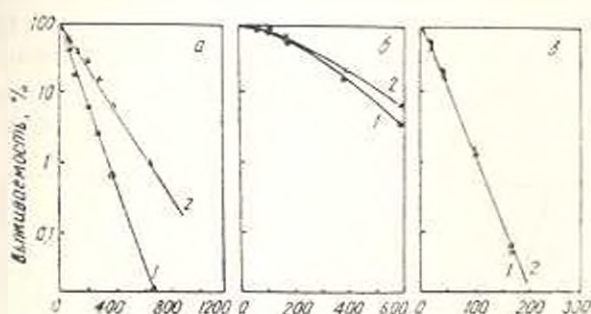


Рис. 2 Влияние цистеаминна на выживаемость клеток АВ 1157 (а), BL 1114 (б) и АВ 2463 (в) при рентген облучении: 1—без протектора; 2—с цистеаминном. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.

Влияние цистеаминна и глицерина на радиочувствительность (D_0^{-1}) разных штаммов *E. coli* при действии γ -, рентгеновых лучей и ускоренных ионов углерода

Генотип	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, \text{ Гр}^{-1}$		ФУД	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, \text{ Гр}^{-1}$		ФУД
	без про- тектора	с цисте- амином		без про- тектора	с глице- рином	
γ-лучи ^{60}Co						
„Дикий“ тип	1.12 ± 0.15	0.49 ± 0.09	2.28 ± 0.35	1.00 ± 0.06	0.39 ± 0.04	2.52 ± 0.25
гес А ⁻	7.60 ± 0.12	7.58 ± 0.28	1.00 ± 0.01	6.20 ± 0.37	3.06 ± 0.18	2.33 ± 0.12
роf А ⁻	5.27 ± 0.70	3.79 ± 0.12	1.39 ± 0.21	4.96 ± 0.44	1.75 ± 0.23	2.80 ± 0.26
Рентгеновы лучи						
„Дикий“ тип	1.69 ± 0.13	0.73 ± 0.05	2.31 ± 0.18	—	—	—
гес А ⁻	4.21 ± 0.22	1.62 ± 0.29	0.91 ± 0.13	—	—	—
роf А ⁻	0.74 ± 0.08	0.62 ± 0.09	1.19 ± 0.17	—	—	—
Ионы углерода						
„Дикий“ тип	3.05 ± 0.31	2.72 ± 0.26	1.12 ± 0.11	2.76 ± 0.11	2.03 ± 0.11	1.36 ± 0.12
гес А ⁻	1.79 ± 0.18	1.77 ± 0.17	1.93 ± 0.10	1.79 ± 0.14	1.34 ± 0.09	1.31 ± 0.11

действие протектора реализовалось на уровне первичных физико-химических процессов, в результате чего снижался бы выход первичных повреждений ДНК, то наиболее отчетливо протекторный эффект выявлялся бы у клеток роf А⁻-мутанта [1, 4], что имеет место, например, при облучении штамма роf А⁻ в условиях анокии (рис. 1). Из представленных данных также видно, что у клеток данного штамма кислороднезависимый компонент защитного действия цистеаминна полностью отсутствует.

В отличие от цистеаминна глицерин эффективно защищает не только клетки «дикого» типа, но и чувствительные мутанты (рис. 3, табл.). При этом в наибольшей степени, по сравнению с гес А⁻-мутантом и клетками «дикого» типа, защитное действие глицерина проявляется при об-

лучении клеток *pol A*-мутанта, т. е. эффективность протекторного влияния последовательно возрастает в ряду изученных штаммов *E. coli*: гес *A*-мутант—дикий тип—*pol A*-мутант. Аналогичная картина наблюдается и при изучении кислородного эффекта [1]. Величина кислороднезависимого компонента у клеток *pol A*-мутанта, так же как и у клеток «дикого» типа и гес *A*-мутанта [1], равна ~ 2 (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отличие от аминотролов радиопротекторное влияние глицерина реализуется на физико-химическом уровне, а не на уровне ферментативной репарации.

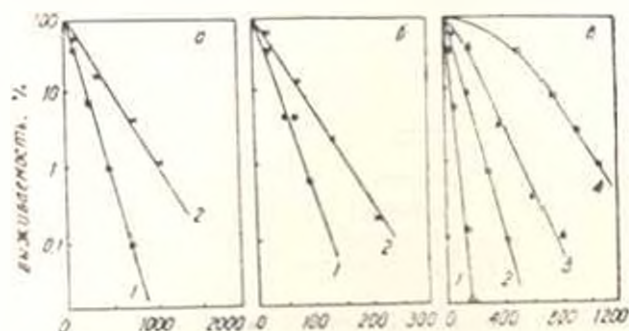


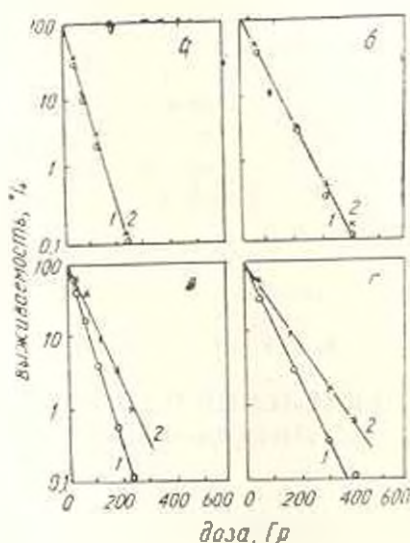
Рис. 3. Влияние глицерина на выживаемость клеток AB 1157 (а), AB 2463 (б) и P 3478 (в) при γ -облучении. 1—без протектора; 2—с глицерином; 3—в условиях аноксии без протектора; 4—в условиях аноксии с глицерином. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.

Модельный анализ генетической детерминированности защитного влияния глицерина, проведенный в [1], показал, что его протекторный эффект можно объяснить снижением выхода одностранных разрывов ДНК, восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией (OP'_1). Показано, что снижение OP'_1 , которое может происходить за счет способности глицерина перехватывать ОН-радикалы, должно по-разному отражаться на уменьшении радиочувствительности клеток гес *A*-мутанта, «дикого» типа и *pol A*-мутанта [1]. Как можно видеть из рис. 3, это действительно имеет место: наименее выражено защитное влияние глицерина при облучении клеток гес *A*-мутанта и наибольший защитный эффект его наблюдается для *pol A*-мутанта.

Одинаковая величина кислородзависимого компонента для гес *A*-мутанта, клеток «дикого» типа *pol A*-мутанта может указывать на то, что в присутствии глицерина снижается не только выход OP'_1 , но и выход OP ДНК, не восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией (OP'_2) [1]. С учетом этого можно полагать, что при действии на клетки излучений с высокой I , когда выход OP'_1 и ПДР увеличивается [5], защитное действие глицерина также будет иметь место. Действительно, анализ материалов, представленных на рис. 4 и в таблице, показывает, что глицерин защищает клетки «дикого» типа и гес *A*-мутанта от латентного действия ускоренных ионов с ФУД, соответственно равными $1,36 \pm 0,12$ и $1,32 \pm 0,11$. В то же время цистеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным (рис. 4).

На основе полученных материалов по защитному влиянию глицерина при действии ускоренных ионов углерода, а также модельных представлений, развитых ранее [8], приведем оценку модифицирующего влияния глицерина на выход OP^{+} и ПДР-повреждений, являющихся летальными для клеток гес А-мутанта и «дикого» типа. Расчеты, выполненные на основе модели, показывают, что выход OP^{+} и ПДР у гес А-

Рис. 4. Влияние цистеаминна (а, б) и глицерина (в, г) на выживаемость клеток АВ 1157 (а, в) и АВ 2463 (б, г) при действии ионов углерода. 1—без протектора, 2—с протектором. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.



мутанта при действии ускоренных ионов углерода соответственно составляет 54 и 33% от общего выхода летальных повреждений. У клеток «дикого» типа эти величины равны 7 и 86%. Используя значения ФУД глицерина при облучении клеток гес А-мутанта и «дикого» типа ионами углерода, а также учитывая флуктуации энергии тяжелых заряженных частиц по чувствительным микрообъемам клеток, получаем суммарный выход OP^{+} и ПДР в присутствии глицерина в случае гес А-мутанта, который в 1,7 раза меньше, чем в обычных условиях. У клеток «дикого» типа выход ПДР под влиянием глицерина уменьшается примерно в два раза. Полученные величины соотношений выходов летальных событий у клеток, облученных ионами углерода в присутствии глицерина, не коррелируют со значениями ФУД по выживаемости клеток, наблюдаемыми нами в эксперименте. Это объясняется тем, что при действии на клетки ускоренных ионов углерода имеют место большие флуктуации энергии по чувствительным клеточным мишеням, что обуславливает высокую степень неравномерности их облучения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что защитное действие цистеаминна и глицерина генетически детерминировано, однако выявленная детерминированность неоднозначна: в случае с цистеамином она выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае с глицерином—возрастании протекторного влияния в ряду изученных штаммов *E. coli*: гес А-мутант→клетки «дикого» типа→ pol^{-} А-мутант. Это обусловлено тем, что аминоктиолы реализуют свое защитное действие на уровне фермен-

тативной репарации, а спирты — на уровне первичных физико-химических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амиртаев К. Г., Красавин Е. А., Козубек С., Нямсамбуу А. *Studia Biophysica*, 106, 131, 1985.
2. Калинин В. Л. и др. *Радиобиология*, 19, 548, 1979.
3. Калинин В. Л., Вербенко В. И. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. 95. М., 1983.
4. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—744, Дубна, 1983.
5. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—743, Дубна, 1983.
6. Кузнецова Е. А. и др. *Радиобиология*, 23, 730, 1983.
7. Bresler S. E. et al. *Molec. Gen. Genet.*, 163, 75, 1978.
8. Kozubek S., Krasavin E. A. *Neoplasma*, 31, 685, 1984.

Поступило 10.11 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.352.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что падение микровязкости мембраны лецитиновых липосом при действии детергента связано с формированием смешанных мицелл после достижения детергентом критической концентрации мицеллообразования. В этих условиях различная степень омовивания не меняет «индекса окисления» липосомальной мембраны.

Ցույց է տրված, որ մշտական իզոպոզիզի թաղանթի միկրովիզկոսիտի ընկեր կապիտ է խառ միջնիկների ձևավորման հետ զետերգենտի միջնիկ-միջնիկ կրիտիկական կոնցենտրացիայի հասնելուց հետո: Իզոպոզիզի թաղանթի ձևավորման ընթացքում միկրովիզկոսիտի ընկերը չփոխվում է:

Microviscosity of lecithin liposome membrane modified by sodium deoxycholate has been studied. It has been shown that the decrease of microviscosity is due to the forming of mixed micelles when the detergent of critical micellization concentration is achieved. Also it has been demonstrated that various degrees of liposome sonication do not change the lipid "oxidation index" under these conditions.

Липосомальная мембрана — микровязкость — детергент — «индекс окисления».

Известно, что проницаемость липидной мембраны может существенно меняться в зависимости от жидкостности мембраны [1, 4] и степени

Сокращения: ДХН — дезоксихолат натрия; ДФГТ — 1,6-дифенил-1,3,5-трисубстит. ККМ — критическая концентрация мицеллообразования; ЯМР — ядерный магнитный резонанс

окисления липидов [9]. Ранее нами было показано, что проникаемость лецитиновых липосом повышается с увеличением концентрации ДХНа [1]. В связи с этим естественно было проперить, обусловлено ли это увеличение только изменением вязкостных свойств мембраны или и перекисным окислением липидов, связанным с длительностью озвучивания суспензии липосом на воздухе.

Материал и методика. В опытах использовали озвученные ушлямеллярные липосомы из яичного лецитина (концентрация 10, 25 и 50 мМ) и ДХНа при различных соотношениях детергента: липид (R). При низких значениях R в отсутствие детергента озвучивание проводили в течение 10 мин. Подробно метод получения липосом и их характеристика приводится в предыдущих работах [1, 2]. Размер липосом и оптическую плотность суспензии определяли методом светорассеяния на «Spreco» M40, (ГДР) [2, 3]. Для определения «индекса окисления» липосомальной мембраны измеряли оптическую плотность суспензии в диапазоне длин волн $\lambda = 215-233$ нм [9].

В качестве флуоресцентной метки использовали ДФГТ, известный как метка для углеводородной области мембраны [11]. ДФГТ предварительно растворяли в тетрагидрофуране, а затем разбавляли в 150 раз используемом буферном растворе. Раствор ДФГТ вводили в суспензию так, чтобы соотношение липид:ДФГТ равнялось 1000:1. Обычно концентрация липидов в клетке составляла 10^{-4} М, а концентрация флуоресцентной метки 10^{-7} М. Низкая концентрация метки исключает возможность переноса энергии между молекулами ДФГТ, а низкая концентрация липидов уменьшает вклад рассеяния и регистрируемую интенсивность флуоресценции. Введение метки в липосомальную суспензию проводили двумя способами либо вместе с буфером при смывании сухой липидной пленки, и тогда суспензию озвучивали уже с введенной в раствор меткой; либо вводили ее в уже сфигурингованную суспензию ушлямеллярных липосом за 1,5–2,0 ч до проведения измерений. Интенсивность спектров флуоресценции не зависела от способа введения зонда.

Измерение флуоресценции проводили на флуориметре Perkin—Elmer MPF-43A (ГДР). Образец возбуждали вертикально поляризованным светом. При ориентации регистрирующего поляризатора параллельно направлению поляризованного возбуждения регистрировалась $J_{\parallel}$, при перпендикулярном положении регистрировалась интенсивность $J_{\perp}$. Для учета вклада рассеяния в флуоресценцию параллельно проводили «холостой опыт», в котором контрольный образец отличался от исследуемого лишь отсутствием в нем метки.

Анизотропию (r) вычисляли по формуле:

$$r = \frac{(J_{\parallel} - GJ_{\perp}) - (J'_{\parallel} - GJ'_{\perp})}{(J_{\parallel} + 2GJ_{\perp}) - (J'_{\parallel} + 2GJ'_{\perp})}$$

где $J'_{\parallel}$ и $J'_{\perp}$ — параллельная и перпендикулярная составляющие флуоресценции в условиях «холостого опыта», G — так называемый G -фактор, представляющий собой отношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света.

Возбуждение флуоресценции ДФГТ проводили на длине волны 360 нм, ширина щели 6 мм.

Для определения микровязкости мембраны в качестве калибровочного раствора использовали различные концентрации вязелинового масла и гентана (0, 10, 25, 40, 50, 60, 75, 90 и 100%).

Каждая серия содержала от 3 до 6 опытов. Все опыты проводили при 23°.

Результаты и обсуждение. Для определения микровязкости липосомальной мембраны (η) определяли анизотропию r системы методом флуоресцентной поляризации с помощью гидрофобного зонда ДФГТ. Говоря о вязкости, обычно подразумевают подвижность флуоресцентного зонда в асимметричной системе, скорость движения которого опре-

деляется микроструктурой его непосредственного окружения в мембране. Практически здесь имеется в виду некий эквивалент, соответствующий вязкости однородной среды, в которой зонд двигался бы с той же скоростью, что и в мембране.

В качестве такой однородной среды был взят раствор вазелинового масла в гептане в разных концентрациях. Вязкость этого контрольного раствора для каждой концентрации масла определяли с помощью вискозиметра Освальда, а анизотропию соответствующего раствора — на флуориметре. Затем строили калибровочную кривую зависимости анизотропии от вязкости, с помощью которой определяли вязкость образца. Однако этот метод пригоден, когда время вращательной релаксации зонда τ не зависит от вязкости. Предположив, что это именно так, мы провели измерения анизотропии и соответственно нашли значения вязкости. Калибровочная кривая зависимости τ от η приведена на рис. 1. На нее нанесены точки, соответствующие значениям анизотропии при различных величинах η .

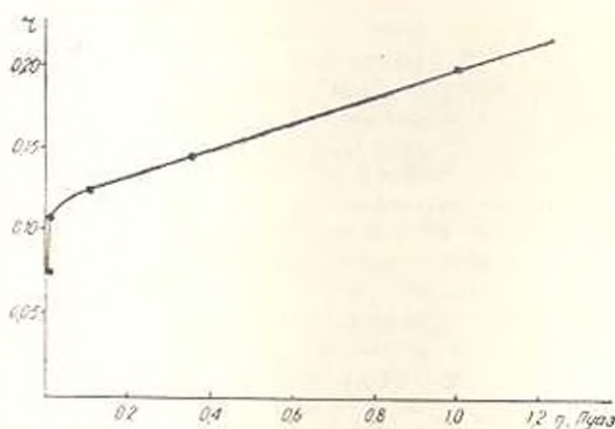


Рис. 1. Калибровочная кривая для оценки микровязкости мембран. Приведены данные по анизотропии (τ) ДФГТ как функции вязкости (η) различных концентраций вазелинового масла в гептане.

Найденные значения η как функция R приведены на рис. 2. Видно, что падение микровязкости мембраны с ростом отношения детергент-липид, вероятно, отражает картину встраивания детергента, вызывающего разжижение мембраны. Видно также, что падение η начинается при $R=0,2$. Это значение R соответствует концентрации ДХНа 5 мМ, являющейся ККМ ДХНа.

Таким образом, только после достижения своей ККМ ДХНа начинает встраиваться в мембрану, что отличает его от Triton-X 100, который встраивается в мембрану при концентрации ниже своей ККМ [7]. Небольшое падение η с ростом концентрации ДХНа связано с постепенным насыщением мембраны детергентом. Дальнейшее увеличение концентрации детергента приводит к образованию смешанных мицелл, обладающих более жидкой структурой, чем бислой ($\eta=0,1$ пуаз) (см. рис. 2). Изучение спектров ЯМР смешанных липосом, полученных из фосфати-

дифхоллина, солюбилизованного октилглюкозидом [8], также свидетельствует о меньшей упорядоченности смешанных мицелл по сравнению с бислоем.

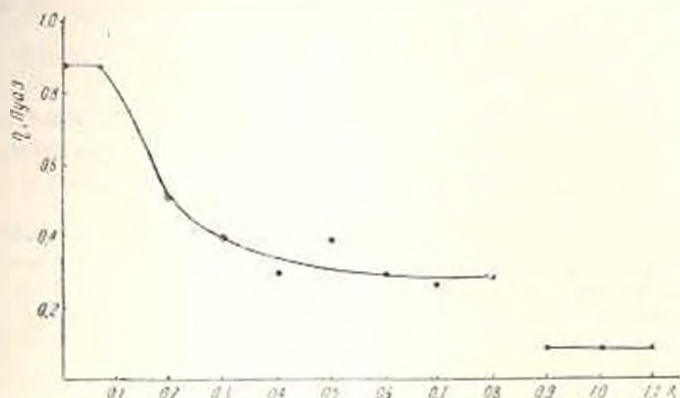


Рис. 2. Микровязкость мембраны (η) как функция соотношения детергент-липид (R) в суспензии. Концентрация липида равна 25 мМ. Приведен индивидуальный опыт.

Следовательно, наблюдаемое повышение проницаемости липосомальной мембраны [1] связано с разжижением мембраны, вызванным встраиванием детергента в мембрану.

Так как липосомы с нулевой или низкой концентрацией ДХНа озвучивались довольно долго, то следовало проверить возможность влияния длительного озвучивания на перекисное окисление липидов, чтобы убедиться в том, что различия в жидкости мембран не связаны со степенью окисления липидов. Для этого мы определяли «индекс окисления» (A), предложенный в работе [9], т. е. измеряли отношения максимумов абсорбции липосомальной суспензии при длинах волн, равных 233 и 215 нм. Согласно теории самоокисления липидов, существенной стадией окисления является конъюгация диеновых связей с последующим формированием гидроперекисей [5, 6]. Увеличение оптической плотности при $\lambda=233$ нм связано с появлением гидроперекисей диеновых связей [10] и является ранним показателем процесса окисления.

Определение «индекса окисления» в диапазоне значений $R=0 \div 0,7$ показало независимость процессов окисления от концентрации детергента: $A=0,33 \div 0,36$. При $R=0,9 \div 1,3$ значение A несколько возрастает и становится равным 0,44. Возможно, это связано с резким увеличением мутности суспензии при данных соотношениях и, следовательно, обусловлено вкладом рассеяния в оптическую плотность.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что увеличение проницаемости липидной мембраны связано с изменением ее микровязкости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алавердян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г., Петросян Л. С. Биол. ж. Армении, 10, 200–204, 1987.

2. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г., Петросян Л. С. Биофизика (в печати).
3. Кленин В. И., Шеголов С. Ю., Лаврушин В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов, 1977.
4. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Biochim. et Biophys. Acta, 455, 322—331, 1976.
5. Farmer E., Satten J. Chem. Soc., 1, 9, 1943.
6. Holman T.: In Human R. T., Lundberg W. O., Matkin T. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, 2, 51, London, 19 4.
7. Inou K., Kitagawa T. Biochem. et Biophys. Acta, 237, 361—372, 1971.
8. Jackson M. L., Schmidt C. E., Lichtenberg D., Litman B. J., Albert A. D. Biochemistry, 21, 4576—4582, 1982.
9. Klein R. A. Biochim. et Biophys. Acta, 233, 454—455, 1970.
10. Lea C. H. In Popjak and Le Preton. Biochemical Problems of Lipids, Butterworths 81, London, 1955.
11. Shintsky M., Barenholz Y. J. Biol. Chem., 249, 2652, 1974.

Поступило 26 XI 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 612.118.221.346.41

КИСЛОТНЫЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ. ВЛИЯНИЕ ХЛОПРОМАЗИНА

М. М. КОРХМАЗИН, Л. Г. МИКАЕЛЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что кислотный гемолиз эритроцитов является сложным много-
стадийным процессом, связанным с нарушением целостности плазматиче-
ской мембраны эритроцитов. При $\text{pH} > 3$ 10^{-5} М оказывает стабилизирующее влияние на структуру эритроцитов,
не предотвращая при этом гемолиза.

Քառուկանոթիկը և քիմիային ճնշմանը որոշ նպաստը, արագորոշյալ գործնական
փորձարկումն ևրոն պզգրկանական փուլի գրաւ ձգտումները ցույց են տալիս քիմիային
ճնշմանը բարդ շնչարկը, որը ներառւում է մեմբրանների վնասման մի րանի փու-
լեր: Քլորոքրոմազինը $3.5 \cdot 10^{-5}$ Մ կոնցենտրացիոն, երբ $\text{pH} > 3$, առաւ է բե-
րում մեմբրանային կառուցվածքի որոշակի կայունացում՝ բնորոշմանը առնումը
պահպանելով քիմիային ճնշմանը:

Some aspects of acidic hemolysis of erythrocytes with an emphasis on initial phase of it have been studied. Results show the complex nature of
acidic hemolysis, which includes various stages of erythrocytic membrane
damage. $3.5 \cdot 10^{-5}$ M chlorpromazine at $\text{pH} > 3$ causes some stabilization
of membrane structure without prevention of hemolysis.

Эритроциты — кислотный гемолиз — хлорпромазин.

Известно, что амфифильные лекарственные соединения при определен-
ных концентрациях оказывают стабилизирующее влияние на устойчи-
вость эритроцитов к осмотическому лизису [6]. Механизм осмотиче-
ского гемолиза давно и интенсивно исследуется. Установлена важная
роль мембраны как в процессе гемолиза, так и в модификации этого про-

Сокращения: XII — хлорпромазин.

цесса различными лекарственными соединениями [6, 7]. В силу ряда преимуществ в клинической практике используется также и другой вид гемолиз—кислотный [1], до настоящего времени мало исследованный.

Сопоставление кинетик осмотического и кислотного гемолиза наводит на мысль о существовании различия в механизмах этих процессов. Детальное изучение кислотного гемолиза, а также влияния амфифильных лекарственных соединений на его кинетику могло бы пролить свет на понимание механизма этого типа лизиса эритроцитов и роли мембран в этом процессе.

Материал и методика. Кровь здоровых доноров хранили в цитратном консервирующем растворе примерно 1—2 часа, затем эритроциты отделяли от плазмы, дважды промывали фосфатным буфером следующего состава (мМ): NaCl —145; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —7,6; KH_2PO_4 —2,4 (рН 7,4). Клетки осаждали при комнатной температуре 10 мин $\times 1000\text{ g}$. Отмытые эритроциты ресуспендировали в том же буфере, доводя концентрацию суспензии до $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. 50 мкл аликвоты клеточной суспензии добавляли в стеклянную кювету, содержащую 4 мл экспериментального раствора. Изотонические растворы NaCl с низкими рН готовили на глицил-глициновом буфере.

В ряде случаев (отмечено в тексте) гемолиз проводили в незабуференных растворах 0,9%-ного NaCl , рН которых доводили до необходимой величины добавлением 0,1 N HCl , при этом эритроциты отмывали 0,9%-ным раствором NaCl (рН 7,4).

В опытах с XII (Львовский химико-фармацевтический завод) эритроциты предварительно инкубировали не менее 10 мин в растворе с XII в концентрации, соответствующей его концентрации в экспериментальном растворе.

О величине и кинетике гемолиза судили по изменению светопропускания суспензии эритроцитов (T) при $\lambda = 700\text{ нм}$ на СФ-26 ЛОМО, снабженном самопишущей установкой.

Изменение формы и состояния эритроцитов контролировали наблюдением в световой микроскоп МБИ-3.

Все эксперименты проводили при комнатной температуре при непрерывном перемешивании суспензии.

Результаты и обсуждение. Кислотный гемолиз эритроцитов рассмотрен в узком интервале рН (2,5—3,5). Величина рН влияет на длительность начальной стадии, на кинетику всего процесса, но не на его конечную величину. Во всех случаях гемолиз происходит полностью. На рис. 1 а приведены кривые светопропускания суспензии эритроцитов в средах с рН 2,5 и 3,5. Видно, что продолжительность начального участка кривой, как и кинетика всего процесса, различны. Собственно, разрушение клеток (обесквашивание и исчезновение при наблюдении в микроскоп) начинается с 200 (рН 2,5) и 500 с (рН 3,5), что соответствует области резкого изменения наклона кривых светопропускания.

Кислотный гемолиз является сложным процессом, включающим несколько стадий. Изучение начальной стадии, во время которой клетка претерпевает изменения, приводящие ее к разрушению, представляет наибольший интерес.

Не претендуя на полное объяснение картины начальных стадий кислотного гемолиза, необходимо тем не менее рассмотреть процессы, происходящие при помещении клеток в кислые растворы.

Одним из возможных проявлений влияния кислой среды является образование дефектов в структуре липидного бислоя мембран, что в условиях исходного неравновесного распределения ионов между клеткой

и средой, а также наличия большого количества осмотически активного гемоглобина должно привести к быстрому проникновению воды в клетку—набуханию. Дальнейшее развитие дефектов в более крупные поры приводит к лизису клеток.

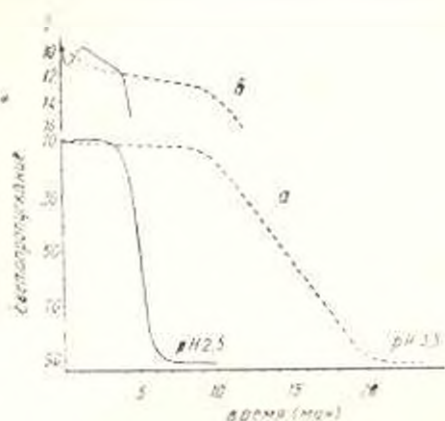


Рис. 1.

Рис. 1 а) Изменение светопропускания суспензии эритроцитов в среде с рН 2,5 и 3,5. б) Светопропускание начальной стадии кислотного гемолиза для рН 2,5 и 3,5, зарегистрированное при большей чувствительности самопишущей установки.

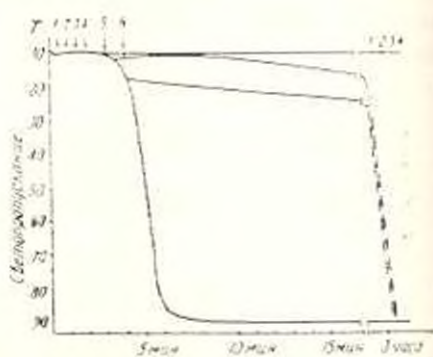


Рис. 2.

Рис. 2. Изменение кинетики кислотного гемолиза при добавлении к суспензии эритроцитов NaOH . На кривой светопропускания для полного гемолиза стрелками указаны моменты добавления NaOH : 1—30 сек, 2—1 мин, 3—1,5 мин, 4—2 мин, 5—3 мин, 6—4 мин.

Не исключается и другая цель событий. Возникновение большого градиента ионов H^+ через мембрану при помещении клеток в кислые растворы приведет к входу H^+ и выходу OH^- из клеток [3]. рН-метрический контроль незабуференного раствора с эритроцитами показал медленное защелачивание среды. В интервале времени, соответствующем начальной стадии гемолиза, рН изменяется от 3,05 до 3,25. Указанные процессы должны повлечь за собой вход хорошо проникающих через эритроцитарную мембрану ионов Cl^- и, соответственно, воды, что приведет к набуханию, а по достижении критического объема—к лизису клеток. Причем, повреждения мембранных структур, вызванные кислой средой, могут снизить порог чувствительности эритроцитов к осмотическим сдвигам.

Другим эффектом кислых растворов является снижение отрицательного поверхностного заряда мембран [4]. Уменьшение электростатического отталкивания эритроцитов должно способствовать их агрегации, наблюдаемой нами в микроскоп. Степень агрегации зависит от величины рН. Она уменьшается с ростом рН от 2 до 3,5. Как агрегация, так и набухание клеток в основном завершаются к 20—30 с. В последующий период вплоть до исчезновения клеток заметных изменений в их популяции не наблюдается, кроме некоторого увеличения уже образованных сфер.

Кривая светопропускания начальной стадии, зарегистрированная при большей чувствительности самопишущей установки, зависит от рН

(рис. 1 б). Область начального роста T соответствует периоду быстрого набухания клеток. Вклад остальных процессов в форму кривой светопропускания (агрегация, изменение формы клеток и др.) в настоящей работе не рассматривается.

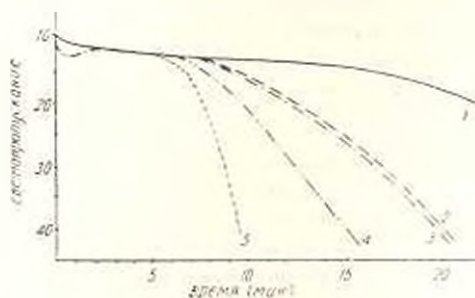
В другой серии экспериментов изучался вопрос о возможности предотвращения кислотного гемолиза с помощью быстрого восстановления pH среды. Для этого в разные промежутки времени в отдельные пробы суспензии эритроцитов в незабуференных растворах с pH 2,5 добавляли малые количества концентрированного раствора NaOH, доводя pH среды до 6,5—7. На рис. 2 приведено изменение T при добавлении NaOH к суспензии эритроцитов с исходным pH 2,5. Видно резкое изменение кинетики гемолиза сразу после добавления щелочи, причем в первые две минуты восстановление pH до нейтральных значений практически останавливает гемолиз. Этот эксперимент свидетельствует об обратимости барьерной функции мембран в первые две минуты действия кислой среды. Эти результаты коррелируют с данными об обратимости формы [5] и электрокинетической подвижности эритроцитов [4] в кислых средах.

Для оценки роли липидного матрикса в процессе кислотного гемолиза нами был использован XII в качестве стабилизирующего агента, известного из экспериментов по осмотическому гемолизу [6, 7] и электромеханической устойчивости липидных бислоев [2].

При pH 2,5 влияние различных долитических концентраций XII проявляется лишь в некотором изменении формы начального участка кривой светопропускания. Кинетика процесса остается постоянной вплоть до концентрации XII = $8 \cdot 10^{-5}$ М. Литическая концентрация XII ($2 \cdot 10^{-4}$ М) заметно ускоряет процесс.

При pH 3,5 картина эффекта XII иная. В зависимости от его концентрации по-разному изменяются как форма начального участка кривой светопропускания, так и кинетика всего процесса (рис. 3). Стаби-

Рис. 3. Изменение кинетики гемолиза эритроцитов, вызванное XII в концентрациях: 1— $3,5 \cdot 10^{-5}$ М; 2—контроль, без XII; 3— $2 \cdot 10^{-5}$ М; 4— $6 \cdot 10^{-5}$ М; 5— $2 \cdot 10^{-4}$ М (литическая концентрация).



лизирующая в случае осмотического гемолиза концентрация $3,5 \cdot 10^{-5}$ М и в данном случае оказывает аналогичное влияние, с той лишь разницей, что не предотвращая гемолиза, резко замедляет его. Близкая по величине концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ М не влияет на кинетику процесса, а $6 \cdot 10^{-5}$ М несколько меняют общую картину кислотного гемолиза. Сужение области эффективной концентрации XII в растворах с низким pH может свидетельствовать в пользу нарушения мембранной структуры и соответственно ослабления эффекта местного анестетика, действующего на мембранном уровне.

Все рассмотренные факторы воздействия—кислая среда, восстановление pH до нейтральных значений, влияние ХП—оцениваются с позиций нарушения билипидного слоя мембран эритроцитов. Однако процесс кислотного гемолиза, несомненно, включает в себя и нарушения белкового компонента мембран, цитоскелета, что также может привести к образованию дефектов в структуре мембран. Роль этих факторов в кислотном гемолизе требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гителъзон И. Н., Терская И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови, Красноярск, 1959 г.
2. Микаелян Н. Г., Алексюк С. А., Карапетян А. К. Биолог. ж. Армении. 39, 3, 241—243, 1986.
3. Crandall E. D., Kloebe R. A., Forster R. E. J. Gen. Physiol., 57, 6, 664—683, 1971.
4. James A. M. Chem. Soc. Rev., 8, 3, 389—418, 1979.
5. Rand R. P., Burton A. C., Canham P. Nature, 205, 4975, 977—978, 1965.
6. Seeman P. Pharmacol. Rev., 24, 4, 583—655, 1972.
7. Sheetz M. P., Singer S. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 11, 4457—4461, 1974.

Поступило 10.III 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 612.352.3:647.963

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ «ОСТАТОЧНОЙ» ФРАКЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

А. Ш. АБРАМЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, П. О. ВАРДЕВИНЯН, Г. А. НАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Показано, что «остаточная» фракция белков хроматина, экстрагируемая при обработке 3М NaCl и 5М мочевиной, увеличивается после введения животным эстрадиола. Методом плавления выявлена общая стабилизация структуры этой фракции при гормональной активации генома. Вместе с тем показано небольшое снижение ее термостабильности при относительно низких температурах плавления. Некоторая дестабилизация структуры может быть непосредственно связана с процессами эстрадиоловой депрессии определенных участков генетического аппарата.

Ցույց է տրված, որ բրոմատինի սպիտակուցների «մնացորդային» ֆրակցիան, որ էքստրակցվում է 3 Մ նատրիումի քլորիդի և 5 Մ միզանյութի լուծույթով, բանախափա տնում է կենդանիներին էստրադիոլ ներարկելուց հետո: Գենոմի հորմոնալ ակտիվացման ժամանակ հաճախ մեթոդով նկատվում է «մնացորդային» ֆրակցիայի ընդհանուր կայունացում: Դրա հետ մեկտեղ նախնադրված է նաև ջերմակայունության որոշ իջեցում հաճախ համեմատաբար ցածր ջերմաստիճաններում: Կառուցվածքի այս որոշ ապակայունացումը կարող է որ անմիջականորեն կապված լինել գենետիկական ապարատի որոշակի հատվածների էստրադիոլային զերիպրևիայի հետ:

It has been shown that "residual" fraction of protein of chromatin, extracted during the treatment with 3M NaCl and 5M urea increases in the quantity after the administration of estradiol to animals. By the melting-

Сокращения: ПСНБ—лабильно связанные нистоновые белки, ПСНБ—прочны связанные нистоновые белки, ОСНБ—«остаточные» нистоновые белки.

technique the general stabilization of structure of this fraction during the hormonal activation of genome has been shown. At the same time some decrease of thermostability during comparatively low temperatures of melting has been revealed. Some destabilization of structure can be directly connected with the processes of estradiol derepression of definite parts of genetic apparatus.

Плавление хроматина—эстрадиоловая активация генома.

Эстрадиоловая активация генома сопровождается структурной перестройкой хроматина и результате специфического и высокоаффинного связывания стероид-рецепторных комплексов с акцепторными участками ядра. До сих пор окончательно не выяснена природа акцепторных участков. Большое количество работ свидетельствует о наличии в них негистоновых белков хроматина, видимо, обеспечивающих специфичность связывания [3, 10, 12]. При этом в одних работах показан существенный вклад лабильно связанных негистоновых белков во взаимодействие гормон-рецепторных комплексов с хроматином [3, 6], а в других выявлена ведущая роль прочно связанных с ДНК негистоновых белков в этом процессе [7, 9, 12].

Разноречивость данных свидетельствует о сложной зависимости связывания различных стероид-рецепторных комплексов от белкового состава хроматина. По-видимому, при взаимодействии стероидных рецепторов с хроматином необходимо учитывать комплексное влияние различных фракций негистоновых белков.

Ранее нами были выявлены изменения в составе лабильно связанных негистоновых белков хроматина печени петушков при дерепрессии геном влиянием эстрадиола [2] и изучена роль этой фракции кислых белков в термостабильности хроматина. В настоящем сообщении приводятся результаты изучения термостабильности «остаточной» фракции хроматина печени петушков при воздействии стероида, представляющей собой комплекс ДНК с прочно связываемыми негистоновыми белками, экстрагируемыми из хроматина при обработке его 3 М NaCl и 5 М мочевиной.

Материал и методика. Исследования проводили на неполовозрелых петушках породы белый леггорн. Эстрадиол-17 β («Sigma», США) вводили внутримышечно в концентрации 20 мг на 1 кг массы тела. Петушков декапировали через 1 ч после введения гормона. Ядра из клеток печени выделяли как описано Шово и соавт. [5], а хроматин из очищенных ядер — по Уманскому и соавт. [11]. Чистоту полученных препаратов проверяли путем измерения их оптических параметров при разных длинах волн и определения соотношения основных компонентов хроматина (при этом средние значения соотношений равнялись: белок/ДНК=1,57—1,60, а гистон/ДНК=0,85—1,00). Белок определяли по Лоури и соавт. [8], ДНК — по Бартону [4].

Фракционирование негистоновых белков проводили по методу Ванга [12]. Хроматин промывали дважды 0,35 М NaCl и 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2) в течение 20 мин и центрифугировали при 20 000 G 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую лабильно связанные негистоновые белки, удаляли, осадок растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 2 М NaCl, 5 М мочевиной, размешивали в течение 6 ч и центрифугировали при 105 000 G 2 ч. Надосадочную жидкость, содержащую прочно связанные негистоновые белки, dialyзуют против 13-кратного объема дистиллированной воды, осаждают ДНК-гистоновый комплекс. Осадок, полученный после ультрацентрифугирования, растворяли в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 3 М NaCl и 5 М мочевиной, центрифугировали при 105 000 G 2 ч. Надосадочная жидкость содержала «остаточную» фракцию белков.

Плавление ДНК, хроматина и его «остаточной» фракции проводили на спектрофотометре «Cenis» SP-K-100 в трис-НСl буфере (рН 7.0), при $\lambda = 260$ нм [1]. Перед плавлением препараты ставили на диатерм в течение 24 ч против буфера, в котором их плавляли. Нагрев осуществляли с помощью температурного программирования с линейной скоростью нарастания 0,5 град/мин. Поглощение регистрировали на программируемом калькуляторе «ИР 975 1/0». Точность определения температуры составляла $\pm 0,05^\circ$, оптической плотности $\pm 5 \cdot 10^{-4}$ ОЕ. Кривые плавления каждого образца снимали 5—6 раз. Использовали 10-миллиметровые кюветы с плотно пригетыми пробками. Измерения проводили в интервале температур от 40 до 100°.

Результаты и обсуждение. Фракционирование негистоновых белков хроматина удобно проводить последовательной экстракцией белков растворами с различной концентрацией хлористого натрия и мочевины. Этим методическим подходом были выделены три фракции негистоновых белков хроматина печени петушков: лабильно связанные белки, прочно связанные белки и так называемые «остаточные» негистоновые белки, экстрагируемые только при обработке препаратом 3 М NaCl и и 5 М мочевиной. Показано, что при таком фракционировании примерно 70% общих негистоновых белков хроматина находится во фракции лабильно связанных белков, 20—22% — в составе прочно связанных белков и 5—7% — в составе «остаточной» фракции (табл.). Эстрадио-

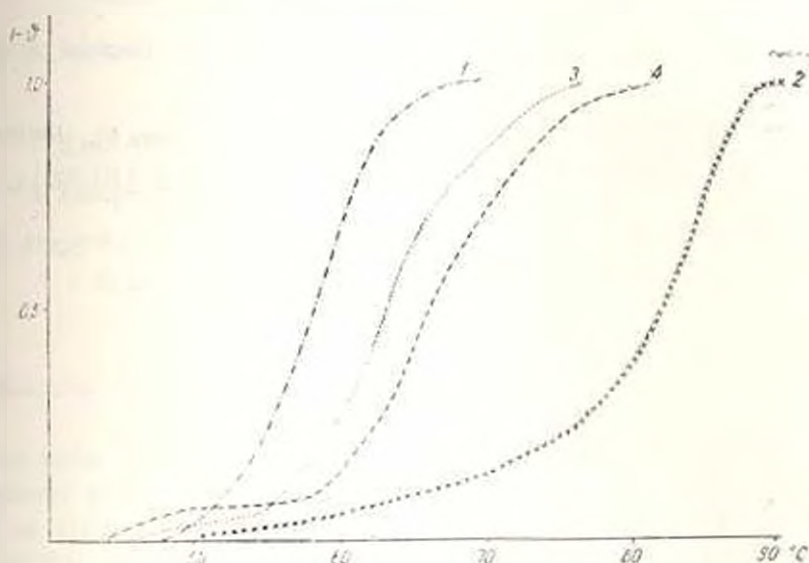
Содержание белка в отдельных фракциях негистоновых белков в контроле и после введения животным эстрадиола-17 β , мг на 1 мг ДНК

Вариант эксперимента	ЛСНБ	ПСНБ	ОСНБ
Контроль	0.245 $\pm$ 0.015	0.074 $\pm$ 0.004	0.025 $\pm$ 0.002
Эстрадиол	0.250 $\pm$ 0.010	0.057 $\pm$ 0.003	0.045 $\pm$ 0.003

ловое воздействие не оказывает существенного влияния на общее содержание лабильно связанных негистоновых белков (табл.), хотя нами ранее были выявлены изменения в составе отдельных фракций этих белков при дальнейшем их фракционировании ионообменной хроматографией и электрофорезом в ПААГ [2]. Заметные изменения обнаруживаются во фракциях прочно связанных и «остаточных» негистоновых белков. При этом количество прочно связанных белков уменьшается на 20% с одновременным повышением содержания негистоновых белков «остаточной» фракции на 50—55% (табл.). Такое существенное перераспределение, по всей вероятности, связано с сильным депрессирующим воздействием гормона. Обращает на себя внимание заметное увеличение количества белка в «остаточной» фракции хроматина, интерес к которой обусловлен данными о том, что она обогащена последовательностью ДНК, специфически узнаваемой «остаточными» белками [13]. В связи с этим представляет интерес изучение изменения термостабильности этой фракции в контроле и при активирующем влиянии эстрадиола с целью уточнения возможности структурных перестроек в ней.

Как видно из рисунка, воздействие эстрадиолом не влияет на плавление препаратов нативного хроматина, в то время как кривая плавле-

ния его «остаточной» фракции смещается в сторону высоких температур. Высокая термостабильность остаточной фракции при воздействии эстрадиола, по-видимому, объясняется повышенным содержанием в ней белка. Вместе с тем на фоне повышения общей термостабильности обращает на себя внимание заметное ее снижение при относительно низких температурах плавления, затрагивающее 7—8% плавящегося комплекса в области АТ-богатых участков ДНК (рис.). Следовательно,



Кривые плавления: 1 свободной ДНК, 2. хроматина, 3 «остаточной» фракции хроматина в контроле, 4 «остаточной» фракции хроматина при воздействии эстрадиола. На оси абсцисс—температура, на оси ординат—для расплавленности ДНК.

введение гормона приводит к увеличению некоторой доли легкоплавких участков, соответствующих сайтам связывания «остаточных» негистоновых белков с АТ-богатыми участками.

Полученные результаты свидетельствуют о структурных перестройках в «остаточной» фракции хроматина при дерепрессирующем геном влиянии эстрадиола в клетках печени петушков. Гормональная активация генома сопровождается общей стабилизацией структуры «остаточной» фракции хроматина, по-видимому, являющейся результатом заметного перераспределения прочно связанных с ДНК негистоновых белков в хроматине. Некоторая дестабилизация структуры может быть непосредственно связана с процессами специфической дерепрессии определенных участков генетического аппарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардгеваян Н. О., Тирацун С. Г., Вардгеваян Р. Р., Паносян Г. А. Физиология растений, 1, 58, 1983.
2. Геворкян Э. С., Абрамян А. Ш., Матиян К. С., Паносян Г. А. Вопросы мед. химии, 31, 5, 107, 1985.
3. Лукиш Г. Л., Романов Г. А. Биологические науки, 4, 22, 1984.

4. Burton K. *Biochem. J.*, **62**, 315, 1956.
5. Chauveau J., Moule Y., Rouiller C. R. *Exp. Cell Res.*, **11**, 317, 1956.
6. Hiremath S. T., Maciewicz R. Y., Wang T. Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **653**, 1, 1981.
7. Klyzsejko—Stefanowicz L., Chiu J. F., Tsai Y. H., Hnilica L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **73**, 1954, 1976.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. *et al.* *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
9. Nyberg L. M., Wang T. Y. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 267, 1976.
10. Thrall C. L., Webster R. A., Spelsberg T. C. In: *The Cell Nucleus*, N. Y., **6**, 4, 1978.
11. Umansky S. R., Kovalov I. I., Tokarskaya V. I. *Biochim. Biophys. Acta*, **3**, 242, 1975.
12. Wang T. Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 61, 1978.
13. Wang T. Y., Chiu J. F., Klyzsejko—Stefanowicz L., Fujtani H., Hnilica L. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1471, 1976.

Поступило 18.V 1987

ДЫХАНИЕ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, А. С. ТЕР-МАРКОСЯН, М. Г. ХРЛОПЯН, К. Г. КИРАКОСЯН

Ереванский медицинский институт, ЦНИЛ, лаборатория
биофизики и молекулярной биологии

Микросомы печени—электростатическое поле—дыхание.

В ряде работ [4, 7, 8] показано, что воздействие ЭСП приводит к избыточному снабжению тканей кислородом. Известно также, что в печени он утилизируется тремя основными путями: митохондриальным окислением, перекисным окислением липидов и микросомальным окислением. Ранее нами было установлено, что ЭСП угнетает митохондриальное дыхание и интенсифицирует липидную перекисную печеночной ткани [2, 3]. В настоящей работе представлены результаты изучения действия ЭСП на скорость утилизации кислорода микросомами печени крыс.

Материал и методика. Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150—180 г, которых подвергали воздействию ЭСП напряженностью 2000 В/см, длительностью 1 ч, 1 и 6 сут, по 6 ч ежедневно и сразу же декапировали. Микросомы печени изолировали по общепринятой методике [1]. Параллельно забивали контрольных животных. Скорость дыхания определяли на полярографе IP-7 (ЧССР) при помощи термостатируемой (1—26°) ячейки с закрытыми электродами Кларка [5]. В полярографическую ячейку, содержащую 2 мл среды инкубации (100 мМ трис-НСl, pH 7.4), добавляли 1 мМ НАДФН и суспензию микросом из расчета 4—6 мг белка. Регистрировали скорость дыхания, которую выражали в $\frac{\text{мл O}_2}{\text{мин. мг белка}}$. Количество белка определяли по [6].

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что воздействие ЭСП всех исследованных экспозиций не вызывает достоверных сдвигов в дыхательной активности микросом.

Сокращения: ЭСП—электростатическое поле.

2000 В. см. в $\frac{\text{мг } O_2}{\text{мин. мг белка}}$

Экспозиция ЭСП	Скорость дыхания	Экспозиция ЭСП	Скорость дыхания
0 (контроль) n=11	7.1 ± 0.4	1 сут n=7	8.2 ± 0.9 $t=1.12$
1 ч n=10	6.6 ± 0.6 0.61	6 сут n=9	6.1 ± 0.45 $t=1.79$

ЭСП практически не влияет на скорость утилизации кислорода микросомами. Принимая во внимание результаты наших предыдущих исследований, мы можем предположить, что избыток кислорода, регистрируемый при воздействии ЭСП в основном удовлетворяется путем перекисного окисления липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кирязян Г. С., Аршакян А. А. В кн. Современные методы в биохимии. М., 1977.
2. Межлумян Л. М., Аршакян Г. Г., Саакян Р. А. Биол. ж. Армения, 31, 1185, 1980.
3. Мкртчян С. Л., Аршакян Г. Г. Биол. ж. Армения, 31, 750, 1978.
4. Пирузян Л. А., Аршакян Г. Г., Ровшанян Г. Н., Карамян А. Д. Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 430, 1974.
5. Шольц К. Ф., Петровский Л. Н. В кн. Методы современной биохимии, 52, 1975.
6. Sizhaki R., Gill D. Analyt. Biochem., 9, 17, 1964.
7. Möse V. In: Fahlner G. Acta Physiol. 224, 19, 1971.
8. Schwenke Zeitschr. Physiol., 16, 17, 197.

Поступило 31.1987 г.

Биол. ж. Армения, 7, 411, № 4, 1988

УДК 535+612.11

ВЫЯВЛЕНИЕ АСИММЕТРИИ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПО РАЗМЕРАМ МЕТОДОМ ДИФРАКТОЭРИТРОМЕТРИИ

Р. Г. МКРТЧЯН, Ф. А. МАОНИ, Г. Н. САРКИСЯН, Р. Г. ХЛЕБОПРОС

НИИ медицинской биологии МЗ АриССР, Ереван

Эритроциты—метод дифрактоэритрометрии

Ранее [6, 7] нами было показано, что при дисперсии по размерам в популяции эритроцитов (что всегда имеет место в реальной крови), да-

Сокращения: СА—симметричный аниозитоз, ПАА—патологический асимметричный аниозитоз, ПАА—патологический асимметричный аниозитоз.

же если она подчиняется закону Гаусса (нормальное распределение), их средний диаметр не пропорционален параметру первого максимума функции Бесселя. Другими словами, принятая методика получения величины среднего диаметра эритроцитов [4, 8, 10, 12] по местоположению первого максимума дифракционной картины неточна.

Вместе с тем имеется ряд литературных данных, свидетельствующих о том, что у здорового организма распределение эритроцитов по размерам (эритроцитометрическая кривая) не всегда подчиняется закону Гаусса [2, 5, 11]. Довольно часто это явление рассматривается как артефакт экспериментальной методики. Однако мы считаем естественным предположить, что это главным образом связано с динамической природой равновесия системы эритронов. Последнее понимается так: в реальном эритроне всегда имеют место флуктуации разных показателей, обусловленные, с одной стороны, его функционированием как целого, с другой — влиянием внешних факторов. Это в равной степени относится и к размерам эритроцитов. Таким образом, делается логическое предположение, что в норме распределение эритроцитов по размерам может иметь асимметричный характер. В отличие от нормального распределения, для которого все моменты выше второго тождественно равны нулю, асимметричное распределение может характеризоваться также третьим и четвертым моментами. Третий момент — коэффициент асимметрии, а четвертый — коэффициент эксцесса. Они имеют следующий физический смысл: коэффициент асимметрии характеризует направление и величину сдвига главной моды распределения от его среднего значения; коэффициент эксцесса дает информацию о случайном характере и степени однородности основной массы эритроцитов по изучаемому признаку (форме кривой распределения и ее высоте вблизи главной моды). Различают два типа коэффициентов асимметрии и эксцесса, отличающихся по знаку.

Назовем НАА явление отклонения эритроцитометрической кривой в норме от симметричной гауссовской. Многочисленные литературные данные [2, 4, 5, 9] свидетельствуют, что при различных патологических состояниях организма наблюдаются отклонения эритроцитометрической кривой от нормы как в виде микроцитоза, так и в виде макроцитоза. Назовем указанную асимметрию ПАА. Допустимо также предположение, что при некоторых заболеваниях может иметь место переход от НАА к СА.

В настоящей работе продолжено развитие теории дифрактоэритрометрии — дифракционного метода решения задачи эритроцитометрии, на случай популяции эритроцитов с асимметричным распределением их по размерам. Это позволяет в дальнейшем построить алгоритм получения параметров асимметричного распределения (величину среднего диаметра, дисперсии, коэффициента асимметрии и коэффициента эксцесса) по экспериментально регистрируемым дифрактограммам с целью выяснения различий между НАА и ПАА.

При решении задачи дифракции света на мазке красной крови, основываясь на работах [1, 5], мы рассматривали эритроциты как частицы, имеющие форму диска.

Отклонение от нормального распределения закладывается в исходную модель в виде асимметрии и используется выражение, хорошо известное в литературе под названием ряда Эджворта — асимптотическое разложение, основанное на нормальном распределении [3]:

$$f(x) \sim \varphi(x) - \frac{\gamma_1}{3!} \varphi^{(3)}(x) + \frac{\gamma_2}{4!} \varphi^{(4)}(x) - \frac{10\gamma_1^2}{6!} \varphi^{(6)}(x), \quad (1)$$

где $\varphi(x)$ — функция гауссовского распределения, $x = \frac{d-d_0}{\sigma}$ — нормированная величина, d_0 — средний диаметр, d — диаметр эритроцита, σ — дисперсия по размерам для нормального распределения, $\varphi^{(i)}(x)$ — производные от $\varphi(x)$ по безразмерному параметру, ($i=1,2,\dots$). $\gamma_1 = \mu_3/\sigma^3$, $\gamma_2 = \left(\frac{\mu_4}{\sigma^4} - 3\right)$ — коэффициенты асимметрии и эксцесса, μ_i — центральные моменты. Это позволит отличить дифракционные картины при симметричном и асимметричном анизоцитозах.

На практике оказывается достаточным использование разложения, содержащего члены с третьим и четвертым моментами (μ_3, μ_4). Поскольку почти всегда γ_1^2 — малые величины, а также в силу равенства $(\pm\gamma_1)^2 = \gamma_1^2$, не позволяющего выяснить, какая именно асимметрия (положительная или отрицательная) дает соответствующий вклад, далее последний член в ряде (1) можем опустить.

Для вычисления интенсивности результирующей дифракционной картины как функции от точки на экране наблюдения достаточно усреднить выражение распределения интенсивности для отдельного эритроцита [7] по размерам, используя формулу для математического ожидания [3] и функцию распределения эритроцитов по размерам в виде (1), без последнего слагаемого. Выражение интенсивности тогда запишется в виде:

$$I(w) = NI_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \left[2 J_1 \left(\frac{kw(\sigma x + d_0)}{2} \right) / \left(\frac{kw(\sigma x + d_0)}{2} \right) \right]^2 e^{-\frac{x^2}{2}} \left[1 - \frac{\gamma_1}{3!} x (3 - x^2) + \frac{\gamma_2}{4!} (3 - 6x^2 + x^4) \right] dx. \quad (2)$$

Из определения нормированной величины x легко убедиться, что в пределах интегрирования от $-\infty$ до $+\infty$ в выражении (2) диаметр эритроцита изменяется от нуля до $+\infty$.

Один из сравнительно простых способов вычисления интегралов вида (2) можно найти в [7]. В результате получается выражение, отличающееся от $I(w)$ для одинаковых эритроцитов, слагаемыми пропорциональными параметрам асимметричного распределения — $d_0, \sigma, \gamma_1, \gamma_2$. Примечательно то, что первое слагаемое аналогично выражению $I(w)$ для одномерного множества эритроцитов с величиной диаметра d_0 [7].

На практике (почти всегда) значение σ/d_0 лежит в интервале 0,05–0,3 и удовлетворяется условие $(\sigma/d_0)^2 \ll 1$. Это позволяет существенно

упростить выражение $I(w)$, необходимое для достижения поставленной цели. Оно имеет вид:

$$I(w) = NI_0 \left[2 J_1 \left(\frac{kwd_0}{2} \right) / \left(\frac{kwd_0}{2} \right) \right]^2 + \frac{NI_0}{8} \left(\frac{\sigma}{d_0} \right)^2 \times \\ \times \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^m [(2m+2)!]^2}{m!(m+2)! [(m-1)!]^2} \frac{\left(\frac{kwd_0}{4} \right)^{2m}}{(2m)!} \left[1 + \frac{\gamma_2 2m}{3d_0} \left(1 + \frac{\sigma^2}{d_0^2} \right) + \right. \\ \left. + \frac{3 + \gamma_2(2m-1)2m}{6} \left(\frac{\sigma}{d_0} \right)^2 \right]. \quad (3)$$

На первый взгляд выражение (3) имеет довольно сложный вид. Однако оценки показали, что во втором слагаемом достаточно ограничиться значениями $m=0,1,\dots,5$. Вместе с тем уже из (3) следует, что при определенном значении d_0 положения экстремумов (максимумов и минимумов) зависят от знака и величины как γ_1 , так и γ_2 . Легко заметить, что при $\gamma_1=\gamma_2=0$ выражение (3) совпадает с выражением для случая гауссовского распределения [6]. При макроцитозе ($\gamma_1>0$) глубина первого минимума уменьшается (высота увеличивается) больше по сравнению с СА, а его положение сдвигается в сторону меньших углов. При микроцитозе ($\gamma_1<0$) имеет место обратное явление.

Вопрос о нахождении значений N и I_0 решается легко, если вместо $I(w)$ в эксперименте измеряется отношение $I(p)=I(w)/NI_0$. Здесь p — набор параметров функции распределения эритроцитов по размерам — $d_0, \sigma, \gamma_1, \gamma_2$.

В дальнейшем будут обсуждены результаты расчетов для разных модельных случаев и сравнения с экспериментальными данными, полученными на созданном нами дифрактоэритрометре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов М. Г. Гематологический атлас. М., 1985.
2. Гольдберг Л. Н., Левина Г. Д. Диаметр эритроцитов в норме и патологии. Томск, 1969.
3. Крамер Г. Математические методы статистики. М., 1975.
4. Лемажухин Б. К., Франк Г. М. Тр. Ин-та биофизики АН СССР, 1, 279, 1955.
5. Леонова В. Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск, 1987.
6. Мкртчян Р. Г., Мкоян Ф. А., Саркисян Г. Н. Биофизика, 33, 3, 1988.
7. Саркисян Г. П., Дубынин В. Н., Мкоян Ф. А., Хлебозорев Р. Г. Препринт № 35Б ИФ СО АН СССР. Красноярск, 1984.
8. Bowli C. Physics Education, 6, 13—15, 1971.
9. Krause Johan R. Lab. Manag., 23, 10, 29—32, 1985.
10. Krishna G., Gopale, Akhmad Adeel, Ali A. K. W. Anwar. Indian J. Exp. Biol., 21, 12, 677—679, 1983.
11. Pietration F. Di., Dolzondit A., Carnicelli M. LAB, 12, 2, 129—133, 1985.
12. Pijper A. J. Lab. Clin. Med., 2, 877—877.

Поступило 8.11.1988 г.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ ИНFUЗОРИЙ ПРИ ПОДКОРМКЕ ЛЕЙКОЦИТАМИ

М. А. АМБАՐՇՄՅԱՆ, А. А. ЛАЛАՅԱՆ

Ереванский государственный медицинский институт, кафедра биологии

Свободноживущие инфузории как тест-объект широко используются в различных областях биологии. Этим, в частности, можно объяснить тот большой интерес, который проявляют многие исследователи к поискам новых методов и способов культивирования простейших. Настоящая работа представляет одну из таких попыток.

Опыты ставились на свободноживущих инфузориях *Paramecium multimicronucleatum*, которые культивировали в сбалансированной минеральной среде Лозина-Лозинского (Л—Л) при различных температурах (25°, 32°, 35° и 37°). В качестве подкормки использовали лейкоцитарную массу крови человека как в отдельности, так и в сочетании с термофильными микроорганизмами (*Bar. coagulans*). Контрольные инфузории подкармливали дрожжами (*Saccharomyces ellipsoides*) по методике Лозина-Лозинского.

Лейкоцитарный корм готовили следующим образом. Одну каплю исходной суспензии лейкоцитов разбавляли в 1,5 мл среды Л—Л и по 1 капле добавляли в каждый микроаквариум (количество лейкоцитов в одной капле составляло 1 млн, а при пересчете в 1 мл—28 млн клеток). Корм из термофильных микроорганизмов готовили разбавлением 5 петлей бактериальной массы в 2 мл среды Л—Л и по 1 капле добавляли в каждый микроаквариум. По количеству обнаруженных в микроаквариумах инфузорий определяли число поколений за сутки. Таким образом, темп размножения определяли путем подсчета числа делений каждой особи (линии) в сутки в течение нескольких дней или недели. При комнатных температурах (23°, 25°) темп размножения составлял 2,44 раза в сутки (контрольные—1,16 раза), при 37°—2,9 раза в сутки (контрольные—1,9 раза). Когда лейкоцитарная масса сочетается с мертвыми термофильными микроорганизмами, инфузории размножаются более энергично—4,16 раза в сутки. При подкормке культур только термофильными бактериями период деления инфузорий резко падает, достигая 1,11 раза в сутки.

Таким образом, лейкоцитарная масса, полученная из крови человека, представляет полноценный корм при культивировании свободно-

живущих инфузорий как при комнатной, так и при высоких (35° — 37°) температурах.

9 с., библиогр. 7 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИИ, № 8020-B87 от 28.X 1987 г.

Поступило 19.V 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 632.937.1:595.78(479.24)

ПАРАЗИТЫ ОСНОВНЫХ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ ВРЕДИТЕЛЕЙ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В ЛОРИ-ПАМБАКСКОЙ ЗОНЕ АРМЯНСКОЙ ССР

А. ДЖ. ГРИГОРЯН

Кировакенский государственный педагогический институт, биологический факультет

В статье приводятся состав энтомофагов вредных чешуекрылых плодовых садов, в частности яблони и груши Лори-Памбакской зоны Арм. ССР, значимость и динамика по годам (за 1977—1980 гг.) для яблонной плодовой галки, рябиновой и яблонной молей, медведицы госпожи и златогузки.

Общая паразитированность опасных вредных чешуекрылых за отмеченные годы в среднем колеблется в пределах, %: яблонной плодовой галки—7,9—19,5; рябиновой моли—0,21, медведицы госпожи—5,3—80,0; яблонной моли—10,5—43,5; златогузки—0—14,2.

На яблонной плодовой галке выявлены 5 видов паразитических насекомых (*Pimpla turionellae* L., *Ascogaster quadridentata* Wesm., *Cremnops desertor* L., *Microdus rufipes* Nees., *Neoplectons pomonella* Schn. et Molt.), рябиновой моли—2 (*Microgaster* sp. aff. *polita* Marsh.), медведице госпоже 8 (*Pimpla instigator* F., *Netaropelma amictum* Fabry., N. sp. cf. *amictum* Fabry., *Ichneumon* sp. cf. *deliratorius* L., *Apanteles* sp. aff. *acuminatus* Reinh., *Carcelia lucorum* Mg., *Huebneria affinis* Fell., *Nemora pellucida* Mg.), златогузке 7 (*Meteorus versicolor* Wesm., *Braeteola anthracina* Richter., *Townsendiellomyia nidiicola* T. T., *Ctenophorocera pavidus* Mg., *Compsilura concinnata* Mg., *Blondelia nigripes* Fl., *Tachina praecox* Mg.), а яблонной моли 5 (*Itopectis tunetana* Schmied., *Habrobracon variegator* Spin., *Tetrestichus evonymellae* Bouche., *Amenaspis fuscicollis* Dalm., *Pseudosareophage mamillata* Pand.) видов паразитов.

Таким образом, на отмеченных вредных насекомых в общей сложности выявлены 26 видов паразитических насекомых, принадлежащих к двум отрядам и 6 семействам, в том числе *Ichneumonidae*—6 видов, *Braconidae*—7, *Eulophidae*—1, *Encyrtidae*—1, *Tachinidae*—10, *Sarcophagidae*—1 вид.

Для каждого вида приводятся фенология и литература по АрмССР.

9 с., библиогр. 10 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИИ, № 9068-B87, от 24.XII 1987 г.

Поступило 1.X 1987 г.

ДЕРЕВЬЯ И КУСТАРНИКИ ГЮНЕЙСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ оз. СЕВАН

П. А. ХУРШУЛЯН, С. Б. АПРАПЕТАН

Институт ботаники АН АрмССР

Целью наших исследований было уточнение и выявление изменений в видовом составе деревьев и кустарников за прошедшие 50—60 лет.

На Гюнейском побережье оз. Севан нами обнаружено 79 видов деревьев и кустарников, что, по существу, охватывает все приводимые ранее другими авторами виды, за исключением двух: *Mespilus germanica* L. и *Rubus saxatilis* L. Здесь нами собраны ранее неприводимые для данного района 2 вида — рябина канкасская (*Sorbus caucasica* Linserl.) ERE № 133264 и миндаль Фенция (*Amygdalus fenzliana* (Fritsch) Lipsky ERE № 133263).

Указанные 79 видов деревьев и кустарников относятся к 17 семействам и 32 родам. Самым представительным является семейство *Rosaceae*—13 родов, 43 вида. Род *Sorbus* представлен 9 видами, *Astragalus*—6, а *Cotoneaster* и *Rosa*—по 5 видов. Из обнаруженных видов деревьев—27 (2 хвойные), кустарников—51 (3 хвойные). Из деревьев преобладающими являются *Quercus macranthera* Fisch. et Mey. ex Hohen. и *Juniperus polycarpus* C. Koch.

Особенно богат видовым составом Севанский хребет (77 видов). Наиболее насыщены северные и северо-восточные микросклоны, где встречаются 90% приводимых видов деревьев и кустарников. 10 видов благодаря большой экологической пластичности встречаются на всех микросклонах.

При сравнении видового состава деревьев и кустарников Гюнейского побережья с таковым Даралагязского, Зангезурского и Иджеванского флористических районов выявлена, тесная связь с соседними флористическими районами, наиболее выраженная в направлении к югу (Севанский хребет).

Богатый видовой состав дендрофлоры Севанского и Аргунейского хребтов и связь их с соседними флористическими районами позволяет предположить, что Гюней является одним из направлений, по которым древесно-кустарниковые виды мигрировали с Кавказа в Иран и Малую Азию и наоборот.

11 с., библиогр. 11 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИИТ, № 9070-В67 от 24. XII 1987 г.

Поступило 23 IX 1987 г.

РОСТ И РАЗВИТИЕ КАТАРАНТУСА РОЗОВОГО (*CATHARANTHUS ROSEUS* G. DON) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПИТАТЕЛЬНОМ РАСТВОРЕ

К. С. МАНАСЯН

Институт агрохимических проблем и гидропоники АН АрмССР,
Ереван - Норатюх

Исследовали развитие и продуктивность растений катарантуса розового, выращенного в условиях открытой гравийной гидропоники, с целью выявления оптимального соотношения азота, фосфора и калия в питательном растворе Дантяна.

При выращивании растений на малых гидропонических установках с использованием растворов с разным соотношением элементов отмечены: одинаковая у растений всех вариантов продолжительность бутонизации; более позднее наступление фаз цветения и плодообразования, но более быстрое их прохождение у растений, получавших полный питательный раствор.

Сокращение доз макроэлементов наполовину и снижение доз фосфора и калия в питательных растворах обеспечивают высокую продуктивность растений, а снижение дозы азота сказывается отрицательно.

9 с., библиогр. 8 назв.

Полный текст статьи деп. в ВНИИПН

Поступило 1.VII 1987 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ ГИББЕРЕЛЛИНОМ

Н. Н. БЕГЛАРЯН, О. Х. ТАДЖИРЯН

Ереванский государственный университет, кафедра
цитологии и генетики

Работа посвящена результатам изучения действия разных концентраций GA_3 (0,01, 0,02, 0,05, 0,1%) при 4-, 6-, 8-часовых экспозициях на всхожесть семян, энергию и темп прорастания, на динамику роста проростков, а также митотическую активность меристематических клеток корешков пшеницы сорта Безостая 1.

Установлены оптимальные концентрации и экспозиции GA_3 . Выявлено их значительное стимулирующее действие на ранних стадиях онтогенеза.

Из испытываемых четырех концентраций GA_3 наиболее эффективными оказались низкие: 0,01%-ная при 8-часовой экспозиции и 0,02%-ная при 4-часовой. Последняя более эффективна, о чем свидетельствуют

значительное повышение всхожести, энергии и темпа прорастания семян, стимуляция роста проростков и повышение митотической активности деления клеток меристемы корешков из обработанных ΓA_3 семян.

9 с., библиогр. 21 назв.

Полный текст статьи деп. в ВНИИТИ

Поступило 2.X 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 634.25:581.111(479.25)

ОВОДНЕННОСТЬ ЛИСТЬЕВ И ПОБЕГОВ ПЕРСИКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГУСТОТЫ ПОСАДКИ

Г. Л. БАБАЯН, Ж. Г. КАРАПЕТЯН

Институт виноградарства, виноделия и плодоводства
Госагропрома АрмССР, пос. Мерцаван

Устойчивость плодовых культур и винограда к неблагоприятным внешним воздействиям (морозы, болезни, засухи и др.) в некоторой степени связана с оводненностью тканей и органов растений.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния густоты посадки на оводненность листьев и побегов деревьев персика в условиях предгорья Араратской равнины.

Объектом исследования служили персиковые деревья, посаженные осенью 1975 г. на территории Мерцаванской экспериментальной базы АрмНИИ ВВиП на площади 2,9 га по различным схемам посадки (5×3; 5×2,5; 4×3; 4×2,5; 3,5×3 и 3,5×2,5 м). Одновременно определяли влажность почвы по вариантам опыта: весь вегетационный период фон влажности почвы поддерживался в пределах 75—80% от НВ.

Независимо от густоты посадки деревьев наиболее высокое содержание воды в листьях и побегах персика наблюдалось на самых ранних этапах их роста, во второй декаде мая—в период интенсивного роста побегов и протекало волнообразно. По мере вызревания побегов количество общей воды в них уменьшалось. Содержание различных форм воды также подвергалось значительным изменениям.

В период вегетации густота посадки деревьев не оказывала отрицательного влияния на уровень оводненности тканей.

Таким образом, оптимальный водный режим почвы положительно влияет на содержание общей воды в тканях однолетних побегов и листьях персика независимо от схемы посадки деревьев.

6 с., библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи деп. в ВНИИТИ, № 3038-В88 от 20.IV 1988 г.

Поступило 13.V 1987 г.

КАВКАЗСКИЙ ДОМОВЫЙ ВОРОБЕЙ
PASSER DOMESTICUS CAUCASICUS BOGD.
В ДОЛИНЕ р. МАРМАРИК

Г. Г. МАНУЧАРЯН, М. Ж. МХИТАРЯН

Ереванский государственный университет, кафедра зоологии

Кавказский домовый воробей в долине р. Мармарик размножается дважды в год. Первое массовое размножение происходит во второй декаде мая, второе—во второй декаде июня. Откладывается 4–7 яиц, во второй кладке—преимущественно 7. Насиживание начинается после откладки 3-го яйца. Первые стаи молодых птиц отмечаются в конце июня, их численность удваивается во второй половине августа за счет второго поколения. Стаи сохраняются до весны (май).

Кавказские домовые воробьи в долине р. Мармарик не могут считаться опасными сельскохозяйственными вредителями, поэтому вопрос об ограничении их численности здесь не стоит, в отличие от Араратской долины, где уже возникла такая необходимость.

11 с., библиогр. 16 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИ

Поступило 9.II 1987 г.

ДАННЫЕ ПО ЭКОЛОГИИ ЖУЛАНА
LANIUS CRISTATUS COBYLINI VAT В АРМЕНИИ

Г. Г. МАНУЧАРЯН

Ереванский государственный университет, кафедра зоологии

Наблюдения велись в долине р. Мармарик. Птицы прилетают на стационар небольшими стайками во второй половине мая. С этого времени наблюдаются отдельные размножающиеся особи, однако массовое размножение происходит в июне. Гнездится жулан на кустах, откладывает 6 яиц. Насиживание длится 14 дней, примерно столько же времени птенцы остаются в гнезде. Жулан—полезная птица, хотя в отдельные годы, когда численность основных кормовых объектов—насекомых—снижается, он может уничтожить птенцов мелких воробьиных птиц. Учеты, проведенные в 1972—1984 гг., показали, что численность жулана из года в год снижается, что объясняется главным образом плотной посадкой деревьев и местах их гнездования. Жуланы покидают стационар в первой декаде сентября.

9 с., библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИ

Поступило 9.II 1987 г.

АНДРЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ ЯЦЕНКО-ХМЕЛЕВСКИЙ
(1909—1987)



Советская наука понесла тяжелую утрату. Ушел из жизни выдающийся ученый, ботаник, анатом, древесиновед, доктор биологических наук, профессор Андрей Алексеевич Яценко-Хмелевский.

А. А. Яценко-Хмелевский родился 30 октября 1909 г. в Елизаветполе (ныне г. Кировабад) в семье старшего лесного ревизора. Профессия отца и близкое общение с природой сыграли большую роль в выборе специальности. В 1927 г. А. А. Яценко-Хмелевский поступил в Тбилисский государственный университет. Еще будучи студентом первого курса он увлекся систематической анатомией растений и физиологией древесины, что и вылилось в дальнейшем основной сферой его научной деятельности.

Со второй половины тридцатых годов и до 1957 года научная деятельность А. А. Яценко-Хмелевского была связана с городами Тбилиси и Ереван. В 1944 г. он пе-

решает на постоянную работу в Ереван и в Институте ботаники создает лабораторию анатомии растений, которую возглавляет до переезда в Ленинград в 1957 г. В Ленинграде Андрей Алексеевич заведует кафедрой ботаники Фармацевтического института, а затем, с 1958 г. по 1979 г. — кафедрой анатомии и физиологии растений Ленинградской лесотехнической академии. До конца своей жизни он остается профессором этой кафедры.

Научная и педагогическая деятельность Андрея Алексеевича была связана с молодостью, к которой он относился с отцовской любовью и требовательностью. Андрей Алексеевич был человеком высокого гражданского долга. За 55 лет своей научной деятельности он воспитал целую плеяду специалистов — кандидатов и докторов наук, работающих во многих областях биологической науки — эволюционной, систематической и экологической анатомии древесных растений, технического древесиноведения, физиологии леса, культуры тканей *in vitro* древесных растений и др.

Будучи эрудированным, высокоинтеллектуальным человеком, владеющим многими иностранными языками, все свои знания он отдавал ученикам, охотно помогал молодым специалистам в научных изысканиях как в области анатомии растений, так и других областях ботанической науки.

Под руководством Андрея Алексеевича защищены 85 кандидатских диссертаций, а 8 его учеников стали докторами наук.

Первые кандидатские диссертации, написанные под его руководством, были успешно защищены в Институте ботаники АН АрмССР в 1947—1955 гг., где и создавалась первая школа ксилологов, ныне работающих в различных научно-исследовательских институтах и учреждениях республики и других городов страны.

А. А. Яценко-Хмелевский является основоположником древесиноведческой науки и

Армении. Здесь им написано около 100 работ и ряд монографий, которые вошли в арсенал мировой науки. Его первая монография «Примитивы систематики древесины», защищенная как докторская диссертация, высоко ценится специалистами всего мира и уже 40 лет является основой разработки теоретических вопросов таксономии. В 1954 г. вышла в свет вторая монография «Древесины Кавказа», уникальный справочник, по своему значению далеко выходящий за пределы Кавказа. Этот замечательный труд был высоко оценен советскими и зарубежными анатомами, ботаниками, древесиноведами и другими специалистами. В Ереване же он написал работу «Основы и методы анатомического исследования древесины», которая и по сегодняшний день пользуется популярностью у специалистов в области структурной ботаники. В лаборатории анатомии растений Андрей Алексеевич создал ценную коллекцию древесных образцов мировой флоры, которая продолжает обогащаться все новыми и новыми видами растений. Она является идеальной научной базой

для всестороннего изучения строения древесины представителей различных семейств растений.

А. А. Яценко-Хмелевский опубликовал более 200 работ, 4 монографии и 1 учебника. Он был бесконечно преданным науке ученым. В 1974 году Андрей Алексеевич был избран почетным членом Французской академии сельскохозяйственных наук, а в 1982 г. стал одним из вице-президентов Международной ассоциации анатомов древесины, членом которой он состоял с 1935 года.

Андрей Алексеевич был человеком щедрой души, настоящим интеллигентом, с исключительным чувством юмора, доброжелательный и отзывчивый. Он прекрасно знал историю музыки, живопись, всемирную художественную литературу, а историю армянского народа — не хуже, чем ботанику, и всегда был готов помочь своим ученикам и коллегам в решении различных научных проблем.

Память об Андрее Алексеевиче Яценко-Хмелевском навсегда сохранят коллеги, многочисленные ученики, друзья.

ПАЛАНДЖЯН В. А., ТУМАНЯН С. А.