ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Журнал издается с 1946 г., выходит 12 раз в год
на армянском и русском языках.
Айастани кенсабанакан андес

«Հայաստանի կենսաբանական գիտություններ» հանդեսը հրատարակվում է Հայկական ՍՍՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և տպագրում է հողագիտության, կենդանաբանության, բուսաբանության, միկրոբիոլոգիայի, կենսաքիմիայի, կենսաֆիզիկայի, մոլեկուլյար կենսաբանության, վենսիրության և ընդհանուր ու կիրառական կենսաբանության այլ բնագավառների վերաբերյալ։

Բաժանորդագինն է 3 ռ. 60 կ. Բաժանորդագրվելու ընդունվում է Սոյուզպեչատի բոլոր բաժանմունքներում։

«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 на год 3 руб. 60 коп. Подписку на журнал можно производить во всех отделениях Союзпечати.

Խմբագրական կոլեգիա՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ռ. Մ. Ավագյան, Վ. Ն. Վեհ. տրյան, Ծու. Ի. Ալեքսանյան, Հ. Գ. Բակլավաջյան, Մ. Ա. Դավթյան, Ա. Ի. Հակոբյան, Ս. Ա. Հարությունյան (պատասխանատու քարտուղար), Ն. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Վապարյան, Գ. Ա. Վանդիլյան, Կ. Գ. Զաքարյան, Ս. Մ. Մովսիսյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ)։

Ամբագական խորհուրդ՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (նախագահ), Ն. Ն. Ազիմովիչ, Վ. Ճ. Ազաթարյան, Հ. Ս. Ավետյան, Լ. Ռ. Գաբրիելյան, Ա. Ա. Դադոյան, Ա. Լ. Խախատրյան, Գ. Ա. Հովսեփյան, Յ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովհաննիսյան, Լ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաքիևոսյան, Մ. Ե. Չաքրյան, Ռ. Ա. Փոդոյան։

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

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, В. Ш. Акобян, Н. Н. Акрамовский, Э. Ш. Габриелян, А. А. Галоян, Л. С. Гамбарян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, К. Г. Погосян, А. Л. Тахтаджян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чаилахян.

Технический редактор Л. Г. Оганесян.

Сдано в набор 7/VI 1989 г. Подписано к печати 24/IX 1989 г. ВФ 05509
Бумага № 1, 70×108 1/16. Высокая печать. Печ. лист. 6,5. Усл. печ. лист. 9,1.
Уч.-изд. л. 7,47. Тираж 430. Заказ 284. Цена 2,57р.
Издательство Академии наук Армянской ССР, Ереван
пр. Маршала Баграмяна, 24 г.
Типография Издательства АН АрмССР, Ереван 19,
пр. Маршала Баграмяна, 24

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՀՈԴՎԱԾՆԵՐ

Գեղամյան Վ. Գ. Ֆիլոգենետիկական փոխադարձ կապերը հրիցիֆալ սնկերի սեռերի միջև և Erysiphales կարգի սիստեմատիկայի որոշ հարցեր 351
Ավագյան Ա. Ի., Ստեփանյան Կ. Վ. Կարտոֆիլի բույսի տերևների դանդաղեցված լուսաշնչման կախումը հանքային պարարտանյութերի դոզայից 353
Վարտանյան Ա. Ա., Ասրիկյան Ֆ. Վ. Մեմբրանային ապիտակուցների ԱԵՖ-ուրոցիլացման պրոցեսների ազդեցությունը սպիտակ առնետների օլիուզնդի սինապտոսոմների կողմից միջնորդանյութի կլանման վրա 367
Դյուլսանյանյան Ա. Վ. Հրիմորոցիանների վրա ֆտորիդի ներգործության ընթացքում Ca++-ի փոխանակիչի ինդուկցիան 371
Մանուկյան Ռ. Ա., Աբգարյան Ֆ. Ֆ. Արատային էլեկտրաստատիկ դաշտերի ազդեցությունը հրիմորոցիանների հնմայնի կինետիկայի վրա 376
Դաբեղինյան Թ. Ն. ABO անտիգենների փոփոխված էքսպրեսիայի ցուցչով հրիմորոցիտների բնութագիրը 379
Տիկունով Ի. Ա. Ակտոմիոզինային կոմպլեքսի կառուցվածքային-ֆունկցիոնալ վիճակները ռեպերպոլյարիզացիայի ռնակցիայի տարբեր փուլերում 383
Նաբերազյան Ֆ. Կ., Բարայան Կ. Ն., Համբարձումյան Ն. Ի., Հակոբյան Ժ. Ի. Տրանսկրիպցիայի ուսումնասիրությունը RNA—GH պլազմիդներ ստացած E. coli բջիջներում 388
Ռաֆայելյան Կ. Ա., Կարագուլյան Է. Ա., Թոչոյան Ա. Ա., Սաֆրիսյան Ռ. Ֆ. Բակտերիալ սուսպենզիայի օպտիմացիոն-վերականգնման պոտենցիալը և բջջային մեմբրանի ռեզերվ-վիճակը 394
Տեր-Զաքարյան Յու. Զ., Ադարարյան Ի. Վ., Ադաբաբյան Ա. Ֆ., Ինոպյան Ֆ. Ա., Մնացականյան Ս. Լ. N-β-(պ-բրոմբենզոիլ) վիթիզիցիլոյենների հին նմուշների հակաբակտերիալ ազդեցությունը 399
Հովհաննիսյան Ս. Գ., Բարայան Ա. Ֆ. Aspergillus niger R-3-ից D-ամիլազի արտադրման մարումը և որոշ ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները 403
Հովհաննիսյան Ի. Ս., Սատուվսկի Ե. Ս., Հովսեփյան Ա. Ս. Պղնձի, ցինկի և կոբալտի իոնների ազդեցությունը Chaetomium luteum կոզալոզների ակտիվության վրա 407
Փիլոսյան Գ. Գ., Սկուրլատով Յու. Ի., Մխիթարյան Ա. Հ., Մատաքյան Ա. Ի., Բալդիրևա Ն. Ա. Ընդհանրացված ցուցանիշների կիրառումը Սևանա լճի ջրի վիճակի վրա գնահատման հոսքի ազդեցության գնահատման դեպքում 412

ՀԱՄԱՌՈՏ ՀԱՂՈՐԴՈՒՄՆԵՐ

Ավագյան Զ. Ի., Այվազյան Ն. Ա., Աֆրիկյան Է. Գ. Ինուլինազային ակտիվության տարածումը տարբեր միկրոօրգանիզմներում 416
Մնացականյան Ն. Գ., Մովսիսյան Ա. Վ., Բալաբեկյան Ն. Դ., Կոստանյան Ց. Տ., Ալեքսանյան Յու. Ի. Մկների ուղեղի հանգեպ ռնգիտանտության հարուցումը քանդակն RNP-ի միջոցով 418
Դաբեղինյան Տ. Ն. Բիմակրոմոլեկուլների պարունակության օրոշումը էրիմորոցիանների ուղղաձայնով մշակված սուսպենզիայի սուպերնատանտներում 421
Նիկողոսյան Վ. Ի. Ազոտաբակտերի ազոտ ֆիքսող ակտիվությունը Սևանա լճի մերկուցված հողագրունտներում 423

Տեսություն և բանավեճ

Գրիգորյան Ֆ. Ն., Ստոլբերգ Ա. Մ., Հայրապետյան Ա. Ն. Վարքի և հիշողության մոլեկուլյար մեխանիզմների հարցի շուրջ 426

ՈՒՆՏՐԱՏՆԵՐ

Մկրտչյան Լ. Ս., Քոթոյան Ն. Գ. *Lacerta* սեռի մողեսների երեք մերձավոր տեսակների ֆոլիդոզի արտաքին ցուցանիշների փոփոխականության անալիզը . . . 435

Քալաշյան Դ. Ս., Կանայան Լ. Ռ., Բարխուդարյան Տ. Ռ. Հավի սպերմի հեղաստոպտանների միջուկի ակտիվության դինամիկան սաղմի հավերին սաթարիվով կերակրելիս 436

Միսքոյան Ա. Ա. Սևանի սիգի տարբեր օրգաններից անջատված չրացած սպիտակուցների սեգմենտային դինամիկան 437

Բազոյան Ա. Մ. Նավերի արյան մեջ սնուցման հորմոնների խտության փոփոխություններ բնկերքի պահման ընթացքում 438

Ադունց Գ. Տ., Ազատյան Խ. Հ., Սարգսյան Լ. Վ., Տեր-Քազնասյան Լ. Գ., Ադունց Կ. Կ., Գասպարյան Ա. Ա. Տոսֆատազների ակտիվությունը բարակ աղիների տարբեր հատվածներում 439

Ավագյան Ա. Կ., Ասլիխանյան Տ. Գ., Ցուրաբով Ն. Օ. Օրգանական ԲՔուների կուտակման դինամիկան տաժատ պուլցիների կազմավորման և հասունացման պրոցեսում 440

ԳՆԱՀԱՏՈՒԹՅՈՒՆ ՆՈՐ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ

Ազիկյան Է. Գ. Новое руководство «Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений». Справочник в 2-х томах под ред. А. А. Герасименко. М., «Машиностроение», 1978, т. 1—688 с., т. 2—584 с 441

СОДЕРЖАНИЕ

СТАТЬИ

Гелюта В. П. Филогенетические взаимосвязи между родами эризифальных грибов и некоторые вопросы систематики порядка *Erysiphales* . . . 351

Авакян А. Б., Степанян К. В. Зависимость замедленной флюоресценции листьев растений картофеля от дозы минеральных удобрений . . . 358

Вирганян А. А., Априкян Г. В. Влияние процессов АДФ рибозилирования мембранных белков на захват нейротрансмиттера синаптосомами мозга белых крыс 367

Гюльханданян А. В. Индукция Ca⁺⁺—H⁺ обменника при действии фторида на эритроциты 371

Манукян Р. А., Арируни Г. Г. Влияние внешних электростатических полей на кинетику гемолиза эритроцитов 376

Гарсеманян Т. Н. Характеристика эритроцитов с измененным показателем экспрессии антигенов АВО 379

Тикунов Б. А. Структурно-функциональные состояния актомиозинового комплекса на разных стадиях реакции суперпреципитации 383

Шахбазян Г. К., Бабаян К. Ш., Амбарцумян Н. С., Акопян Ж. И. Исследование транскрипции в клетках *E. coli* полученной плазмиды pJZA-GH . . . 388

Багратян К. А., Карагулян Э. А., Гочунян А. А., Саркисян Г. Г. Величина окислительно-восстановительного потенциала бактериальной суспензии и редокс-состояние мембран клеток 394

Тер-Захарян Ю. З., Агабабян Р. В., Агабабян А. Г., Геворкян Г. А., Мнджоян О. Л. Антибактериальная активность гидрохлорида этилового эфира N-/β- (п-хлорбензоил) этил/глицилглицина 398

Оганесян С. Н., Бабаян А. Г. Очистка и некоторые физико-химические свойства оксидазы D-аминокислот из *Aspergillus niger R—3* 403

Оганесян Р. О., Островский Н. С., Овсепян А. К. Влияние ионов меди, цинка и кобальта на выживаемость бокоплавов *Gammarus lacustris* . . . 407

Вирумян Г. Н., Скурлатов Ю. И., Мхитарян Л. Г., Мартирян А. Н., Болдырева Н. М. Применение обобщенных показателей к оценке влияния речного стока на состояние воды оз. Севан . . . 412

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Авакян З. Г., Айвазян Н. А., Африкян Э. Г. Инулиназная активность у различных микроорганизмов 416

Месропян Н. П., Мовсесян А. В., Балабаджян Н. Г., Гаспарян Э. Т., Алексанян Ю. Т. Индукция резистентности к мышиной опухоли с помощью ксеногенной РНК 416
Гарегинян Т. И. Определение содержания биомакромолекул в супернатантах суспензии обработанных ультразвуком эритроцитов 421
Никогосян В. Г. Азотфиксирующая активность азотобактера в обнаженных почвогрунтах озера Севан 423

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

Григорян Г. Е., Стольберг А. М., Айрапетян С. Н. О молекулярных механизмах научения и памяти 426

РЕФЕРАТЫ

Мелкумян Л. С., Торосян Е. Г. Анализ изменчивости качественных признаков фолидоза трех видов ящериц рода *Lacerta* 435
Балоасинян Д. С., Канцян Л. Р., Бархударян Т. Р. Динамика митотической активности гепатоцитов куриного эмбриона при скармливании курам-несушкам янтарной кислоты 436
Мисарян С. С. Сезонная динамика количественных изменений водорастворимых белков, выделенных из различных органов севанского сига . . . 437
Бадалян А. М. Изменение концентрации половых гормонов в крови коров при задержке последа 438
Адинц Г. Г., Асланян И. Г., Саркисян Л. В., Тер-Гитчосян Л. П., Адинц Г. Г., Гаспарян А. А. Активность фосфатаз в различных отделах тонких кишок 439
Авакян А. Г., Степанян Т. Г., Тарасова Е. О. Динамика накопления органических кислот в процессе формирования и созревания плодов томата . . . 440

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Африкян Э. К. Ценное руководство «Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений». Справочник в 2-х томах под ред. А. А. Герасименко. М., «Машиностроение», 1978, т. 1—688 с., т. 2—784 с. 441

CONTENTS

ARTICLES

Gelyuta V. P. Phylogenetic Connections among Genera of Powdery Mildew Fungi and Some Questions of Systematics of *Erysiphales* Order 351
Avakyan A. E., Stepanian K. V. Dependence of Delayed Fluorescence of Leaves of Potato Plants on the Doses of Mineral Fertilizers 358
Vartanian A. A., Apriklian G. V. Influence of Processes of ADP—Ribosylation of Membrane Proteins on the Uptake of Neurotransmitter by White Rat Brain Synaptosomes 367
Gyulkhandanyan A. V. Induction of Ca^{2+}—H^+ Exchanger in Erythrocytes under the Influence of Fluoride 371
Manukian R. A., Arisruni G. G. Influence of External Electrostatic Fields on the Kinetics of Erythrocytes Hemolysis 376
Gareginian T. M. Characterization of Erythrocytes with the Modified Index of Expression of ABO Antigenes 379
Tikunov B. A. Structure—Functional States of Actomyosin Complex on Various Stages of Superprecipitation Reaction 383
Shakhbazian G. K., Babayan K. Sh., Hambartsumian N. S., Hakobian Zh. I. Study of Transcription in *E. coli* Cells, Received *pJZA—OH* Plasmids . . 388
Baghramia n K. A., Karagulian E. A., Trchounian A. A., Sargisian G. G. Value of Oxidation—Reduction Potential of Bacterial Suspension and Redox—State of Cells Membranes 394

Ter—Zakarian Yu. Z., Aghababian P. V., Aghababian A. G., Gevorkian G. A., Majoyan O. L. Antibacterial Activity of Hydrochloride of the Ethyl Ester of N-3-(p-chlorobenzoyl) Ethyl—Glycylglycine 398
Hovhannesian S. P., Babayan A. G. Purification and Some Physico—Chemical Properties of *D*-Amino Acid Oxidase from *Aspergillus niger* R—3 . . 403
Hovhannisian R. O., Ostrovski I. S., Hovsepian A. K. Influence of Copper, Zinc and Cobalt Ions on the Vitality of *Gammarus lacustris* 407
Pirumian G. P., Skurlatov Yu. I., Mkhitarian A. H., Martirian A. I., Boldereva N. M. Application of Generalized Indices to the Evaluation of the Action of River Meander on the State of Water of the Lake Sevan . . . 412

SHORT COMMUNICATIONS

Avagian Z. G., Aivazian N. A., Afrikian E. G. Distribution of Inulinase Activity in Various Microorganisms 416
Mesropian N. P., Movsesian A. V., Balabajian N. G., Gasparian E. T., Alexanian Yu. T. Induction of Resistance of Mice Tumour with Xenogen RNA 418
Garegintan T. N. Definition of Content of Biomacromolecules in Supernatants of Suspension Treated with Erythrocytes Ultrasone 421
Nikoghosian V. G. Nitrogen-fixation Activity of Azotobacter in the Naked Grounds of the Lake Sevan 423

REVIEW AND DEBATE

Grigorian G. E., Stolberg A. M., Ayrapetyan S. N. On the Molecular Mechanisms of Learning and Memory 426

ABSTRACTS

Melkumian L. S., Torosian Ye. G. Analysis of Variability of Qualitative Signs of Pholidosis of Three Relative Species of Lizards of *Lacerta* Genus . . 435
Balasanian D. S., Kanayan L. R., Barkhudarian T. R. Dynamics of Mitotic Activity of Hepatocytes of Hen Embryo during the Feeding of Hens Egg—Layers with Amber Acid 436
Mistrian S. S. Seasonal Dynamics of Quantitative Changes of Watersoluble Proteins, Isolated from Various Organs of Sevan Whitefish 437
Badalian A. M. Change of Concentration of Sexual Hormones in the Cows Blood during Placental Retention 438
Adunts G. T., Astanian I. H., Surgisian L. V., Ter—Tadevosian L. P., Adunts G. G., Gasparian A. A. Activity of Phosphatases in Various Parts of Small Intestines 439
Avagian A. G., Stepanian T. G., Torosova Ye. O. Dynamics of Accumulation of Organic Acids in the Process of Formation and Development of Tomato Fruits 440

CRITICS AND BIBLIOGRAPHY

Afrikian E. G. Ценное руководство „Защита от коррозии старения и повреждений машин, оборудования и сооружений». Справочник в 2-х томах под ред. А. А. Герасименко. М., «Машиностроение». 1987, т. 1, 688 с., т. 2—784 с. 441

Հայկական ՍՍՀ գիտությունների ակադեմիա. Հայաստանի կենսաբանական հանդես
Академия наук Армянской ССР, Биологический журнал Армении
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Biological Journal of Armenia

т. 41, № 5, 1988

ՀՈԴՎԱԾՆԵՐ · СТАТЬИ

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 582.284

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ РОДАМИ ЭРИЗИФАЛЬНЫХ ГРИБОВ И НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ СИСТЕМАТИКИ ПОРЯДКА *ERYSIPHALES*

В. П. ГЕЛЮТА

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Обсуждаются филогенетические взаимосвязи между 20 телеоморфными родами эризифальных грибов. Предлагается новая система порядка *Erysiphales*. Он делится на три семейства (*Blumeriaceae*, *Erysiphaceae* и *Leveillulaceae*), четыре подсемейства (*Erysiphoideae*, *Golovinomycetoideae*, *Leveillutoideae* и *Phyllactinioideae*) и ряд родов. Секция *Golovinomyces* U. Braun возводится в ранг рода.

Քննարկվում են ֆիլոգենետիկական փոխադարձ կապերը էրիֆիլալ սնկերի 20 տելեոմորֆ սեռերի միջև. Առաջարկվում է Erysiphales կարգի նոր համակարգ. Այն բաժանվում է 3 ընտանիքների (Blumeriaceae, Erysiphaceae և Leveillulaceae), 4 ենթաընտանիքների (Erysiphoideae, Golovinomycetoideae, Leveillutoideae և Phyllactinioideae) և սերունդների չորքի. Golovinomyces U. Braun սեկցիան բարձրացվում է սեռի աստիճանի.

Phylogenetic connections among 21 teleomorphic genera of powdery mildew fungi are discussed. New system of the order *Erysiphales* is proposed. It divides into three families (*Blumeriaceae*, *Erysiphaceae* and *Leveillulaceae*), four subfamilies (*Erysiphoideae*, *Golovinomycetoideae*, *Leveillutoideae* and *Phyllactinioideae*) and several tribes. Section *Golovinomyces* U. Braun is raised to the rank of genus.

Эризифальные грибы—порядок Erysiphales—филогенетические взаимосвязи.

Исследованию филогенетических взаимосвязей таксонов порядка *Erysiphales* посвящен ряд работ, обзор которых дается в монографиях Ячевского [6], Брауна [17] и, частично, в одной из наших статей [3]. Все известные к началу 80-х годов филогенетические построения касались родов *Cystotheca* Berk. et Curt., *Erysiphe* DC.: Fr., *Leveillula* Arn., *Microsphaera* Lév., *Phyllactinia* Lév., *Podosphaera* Kunze, *Sphaerotheca* Lév., *Trichocladia* Neger, *Typhulochaeta* Ito et Hara, *Uncinula* Lév., и их анаморф. Однако в результате интенсивных критико-системати-

ческих исследований подтвержден статус и даны описания еще ряда новых родов, таких как *Arthrocladiella* Vass., *Blumeria* Gol. ex Speer., *Brasiliomyces* Vieg., *Bulbouncinula* Zheng et Chen, *Furcouncinula* Z. X. Chen, *Medusosphaera* Gol. et Gam., *Pleochaeta* Sacc. et Speg., *Queirozia* Vieg. et Card., *Sawadaia* Miyabe, *Uncinuliella* Zheng et Chen и *Xenomyxa* Syd. Большинство из них не учтено в упоминаемых схемах филогенетических взаимосвязей таксонов эризифальных грибов, в связи с чем возникла необходимость пересмотра этих построений.

Первая схема (рис. 1), в которой учитываются филогенетические связи почти всех приведенных выше родов, за исключением *Furcouncinula*, *Queirozia* и *Xenomyxa*, создана Брауном [14, 17]. Однако в

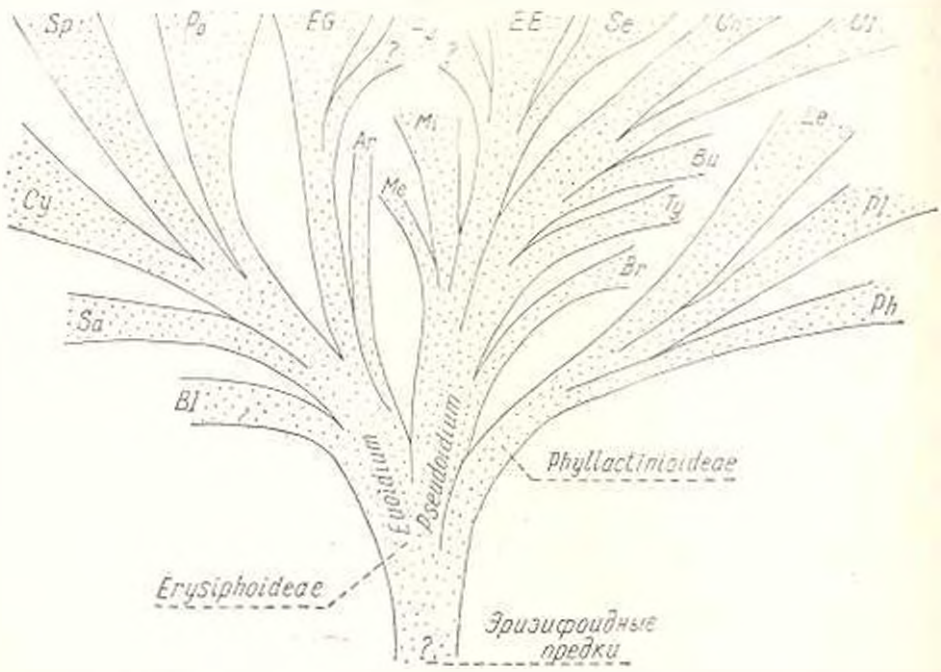


Рис. 1. Схема филогенетических взаимосвязей между родами порядка *Erysiphales* по представлениям Брауна [17] (здесь и на рис. 2: Ar—*Arthrocladiella*, Bl—*Blumeria*, Br—*Brasiliomyces*, Bu—*Bulbouncinula*, Cy—*Cystotheca*, E—*Erysiphe* s. str., EE—*Erysiphe* sect. *Erysiphe*, EG—*Erysiphe* sect. *Golovinomyces*, Eg—*Erysiphe* sect. *Galeopsidis*, Fu—*Furcouncinula*, Go—*Golovinomyces*, Le—*Leveillula*, Me—*Medusosphaera*, Mi—*Microsphaera*, Ph—*Phyllactinia*, Pl—*Pleochaeta*, Po—*Podosphaera*, Qu—*Queirozia*, Sa—*Sawadaia*, Se—*Setoerysiphe*, Sp—*Sphaerotheca*, Ty—*Typhulochaeta*, Ul—*Uncinuliella*, Un—*Uncinula*, Xe—*Xenomyxa*)

ней имеются отдельные положения, с которыми мы не можем согласиться. На рис. 2 представлена филогенетическая схема порядка *Erysiphales*, которая отвечает нашим взглядам на эволюцию эризифальных грибов. Объем порядка мы принимаем в понимании Женг [20], поэтому в нашу схему дополнительно включены роды *Furcouncinula*, *Queirozia* и *Xenomyxa*, которые не учитываются У. Брауном.

Как видно из рис. 1 и 2, по ряду позиций схемы У. Брауна и наша совпадают, в частности, выделение в отдельные ветви рода *Blumeria*

и группы родов (*Leveillula*, *Pleochaeta*, *Phyllactinia* и *Queirozia*) с анаморфами типа *Ovulariopsis* и *Oidiopsis*. Однако на основании особенностей анаморфы, круга питающих растений (почти все—травянистые растения) и экологии род *Leveillula* мы рассматриваем несколько в стороне от остальных родов этой группы.

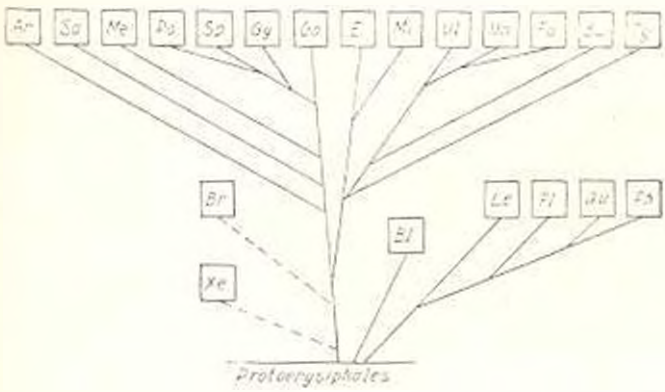


Рис. 2. Филогенетические связи между родами *Erysiphales* (по представлениям автора).

Род *Blumeria* в значительной степени отличается от всех родов *Erysiphales*. Он имеет специфическую анаморфу (конидиеносец с бульбовидным утолщением в основании), длиневидно разветвленные гаустории, серповидные неокрашенные сеты, особое анатомическое строение плодового тела [19]. Однако основное отличие заключается в круге питающих растений: *Blumeria graminis* (DC.) Speer — единственный представитель этого рода—паразитирует только на злаках, остальные виды *Erysiphales*—паразиты растений других порядков, почти исключительно двудольных. Приведенный комплекс отличий позволяет нам [2] и Брауну [14] рассматривать данный род как отделившийся от остальных таксонов порядка *Erysiphales* еще на ранних этапах филогенеза, в связи с чем его следует выделить в отдельное семейство *Blumeriaceae* [2]. Аналогично в отдельное семейство *Leveillulaceae* необходимо также выделить и группу родов с полуэндофитным мицелием и со специфичными анаморфами типа *Ovulariopsis* и *Oidiopsis*, рассматривая при этом роды *Phyllactinia*, *Pleochaeta* и *Queirozia* в подсемействе *Phyllactinioideae*.

Наиболее сложные взаимосвязи наблюдаются в третьей эволюционной ветви развития эризифальных грибов (семейство *Erysiphaceae* s. *str.*). Для представителей большинства родов, включенных в это семейство, характерны анаморфы типа *Oidium* s. l.[1]. Однако этот тип, на наш взгляд, не является однородным, на что обращали внимание Ячевский [6], Головин [4], Блюмер [7] и др. Первый из указанных авторов предложил разделить род *Oidium* на *Euoidium* (конидии образуются в цепочках) и *Pseudoidium* (конидии одиночные на конидиеносцах). Мы

[1] У некоторых видов и родов анаморф не обнаружены.

полностью присоединяемся к этому мнению в связи с чем признаем недавно описанный [18] новый род *Pseudoidium*.

Заслуживает внимания предложение Головина [4] разделить род *Erysiphe* на два по типу анаморфы его представителей. К сожалению, оно не было реализовано автором с учетом правил «Международного кодекса ботанической номенклатуры», в результате чего название нового рода *Linkomyces* Gol. не стало законным. Лишь в 1978 г. Брауном [12] род *Erysiphe* был разделен на 3 секции, из которых секция *Erysiphe* полностью соответствует роду *Linkomyces* П. Н. Головина. Сравнительный анализ данных по морфологии телеоморфы также свидетельствует, что данный род должен быть разделен на два, и связи с чем секцию *Golovinomyces* U. Braun мы возводим в ранг рода.

Итак, семейство *Erysiphaceae* s. str. делится на две большие группы (рис. 2), первая из которых содержит роды с анаморфой типа *Oidium* (*Arthrocladiella*, *Erasiella*, *Cystotheca*, *Golovinomyce*, *Medusosphaera*, *Podosphaera*, *Sawadaia* и *Sphaerotheca*), вторая — типа *Pseudoidium* (*Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* и *Uncinuliella*).К последней группе мы относим также роды *Bulbouncinula* и *Furcouncinula* анаморфы которых неизвестны, но по морфологии телеоморф они очень близки к роду *Uncinula*. К ней же, очевидно, принадлежит и род *Typhulochaeta* (анаморфа также не известна). Следует отметить, что для отдельных видов родов *Microsphaera*, *Uncinula* и одного вида, *Uncinuliella* в литературе иногда отмечаются анаморфы типа *Oidium* s. str. [20]. Однако анализ работ [8—9, 11, 13, 15—16], специально посвященных изучению анаморф эризифальных грибов, свидетельствует об ошибочности таких сведений.

Исходя из сказанного, семейство *Erysiphaceae* s. str. мы делим на два подсемейства — *Erysiphoideae* и *Golovinomycetoideae*.

В подсемействе *Erysiphoideae* филогенетические связи между родами более или менее ясны. Так, для родов *Erysiphe* и *Microsphaera* известно довольно много промежуточных видов, таких как *Microphaera* (*Erysiphe*) *tortilis*, *E.* (*M.*) *trifolii*, *M.* (*E.*) *alhagi* и др., о таксономической принадлежности которых до сих пор нет единого мнения. Как уже сообщалось [1], переход между этими родами хорошо прослеживается на примере паразитов бобовых, где можно наблюдать как типичные виды *Erysiphe* и *Microsphaera*, так и серию промежуточных между ними таксонов.

Несколько в стороне от *Erysiphe* и *Microsphaera* находится группа родов со спирально загнутыми на концах придатками (*Bulbouncinula*, *Furcouncinula*, *Uncinula*, *Uncinuliella*). К ней же, очевидно относится и *Typhulochaeta*. Учитывая их обособленность, предлагаем выделить эти роды в самостоятельное колено *Uncinuleae*. Как считает Браун [14], они связаны с *Erysiphe*, о чем свидетельствует наличие таких промежуточных видов, как *E. abeliae* Zheng et Chen и *U. paradoxa* Sim.

Наиболее сложны, на наш взгляд, взаимосвязи в подсемействе *Golovinomycetoideae*, так как здесь имеется ряд родов, между которыми пока не известны переходные виды. Это, в первую очередь, роды

Arthrocladiella, *Sawadaia* и *Medusosphaera*. Единственный вид первого из них, *A. mougeotii* (Lév.) Vass., ранее включали [5, 7, 12, 18 и др.], а некоторые авторы и сейчас включают в род *Microsphaera*. Однако результаты подробного исследования этого таксона, особенно его анаморфы [8, 10, 13], подтвердили правомерность выделения данного вида из рода *Microsphaera*, но Безевинкель [10] отнес его (на наш взгляд, совершенно необоснованно) в род *Erysiphes*. I. Придатки *M. mougeotii*, хотя и многократно дихотомически ветвятся по своему строению не соответствуют ни роду *Microsphaera*, ни роду *Erysiphe*. Все это подтверждает правильность выделения этого вида в отдельный род.

Виды рода *Sawadaia* длительное время относили к роду *Uncinula* из-за спирально закрученных окончаний придатков. Однако они имеют специфическую анаморфу типа *Oidium* s. str. Кроме того, для большинства придатков плодовых тел характерно 1—2-кратное дихотомическое ветвление, что также не характерно для рода *Uncinula*. В связи с этим мы полностью разделяем точку зрения [2, 14, 20, 21] о самостоятельности данного рода.

Род *Medusosphaera* Браун [14, 17] считает производным от *Microsphaera*, не объясняя при этом своих взглядов. Очевидно, такой вывод основан на некоторой общности в строении придатков представителей этих родов. Однако при более внимательном изучении окончания придатков можно сделать вывод, что эти образования идентичны у родов *Medusosphaera* и *Podosphaera* и не соответствуют таковым рода *Microsphaera*. Кроме того, род *Medusosphaera* (как и *Podosphaera*), по данным Лисы [20], имеет анаморфу типа *Oidium*, *Microsphaera* же — типа *Pseudoidium*. В связи с этим род *Medusosphaera* должен рассматриваться в качестве производного от предков типа *Golovinomyces*.

Более тесную группу представляют остальные роды подсемейства *Golovinomycetoideae* — *Cystotheca*, *Golovinomyces*, *Podosphaera* и *Sphaerotheca*. Вопрос о филогенетических взаимосвязях в этой группе (кроме рода *Cystotheca*) был подробно рассмотрен нами [3] ранее. В указанной работе мы делаем вывод о близком родстве представителей родов *Podosphaera* и *Sphaerotheca*, происходящих от общих предков. Довольно близки также роды *Golovinomyces* и *Sphaerotheca*, главное отличие между которыми заключается только в числе асков. Наличие одного аска у последнего из них можно объяснить только редукцией аскогенной гифы у его предков типа *Golovinomyces*. Род *Cystotheca* почти идентичен роду *Sphaerotheca*, но у первого из них имеется двойной расслаивающийся перидий, в то время как у рода *Sphaerotheca* он не расслаивается.

Подводя итог сказанному о подсемействе *Golovinomycetoideae*, отметим, что роды *Cystotheca*, *Golovinomyces*, *Podosphaera* и *Sphaerotheca* представляют собой отдельную группу близкородственных таксонов, которой мы придаем ранг колена. Остальные роды (*Arthrocladiella*, *Sawadaia* и *Medusosphaera*) являются, очевидно, осколками эволюционного процесса, направленного в сторону развития от примитивных

представителей типа *Golovinomyces cichoraceorum*: —паразитов травянистых растений к более специализированным (в широком смысле) паразитам древесных пород с высокодифференцированными от мицелия придатками. Ввиду отсутствия каких-либо промежуточных между этими родами видов каждый из них необходимо рассматривать в отдельном колене.

Особый интерес в филогенетическом плане представляет род *Brasiliomyces*. Он близок к *Golovinomyces*, но имеет очень примитивное плодовое тело с однослойным перидием и анаморфу типа *Oidium* s. str. Судя по кругу хозяев, среди которых имеются и относительно примитивные древесные породы, его, очевидно, нельзя рассматривать в качестве непосредственного производного от *Golovinomyces*. По всей вероятности, это еще один осколок эволюционного процесса в подсемействе *Golovinomycetoideae*, который в систематическом плане должен относиться к колену *Golovinomyceteae*.

Наиболее примитивным является род *Xenotuxa*, принадлежность которого к порядку *Erysiphales* пока окончательно не решена [20]. Однако по большинству признаков он соответствует этой группе, хотя и имеются некоторые отличительные признаки—паразитирование на папоротниках, расплывающиеся плодовые тела после созревания, наличие асков различной степени зрелости в одном и том же плодовом теле, наличие слизистого слоя вокруг сумок. Ввиду отсутствия сведений об анаморфах этого рода и дискуссионности тезисов о его принадлежности к порядку *Erysiphales* пока рано делать какие-либо выводы о его филогенетических связях, однако можно предположить, что род *Xenotuxa*—реликтовый таксон, близкий к примитивным предкам эризифальных грибов.

Учитывая все сказанное выше, предлагаем следующую систему порядка *Erysiphales*.

Порядок Erysiphales

Семейство *Blumeriaceae* Gel. fam. nov.

Descriptio. Mycelium superficiale, cum setis falcatis. Anamorpha typi Oidium (conidia catenulata), sed conidiophora basi bulbosa. Haustoria cum processibus digitiformibus. Cleistothecia hypocrateriformia.

Genus typicus: *Blumeria* Gel. ex Speer. Sydowia 27: 2 (1974).

Семейство *Erysiphaceae* Lév. emend. Gel. emend. nov.

Подсемейство *Erysiphoideae*

Колено *Erysipheae* (роды *Erysiphe* DC.: Fr. emend. Gel. emend. nov., *Microsphaera* Lév).

Колено *Uncinuleae* Gel. trib. nov. (роды *Bulbouncinula* Zheng et Chen, *Furcouncinula* Z. X. Chen , *Typhulochaeta* Ito et Hara, *Uncinula* Lév., *Uncinuliella* Zheng et Chen).

Descriptio. Mycelium superficiale. Anamorpha typi Pseudoidium (conidia solitaria). Cleistothecia semiglobosa. Appendices simplices, apiculi appendicum flexi vel spiraliter contorti.

Genus typicus: *Uncinula* Lév. Ann. Sci. Nat. ser. 3. Bot. *15*: 151 (1851).

Подсемейство *Golovinomycetoideae* Gel. subfam. nov.

Descriptio. Mycelium superficiale. Anamorpha typi Oidium (conidia catenulata). Haustoria globosa. Cleistothecia globosa, semiglobosa vel impressa.

Genus typicus: *Golovinomyces* (U. Braun) Gel. comb. et stat. nov.— Bas.: *Erysiphe* sect. *Golovinomyces* U. Braun, Fedd. Repert. *89* (9—10): 659 (1978).

Колено *Arthrocladielleae* Gel. trib. nov.

Descriptio. Cleistothecia cum appendicibus verticillate vel dichotome ramificantibus.

Genus typicus: *Arthrocladiella* Vass. Бот. журн. *45*: 1369 (1960).

Колено *Golovinomyceteae* (роды *Brasiliomyces* Vieg., *Cystotheca* Berk. et Curt., *Golovinomyces* (U. Braun) Gel., *Podosphaera* Kunze, *Sphaerotheca* Lév.).

Колено *Medusosphaereae* Gel. trib. nov.

Descriptio. Cleistothecia cum appendicibus angulato-flexuosis, apice dichotome ramificantibus et cum appendicibus virgatis.

Genus typicus: *Medusosphaera* Gel. et Gam. Бот. матер. отд. спор. раст. инст. АН СССР *15*: 92 (1962).

Колено *Sawadaieae* Gel. trib. nov.

Descriptio. Cleistothecia cum appendicibus 1—2 dichotome ramificantibus, apice spiraliter contortis.

Genus typicus: *Sawadaia* Miyabe in Sawada, Agric. Exp. Stat. Formosa, Spec. Bull. *9*: 49 (1914).

Семейство *Leveillulaceae* Gel. fam. nov.

Descriptio. Mycelium hemiendophyticum. Anamorpha typi Oidiopsis et Ovulariopsis (incl. Streptopodium). Cleistothecia hypocrateriformia, depressa et turbinata.

Genus typicus: *Leveillula* Arn. Ann. Epiphyt. *7*: 94 (1921).

Подсемейство *Leveilluloideae* (род *Leveillula*)

Подсемейство *Phyllactinioideae* Palla (роды *Phyllactinia* Lév., *Pleochaeta* Sacc. et Speg., *Queirozia* Vieg. et Card.).

Анаморфные роды

Oidiopsis Scalia

Oidium Link in Willd.

Ovulariopsis Pat. et Har. (incl. Streptopodium Zheng et Chen).

Pseudoidium Paul et Kap.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гелюта В. П.* В кн.: Мат-лы V конф. по низшим растениям Закавказья, сентябрь, 1979 г., Баку, 1979.
2. *Гелюта В. П.* Автореф. канд. дисс., Киев, 1980.
3. *Гелюта В. П.* В кн.: Новости систематики высш. и низш. растений. 1979, Киев, 200—209, 1981.

4. *Головин П. Н.* Бюлл. Среднеаз. гос. ун-та. 25, 109—125, 1947.
5. *Симонян С. А.* Микофлора ботанических садов и дендропарков Армянской ССР. 234. Ереван, 1981.
6. *Ячевский А. А.* Карманный определитель грибов. 2, 626. Л., 1927.
7. *Blumer S.* Echte Mehltaupilze (Erysiphaceae). Ein Bestimmungsbuch fur die in Europa vorkommenden Arten., 136, Jena, 1967.
8. *Boesewinkel H. J.* Rev. Mycol., *4*, 493—507, 1977.
9. *Boesewinkel H. J.* Sydowia, *32*, 1—6, 13—56, 1979.
10. *Boesewinkel H. J.* Cryptogamie. Mycol., *1*, 105—110, 1980a.
11. *Boesewinkel H. J.* Bot. Rev., *46*, 2, 167—220, 1980b.
12. *Braun U.* Feddes Repertorium, *88*, 9—10, 655—665, 1978.
13. *Braun U.* Flora, *170*, 77—90, 1980.
14. *Braun U.* Nova Hedwigia, *34*, 679—719, 1981.
15. *Braun U.* Zbl. Microbiol., *137*, 138—142, 1982.
16. *Braun U.* Zbl. Mikrobiol., *137*, 314—324, 1982.
17. *Braun U.* A monograph of the Erysiphales (Powdery mildews), 700, Berlin—Stuttgart, 1987.
18. *Paul Y. S., Kapoor J. N.* Indian phytopathology, *38*, 4, 761—763, 1985.
19. *Speer E. O.* Sydowia, *27*, 1—8, 1975.
20. *Zheng R.—y.* Mycosystema, *22*, 2, 203—263, 1985.
21. *Zheng R.—y., Chen C.—q.* Acta Microbiol. Sinica, *20*, 1, 37—44, 1980.

Поступило 1.IX 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 635.21:631.82:581.132:539.06

ЗАВИСИМОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ДОЗЫ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ

А. Б. АВАКЯН, К. В. СТЕПАНЯН

НИИ земледелия Госагропрома Армянской ССР, г. Эчмиадзин

У растений удобренных вариантов максимальная интенсивность замедленной флюоресценции хлорофилла листьев была в основном выше, а время полуспада этой величины — меньше, чем у листьев неудобренных растений. Предполагается, что кинетика спада индукционной кривой послесвечения отражает изменение эффективности сопряжения между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза листьев. Отмечено, что величина обоих параметров замедленной флюоресценции зависит от уровня азотного метаболизма в онтогенезе растений.

Վարարտադված բույսերի մոտ տերևների [illegible] պահպոլծված լուսարձակման մաքսիմալ ինտենսիվությունը հիմնականում ավելի բարձր է, իսկ այդ մեծության կիսատնկման ժամանակը ավելի պակաս է չպարարտացված բույսերի համեմատ. Ցույց է տրված, որ ԴՂՀ ինդուկցիոն կորի անկումը համապատասխանում է ֆոտոսինթեզի լույսային և մթնային ռեակցիաների փոխազդեցության էֆեկտիվությունը նվազ է, որ բույսերի զարգացման ընթացքում ԴՂՀ երկու պարամետրերի մեծությունը կախված է ազոտական մետաբոլիզմի մակարդակից։

Сокращения: ЗФХ—замедленная флюоресценция хлорофилла, I—максимальная интенсивность ЗФХ, τ—время полуспада I, ρ—коэффициент корреляции, R—множественный коэффициент корреляции, Д—коэффициент детерминации, В—водообеспеченность листьев, У—продуктивность растений, индексы п и л—соответственно содержание элемента в почве или листьях.

Maximal intensity from delayed fluorescence of leaves chlorophyll from fertilized variants of plants was radically more, whereas the halftime decay of DF was less than from leaves of non-fertilized plants. It was supposed that the kinetics decay of induction curve of DF reflected the change of efficiency of relationship between light and shady reactions of leaves photosynthesis. The values of both parameters of delayed fluorescence depended on the level of nitrate metabolism in the plants ontogenesis.

Растение картофеля—замедленная флюоресценция хлорофилла—минеральные удобрения—азотный метаболизм.

В настоящее время известна зависимость между эффективностью воздействия минеральных удобрений и влагообеспеченностью почвы на повышение продуктивности растений и их фотосинтеза [7, 9, 12]. При оптимальных режимах влажности почвы улучшается усвоение питательных элементов корневой системой и повышается их содержание в листьях [7, 18]. Однако эта взаимосвязь практически не изучена на уровне первичных реакций фотосинтеза у растений, выращиваемых в полевых условиях. Информативным в этом плане может явиться ЗФХ листьев, которая представляет собою непроизводительную трату поглощенной световой энергии при обращении первичных реакций фотосинтеза и обусловлена в основном функционированием фотосистемы 2 [10, 16]. Показано, что величина параметров этого свечения зависит от концентрации ионов в водной среде инкубирования изолированных хлоропластов [5] и в вегетационных сосудах с почвой (при различных уровнях азотного питания) [2]. В этой связи представляет также определенный интерес изучение с использованием метода ЗФХ влияния различных доз минеральных удобрений на фотосинтез растений, выращиваемых в полевых условиях.

Материал и методика. Объектом исследования служили растения картофеля сорта Пирмунес, выращиваемые в условиях сухого жаркого климата Араратской равнины. Полевые опыты закладывали на лугово-бурых старопорошаемых тяжелосуглинистых почвах в 4-кратной повторности (учетная делянка 50 м²). Часть азотного N_{60} (количество действующего вещества в кг/га) и полную дозу фосфорного и калийного удобрений вносили в почву перед посадкой клубней. В фазе бутонизации растения подкармливали азотом в дозе N_{60}. В качестве контрольных использовали растения с неудобряемого варианта.

Наблюдения вели с фазы цветения растений (с 15 июля), так как именно с этого срока начинаются процессы клубнеобразования [8]. Среднесуточная температура воздуха в дни исследований в среднем составляла 26,0°, а средняя максимальная температура воздуха—33,6°. Колебания температуры воздуха по различным дням исследований были незначительны. Растения в период наблюдений поливали только 2 раза, и до сбора урожая почву практически не увлажняли.

Влажность почвы (в слое 0—20 см) и листьев определяли стандартным весовым методом путем их подсушивания соответственно при 105 и 80°. Состав минеральных элементов определяли в 3-кратной повторности в воздушно-сухой навеске листьев по методу Гинзбург-Щегловой, а в образцах абсолютно сухой почвы—по методам Мачиговой (K_2O) и Арриниуса (P_2O_5).

Регистрацию ЗФХ непарных долей листьев, отчлененных по одному от 50 растений каждого варианта, проводили в утренние часы на однодисковом фосфороскопе (время между возбуждением и измерением свечения составляло 7 мсек) с одной и той же площади по центру долей. Свечение возбуждали светом лампы КГМ-200 через водный тепловой и красный светофильтр КС-14. Отчлененные от растений доли листьев перед измерением ЗФХ инкубировали в темноте в течение 2 часов.

Статистический анализ выполняли стандартными методами. Коэффициент вариации параметров ЗФХ в каждой повторности каждого варианта изменялся в пределах 3—5%.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлена характерная индукционная кривая ЗФХ листьев. Исследуемым параметром являлась величина I, обусловленная значением электрохимического градиента на мембранах хлоропластов [5, 16], которая в онтогенезе расте-

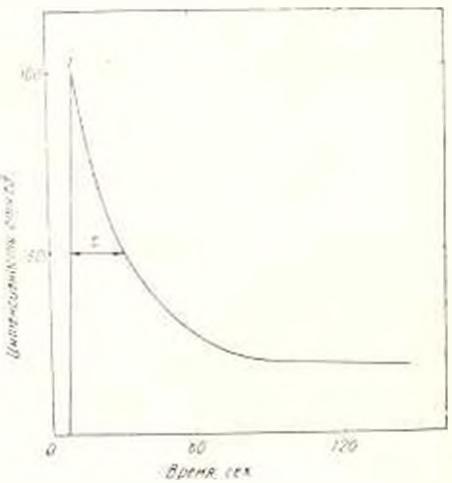


Рис. 1.

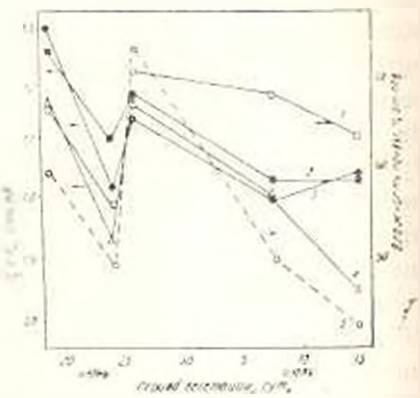


Рис. 2.

Рис. 1. Индукционная кривая замедленной флюоресценции листа картофеля.

Рис. 2. Кинетика изменения отношений максимальных интенсивностей замедленной флюоресценции хлорофилла листьев картофеля удобренных (I_0) и неудобренного контрольного ($I_к$) вариантов, а также влажности почвы (кр. 5) в течение вегетации. Дозы внесенных в почву минеральных удобрений у растений опытных вариантов составляли: 1 — $N_{150}P_{90}K_{45}$; 2 — $N_{150}P_{150}K_{45}$; 3 — $N_{150}P_{150}K_{75}$; 4 — $N_{150}P_{150}K_{45}$.

лий может зависеть от концентрации активных центров фотосистемы 2 в расчете на единицу площади листа [2]. Определяли также время полуспада I—τ, которое, как предполагается, у листьев коррелирует с активностью реакций темнового восстановления CO_2 [10].

Ранее было показано, что абсолютная величина этих параметров ЗФХ в течение вегетации растений в основном зависит от колебаний температуры воздуха [1]. Поэтому для выявления непосредственного влияния минеральных удобрений на свечение при различных влажностях почвы использовали также величины отношений исследуемых параметров ЗФХ у опытных (удобренных) и контрольных растений ($I_0/I_к$, $\tau_0/\tau_к$).

Величина $I_0/I_к$ в период исследований претерпевала сложные изменения, которые в определенной степени соответствовали колебаниям влажности почвы (рис. 2). Уменьшение водообеспеченности почвы приводило к достоверному понижению уровня ЗФХ и увеличению I листьев опытных вариантов. У контрольных растений уровень свечения в течение вегетации был в основном ниже, а величина τ больше, чем у листьев

удобренных вариантов (рис. 2, табл. 1). Растения опытных вариантов имели более высокую продуктивность, и их листья характеризовались более низкой водообеспеченностью по сравнению с контрольными растениями (табл. 1). В период исследований средние значения абсолют-

Таблица 1. Зависимость времен полуспада максимальной интенсивности замедленной флюоресценции листьев опытных и контрольных растений ($\tau_0/\tau_к$), влажности листьев и продуктивности растений от дозы внесенных минеральных удобрений

Варианты	$\tau_0/\tau_к$ отн. ед.			Влажность, %	Продуктивность, ц/га
	19 июня	26 июня	15 июля		
Контроль	1.000	1.000	1.000	83.7	256.3
$N_{150}P_{90}K_{45}$	1.007	0.914	0.889	79.6	316.9
$N_{150}P_{120}K_{90}$	0.871	9.967	0.920	81.0	305.3
$N_{150}P_{150}K_{75}$	0.819	0.989	0.861	81.5	339.8
$N_{150}P_{120}K_{45}$	0.978	0.920	1.128	79.9	294.7

В качестве контроля служили растения, выращиваемые на неудобренной почве.

Таблица 2. Содержание минеральных элементов в листьях и почве в фазе отмирания растений в зависимости от дозы внесенных удобрений

Варианты	Концентрация в листьях, %			Концентрация в почве, мг на 100 г почвы	
	N	P	K	P	K
Контроль	0.28	0.28	5.7	67.4	108.2
$N_{150}P_{90}K_{45}$	0.28	0.30	5.9	69.2	112.3
$N_{150}P_{120}K_{90}$	0.34	0.25	5.6	65.6	110.2
$N_{150}P_{150}K_{75}$	0.28	0.30	6.2	68.0	113.4
$N_{150}P_{120}K_{45}$	0.84	0.25	5.4	69.4	106.1

Контрольные растения выращивали на неудобренной почве.

ных величин I и τ листьев в определенной степени коррелировали с их продуктивностью ($Д_{15} = 67{,}4\%$; $Д_{26} = 71{,}5\%$). Между средними абсолютными значениями I и τ по дням совместных измерений отмечали наличие достоверного соответствия ($\rho_{st} = -0{,}918$) (критическая величина ρ по 5 повторностям на 5%-ном уровне значимости равна 0,878). Так как достоверные различия в уровне ЗФХ листьев опытных вариантов в основном регистрировали при уменьшении влажности почвы, то в целях определения компонентов удобрений, приводящих к появлению указанной зависимости, было рассмотрено наличие соответствия между содержанием минеральных элементов в почве и листьях (табл. 2) и значениями параметров свечения растений в условиях пониженной водообеспеченности почвы (15.07).

Содержание азотных соединений не имело достоверной линейной зависимости от количества в листьях соединений калия ($\rho_{N,K} = -0{,}706$) и фосфора ($\rho_{N,P} = -0{,}555$), однако между концентрациями

$K_л$ и $P_л$ такое соответствие имелось ($r_{P_л P_п} = 0{,}888$). Количество $K_л$ было достоверно обусловлено содержанием этого элемента в почве ($r_{K_л K_п} = 0{,}910$), но концентрация $P_л$ мало зависела от аналогичного показателя в почве ($r_{P_л P_п} = 0{,}339$). Как известно, уменьшение зависимости содержания минеральных элементов в растениях с увеличением их концентрации в питательном субстрате наблюдается при применении повышенных доз [6, 7]. В то же время известно, что дозы $P_{120-150}$ являются повышенными для растений картофеля [12]. Показано также, что в условиях нарастающего водного дефицита начальные компоненты и первичные продукты азотного метаболизма не используются в дальнейших превращениях, а накапливаются в тканях (при этом уменьшается концентрация структурных белков) [4]. Это обстоятельство должно неблагоприятно влиять на активность фотосинтетических процессов [3]. Поэтому различия в уровнях азотного метаболизма и параметров ЗФХ листьев по вариантам могут быть в определенной степени связаны с использованием в эксперименте повышенных доз $P_п$, которые, как известно, усиливают отрицательные последствия недостатка влаги [8]. При этих дозах наблюдается уменьшение засухоустойчивости растений [11, 12], предположительно связанное со снижением содержания свободной воды в листьях [12, 13], что, по-видимому, и приводит к ускорению отмирания растений [12]. Этим объясняют уменьшение продуктивности картофеля при использовании повышенных доз фосфорных удобрений [12].

Проведенный анализ показал, что между уровнем водообеспеченности листьев и содержанием $P_п$ и $K_п$ имелась слабая связь, которая, однако, была больше в первом случае ($r_{P_п в} = -0{,}518$; $r_{K_п в} = 0{,}053$), чем, возможно, обусловлена и сила связи $N_л$ с В ($r_{N_л в} = -0{,}602$). Действительно, содержание общего азота в растениях по вариантам определялось содержанием фосфора в листьях и почве ($R_{N_л (P_л P_п)} = 0{,}974$), причем изолированное увеличение $P_л$ сопровождалось достоверным уменьшением $N_л$, а $P_п$ — возрастанием $N_л$ ($r_{N_л P_л (P_п)} = -0{,}968$; $r_{N_л P_п (P_л)} = 0{,}955$). Отсутствие линейной связи между $P_л$ и $P_п$ и ее наличие между $P_л$ и $K_л$ позволили предположить, что именно концентрация последнего элемента может оказывать существенное влияние на содержание $N_л$. Однако между концентрацией $K_л$ и уровнем $N_л$ не имелось достоверной линейной связи даже при элиминации воздействия $P_л$ ($r_{N_л K_л (P_л)} = -0{,}818$), хотя и в этом случае сохранялась линейность соответствия между количествами $P_л$ и $K_л$ ($r_{P_л K_л (P_п)} = 0{,}929$). Отсутствие достоверной линейной связи между $N_л$ и $K_л$, по-видимому, может быть обусловлено только определенным положительным воздействием $K_л$ на увеличение содержания азотных соединений. Действительно, известно, что при увеличении $K_п$ происходит активация темновых реакций фотосинтеза [17], повышение эффективности фотофосфорилирования [3, 10, 14] и уровня флоэмного транспорта [9], что в конечном итоге приводит к оптимизации азотного метаболизма [3]. С другой стороны, увеличение исходного $K_п$, кроме увеличения $K_л$, может приводить и к определенному избыточному повышению

концентрации минерального азота в растениях [15]. Следовательно, содержание $K_п$ должно в большей степени определять влияние калия на общий уровень азотного метаболизма растений ($\rho_{N_л K_п} = -0{,}754$). Отсутствие достоверной линейной связи в последнем случае, по-видимому, связано с различиями в уровне оводненности листьев вариантов ($\rho^{N_л K_п}_{(B)} = -0{,}906$). Они в действительности, вероятно, не связаны только с влиянием через содержание $K_п$ ($\rho_{N_л K_п (B)} = -0{,}718$). В то же время зависимость влажности листьев вариантов от концентрации $P_п$ не имела линейного характера даже при исключении благоприятного воздействия $P_л$ через оптимизацию метаболизма растений ($\rho_{P_п B (P_л)} = -0{,}653$). Поэтому возможно, что увеличение содержания $P_п$, с одной стороны, индуцируя повышение общего $P_л$, приводит к увеличению концентрации макроэргических соединений, а с другой — через уменьшение влажности листьев вызывает снижение эффективности фотофосфорилирования.

В этот же срок (15.07) значения I вариантов достоверно коррелировали с величинами $N_л$ и τ ($\rho_{IN_л} = -0{,}935$; $\rho_{I\tau} = -0{,}928$), и отмечалось определенное соответствие между значениями τ и $N_л$ ($\rho_{\tau N_л} = 0{,}872$). Это свидетельствовало о том, что интенсивность ЗФХ в основном определяется уровнем азотного метаболизма, очевидно, оказывающим также значительное влияние на величину τ ($Д_{\tau N_л} = 76{,}0\%$), чем, вероятно, обусловлена сила связи между I и τ. С другой стороны, отсутствие достоверной связи между τ и $N_л$, вероятно, указывает на наличие и других факторов, определяющих значения первой величины.

Значения $K_л$ вариантов, не находясь в достоверной связи с величинами $N_л$, не приводили и к достоверным изменениям уровня ЗФХ ($\rho_{IK_л} = 0{,}707$; $\rho_{IK_л (P_п)} = 0{,}755$), однако при элиминации влияния $P_п$ между значениями $K_л$ и величинами τ обнаруживалась достоверная зависимость ($\rho_{\tau K_л} = -0{,}838$; $\rho_{\tau K_л (P_л)} = -0{,}903$). Необходимо отметить, что увеличение $K_л$ (при элиминации его воздействия на азотный метаболизм через повышение $P_л$) не приводило к достоверным изменениям τ ($\rho_{N_л K_л (P_л)} = -0{,}347$; $\rho_{\tau N_л (P_л)} = -0{,}738$), что подтверждает обусловленность τ от уровня азотного метаболизма.

Содержание же $P_л$ оказывало существенное влияние на интенсивность ЗФХ только в условиях достоверного воздействия на $N_л$ ($\rho_{IP_л} = 0{,}690$, $\rho_{IP_л (P_п)} = 0{,}878$), однако изменения τ даже при элиминации влияния $P_п$ недостоверно коррелировали со значениями $P_л$ ($\rho_{\tau P_л} = -0{,}656$; $\rho_{\tau P_л (P_п)} = -0{,}868$). Это свидетельствует о том, что величины I в условиях пониженной водообеспеченности в основном были обусловлены уровнем синтеза структурных белков, коррелирующего, вероятно, с увеличением $P_л$, а значения τ в большей степени, но не полностью зависели от уровня этого процесса.

Выше уже было отмечено, что значения $K_п$ в большей мере, чем $K_л$, позволяют рассматривать воздействие калийного удобрения в целом на азотный метаболизм растений в условиях низкой влажности почвы. Однако между величинами I и $K_п$ не отмечалось достоверной линейной связи ($\rho^{I}_{K_п} = 0{,}852$), хотя и изменения τ в этом случае бы-

ли уже автономными ($r_{\tau K_n} = -0,966$). Учитывая отмеченную выше недостоверную связь между τ и K_n, следует заключить, что уменьшение τ при увеличении K_n было связано также с индуцируемым калийным удобрением, повышением содержания начальных компонентов азотного метаболизма в листьях ($r_{K_n (P_n)} = -0,951$). В то же время элиминация влияния P_n позволила заключить, что значения τ в этом случае не были полностью обусловлены причинами, обусловливающими увеличение I ($r_{\tau (P_n)} = 0,871$), что исключало возможную зависимость τ от воздействия ионов K^+ непосредственно на величину электрохимического градиента ($r_{IK_n (P_n)} = 0,284$). Однако различия в I между вариантами были в целом обусловлены уровнем азотного обмена и величиной τ ($R_{I(\tau N_n)} = 0,963$). Следовательно, отсутствие достоверной линейной корреляции I с K_n при элиминации уровня влажности листьев ($r_{IK_n (W)} = 0,876$) и сохранение зависимости этого параметра ЗФХ от содержания N_n ($r_{IN_n (W)} = -0,997$) обусловлены влиянием K_n на величину τ.

Элиминация влияния влажности листьев приводила также к увеличению силы связи между τ и N_n ($r_{\tau N_n (W)} = 0,968$). Однако корреляция параметров ЗФХ с содержанием P_n при этом была недостоверной ($r_{IP_n (W)} = 0,669$; $r_{\tau P_n} = -0,610$), что, очевидно, является результатом исключения лимитирующего влияния влажности на уровень азотного метаболизма ($r_{N_n P_n (W)} = -0,663$), который при данном условии, вероятно, определяется только влиянием K_n на уровень первичного метаболизма азота. Действительно, если исключить также воздействие P_n на концентрацию P_n, то становится очевидно, что количество последнего в листьях полностью определяется влиянием K_n на уровень азотного метаболизма ($r_{N_n P_n (P_n W)} = -0,953$). Наличие в этом случае достоверных корреляций параметров ЗФХ с концентрацией P_n свидетельствует о том, что содержание последнего в листьях коррелирует с интенсивностью фотосинтетических процессов.

На рис. 3 представлена гипотетическая схема воздействия условий минерального питания на фотосинтез и азотный метаболизм в условиях пониженной водообеспеченности, основанная на положениях данной работы. Согласно этой схеме, содержание азотных соединений в листьях определялось их поступлением из корневой системы и процессами метаболизма N_n. Уменьшение влажности листьев, индуцируемое в основном повышенными дозами P_n, по-видимому, приводило к понижению концентрации макроэргических соединений, уровень которых лимитировал концентрацию активных центров фотосинтеза. В то же время известно, что уменьшение концентрации этих соединений ухудшает также отток ассимилятов из листьев [9]. По этой причине, вероятно, в листьях в условиях пониженной влажности почвы наблюдается увеличение доли первичных продуктов азотного метаболизма и минеральных форм азота с одновременным уменьшением доли конечных продуктов этого метаболизма [4, 9]. Действительно, в нашем эксперименте наличие избыточных первичных форм N_n подтверждалось

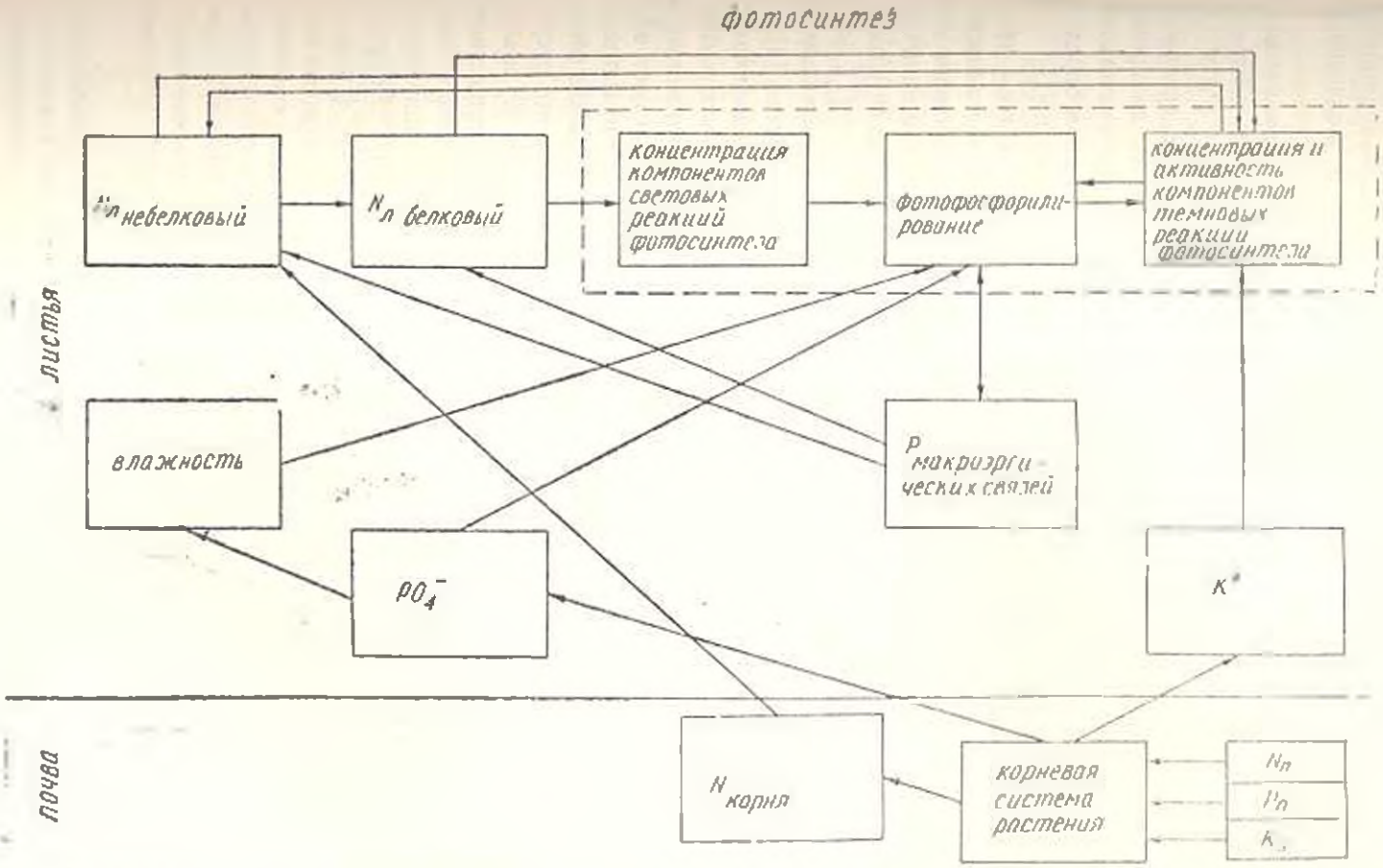


Рис. 3. Схема воздействия условий минерального питания на азотный метаболизм и фотосинтез листьев растений

тем, что увеличение $P_л$ сопровождалось уменьшением $N_{у}$. Оптимизация азотного метаболизма в целом, вероятно, лимитировалась дозой калийного удобрения, повышение содержания которого, по-видимому, приводило к активации темновых реакций фотосинтеза и увеличению содержания фосфорорганических соединений.

Значения обоих параметров ЗФХ листьев в основном коррелировали с уровнем азотного обмена, чем, очевидно, объясняется их соответствие друг другу в данном эксперименте. Сила связи между I и N_1 в условиях пониженной водообеспеченности, по-видимому, в основном определялась уровнем синтеза белков фотосинтетического аппарата, мало зависела от воздействия ионов на величину электрохимического градиента единичного хлоропласта и, следовательно, в основном определялась концентрацией активных фотосистем 2 на единице площади.

После полива в эксперименте наблюдали резкое увеличение I листьев опытных вариантов относительно контроля (рис. 2). В свете вышесказанного, оно, по-видимому, обусловлено более высоким уровнем активации метаболизма растений опытных вариантов вследствие наличия удобрений и условий оптимальной влажности почвы. Действительно, известно, что после полива происходит активация фотосинтеза [11, 14], которая в конечном итоге должна приводить к увеличению интенсивности азотного метаболизма [3], что и наблюдали в экспериментах [4].

Определенная корреляция между N_1 и τ в вариантах, по-видимому, была индуцирована их связью с концентрацией активных компонентов световых реакций фотосинтеза и уровнем первичного метаболизма азота в листьях. Обе последние величины суммарно характеризуют эффективность сопряжения световых и темновых реакций фотосинтеза [3, 10]. Следовательно, изменения τ, по-видимому, могут служить показателем этого сопряжения. Поэтому можно предположить, что отсутствие достоверного увеличения I при повышении содержания $K_п$ и элиминации влияния влажности листьев может быть связано с существенной активацией калийным удобрением (достоверное уменьшение τ) темновых реакций восстановления CO_2, которое, как известно, индуцирует повышение эффективности фотофосфорилирования [3, 10]. Действительно, ранее было показано, что увеличение эффективности фотофосфорилирования в расчете на хлоропласт индуцирует определенное снижение уровня ЗФХ [5]. В то же время можно предположить, что более низкие значения τ у листьев высокопродуктивных вариантов, по сравнению с контрольным, в основном свидетельствуют о благоприятном влиянии минеральных удобрений на повышение сопряженности световых и темновых реакций фотосинтеза в различных условиях водообеспеченности почвы.

Таким образом, можно заключить, что существуют определенные корреляционные связи между величиной параметров ЗФХ листьев и уровнем метаболизма растений, а также между влиянием минеральных удобрений и влажности почвы на растения уже на уровне первичных реакций фотосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авакян А. Б.* Физиология растений. 33. 1. 23. 1986.
2. *Алешин Е. П., Федулов Ю. П., Дорошенко Т. Н.* и др. Докл. ВАСХНИЛ. 12. 6. 1983.
3. *Андреева Т. Ф.* В сб.: Физиология фотосинтеза. 89. М., 1982.
4. *Водяник Л. С., Водяник Т. М.* Сельскохозяйственная биология. 10. 12. 1984.
5. *Григорьев Ю. С., Моргун В. Н., Гольд В. М.* и др. Биофизика. 27. 6. 973. 1982.
6. *Исмайлов С. Ф., Котлярова Т. Н., Смирнова А. М.* Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 366. 1983.
7. *Журбицкий З. И.* Физиологические и агрономические основы применения удобрений. М., 1963.
8. Картофель. Под ред. Н. С. Бацанова. М., 1970.
9. *Курсанов А. Л.* Транспорт ассимилятов в растениях. М., 1976.
10. *Маторин Д. Н., Венедиктов П. С., Тимофеев К. Н., Рубин А. Б.* Биологические науки. 2. 35. 1978.
11. *Ниловская Н. Г., Моисеев А. Д.* Тез. докл. Всесоюзн. конф.: Устойчивость к неблагоприятным факторам среды и продуктивность растений. 89. Иркутск, 1984.
12. *Петербургский А. В., Асиров Х. К., Плешков Б. П.* и др. Агрохимия. М., 1964.
13. *Прошкин А. В.* Биологические науки. 4. 90. 1973.
14. *Тарчевский И. А.* В сб.: Физиология фотосинтеза. 118. М., 1982.
15. *Davidian J. C., Salsac L.* Physiol. vegét., 17. 2, 373. 1979.
16. *Lavorel J., Lavergne J., Etienne A. L.* Photochem. and Photobiol., 35, 4–5, 287. 1982.
17. *Nakatani H. Y., Barber J., Minski M. J.* Biochim. Biophys. Acta, 547, 1, 29, 1979.
18. *Volkenburgh E., Boyer J. S.* Plant Physiol., 77, 1, 190, 1985.

Поступило 3 II 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 574.578.571.963.3.547.965

ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ НА ЗАХВАТ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА СИНАПТОСОМАМИ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

А. А. ВАРТАНЯН, Г. В. АПРИКЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Разработана экспериментальная модель, позволяющая выявить влияние процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков нервных клеток на захват нейромедиаторных аминокислот. Обнаружено, что захват ^{14}С-АК, ^{14}С-ГК, ^{14}С-ГАМК нервными окончаниями мозга ингибируется вследствие модификации некоторых мембранных белков синаптосом АДФРТ. Показано также, что в процесс АДФ-рибозилирования не вовлекаются белки, ответственные за систему транспорта ГАМК.

*Մշակվել է փորձնական մոդել, որը թույլ է տալիս հայտնաբերիլ նյարդային բջիջների մեմբրանային սպիտակուցների ԱԴՖ-ռիբոզիլացման պրոցեսների ազդեցությունը միջնորդանյութի ամինաթթուների կլանման վրա։ Հայտնաբերվել է, որ գլխուղեղի նյարդային վերջույթների սինապտիկ մեմբրանի որոշ սպիտակուցների ԱԴՖՏ մոդիֆիկացիայի արդյունքում նվազում է ^{14}C-ԱԹ, ^{14}C-ԳԹ և ^{14}C-ԳԱՄԹ-ի կլանումը։ Գտնվել է նաև, որ ԱԴՖ-ռիբոզիլացման պրոցեսի մեջ չեն ներգրավվում ԳԱՄԹ տրանսպորտային սիստեմի սպիտակուցները։

Сокращения: АДФРТ—(АДФ-рибозо)трансфераза, ГАМК—γ-аминомасляная кислота, АК—аспарагиновая кислота, ГК—глутаминовая кислота, ДАМК—2,4 диаминомасляная кислота.

An experimental model is worked out, which lets us to make clear the influence of the processes of ADP—ribosylation of nerve cells membrane proteins on the uptake of neuromediatory amino acids. The inhibition of the uptake of ^{14}C—AA, ^{14}C—GA, ^{14}C—GABA by brain nerve endings as a result of modification of some synaptosomal membrane proteins by ADPRT is revealed. The proteins responsible for the system of GABA transport are not involved in the process of ADP—ribosylation.

Синаптосомы мозга—АДФРТ—γ-аминомасляная кислота—2,4-диаминомасляная кислота.

Понимание физиологической роли модификации ключевых белков метаболизма клетки АДФРТ несколько упростилось после получения моноклональных антител к поли- и моно-АДФР, что делало возможным их качественное и количественное определение [12, 13]. Выявились очень интересные закономерности этого процесса [10]. И если первые работы в этой области были связаны с получением фермента функциональной гомогенности, изучением его физико-химических свойств, то в последние годы все больше появляется публикаций о влиянии АДФ-рибозилирования белков на различные метаболические процессы клетки [16]. На сегодняшний день, пожалуй, единственно доказанной точкой приложения АДФРТ является репарация ДНК [6, 8], хотя высказываются вполне обоснованные предположения, что АДФ-рибозилирование некоторых ядерных белков может служить запуском пролиферации и дифференцировки клеток [3, 4, 11, 17], активацией транскрипции ДНК [15]. И совершенно открытым остается вопрос о функциональной значимости АДФРТ из плазматических мембран. Ранее [2] и нами в мембранах синаптосом мозга белых крыс была показана АДФРТ-активность, было обнаружено также, что активность эта возрастает в ряду: головной мозг, мозжечок, ствол мозга [1]. В предыдущих исследованиях лаборатории отмечалось снижение уровня захвата нейромедиаторных аминокислот нервными окончаниями мозга белых крыс в том же ряду (данные не опубликованы). Было вполне естественно предположить, что процесс АДФ-рибозилирования мембранных белков синаптосом мозга может служить одним из звеньев в механизме ингибирования захвата нейромедиатора нервными окончаниями мозга.

В настоящей работе впервые приводятся данные о связи между модификацией мембранных белков АДФРТ и захватом нейротрансмиттера синаптосомами мозга белых крыс.

Материал и методика. Работа выполнена в Институте биохимии АН АрмССР, 1986—1987 гг. Активность АДФРТ определяли по ранее описанной методике [14] с незначительными изменениями. Синаптосомы, мембраны которых становились проницаемыми для НАД$^+$, получали по несколько модифицированной методике [5]. Синаптосомы получали по Хайош [7]. Захват нейромедиаторных аминокислот синаптосомами мозга белых крыс изучали по методу Хея [9].

Результаты и обсуждение. Экспериментальная модель, позволяющая исследовать влияние процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков на захват нейромедиаторных аминокислот синаптосомами мозга белых крыс, состояла из трех комплементарных участков: проникновение НАД$^+$ в синаптосомы с сохранением их интактности, модифи-

кация мембранных белков АДФРТ, изменение захвата нейротрансмиттера вследствие этой модификации. На начальном этапе была проведена серия контрольных экспериментов по выявлению оптимальных условий для проникновения НАД+ через синаптическую мембрану (зависимость от времени выдержки на холоду «cold shock», зависимость от концентрации НАД+ во внесинаптосомальной среде, от концентрации некоторых компонентов пермеабилизующего буфера; данные не приводятся). В ходе исследований выявились оптимальные условия для этого процесса: 30 мин выдержки на холоду синаптосом в пермеабилизующем буфере при концентрации НАД+ в инкубационной среде 3 мМ вполне достаточно для получения желаемого эффекта.

Из рис. 1 следует, что модель, предложенная нами, позволяет решить задачу изучения влияния процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков на захват нейромедиаторных аминокислот синаптосомами мозга белых крыс

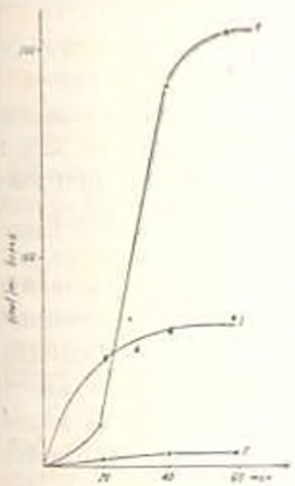


Рис. 1.

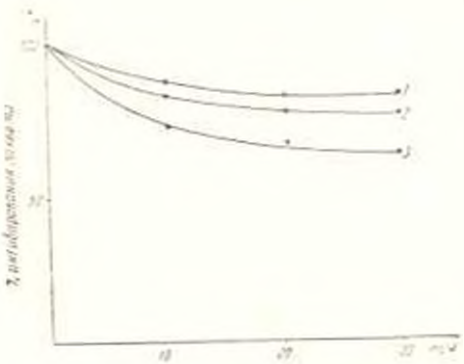


Рис. 2.

Рис. 1. Зависимость включения [^{14}C]-аденин НАД+ (1) и ^{14}C-карбонил НАД+ (2) в ТХУ-нерастворимые белки синаптосом мозга белых крыс. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,1 мкКю [^{14}C]-НАД+, 100 мкг свежеприготовленных синаптосом мозга, 5 мМ НАД+ в буфере, описанном в «материале и методике» (3) — проникновение НАД в синаптосомы мозга (концентрация НАД+ равнялась 0,4 мМ, остальное как в подписи к (1).

Рис. 2. Ингибирование захвата нейромедиаторных аминокислот АДФ-рибозилированием мембранных белков синаптосом мозга белых крыс в зависимости от времени. 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — γ-аминомасляная кислота.

Основываясь на имеющихся в литературе данных о том, что при инкубации меченых аминокислот с синаптосомами мозга при 37° уже к 10-й минуте достигается равновесие в процессе захвата медиатора [9], мы выбрали три интервала времени: 10, 20 и 30 минут. Исследование кинетики изменения захвата нейромедиаторных аминокислот вследствие модификации мембранных белков АДФРТ показало, что через 30 мин наступает полное равновесие между этими двумя процессами (рис. 2). И если захват ^{14}C-АК и ^{14}C-ГК синаптосомами мозга сви-

жается приблизительно на 20%, то захват ^{14}С-ГАМК ингибируется более чем на 30%. Интересным оказался тот факт, что во всех трех случаях это ингибирование не превышает 30%. Это может свидетельствовать либо о существовании достаточно эффективных механизмов обратной регуляции активности АДФРТ плазматических мембран нервных клеток, либо о том, что АДФ-рибозилируются белки, непосредственно не повлекающиеся в систему транспорта нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

На следующем этапе работы мы попытались получить экспериментальное подтверждение высказанной гипотезы. Понятно, что если какой-либо конкурентный ингибитор снижает захват нейромедиаторных аминокислот до и после модификации мембранных белков АДФРТ на одну и ту же величину, то АДФ-рибозилирование не затрагивает белок-переносчик. На рис. 2 представлены результаты изучения влияния АДФ-рибозилирования белков на захват ^{14}С-ГАМК синаптосомами мозга белых крыс в присутствии конкурентного ингибитора ДАМК. Видно, что при четырех выбранных концентрациях ингибитора захват ^{14}С-ГАМК с модифицированными мембранами и в контрольных экспериментах не меняется. Таким образом, снижение захвата синаптосомами мозга белых крыс на 20% в случае с ^{14}С-АК и ^{14}С-ГК и на 32% в случае с ^{14}С-ГАМК лишь опосредовано влиянием АДФ-рибозилированных белков на систему транспорта нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

Полученные нами данные указывают на новый путь включения АДФ-рибозилированных белков в метаболизм клетки. Изучение механизмов, регулирующих захват нейротрансмиттера синаптосомами мозга с модифицированными мембранами, выявит новые возможности для исследования вопросов синаптической нейротрансмиссии на молекулярном уровне, тем самым приблизив нас к более глубокому пониманию процессов, связанных с передачей нервного импульса.

Поступило 10.XII 1987 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вартанян А. А.* Биолог. ж. Армении, 41, 3, 1988.
2. *Фоменко А. И., Хазмуратов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В.* Биол. мембраны, 3, 2, 124—128, 1986.
3. *Bredehorst R., Klarpoth K., Hilz H., Schelhagen C., Geelssi C.* Cell Differentiation, 9, 95—10[illegible], 1980.
4. *Bredehotsr R., Wielkens K., Rochette-Igly C., Hilz H.* Eur. J. Biochem., 20, 267—274, 1982.
5. *Carter S. C.* ADP—Ribosylation of Proteins, Ed. Althous A., Hilz H., Shall S. Springer—Verlag, Berlin, 397—401, 1985.
6. *Durkacz R. W., Irwin L., Shall S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 101, 1433—1444, 1981.
7. *Hajos F.* Brain Res., 93, 485—489, 1975.
8. *Hayaishi O., Ueda K.* ADP—Ribosylation of Proteins. Acad. Press. London—N.-York, 148—161, 1982.
9. *Henn F. A., Hamberger A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2680—2690, 1971.
10. *Hilz H.* [illegible]—Seyler Z. Physiol. Chem., 362, 1415—1425, 1981.

11. *Ithel M., Jongstra—Bilen I., Mandel P.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *116*, 428—434, 1983.
12. *Kanai Y., Miwa M., Matsushima T.* Nature, *274*, 809—812, 1978.
13. *Kanai Y., Sugimura T., Matsushima T.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *79*, 300—306, 1974.
14. *Lester H. A., Steer H. I., Michaelson D. M.* J. of Neurochem., *38*, 1080—1086, 1982.
15. *Smulson M. E., Hough C., Kasid U., Dritschlo R., Lubet A.* ADP—Ribosylation of Proteins, Ed. Althous A., Hilz H., Shall S., Springer—Verlag, Berlin, 207—216, 1985.
16. *Ueda K., Hayaishi O.* Annual. Rev. Biochim., *54*, 73—100, 1985.
17. *Willems G. T., Johnstone A. P.* Biosci. Rep., *3*, 815—830, 1983.

Поступило 10.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.352.315:612.111.612.014.462.4

ИНДУКЦИЯ Ca^{2+}-H^+ ОБМЕННИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФТОРИДА НА ЭРИТРОЦИТЫ

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Добавление Ca^{2+} к суспензии клеток, инкубируемых с ингибитором гликолиза NaF, приводило к протонному всплеску и выделению K^+. В некоторых случаях, а также в присутствии глюкозы или Mg^{2+} последовательные внесения Ca^{2+} вызывали серию всплесков; скорость выхода K^+ при этом уменьшалась. Подсчитана Ca^{2+}-зависимая калиевая проводимость при инициировании одного и нескольких всплесков. На основании опытов с ионофором A23187 предполагается, что протонный всплеск обусловлен образованием Ca^{2+}-H^+ обменника при трансформации эритроцитов.

NaF գլիկոլիզի ինհիբիտորով ինկուբացված բջիջների կախույթին Ca^{2+} ավելացումը հանգեցնում է պրոտոնային ճզփումի և K^+ արտազատման։ Որոշ դեպքերում, ինչպես նաև գլյուկոզայի կամ Mg^{2+} առկայության դեպքում Ca^{2+} հետևողական ներարկումները հարուցում են մի շարք ճզփումներ, ընդ որում, K^+ արտազատման արագությունը նվազում է։ Հաշվարկված է Ca^{2+}-կախյալ կալիումային հաղորդականությունը մեկ և մի քանի ճզփումների ժամանակ։ A23187 իոնոֆորով կատարված փորձերը հիմք են տալիս ենթադրելու, որ պրոտոնային ճզփումը պայմանավորված է էրիթրոցիտների արանոֆորմացիայի ժամանակ Ca^{2+}-H^+ փոխանակիչի գոյացումով։

The addition of Ca^{2+} to erythrocyte suspension, incubated with inhibitor of glycolysis *NaF*, leads to proton rebound and ejection of K^+. In some cases, as well as in presence of glucose or Mg^{2+}, the successive injections of Ca^{2+} have resulted in series of rebounds with decreased rate of K^+ efflux. The Ca^{2+}—dependent potassium conductance in the initiation of one and some rebounds has been calculated. On the basis of experiments with ionofore A32187, it is supposed that proton rebounds are due to generation of Ca^{2+}-H^+ exchanger by transformation of erythrocytes.

Сокращения: СССР—карбонилинанидхлорфенилгидразон.

Известно, что повышение уровня Ca^{2+} в эритроцитах сверх физиологических значений приводит к выходу K^+ вследствие активации Ca^{2+}-зависимого калиевого канала. Изменение концентрации Ca^{2+} в эритроцитах можно индуцировать инкубацией клеток с ингибиторами метаболизма [3, 6, 13], что в конце концов приведет к подавлению работы Ca^{2+} АТФазы, «откачивающей» Ca^{2+} против градиента концентрации с использованием энергии гидролиза АТФ [15, 17, 19]. Другим способом открывания калиевых каналов является увеличение пассивного входа Ca^{2+} в эритроциты с помощью ионофора двухвалентных катионов А23187 [1, 5, 7, 11, 14, 16, 23].

Транспорт Ca^{2+} в цитоплазму может приводить к комплексу нарушений мембран эритроцитов, включающих изменения деформируемости, структуры белкового цитоскелета, белок-липидных взаимодействий и микровезикуляцию [2, 9, 10, 20—22]. В конечном итоге при этом будет происходить трансформация эритроцитов.

В настоящей работе приводятся результаты исследования вызванных Ca^{2+} всплесков протонов и обменных потоков ионов K^+, H^+ и Ca^{2+} при инкубации эритроцитов человека с ингибитором гликолиза NaF, а также степени гемолиза эритроцитов при индуцировании всплесков.

Материал и методики. Эритроциты выделяли из свежей гепаринизированной крови доноров центрифугированием. Клетки затем два раза промывали в растворе 150 мМ NaCl.

Транспорт K^+ и H^+ измеряли K^+-селективным («Crytur», ЧССР) и H^+-селективным («Radiometer», Дания) электродами, соединенными в одной ячейке и подключенными через pH-метры к самописцам.

Мембранный потенциал эритроцитов (ΔE) определяли в безбуферной среде с помощью метода, основанного на измерении pH в наружной среде и внутри клеток и последующем вычислении по формуле Нернста [8]. О количестве K^+ и pH внутри эритроцитов судили по результатам гемолиза, вызванного сапонином [25].

Степень гемолиза в процессе всплесков определяли при 540 нм на спектрофотометре СФ-26 в супернатанте суспензии клеток, осажденных при 6000 об/мин в течение 3 мин на центрифуге Т-30 (ГДР). Контролем служил супернатант осажденных эритроцитов, инкубированных без добавок NaF и Ca^{2+}.

Все исследования велись при $t = 22^\circ$—24°. Средние значения мембранного потенциала подсчитывали с применением критерия Стьюдента.

Для опытов использовали фторид Na и протонофор СССР фирмы «Sigma» и ионофор А23187 фирмы «Calbiochem» (США). Остальные реактивы советского производства классификации «о. с. ч.» или «х. ч.».

Результаты и обсуждение. Нами экспериментально была подобрана концентрация фторида, при которой потоки ионов через мембрану наиболее выражены. Типичные результаты индуцированного Ca^{2+} ионного обмена показаны на рис. 1 и 2. После добавления NaF происходит небольшой выход K^+ вследствие присутствия в среде 1 мМ Ca^{2+}. Первое внесение Ca^{2+} практически не отражается на ионном обмене, второе приводит к резкому выходу H^+. Вхождение H^+ внутрь совпадает с быстрым выделением K^+ (рис. 1). Всплеск протонов, длящийся 2—3 мин, не обязательно происходит в момент инъекции Ca^{2+}. Наличие в среде 0.015 мМ протонофора СССР в некоторой степени умень-

шает период всплеска. Поскольку эритроциты инкубируются в безбуферной среде, то изменение pH, согласно [8], отражает изменение ΔE. Скачок pH в разных опытах варьировался в пределах 0,1—0.2 ед., что эквивалентно величинам ΔE, равным —6÷—12 мв. Это сравнимо

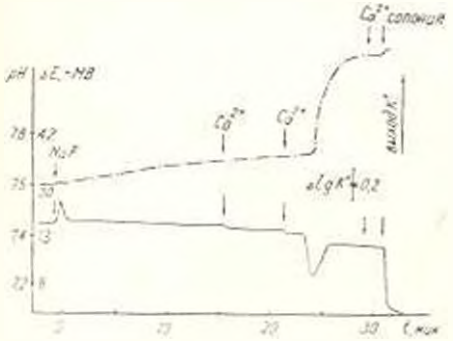


Рис. 1. Всплеск протонов (——) и выход K^+ (— —) из эритроцитов под действием Ca^{2+}. 0,1 мл плотно отцентрифугированных клеток разбавляли в 3 мл среды, содержащей 150 мМ NaCl, 0,1 мМ KCl, 1 мМ $CaCl_2$ и после 10—15 мин инкубации, необходимой для уравновешивания pH среды, вносили 10 мМ NaF (момент 0 на рис.). Конечные концентрации добавляемого Ca^{2+}—по 1 мМ, сапонина—0,02%.

с мембранным потенциалом самих эритроцитов, определенных нами в отдельных опытах без фторида ($\Delta E = -11{,}15$ мв $\pm 0{,}265$ мв; $n = 25$).

В ряде аналогичных опытов после внесения Ca^{2+} резкого выхода K^+ не происходит (рис. 2). Первый всплеск при этом более затянутый. Если в случае, показанном на рис. 1, последующие добавки Ca^{2+} практически не приводят к какому-либо перераспределению ионов, то, как видно из рис. 2, в данном опыте они инициируют замедленные всплески H^+ с уменьшающейся амплитудой.

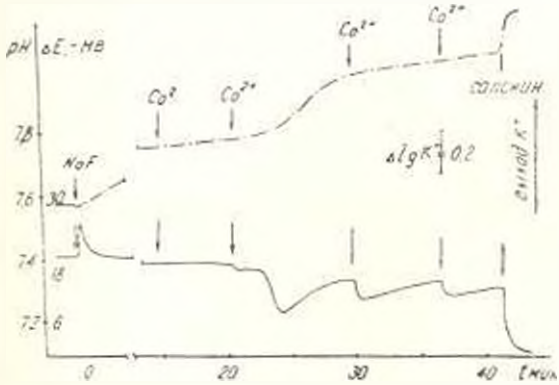


Рис. 2. Последовательные всплески протонов под действием Ca^{2+} в эритроцитах. Условия и обозначения такие же, как в подписи под рис. 1.

Инкубация эритроцитов, дающих в обычных условиях 1 всплеск, с 1 мМ Mg^{2+} или 5 мМ глюкозы (с целью увеличения внутриклеточной АТФ), также приводит к замедленным всплескам H^+ и уменьшению выхода K^+. Однако при добавлении Mg^{2+} всплески начинаются после

3—5 внесения Ca^{2+}, причем ингибирование калиевой проницаемости более выражено и количество всплесков достигает пяти.

Следуя авторам работы [23], можно подсчитать индуцированную Ca^{2+} калиевую проводимость (g) в случае одного (рис. 1) и нескольких всплесков (рис. 2) по формуле $g = F \cdot j/(\Delta E - \Delta E_k)$. Здесь F—число Фарадея, равное 96500 Ампер сек/моль, j—поток ионов калия через мембрану, ΔE—мембранный потенциал, ΔE_k—нернстовский равновесный потенциал для K^+.

Поток через мембрану определяли как изменение концентрации вышедших ионов калия (начиная с пика всплеска после второй добавки Ca^{2+}, когда протоны входят внутрь, до завершения всплеска) на единицу площади эритроцитов. Учитывая, что у нас в среде инкубации 0,1 мл эритроцитов, а площадь 1 л эритроцитов $S = 1{,}75 \cdot 10^7$ см² [23], получим значение j_1 (рис. 1), равное $2{,}1 \cdot 10^{-9}$ ммоль/см²·сек, а j_2 (рис. 2) — $0{,}19 \cdot 10^{-9}$ ммоль/см²·сек. Мембранный потенциал ΔE вычисляли на основании измерений pH во внешней среде на пике всплеска и pH внутри клетки. ΔE_k определяли по формуле Нернста, измеряя начальную концентрацию K^+ в клетке и концентрацию K^+ во внешней среде после завершения всплеска. Концентрацию K^+ внутри эритроцитов рассчитывали на 1 л внутриклеточной воды, которая занимает приблизительно 70% объема клеток [1].

При этих условиях g_1 (1 всплеск) и g_2 (несколько всплесков) равнялись соответственно 19,7 и 1,59 мкСм/см² (где См—1 Симене). Таким образом, калиевая проводимость при периодических всплесках (рис. 2) более чем на порядок меньше, чем в случае индуцирования одного всплеска (рис. 1).

Нами были проведены специальные опыты по выяснению степени гемолиза эритроцитов при одном и нескольких всплесках. Если считать, что добавление сапонина вызывает полный гемолиз клеток, то в случае одного всплеска он уменьшается почти в два раза, а при вызываемых Ca^{2+} нескольких всплесках составляет всего около 10% от полного.

При старении эритроцитов в течение 24 ч на холоду сразу после инкубации с 10 мМ NaF начинается резкий выход K^+. Аналогичный результат получается при добавлении 15—20 мМ NaF к свежевыделенным эритроцитам.

С целью выяснения возможного механизма всплесков были проведены опыты с ионофором двухвалентных катионов A23187 (рис. 3). Из

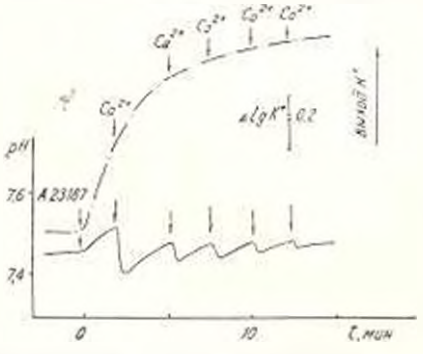


Рис. 3. Всплески протонов (———) и выход K^+ (—, — —) из эритроцитов, индуцированные ионофором A23187 и Ca^{2+}. 0,1 мл плотно отцентрифугированных клеток вносили в 3 мл среды, содержащей 150 мМ NaCl и 0,1 мМ KCl, и после 10—15 мин инкубации добавляли 0,01 мМ A23187 (момент 0 на рис.) и по 2 мМ Ca^{2+}.

рисунка видно, что в присутствии ионофора происходит значительное выделение K^+ и увеличение внеклеточного pH. Ионы кальция дают

протонные всплески, но с меньшей амплитудой, чем в случае, приведенном на рис. 2. Калиевый поток при этом не изменяется. Отметим, что если Ca^{2+} вносить, когда уже большая часть K^+ вышла из клеток, то всплески H^+ не индуцируются. Поскольку A23187 является Ca^{2+}-H^+ обменником [12], то в начальной фазе всплеска, очевидно, имеют место вход Ca^{2+} и выход H^+.

Можно полагать, что в присутствии NaF действие Ca^{2+} на белковый цитоскелет приводит к трансформации эритроцитов, сопровождающейся всплеском протонов. При этом в первой стадии всплеска происходит обмен Ca^{2+} на H^+. Затем протоны входят внутрь одновременно с выбросом K^+ (рис. 1), т. е. в активации K^+—H^+ обмена существенную роль играет транспорт Ca^{2+} в цитоплазму.

Повторные всплески и уменьшение калиевой проницаемости (рис. 2), возможно, объясняются возвращением эритроцитов к исходному состоянию вследствие замыкания дефектов цитоскелета. Значительное уменьшение степени гемолиза клеток при нескольких всплесках, а также опыты с Mg^{2+} и глюкозой дают основание для такого предположения, поскольку известно, что и Mg^{2+} и АТФ возвращают мембранам эластичность [24]. В работе [18] была установлена временная задержка активации Са-насоса как условие для быстрого увеличения концентрации Ca^{2+} в эритроцитах, индуцированного ионофором A23187, и затем выход Ca^{2+} вследствие работы Ca^{2+}-АТФазы. Поэтому повторные всплески могут происходить из-за неполного «истощения» эритроцитов по АТФ и выхода Ca^{2+} из цитоплазмы при работе Ca^{2+}-АТФазы. Тогда во второй половине всплеска будет иметь место обмен H^+ не только на K^+, но и на Ca^{2+} (за счет чего и будет уменьшаться калиевая проводимость).

Таким образом, можно предположить, что при трансформации эритроцитов, вызванной увеличением транспорта Ca^{2+} в цитоплазму, в начальной стадии всплеска происходит индукция Ca^{2+}-H^+ обменника, во второй же фазе активируется K^+-H^+ обмен (1 всплеск) или (K^+ + Ca^{2+})/H^+ обмен (несколько всплесков).

Известно, что при патологических состояниях, а также при различных стрессовых ситуациях в организме человека может происходить трансформация эритроцитов, вероятно, сопровождающаяся перераспределением ионных потоков вследствие образования ионообменников.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гюльханданян А. В.* Биолог. ж. Армении. *39*, 212—216, 1986.
2. *Allan D., Thomas P.* Biochem. J., *198*, 433—440, 1981.
3. *Cardos G.* Acta Physiol. Hung., *10*, 187—193, 1956.
4. *Hoffman J. F., Laris P. C.* J. Physiol., *239*, 519—552, 1974.
5. *Lake W., Rasmussen H., Goodman D. B. P.* J. Membrane Biol., *32*, 93—113, 1977.
6. *Lew V. L.* Biochim. Biophys. Acta, *233*, 827—830, 1971.
7. *Lew V. L., Simonsen L. O.* J. Physiol. (Gr. Br.), *362*, 60, 1985.
8. *Macey R. I., Adorante J. S., Orme F. W.* Biochim. Biophys. Acta, *512*, 284—295, 1978.
9. *Mombers C., De Gier J., Demel R. A., Van Deenen L. L. M.* Biochim. Biophys. Acta, *603*, 52—62, 1980.

10. *O'Kear E. A., Udden M. M., McIntire L. V., Lynch E. C.* Biochim. Biophys. Acta, *691*, 271—280, 1982.
11. *Reed P. W.* J. Biol. Chem., *255*, 3189—3197, 1970.
12. *Reed P. W., Lardy H. A.* In: The Role of Membranes in Metabolic Regulation (Mehlman M. A., Hanson R. W., eds.). Academic Press, New York, 111—131, 1972.
13. *Romero P. J.* Biochim. Biophys. Acta, *507*, 178—181, 1978.
14. *Romero P. J., Whittam R.* J. Physiol. Lond., *214*, 481—507, 1971.
15. *Sarkadi B.* Biochim. Biophys. Acta, *604*, 159—190, 1980.
16. *Sarkadi B., Szasz J., Gardos G.* J. Membrane Biol., *26*, 357—370, 1976.
17. *Sarcadi B., Szasz J., Gerloczy A., Gardos G.* Biochim. Biophys. Acta, *464*, 93—107, 1977.
18. *Scharff O., Foder B., Skibsted U.* Biochim. Biophys. Acta, *730*, 295—305, 1983.
19. *Scharzmann H. J.* Annu. Rev. Physiol. Palo Alto, Calif., *45*, 303—312, 1983.
20. *Shiga T., Sekiya M., Maeda N., Kon K., Okazaki M.* Biochim. Biophys. Acta, *814*, 289—299, 1985.
21. *Shukla S. D., Berriman J., Coleman R., Finean J. B., Mitchell R. H.* FEBS, Lett., *90*, 289—292, 1978.
22. *Siefring G. E., Apostol A. B., Velasko P. T., Lorand L.* Biochemistry, *17*, 2598—2601, 1978.
23. *Stampe P., Vestergaard—Bogind B.* Biochim. Biophys. Acta, *815*, 313—321, 1985.
24. *Weed R. I., La Celle P. L., Merrill E. W.* J. Clin. Invest., *48*, 795—809, 1969.
25. *Vestergaard—Bogind B., Bennecon P.* Biochim. Biophys. Acta, *688*, 37—44, 1982.

Поступило 25.XI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 616.155.18:537.2

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ НА КИНЕТИКУ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Р. А. МАНУКЯН, Г. Г. АРШУНИ

Ереванский государственный медицинский институт, ЦНИЛ

Установлено, что электростатические поля исследованных параметров непосредственного действия на эритроцитарные мембраны не оказывают. Повышение прочности мембран эритроцитов при длительном воздействии in vivo является следствием опосредованного действия прилагаемого поля.

Ցույց է տրված, որ ուսումնասիրվող պարամետրերով էլեկտրաստատիկ դաշտերը էրիթրոցիտար թաղանթների վրա անմիջական ազդեցություն չեն թողնում. էրիթրոցիտների թաղանթների ամրության բարձրացումը երկարատև ազդեցության դեպքում in vivo պայմաններում հանդիսանում է դաշտի միջնորդված ազդեցության արդյունք:

It is established that electrostatic fields of studied parameters have no direct effect on the erythrocyte membranes. Increasing of stability of erythrocyte membranes under prolonged effect *in vivo* may be the result of indirect effect of applied fields.

Электростатическое поле—эритроцитарная мембрана—гемолиз

В ряде работ показано, что непосредственное воздействие внешних ЭСП на искусственные и естественные биологические мембраны при-

Сокращения: ЭСП—электростатическое поле, ЭМ—эритроцитарная мембрана.

водит к их структурным и функциональным перестройкам [6, 9, 11 13]. Однако в доступной нам литературе мы не встречали работ, касающихся эффектов ЭСП на мембранном уровне при воздействии поля на целостный организм. Нами предпринята попытка изучения влияния ЭСП на прочность ЭМ в экспериментах in vivo и in vitro при помощи фазового анализа кинетики гемолиза эритроцитов.

Материал и методика. В экспериментах использовали свежую гепаринизированную кровь беспородных крыс-самцов. Кровь получали после декапитации животных и к 5 мл разбавленной 0,9%-ным NaCl (1:10) суспензии добавляли 0,02 мл гепарина. Гемолиз проводили при 22° на модифицированной установке, подробное описание которой дано в работе [1]. Модификация заключалась в замене ФЭК-56М более чувствительным прибором КФК-2. Для изучения непосредственного воздействия ЭСП на процесс гемолиза к торцевой стороне 1-сантиметровой кюветы плотно прикладывали изолированный латунный электрод, к которому подавали отрицательный потенциал от высоковольтного стабилизатора ВС-22. Кюветодержатель и корпус прибора заземляли. Таким образом, содержимое кюветы подвергалось воздействию ЭСП, напряженность которого варьировалась величиной подаваемого потенциала.

Осмотический гемолиз проводили в гипотоническом растворе, содержащем 0,22%-ный NaCl, 3,75 мМ трис HCl, pH 7,3, кислотный—в 0,9%-ном NaCl, 15 мМ трис HCl, pH 2,2. К 2 мл гемолизата добавляли 0,1 мл суспензии эритроцитов. Фазовый анализ кривых проводили согласно [1]. Рассчитывали следующие параметры: t—общее время гемолиза, T—длительность «лаг»-фазы кислотного гемолиза, V—скорость кооперативного участка, a—глубину, b—высоту гемолиза.

Были проведены 3 серии экспериментов. В первой серии исследовали кинетику гемолиза эритроцитов крыс, подвергшихся воздействию ЭСП (напряженность 2000 в/см, длительность—час, сутки, 6 дней по 6 ч ежедневно). ЭСП создавалось при помощи установки, описанной в работе [2]. Во II серии изучали кислотный и осмотический гемолиз суспензии эритроцитов, предварительно выдержанной в течение часа в ЭСП (2000 в/см). В III серии определяли кинетику гемолиза во время воздействия ЭСП, напряженность которого меняли от 500 до 3500 в/см через каждые 500 в. Для каждой точки не менее 3 раз, и полученные данные усредняли.

Статистическую обработку данных производили по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Из результатов I серии экспериментов, приведенных в табл. 1 и 2, следует, что часовое действие поля не влияет на исследуемые кинетические параметры. Суточная экспозиция его приводит к снижению скорости кислотного и осмотического гемолиза. Возрастает высота кислотного, высота осмотического проявляет тенденцию к увеличению.

Недельное воздействие ЭСП вызывает значительное изменение ряда параметров: увеличиваются высота осмотического (22%), общее время кислотного (12,5%) и осмотического (23%) гемолиза, а также длительность «лаг»-фазы кислотного гемолиза. Скорости как кислотного, так и осмотического гемолиза заметно снижаются (на 33 и 27% соответственно).

Эксперименты по воздействию ЭСП in vitro (II и III серии) показали, что при всех исследованных напряженностях ни во время воздействия, ни после достоверных изменений в изучаемых параметрах не происходит. В ряде теоретических и экспериментальных работ было показано, что электрические поля высоких напряженностей (>1000 в/см) должны приводить к пробою мембраны, происходящему по механизму

Таблица 2. Действие ЭСП (2000 в см) на кинетику осмотического гемолиза эритроцитов крыс

Параметры гемолиза	Длительность воздействия ЭСП					
	0 n=7	1 ч n=11	0 n=6	21 ч n=10	0 n=6	6 дн. по 6 ч n=11
a (см)	19.7±0.2	19.6±0.2	20.3±0.2	19.3±0.3	20.7±0.2	20.0±0.2
в (см)	4.4±0.2	4.3±0.2	3.1±0.15	4.3±0.3*	3.2±0.14	3.6±0.2
t (сек)	263±8	255±7	216±2.4	232±9	160±3	205±7*
T (сек)	161±3	152±4	131±1.8	131±3.2	96±3	108±5*
V ($сек^{-1}$)	2.53±0.1	2.62±0.15	3.32±0.1	2.89±0.1*	4.96±0.15	3.32±0.1*

*—$P<0,05$

n—количество животных.

Таблица 2. Действие ЭСП (2000 в см) на кинетику осмотического гемолиза эритроцитов крыс

Параметры гемолиза	Длительность воздействия ЭСП					
	0 n=7	1 ч n=11	0 n=6	24 ч n=10	0 n=7	6 дн. по 6 ч n=10
a (см)	16.9±0.2	16.8±0.2	15.7±0.4	16.2±0.1	15.9±0.15	16.1±0.16
в (см)	3.15±0.1	3.3±0.1	2.6±0.1	2.8±0.1	2.25±0.13	2.75±0.12*
t (сек)	115±2	113±1.6	119±2	124±1.4	100±2.6	123±2.7*
V ($сек^{-1}$)	4.59±0.24	4.69±0.16	5.18±0.13	4.56±0.13	6.94±0.3	5.45±0.1*

*—$P<0,05$,

n—количество животных.

инициации и роста пор [4, 11, 15]. Отсутствие подобных эффектов in *vitro* в наших экспериментах можно объяснить недостаточной напряженностью поля и тем фактом, что использованные солевые растворы частично экранируют внешние поля. Результаты, полученные в экспериментах in vitro, а также тот факт, что часовая экспозиция in vivo не влияет на гемолиз, свидетельствуют о том, что ЭСП исследованных параметров не оказывают непосредственного действия на прочность ЭМ.

Изменение параметров гемолиза при суточном и недельном воздействии поля указывает на повышение кислотной и осмотической резистентности эритроцитов. Удлинение «лаг»-фазы, возможно, свидетельствует об изменении ионной проницаемости мембраны, а увеличение высоты гемолиза—о возрастании количества негемолизированных эритроцитов.

В ряде работ [5, 7, 8, 16, 17] показано, что резистентность эритроцитов и скорость их гемолиза зависят от возраста эритроцитов, содержания холестерина, текучести и жирнокислотного состава липидов. Известно, что воздействие ЭСП in vivo приводит к значительным метаболическим перестройкам и активации эритропоэза [5, 13, 14]. Принимая во внимание вышеизложенное, мы можем предположить, что повышение прочности ЭМ может быть следствием или метаболических пе-

рестроек в мембране, или выхода в кровеносное русло молодых эритроцитов. Возможно, оба процесса происходят одновременно.

Таким образом, ЭСП исследуемых напряженностей в условиях нашего эксперимента непосредственного действия на прочность ЭМ не оказывает. Повышение резистентности эритроцитов в экспериментах in vivo является следствием опосредованного действия внешних ЭСП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агамалян А. Г., Оганесян С. С.* Косм. биол. и авиакосм. мед., *17*, 6, 60—62, 1983.
2. *Арцруни Г. Г.* Мат-лы научн. конф. мол. уч., посвящ. 25-му съезду КПСС, 32, Ереван, 1975.
3. *Арцруни Г. Г.* Мат-лы научн. конф. мол. уч., посвящ. 25-му съезду КПСС, 34, Ереван, 1975.
4. *Гончаренко М. С., Катков И. И.* Биофизика, *30*, 3, 441—445, 1985.
5. *Гительзон И. И., Терсков И. А.* В кн.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов, 48—56, М., 1967.
6. *Чизмаджев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф., Абидор И. Г.* В кн.: Итоги науки и техники. Биофиз. мембран, 2, 161, М., 1982.
7. *Araki K., Rifkind J.* Biochim. Biophys. Acta, *645*, 81—90, 1981.
8. *Benga G., Tlavis B., e. a.* BBA, Biomembranes, 775 (M 121), 2, 257—159, 1984.
9. *Ben-Sasson Sh., e. a.* Analyt. Quant. Cytol., *4*, 4, 309—314, 1982.
10. *Coster H., Zimmermann U.* J. Membrane Biol., [illegible], 73—9[illegible], 1975.
11. *Deuticke B.* Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem., [illegible], 3, 229—230, 1984.
12. *Kinosita K., Tsong T.* Biochim. Biophys. Acta, *554*, 2, 479—497, 1979.
13. *Möse J., Fischer G.* Arch. Hyg., [illegible], [illegible], 1971.
14. *Mose J., Shug S., Fischer G.* Biomed. Techn., *17*, 2, 55, 1972.
15. *Rieman Z., Zimmermann U., Pilwat G.* BBA, *394*, [illegible], 1975.
16. *Rifkind J., Araki K., Hadley E.* Arch. Biochem. Biophys., 222, 582—[illegible], 1983.
17. *Sida T., Maeda N., Sekiya M. e. a.* Med. J. Osaka Univ., 29, 1—2, 21—2[illegible], 1978.

Поступило 5.I.1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 616.155.1—097

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ С ИЗМЕНЕННЫМ ПОКАЗАТЕЛЕМ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ АВ0

Т. Н. ГАРЕГИНЯН

Ереванский медицинский институт, кафедра биологической и медицинской физики

Показано, что после обработки эритроцитов УЗ при снижении показателя экспрессии антигенов системы АВ0 происходят достаточно выраженные изменения в СОЭ и морфологии клеток.

Ցույց է տրված, որ էրիթրոցիտների ուլտրանայնային մշակումը արյան համակարգի անտիգենների էքսպրեսիայի գործակցի նվազման մեջ բերում է էրիթրոցիտների նստեցման արագության և մորֆոլոգիայի գծերի փոփոխությունների

Сокращения: УЗ—ультразвук; ЭФП—электрофоретическая подвижность; СОЭ—скорость оседания эритроцитов.

It is shown that after ultrasonic action with the change of index of ABO antigene system expression marked alterations take place in reaction of sedimentation and morphology of cells.

Эритроциты—антигены системы АВО.

Обработка эритроцитов ультразвуком вызывает изменение показателей экспрессии антигенов системы АВО, в частности, снижение титра антигенов при стандартной реакции гемагглютинации [1, 3]. Вопрос о взаимосвязи этого явления с состоянием мембран и сдвигами физико-химических параметров эритроцитов изучен недостаточно, хотя имеет большое прикладное значение в связи с возможностью ультразвуковой модификации форменных элементов крови.

Материал и методика. Работа проведена в Центральном институте переливания крови и гематологии МЗ СССР и на кафедре физики ЕрМИ в 1985 г. Эритроциты были выделены из свежей донорской крови А(II) и В(III). Ультразвуковую обработку клеток осуществляли на частоте 0,88 МГц в режиме амплитудно-импульсной модуляции при длительности импульсов 2 мс и частоте следования 50 Гц с помощью аппарата УЗТ-101. Обработку эритроцитов проводили при 37° в специальной термостатируемой кювете, где обеспечивалась бегущая ультразвуковая волна. Температура поддерживалась в пределах 1°.

Архитектонику поверхности эритроцитов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии ЕМ-100 С (Япония). Суспензию эритроцитов фиксировали 2,5%-ным раствором глютарового альдегида, приготовленного на кокодилатном буфере (pH 7,2). После часовой инкубации при комнатной температуре клетки дважды промывали тем же буфером [2], затем фиксировали 2,5%-ным раствором четырехокиси осмия на основном буфере в течение 10—60 мин [1]. Клетки обезвоживали возрастающими концентрациями этанола, затем полученную взвесь наносили тонким слоем на медные пластинки, высушивали на воздухе и напыляли золотом, используя установку УЕЕ-4С (Япония). У 100—115 эритроцитов каждой пробы высчитывали процентное соотношение типов клеток и фотографировали их.

Эффективный объем и распределение эритроцитов по размерам проводили с помощью счетчика «Coulter Counter», Model ZBI (Франция). Эритроциты донорской крови первоначально дважды разбавляли физиологическим раствором так, чтобы количество подсчитываемых клеток было совместимо с возможностями прибора. Эритроциты разбавляли в соотношении 1:1500, используя калибровочный дозатор и автоматический дилютор. Измерения повторяли трижды с точностью ±3,92. Электрический заряд поверхности эритроцитов оценивали по электрофоретической подвижности, которую определяли на цитофорометре «Opton» (ФРГ) при режиме 5 мА, 100 В, t = 25°. Передвижение клеток регистрировали с использованием фазово-контрастного микроскопа (ув. 800 раз). Электрофоретическую подвижность рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{l/t}{E} \text{ см}^2 \cdot \text{вольт}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}, \quad (1)$$

где l—расстояние (в мкм), проходимое клеткой за время измерения, E—напряженность поля в В/см, t—время, необходимое для прохождения расстояния эритроцитом.

Величину E рассчитывали по формуле

$$E = \frac{I\rho}{hz}, \quad (2)$$

где I—сила тока в амперах, ρ—удельное сопротивление буферного раствора, h—высота камеры, z—глубина камеры в см. Точность измерения ±0,0185 мкм/см/сек$^{-1}$ В.

Реакцию оседания эритроцитов определяли микрометодом Панченкова. Кровь смешивали с 5%-ным раствором лимоннокислого натрия (4:1).

Регистрацию кислородно-диссоциационных кривых проводили на сканирующем анализаторе Hem-O-Scan (Япония) при pH 7,4, P_{CO} —40 мм рт. ст., t—37°.

Потоки Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов измеряли анализатором «IL System 502 Na^+/K^+ (США) ионоселективными электродами с пределом измерения 0,05 ммоль/л.

Была проведена следующая статистическая обработка полученных результатов.

1. С помощью программируемого микрокалькулятора «Электроника МК-61», согласно готовой программе, для таких параметров, как объем, заряд, СОЭ эритроцитов, вычислены средние значения

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} m_i x_i,$$

исправленная дисперсия $S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} m_i (x_i - \mu)^2$, среднее квадратического смещения—стандарт.

2. Произведена оценка среднего значения генеральной совокупности упомянутых величин, распределенных согласно Стьюденту, через доверительные интервалы с достоверностью 0,95.

3. Составлены эмпирические линейные уравнения регрессии для значений параметров контрольных и озученных эритроцитов и отдельно вычислены коэффициенты корреляции.

Значения этих коэффициентов показывают, что в основном имеет место тесная взаимосвязь между соответствующими параметрами необработанных и обработанных эритроцитов.

Результаты и обсуждение. В контрольных опытах интактные эритроциты обратимо изменяли свою форму при помещении в различные растворы. В физиологическом растворе они имели форму двояковогнутого диска, в изотоническом соленом растворе—дискоцитов и тутовых ягод. Клетки, перенесенные вновь в свежую плазму, приобретали дисковидную форму без изменения объема.

После обработки ультразвуком изменяется количественное соотношение отдельных форм эритроцитов. Если в пробе с интактными клетками дискоциты составляли 36,5%, а «тутовые ягоды»—63,5%, то в пробе с модифицированными ультразвуком эритроцитами эти формы составляли соответственно 44,8 и 55,2%, т. е. снижается частота появления эхиноцитов и увеличивается число дискоцитов. Следовательно, обработка ультразвуком модифицирует архитектонику поверхности эритроцитов.

Сопоставление эффективных объемов эритроцитов группы А (II) и В (III) при различных титрах агглютинации не выявляет значительной разницы. Так, для групп А (II) с титром 1/32 характерны клетки объемом 82,17 мкм³, а с титром 1/8—79,48 мкм³, для группы В (III) — клетки с титром 1/64 имеют объем 83,87 мкм³, с титром 1/16—81,8 мкм³. Можно говорить лишь о тенденции к небольшому снижению объема, однако его физическое значение, по-видимому, незначительно.

Электрический поверхностный заряд эритроцитов—чувствительный физико-химический показатель физической полноценности, связанный с молекулярными перестройками мембраны клетки. При сопоставлении данных об электрофоретической подвижности эритроцитов с различны-

ми показателями экспрессии антигенов также не обнаружено существенной разницы (табл. 1).

Таблица 1. Электрофоретическая подвижность необработанных и обработанных ультразвуком эритроцитов групп крови А (II) и В (III)

ЭФП эритроцитов группы А (II)		ЭФП эритроцитов группы В (III)	
титр 1:32	титр 1:8	титр 1:64	титр 1:16
112	0.97		
0.956	0.943	1.064	1.044
0.96	0.92	1.012	1.01
1.11	1.11	0.962	0.94
1.014	1.014	1.06	1.05
1.07	0.967	1.12	1.11
0.956	0.943	1.029	1.019
1.02	1.01	0.96	0.94
0.936	0.92	1.048	1.03
1.06	1.05	1.02	1.01
1.018±0.066	0.983±0.056	1.038±0.047	1.02±0.046

Одним из существенных для оценки функционального состояния эритроцитов показателей является форма кривой насыщения эритроцитов кислородом. Мы определяли не только степень кооперативности, но и сродство гемоглобина к кислороду путем оценки P_{50}, т. е. величины парциального давления O_2, при которой насыщены 1/2 всех участков связывания.

Результаты этой серии опытов показали, что величина P_{50} для контрольных и модифицированных ультразвуком эритроцитов различается незначительно и находится в пределах ошибки. По гемолизатам отклонения от нормы практически отсутствуют.

Особый интерес представляет воздействие ультразвука на величину пассивной проницаемости мембран эритроцитов для одновалентных ионов калия и натрия. Этот параметр весьма чувствителен к изменениям белково-липидных отношений в мембранах эритроцитов. В опытах был определен выход K^+ и Na^+ из эритроцитов. Попытка определить количество этих катионов в гемолизатах крови не увенчалась успехом из-за неполного гемолиза в отдельных случаях, возможно, и реабсорбции на тенях эритроцитов. Было обнаружено, что после отмывок и обработки ультразвуком эритроцитов выход в супернатант K^+ ультразвуком, снижая показатель антигенов системы АВО, незначительно увеличивает выход Na^+.

Полученные результаты показывают, что обработка эритроцитов ультразвуком, снижая показатель антигенов системы АВО, незначительно повышает выход Na^+, не затрагивая выход K^+.

Расчет скорости оседания эритроцитов, величина которой в разных пробах контрольной группы колеблется в широких пределах, показал зависимость от степени экспрессии антигенов, когда сравнивались необработанные и обработанные ультразвуком эритроциты (табл. 2).

Таблица 2. Скорость оседания необработанных и обработанных ультразвуком эритроцитов групп крови А (II) и В (III)

СОЭ		СОЭ	
титр 1:32	титр 1:8	титр 1:64	титр 1:16
4	8	7	8
6	13	5	7
3	5	5	6
4	7	13	16
10	15	5	7
10	12	6	9
8	10	7	9
6±2.78	10.375±3.24	6.86±2.61	8.9±3.09

При ультразвуковой обработке эритроцитов донорской крови изменяется показатель экспрессии антигенов, что приводит к достаточно выраженным изменениям морфологии, СОЭ эритроцитов, однако ЭФП, эффективный объем, проницаемость ионов K^+ и сродство к кислороду практически не меняются.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Пирузян Л. А., Маев Р. Г., Иисневич М. М., Койфман М. М., Корнева З. И.* Биофизика, *31*, 2, 269—273, 1986.
2. *Palade G. E.* J. Exp. Med., *95*, 285—288, 1952.
3. *Pinamonti S., Gallenga P. E. and Mazzo* M. Ultrasound in Med. & Biol., *8*, 6, 1982.
4. *Sabatini D. D., Bensh K., Barnett R. J.* J. Cell Biol., *17*, 19—58, 1963.

Поступило 18.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 612.714.14

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РЕАКЦИИ СУПЕРПРЕЦИПИТАЦИИ

Б. А. ТИКУНОВ

Институт кардиологии им. Л. А. Оганесяна МЗ АрмССР, Ереван

Показано, что двухстадийность СПП и АТФазы скелетномышечного натурального актомиозина является результатом синхронного вовлечения и последовательного «срабатывания» в этих реакциях двух типов функционально неэквивалентных белковых комплексов. Варьируя ионной силой раствора, можно сдвигать равновесие в сторону одного либо другого типа актомиозиновых макромолекул, каждому из которых соответствует определенное структурное состояние как до начала, так и после окончания указанных реакций. Предполагается, что эти структурно-функциональные состояния актомиозина являются отражением наличия в растворе комплекса актина с двумя типами миозиновых конформеров.

Сокращения: СПП—суперпреципитация, НАМ—натуральный актомиозин, АО—акридиновый-оранжевый.

Յուց է տրված, որ կմախքային մկանների բնական ակտոմիոզինի ՍԳՊ և ՍՏՖազայի ներկուտի փոփոխությունը այդ ռեակցիաներում ֆունկցիոնալ տեսակետից ոչ էկվիվալենտ ակտոմիոզինի երկու տիպի կոմպլեքսների ձևերուն ներդրավման և հաջորդական ռեակցման հետևանք է։ Լուծույթի իոնական ուժի փոփոխմամբ կարելի է համապատասխանություններ հաստատել երկու տիպի կոմպլեքսների այս կամ այն տիպի կողմից, որոնցից յուրաքանչյուրին համապատասխանում է որոշակի կառուցվածքային վիճակ ինչպես նշված ռեակցիաների ընթացում։ Այնպես էլ դրանց ավարտից հետո։ Ենթադրվում է, որ ակտոմիոզինի այդ կառուցվածքային-ֆունկցիոնալ վիճակները արտահայտում են լուծույթում երկու տիպի միոզինային կոնֆորմերների հետ ակտինի կոմպլեքսի ներկայություն։

It has been shown that simultaneous drawing in SPP and ATPase and consecutive works of two types of actomyosin complex is caused by the two stages proceeding in both reactions. The differences in the conformations (or configurations) and in surface charge distribution for this two types of actomyosin complex has been established. It is proposed that the two states of actomyosin indicate the (actin—two difference myosins conformere) complex presence in solution.

Скелетные мышцы—актомиозин—суперпреципитация—АТФаза—ионная сила

Предположения о том, что многостадийное протекание СПП может быть обусловлено неоднородностью актомиозиновых растворов [5, 13] либо прохождением фермент-субстратным комплексом ряда промежуточных состояний [6, 10, 11], до последнего времени остаются недоказанными.

Нами ранее было показано, что, варьируя ионной силой раствора, можно вызвать противоположные изменения в кинетике отдельных стадий СПП и АТФазы натурального актомиозина [2]. Было высказано предположение о том, что на разных стадиях в эти реакции вступают два типа актин-миозиновых комплексов с различными механизмами функционирования.

В настоящей работе предпринята попытка обосновать эту точку зрения путем сопоставления некоторых структурных параметров актомиозиновых макромолекул в условиях, обусловливающих их различное функциональное поведение.

Материал и методика. НАМ получали по описанному методу [8] из бедренных мышц беспородных белых крыс. Чистоту препаратов белка проверяли электрофоретически [12], а концентрацию определяли по A_{280} с помощью калибровочных кривых.

Кинетические кривые СПП и АТФазы НАМ регистрировали на установке, собранной по схеме [1], а графический расчет характеристических параметров на разных стадиях реакций производили согласно описанному ранее методу [2].

Измерения проводили в сантиметровых кюветах при суммарном объеме пробы 7 мл. В состав реакционной среды входили следующие компоненты: 20 мМ трис-HCl (pH 7.35), 4 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,5 мМ АТФ, 0,05 мМ $MgCl_2$, 1 мг/мл НАМ. Спектры УФ-абсорбции НАМ и светопоглощения катионного красителя АО записывали при 25° на спектрофотометре Specord M-40 (ГДР). Инкубационная среда содержала: 20 мМ трис-HCl (pH 7,35), 4 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1 мг/мл НАМ. АО применялся в конечной концентрации 10 γ/мл.

Результаты и обсуждение. Снижая либо повышая ионную силу раствора относительно значений, близких к физиологическим, можно добиться одностадийности СПП и АТФазной реакции НАМ (рис. 1). Вследствие большей продолжительности второй, более медленной ста-

дии этих реакций она разграничивается по времени наступления с первой, благодаря чему становится возможным проследить их поочередное появление при совместном протекании.

Более того, при условии двухстадийности СПП увеличение оптической плотности белковой суспензии в ходе второй стадии происходит после завершения первой, т. е. на фоне более высокой плотности раствора. Это обеспечивает «наседание» второй стадии СПП на первую и разделяет их по шкале оптической плотности (рис. 1, *а*). Аналогичные рассуждения справедливы и в отношении кинетики высвобождения неорганического фосфата в ходе АТФазной реакции (рис. 1, *б*).

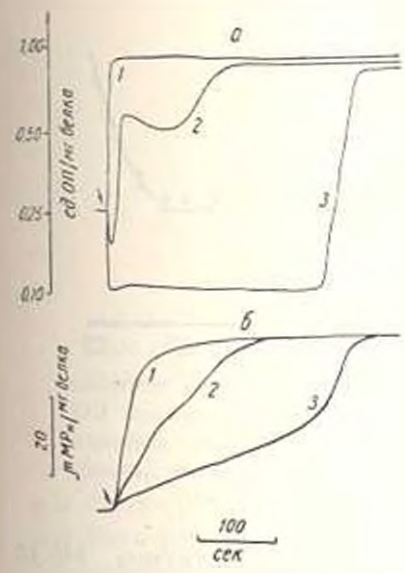


Рис. 1. Кинетические кривые СПП (*а*) и АТФазы (*б*) скелетных мышц крыс. 1—0,075 М KCl, 2—0,13 М KCl, 3—0,175 М KCl. Стрелками обозначен момент добавления АТФ.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании двух типов актомиозиновых комплексов, сильно различающихся по функциональным характеристикам. Их синхронное вовлечение в реакции СПП и АТФазы обусловливает по рассмотренному выше механизму двухстадийность кинетики этих процессов.

Следует отметить, что при ионной силе 0,13 степень каждой из отдельных стадий СПП составляет ровно половину максимальных значений этого параметра, характерных для соответствующих однофазных кинетических кривых. Поскольку степень СПП пропорциональна количеству вступивших в реакцию актомиозиновых макромолекул, на основании полученных соотношений можно рассчитать, что при указанной ионной силе раствора примерно половина белковых единиц находится в одном, а половина—в другом функциональном состоянии.

Для ответа на вопрос, что представляют из себя эти функциональные состояния и различаются ли структуры соответствующих им белковых комплексов, нами были изучены оптические характеристики препаратов НАМ до и после взаимодействия с АТФ при различных ионных условиях.

Как следует из рис. 2 *а*, изменение ионной силы сопровождается появлением двух максимумов УФ-абсорбции НАМ. Первый находится

при значениях ионной силы, близких к 0,075, а второй—в области 0,2, т. е. их положение совпадает с положением соответствующих максимумов степеней однименных стадий СПП, а также АТФазной реакции препаратов НАМ [2]. На основании этих данных можно предположить, что два структурных состояния белка соответствуют рассмотренным выше двум типам функционально неэквивалентных актомиозиновых комплексов. В таком случае мы вправе также говорить о том, что функциональные характеристики этих типов белковых комплексов определяются исходно их структурным состоянием.

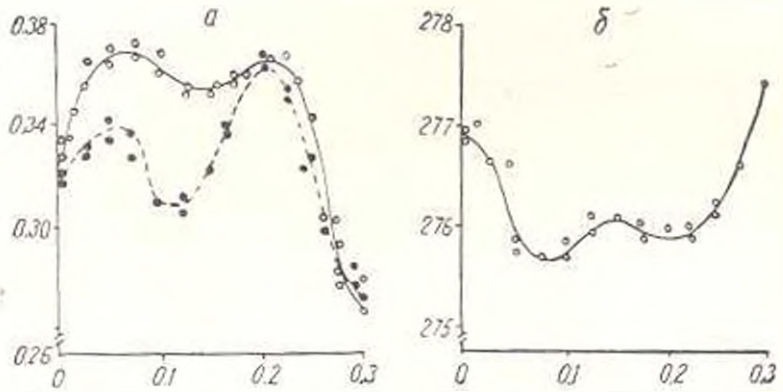


Рис. 2. Зависимость величины УФ-абсорбции (а) и положения спектрального максимума (б) НАМ скелетных мышц крыс от концентрации KCl. Сплошные и пунктирные кривые—соответственно до и после гидролиза АТФ. По оси абсцисс—концентрация KCl (М). По осям ординат: а—максимум УФ-абсорбции белка, б—длина волны (нм).

Обращает на себя внимание равенство двух максимумов УФ-абсорбции белка. Это может показаться странным, поскольку функциональные характеристики соответствующих им актомиозиновых комплексов существенно различаются. По-видимому, методом УФ-спектроскопии не представляется возможным уловить те тонкие структурные различия, которые обусловливают функциональные особенности актомиозиновых макромолекул. Не исключено также, что в основе увеличения поглощения белка в ультрафиолете при низких и высоких ионных силах лежат различные структурные перестройки, приводящие к одинаковому конечному оптическому эффекту.

Рост УФ-абсорбции по мере перехода актомиозиновых макромолекул преимущественно в одно или другое структурно-функциональное состояние сопровождается также коротковолновым (на 1—1,5 нм) сдвигом спектрального максимума (рис. 2 *б*). Это может послужить указанием на то, что в этих состояниях белковому комплексу отвечает более развернутая конформация либо меньшая степень агрегации актомиозиновых макромолекул.

О справедливости такого предположения свидетельствует также увеличение светопоглощения связанного с актомиозином АО при ионных силах, близких к 0,075 и 0,2 (рис. 3). Это происходит в основном за счет увеличения относительного вклада (а значит, и числа) мономе-

ров красителя* которые главным образом сорбируются рассредоточенными на поверхности белковых макромолекул анионными группировками (в отличие от мономеров, полимерные формы АО сильнее взаимодействуют с блочно расположенными группами, несущими электростатический заряд [3]). Следовательно, при переходе в любое из двух функциональных состояний актомиозиновый комплекс претерпевает такие структурные изменения, которые обусловливают более диффузное распределение заряда на поверхности его белковых компонентов.

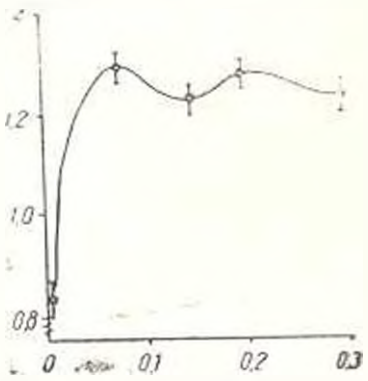


Рис. 3. Изменение отношения максимумов светопоглощения связанных с НАМ скелетных мышц крыс мономерных и полимерных форм АО при различных концентрациях KCl. По оси абсцисс—концентрация KCl (М); по оси ординат—$A_{456}/_{465}$.

После «отработки» на СПП максимум УФ-абсорбции НАМ в первом структурном состоянии значительно снижается (рис. 2, *а*). Это может быть результатом маскировки поверхностных хромофоров белковых компонентов комплекса вследствие его уплотнения в ходе первой стадии СПП. Вторая стадия реакции, очевидно, не сопровождается столь значительными конформационными перестройками, поскольку величина УФ-абсорбции в области высоких значений ионных сил одинакова в препаратах НАМ как до, так и после гидролиза АТФ.

Полученные результаты представляется целесообразным рассмотреть в свете современных представлений о существовании двух структурных форм миозина [7], также способных переходить друг в друга, в частности, при изменении ионной силы [9]. В таком случае можно предположить, что обнаруженные структурно-функциональные состояния актомиозина представляют собой комплексы актина с двумя формами миозиновых макромолекул (конформеров—по [4]). Доказательство этого предположения позволило бы в новом качестве рассмотреть вопросы, связанные с молекулярными механизмами реакции СПП, а также степенью адекватности ее процессу мышечного сокращения.

---

* В растворе АО находится в мономерной и полимерной формах, спектральные максимумы которых расположены в области 496 и 465 нм соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Заалишвили М. М.* Физико-химические основы мышечной деятельности. 123—125 Тбилиси, 1971.
2. *Тикунов Б. А.* Биолог. ж. Армении, 39, 3, 195, 1986.
3. *Филатова Л. Г., Штранкфельд И. Г., Есипова И. Г., Москаленко И. Е.* В сб. Биофизические основы и регуляция процесса мышечного сокращения. 113—119 Ереван, 1972.
4. *Леднев В. В.* В сб.: Механизмы контроля мышечной деятельности. 121—136, Л. 1985.
5. *Kominz D. R.* Biochemistry, 9, 1792, 1976.
6. *Matsunaga T., Noda H.* J. Biochem., 86, 67, 1986.
7. *Mortta F.* J. Biochem., 81, 313—320, 1977.
8. *Snaub M. C., Perry S. V.* Biochem. J., 107, 263—269, 1967.
9. *Shriver J. W., Sykes P. D.* Biochemistry, 21, 3022—3028, 1982.
10. *Szoor A., Kalapos J., Czabina S., Konya L.* Kiserleter Orvostudomany, 31, 303—307, 1982.
11. *Szoor A., Konya L., Czabina S.* Kiserleter Orvostudomany, 35, 56—61, 1983.
12. *Weber K., Osborn M.* Ibid., 244, 4406—4412, 1969.
13. *Yasui T., Watanabe S.* J. Biol. Chem., 98, 210, 1965.

Поступило 10.IV 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.21

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ *E. coli* ПОЛУЧЕННОЙ ПЛАЗМИДЫ pJZA-GH

Г. К. ШАХБАЗЯН, К. Ш. БАБАЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван.
Бурастанская экспериментальная совхоз-лаборатория, АрмССР

Получена рекомбинантная плазмида pJZA-GH, содержащая длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса и структурную часть гена гормона роста быка. Анализ РНК, выделенной из *E. coli*, несущей плазмиду pJZA-GH, показал наличие последовательности, гибридизующейся с геном гормона роста быка.

Ստացվել է ռեկոմբինանտ պլազմիդ pJZA-GH, որը պարունակում է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի վերջնային երկար կրկնություններ և ցուլի աճի հորմոնի գենի ստրուկտուրային մասը pJZA-GH պլազմիդ կրող E. coli-ից անջատված ՌՆԹ-ի անալիզը ցույց է տվել ցուլի աճի հորմոնի գենի հետ հիբրիդիզացվող հաջորդականությունների առկայությունը։

A recombinant plasmid *pJZA—GH*, containing long terminal repeat of Rous sarcoma virus and bovine growth hormone gene sequences is constructed. RNA molecules, isolated from *E. coli* cells, bearing *pJZA—GH* plasmid, contain sequences homologous to bovine growth hormone gene.

В последние годы интенсивное развитие получила техника микроинъекций генетического материала в зиготы и ранние эмбрионы различных животных [6, 11]. Для проведения подобных исследований предварительно получают серии рекомбинантных плазмид, которые имеют различные регулируемые и нерегулируемые промоторы, а также хорошо охарактеризованные структурные гены.

В качестве промоторов и энхансеров часто используются последовательности длинных концевых повторов ретровирусов. Этот подход особенно популярен еще и потому, что ретровирусы используются как векторы для трансформации клеток эукариот [3].

Цель настоящей работы заключалась в получении рекомбинантных клонов, несущих длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса (LTR RSV) [1] и структурную часть гена гормона роста быка [14]. LTR RSV, помимо последовательностей промотора и энхансера [8, 13], несут в себе участки, гомологичные бактериальным промоторам [5, 10]. Показано, что LTR RSV направляет в *E. coli* транскрипцию прилежащих к нему вирусных генов [9]. Кроме того, когда к LTR RSV был подшит бактериальный ген устойчивости к неомицину, то полученные рекомбинантные клоны экспрессировались как в прокариотической, так и в эукариотической системах [10]. Поэтому представлялось интересным прежде чем проводить микроинъекции полученных нами рекомбинантных клонов в зиготы мышей, проверить возможность транскрипции последовательностей гена гормона роста быка в *E. coli*.

Материал и методика. Клетки *E. coli* HB 101 выращивали на LB-агаре или жидкой L-среде. Использовали плазмиду pJZA 10 [1] и плазмиду pMA 5, любезно предоставленную Л. Геннингом (ИМГ АН СССР), рестрикционные эндонуклеазы и лигаза—НПО «Фермент», Вильнюс.

Плазмиды выделяли методом щелочной экстракции [4]. Размер и ориентацию вставок ДНК в рекомбинантных плазмидах определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном пластинчатом геле в буфере (мМ): 40—CH_3COONa, 40—Трис CH_3COOH, 1—ЭДТА (pH 7.7). Полученные фрагменты анализировали после окраски бромидом этидия. Фрагменты ДНК нужного размера элюировали из геля методом электроэлюции [2].

Расщепление ДНК соответствующими рестриктазами проводили в буфере, содержащем (мМ): 7 Трис-HCl (pH 7.5), 7 $MgCl_2$, 1 ДТТ и 50 NaCl, при 37° в течение 1 часа. После инкубации препарат прогревали в течение 10 мин при 65° для инактивации фермента. К расщепленной ДНК добавляли ДНК векторной плазмиды, предварительно линеаризованной и обработанной щелочной фосфатазой. Лигирование вели в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 7 мМ $MgCl_2$, 10 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА, 7 мкМ АТР. На 1 мкг ДНК добавляли 2 единицы активности лигазы. Инкубировали 12—16 ч при 12.5°.

Трансформацию клеток *E. coli* HB 101 проводили по методу, описанному ранее [1]. Эффективность трансформации определяли по количеству колоний, выросших на чашках с LB-агаром, содержащим 40 мкг/мл ампициллина. Трансформанты тестировали анализом ДНК рекомбинантных плазмид по их подвижности в электрофорезе и расщеплению различными рестриктазами.

Выделение РНК из клеток *E. coli* проводили экстракцией горячим фенолом [2], электрофорез и блоттинг РНК—по методу Томас; гибридизацию фильтров—с ^{32}P-меченными пробами pBR 322 и фрагментом ДНК, специфичным для гена гормона роста быка; гибридизацию—в 50%-ном формамиде при 42° в течение 48 ч; отмывку—в 0.1

SSC, 0,1 SDS при 42°. После отмывки фильтр экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1.

В отдельных случаях препараты РНК предварительно обрабатывали ДНКазой и РНКазой.

Результаты и обсуждение. Плазмида pJZA 10, как видно из рис. 1, представляет собой pBR 322 со встроенным по сайтам Eco R1-BamH1 участком провирусной ДНК RSV, содержащим интактный LTR, нетранслируемый участок перед геном gag (ген внутренних белков вириона) и фрагмент, кодирующий первые несколько аминокислот гена gag [1]. Эта плазмида использовалась в работе в качестве вектора для подстройки к последовательностям LTR RSV структурной части гена гормона роста быка. Структурную часть гена гормона роста быка вы-

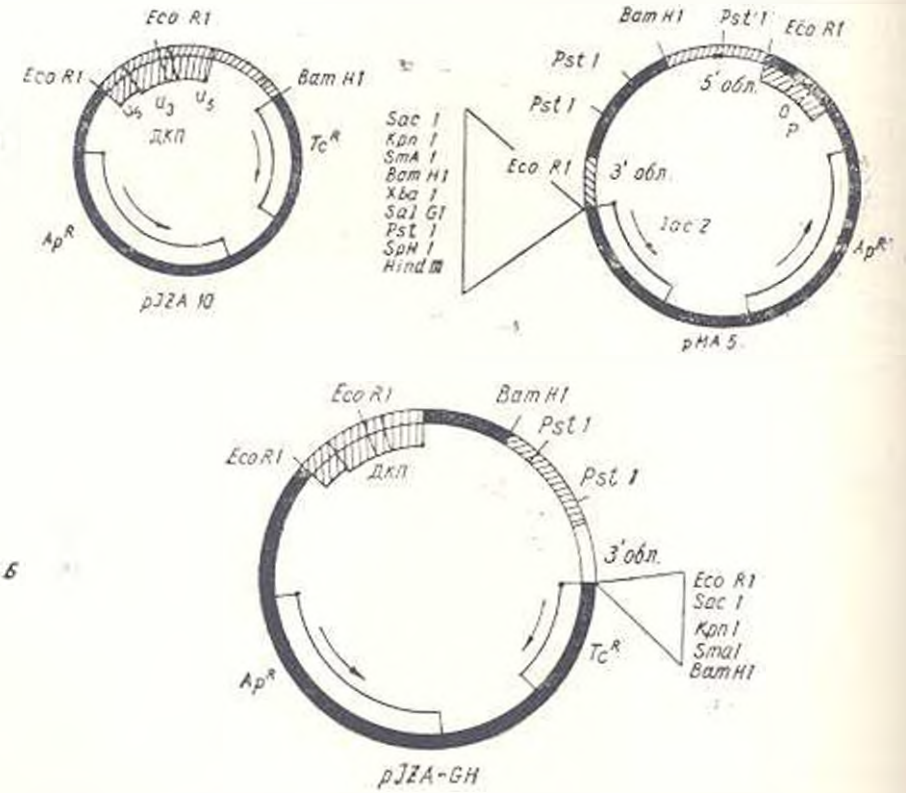


Рис. 1. Схематическое изображение плазмид, использованных в работе: А) структура плазмид pJZA 10 и pMA 5; Б) структура полученной рекомбинантной плазмиды pJZ-GH.

делили из рекомбинантной плазмиды pMA 5, которая представляет собой рекомбинантную плазмиду, несущую в составе вектора pUC 19 по Eco RI сайту участок генома быка, содержащий ген гормона роста. Структурная часть гена гормона роста может быть выделена из состава плазмиды рестрикцией по Bam III, при этом вырезается фрагмент ДНК длиной 2.15 т. п. н., содержащий структурную часть гена гормона роста быка и 3'-область генома, прилегающего к этому гену. Причем обработка Bam H1 удаляет последовательности собственного промотора гена гормона роста [14].

Для получения рекомбинантной плазмиды, которая содержит в себе участок LTR RSV и структурную часть гена гормона роста быка (рис. 1 *Б*), были проведены следующие процедуры. ДНК pJZA 10 обрабатывали рестриктазой Bam HI. С целью дефосфорилирования 5′-концов молекулы после линеаризации ДНК обрабатывали щелочной фосфатазой (подобная обработка снижает вероятность самолигирования молекулы). ДНК pMA 5 рестрицировали одновременно Bam HI и Hind III, в результате чего в векторную молекулу встраивается только фрагмент, несущий структурную часть гена гормона роста, содержащий Bam HI концы. После лигирования смеси, содержащей рестрицированные ДНК pJZA 10 и pMA 5, проводили трансформацию клеток *E. coli* HB 101.

Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее подвижность при помощи электрофореза. Дальнейшему анализу подвергали те плазмиды, размер которых соответствовал ~ 7 т. п. н. Такие плазмиды рестрицировали Eco RI. В случае получения нужного рекомбинанта при рестрикции Eco RI должны образовываться фрагменты 0.35, 3.0, 4.0 т. п. н. На рис. 2 приведено электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмид pZJA 10, pMA 5 и № 84, полученных в результате рестрикции Eco RI и Bam HI. Видно, что клон № 84, обозначенный нами как pJZA-GH, представляет собой искомый рекомбинант, несущий последовательности LTR RSV и структурную часть гена гормона роста быка. Рестрикционный анализ показывает также ориентацию гена гормона роста быка в плазмиде pJZA-GH: начало считывания гена гормона роста прилегает к промоторной части LTR RSV.

Ранее было показано, что в составе LTR RSV имеются последовательности, гомологичные промотору бактериальной природы, которые способны направлять транскрипцию прилегающего к ним генетического материала в *E. coli* [5, 10]. Полученные авторами рекомбинантные клоны активно экспрессировались также и в эукариотических клетках. Поэтому нами был проведен предварительный анализ транскрипционной активности клона pJZA-GH в клетках *E. coli* с целью последующего введения методом микроинъекций в зиготы мышей.

На рис. 3 приведены результаты блоттинг-гибридизации РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиды pJZA 10, pMA 5 и pJZA-GH с Pst I фрагментом ДНК pMA 5 длиной 1 т. п. н., содержащим только последовательности гена гормона роста быка. Так как при элюции Pst I фрагмента ДНК из геля неизбежно наличие примесей ДНК, несущих плазмидные последовательности, то для дифференциации транскриптов, синтезируемых с последовательностей гена гормона роста, от вектальных транскриптов в параллельном эксперименте проводили гибридизацию тех же препаратов РНК с ^{32}P меченной ДНК pBR 322 (рис. 3 Б).

Анализ синтезируемых транскриптов не выявил в клетках *E. coli*, несущих pJZA 10, последовательностей, гибридизирующихся только с Pst I фрагментом гена гормона роста. Все выявляемые полосы гибридизации совпадали с полосами гибридизации с pBR 322. Анализ тран-

криптов, синтезированных в клетках *E. coli*, несущих pMA 5, показал наличие гетерогенной популяции РНК, некоторые из которых гибридизуются только с Pst I фрагментом гена гормона роста. Транскрипты, выявляемые в нижней зоне геля, гибридизуются только с pBR 322. Транскрипция последовательностей гена гормона роста в клетках *E. coli*, несущих pMA 5, связана с наличием в векторной плазмиде pUC 19 последовательностей мощного промотора гена lac. Видимо, мы наблюдали появление сквозных транскриптов, инициированных с промотора гена lac и доходящих до конца структурной части гена lac, встроенного в pUC 19 вектор. При этом образуется транскрипт длиной 5.7 т. п. н. Транскрипты длиной 4 и 2.9 т. п. н., вероятно, образуются в результате неспецифической инициации или терминации транскрипции в участках, прилегающих к структурной части гена гормона роста. В целом уровень транскрипции в клетках *E. coli*, несущих pMA 5, значительно выше, чем в других исследованных клонах. Это обусловлено значительно большей копийностью рекомбинантных плазмид, полученных на основе векторов серии pUC, по сравнению с pBR 322.

При гибридизации РНК из клеток *E. coli*, несущих рекомбинантную плазмиду pJZA-GH, с Pst I фрагментом гена гормона роста, помимо pBR специфичных последовательностей выявляются два дополнительных транскрипта длиной 2.9 и 1.9 т. п. н. Транскрипт длиной 2.9 т. п. н. соответствует по длине РНК, которая может синтезироваться при инициации транскрипции с зоной бактериального промотора, локализованной в U_3 области LTR RSV. При гибридизации всех трех препаратов РНК с pBR 322 выявляется гетерогенная, но в целом сходная во всех препаратах популяция РНК размером от 1.6 до 0,5 т. п. н. Полоса 1.6 т. п. н., выявляемая во всех препаратах, соответствует по размеру транскрипту гена Amp^R. Более высокомолекулярные транскрипты 3.3 и 2.4 т. п. н., гибридизующиеся с pBR 322 в клетках *E. coli*, несущих pJZA 10, по всей вероятности, образуются в результате инициации транскрипции с бактериального промотора, локализованного в U_3 области LTR RSV [10].

Не исключено, что в препаратах РНК из *E. coli* могут содержаться примеси ДНК. Для проверки этого предположения в параллельных экспериментах гибридизационному анализу подвергали также препараты РНК, предварительно обработанные РНКазой и ДНКазой. Обработка РНКазой полностью снимала возможность гибридизации с ^{32}P меченным Pst I фрагментом гормона роста и pBR 322. Обработка ДНКазой, несмотря на некоторую деградацию препаратов, связанную с наличием в препаратах ДНКазы примесей РНКазы, практически не изменяла картину гибридизации.

Таким образом, при анализе РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиду pJZA-GH, выявляется дискретный транскрипт длиной 2.9 т. п. н., инициируемый с промоторных последовательностей LTR RSV и содержащий последовательности структурного гена гормона роста быка.

На основании приведенных данных можно предположить, что полученная рекомбинантная плазмида pJZA-GH будет способна нормально

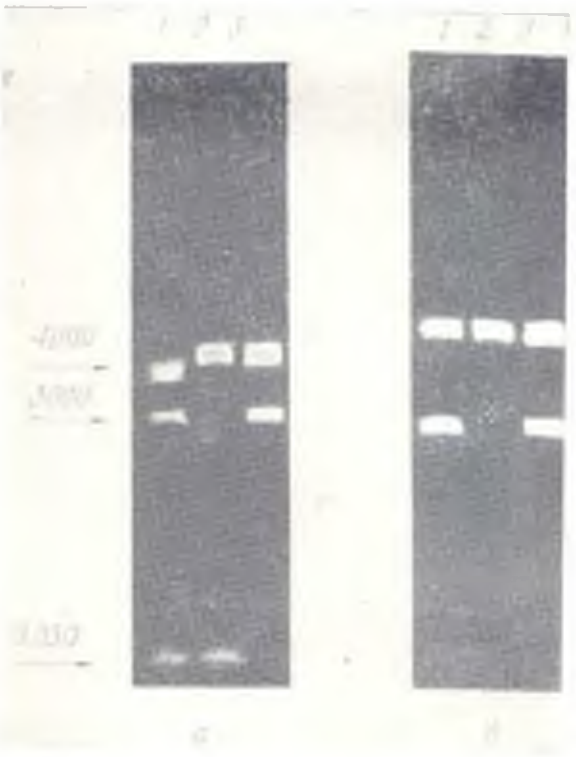


Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмид 1—pJZA-GH, 2—pJZA-18, 3—pMAA, полученных в результате рестрикции а—Eco RI и б—Bam HI.

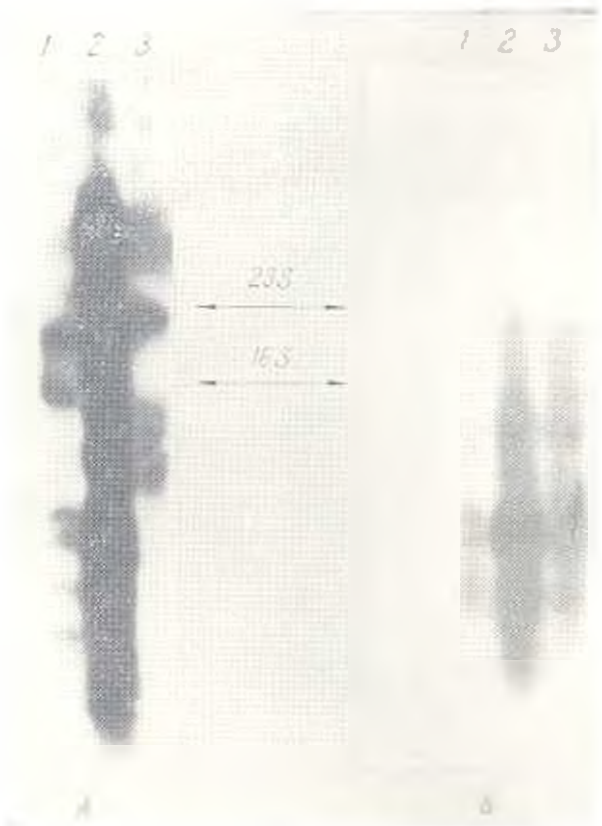


Рис. 3. Блоттинг гибридизации РНК, выделенной из клеток *E. coli*, несущих плазмиды: 1 – pJZA GH, 2 – pMA 5, 3 – pJZA 10: А) с PstI фрагментом ДНК pMA 5 длиной 1 [illegible] п.н.; Б) с [illegible]P меченной ДНК pBR 322.

транскрибироваться в клетках мышей после микроинъекций ее в их зиготы. Это предположение подтверждается также и данными о том, что ген гормона роста при подшивке к нему LTR RSV и состоянии экспрессироваться в культуре клеток после трансфекции [7, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Амбарцумян Н. С., Татосян А. Г.* Биолог. ж. Армении, *37*, 619—626, 1984.
2. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* В кн.: Молекулярное клонирование, М., 1984.
3. *Bernstein A., Berger S., Huszar D., Dick J.* Genet. eng., *7*, 235—261, 1985.
4. *Birnboim U. C., Doly J.* Nucl. Acids Res., *7*, 1513—1517, 1979.
5. *Guntaka R. V., Mitsialis S. A.* Gene, *12*, 113—121, 1980.
6. *Hammer R. E.* Nature, *315*, 680—683, 1985.
7. *Kopchick J. J., Malavarca R. H., Livelli T. J., Leung F. C.* DNA, *4*, 23—33, 1985.
8. *Luciw P. A., Bishop J. M., Varmus H. E., Capecchi M. R.* Cell, *33*, 705—716, 1983.
9. *Mermer B., Malamy M., Coffin J. M.* Molec. cell. Biol., *3*, 1749—1758, 1983.
10. *Mitsialis S. A., Yong J. F., Pelese F., Guntaka R. V.* Gene, *16*, 217—225, 1981.
11. *Palmiter R. P., Brinster R. L.* Cell, *41*, 343—345, 1985.
12. *Pastean F., Tocci M. J., Leung F., Kopchick J. J.* Gene, *38*, 227—232, 1985.
13. *Weber F., Schaffner W.* EMBO J., *4*, 949—956, 1985.
14. *Woychik R. P., Camper S. A., Lyons R. H., Horowitz S., Goodwin E. C., Rottman F. M.* Nucl. Acids Res., *10*, 7197—7210, 1982.

Поступило 29.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.352.315+23

ВЕЛИЧИНА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ И РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН КЛЕТОК

К. А. БАГРАМЯН, Э. А. КАРАГУЛЯН, А. А. ТРЧУНЯН, Г. Г. САРКИСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Предполагается, что образование отрицательных значений ОВП в процессе роста бактериальной суспензии определяет готовность клеток к жизнедеятельности. Показано, что изменения ОВП этой суспензии обусловлены процессами, происходящими непосредственно на поверхности бактериальной мембраны, тогда как в окружающей среде эти изменения не наблюдаются.

Ներկայացված է, որ բակտերիալ սուսպենզիայի աճման ընթացքում ՕՎՊ-ի բացասական արժեքների առաջացումը որոշված է բջջային մեմբրանի ռեդոքս-վիճակով, որի վերականգնված վիճակը, հնարավոր է, որոշում է բջիջների պատրաստու-

Сокращения: ОВП. E_h—окислительно-восстановительный потенциал.

կանությունը կենսադրժանությունը: Ցույց է տրված, որ սուսպենզիայի ՕՎՊ-ի փոփոխությունները պայմանավորված են անմիջականորեն բակտերիալ մեմբրանի վրա տեղի ունեցող պրոցեսներով:

We suppose that negative significance of oxidation—reduction potential during the bacterial growth is determined by redox—state of cell membranes. The reduced state of membrane is probably necessary for normal functions of cells. It is demonstrated that oxidation—reduction potential changes in bacterial suspension are due to cell membrane surface processes.

Бактериальная суспензия—окислительно-восстановительный потенциал—редокс-*состояние мембран.*

В последние годы в литературе появились данные о регуляторной роли ОВП во многих биологических процессах [6, 8, 9—11]. В связи с этим становится важным выяснение механизма образования ОВП и его локализации. Высказано предположение [2—4], что изменения E_h культуральной жидкости в процессе роста бактерий являются результатом выброса окислительно-восстановительных эквивалентов в окружающую среду, своеобразной подготовкой редокс-условий, в которых становится возможным их развитие и рост. Вместе с тем в последнее время высказывается мнение, что при различных процессах, в частности, при работе транспортных систем, происходят изменения окислительно-восстановительного состояния сульфгидрильных групп мембранных белков [1, 8—10]. Естественно, возникает вопрос, среда или клетки ответственны за изменение ОВП бактериальной суспензии.

Материал и методика. Использовали бактерии *Escherichia coli* К-12 (λ), дикий тип. Клетки выращивали при 37° в течение 18—22 ч. без встряхивания, в 800 мл пептонной среды с глюкозой, залитой в литровые колбы. После выращивания бактерии отмывали в дистиллированной воде и переносили в экспериментальный раствор, содержащий фосфатно-трисовый буфер, 1 мМ KCL, 1 мМ NaCL и 0,4 мМ $MgSO_4$ (pH раствора 7,6). Глюкозу вводили в концентрации 22 мМ, феррицианид $K_3[Fe(CN)_6]$—10 мМ, толуол—1 мкл/мл. Сферопласты *E. coli* получали обработкой бактерий пенициллином по методу Кабака [7].

ОВП бактериальной суспензии измеряли с помощью платинового электрода типа ЭПВ-1, вспомогательного электрода типа ЭВЛ-1 М3 и регистрировали на самопишущем потенциометре типа КСП-4.

Каждая кинетическая кривая, приводимая в работе, представляет собой одну из, по крайней мере, трех записей данной серии экспериментов. Кривые показывают динамику установления ОВП на электроде в новой среде, величина которого стабилизируется в течение 15—25 мин. В то же время при введении добавок ОВП изменяется до нового значения в пределах 5—8 мин.

Результаты и обсуждение. Величина ОВП суспензии бактерий *E. coli* (18—22 ч после инокуляции в пептонной среде) составляла—200 мВ (рис. 1, *а*). После осаждения клеток ОВП надосадочной жидкости оказался в области положительных значений (+200 мВ), а E_h осадка составлял—350—400 мВ (кр. 2 и 3 соответственно). После кипячения бактериальной суспензии E_h был близок к ОВП надосадочной жидкости. Полученные результаты свидетельствуют о том, что величина E_h суспензии бактерий близка к таковой клеток.

На рис. 1б представлены результаты экспериментов, в которых к бактериям в качестве восстановительного агента добавляли глюкозу [4]. Видно, что E_h суспензии бактерий после установления потенциала на электроде составлял —550 мВ (кр. 1). После измерений клетки бактерий осаждали и измеряли редокс-потенциал в осадке и надосадочной жидкости. Кр. 2 и 3 показывают динамику установления E_h на

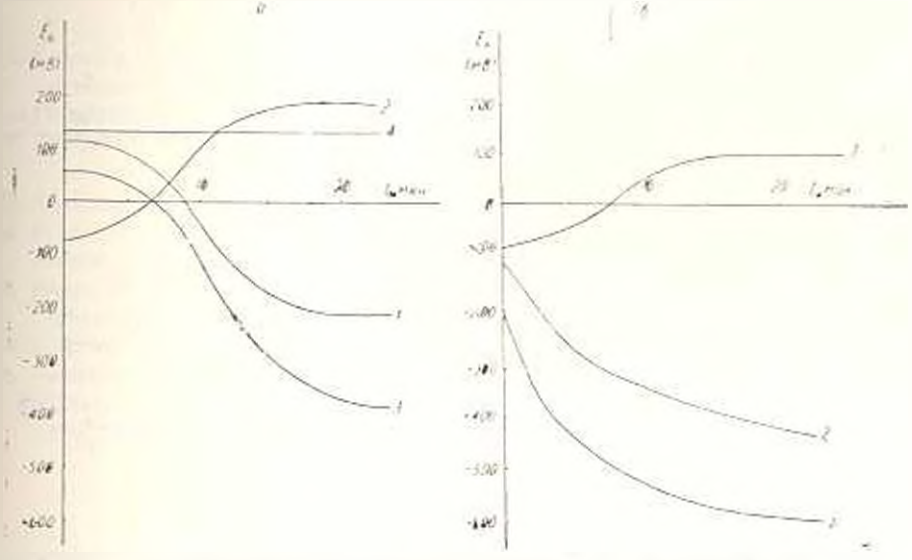


Рис. 1. а—Изменение E_h в суспензии бактерий *E. coli* K-12 (λ) (кр. 1), 2—в надосадочной жидкости, 3—в осадке бактерий, 4—E_h, измеренный после кипячения суспензии клеток. б—изменение E_h в суспензии бактерий *E. coli* после добавления глюкозы (клетки осаждали, отмывали в дистиллированной воде и переносили в экспериментальный раствор, содержащий фосфатно-трисовый буфер, 1 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 0,4 мМ $MgSO_4$, pH раствора 7,6). Глюкозу добавляли в концентрации 22 мМ. 2—изменение E_h в осадке бактерий той же суспензии с глюкозой, 3—в надосадочной жидкости.

электроде в осадке и надосадочной жидкости. Величина ОВП в осадке бактерий была близка к таковой суспензии (—350 мВ), в то время как в надосадочной жидкости этот показатель находился в области положительных значений и составлял примерно +100 мВ. Добавление феррицианида $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве окислителя [9] к бактериальной суспензии приводит к повышению E_h до +370 мВ (не показано). В осадке той же суспензии с феррицианидом он был выше (—200 мВ), чем редокс-потенциал в осадке бактерий после добавления глюкозы (рис. 1 б, кр. 2), E_h надосадочной жидкости составлял +260—+270 мВ.

Достоверность нашего предположения проверялась в экспериментах с применением толуола. В присутствии толуола E_h бактериальной суспензии после добавления глюкозы снижается до —250 мВ (рис. 2 *а*, кр. 1), в то время как в той же среде без толуола E_h суспензии падает до —550 мВ (кр. 2). Обработка бактерий толуолом приводит к нарушению целостности мембран бактерий и образованию значительных отверстий в них, а это, в свою очередь, ведет к уменьшению, по крайней

мере, разности электрохимических потенциалов — $\Delta\mu^{H^+}$ [5]. В литературе имеются данные о влиянии $\Delta\mu^{H^+}$ на редокс-потенциал мембран бактерий [9—11]. Возможно, что изменения E_h суспензии клеток в данном случае обусловлены изменением $\Delta\mu^{H^+}$, в свою очередь, определяемого мембранными процессами.

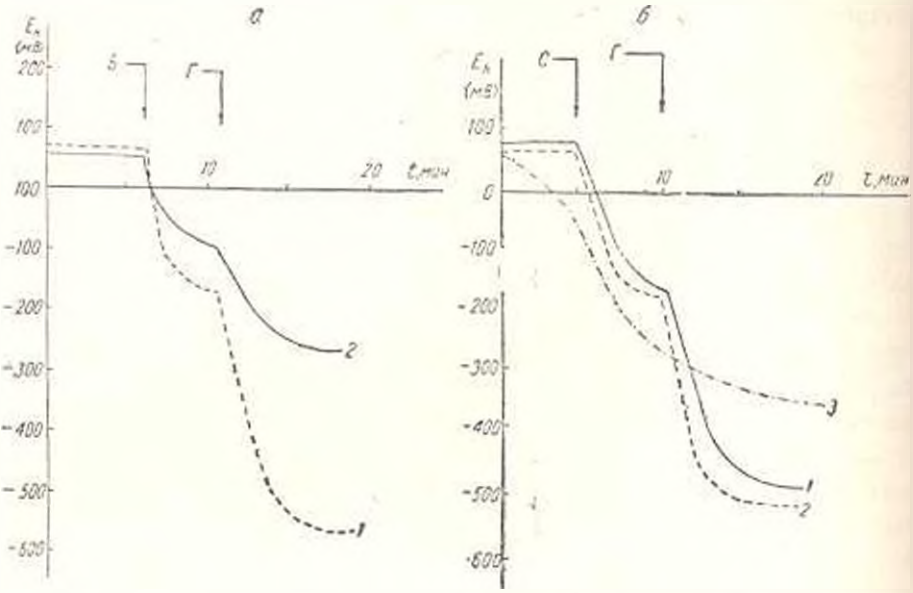


Рис. 2. *а* — изменение E_h в суспензии бактерий *E. coli* (кр. 1) и после их обработки толуолом (1 мкл/мл, кр. 2). Стрелками указано введение бактерий (Б) и глюкозы (Г, 22 мМ). *б* — изменение E_h в суспензии сферопластов *E. coli* (кр. 1), 2 — в суспензии интактных бактерий, 3 — в осадке сферопластов.

Проведенные эксперименты показали, что за отрицательное значение ОВП в суспензии бактерий ответственны сами клетки, вернее, клеточные мембраны. Для уточнения локализации ОВП и реакции, его определяющих, был измерен редокс-потенциал суспензии сферопластов. Известно, что в присутствии пенициллина прекращается образование клеточной оболочки бактерий и они оказываются отделенными от среды только плазматической мембраной [7]. Из рис. 2 *б* можно видеть, что динамика E_h суспензии сферопластов очень сходна с таковой интактных клеток (кр. 1 и 2 соответственно).

Утверждение о том, что изменение E_h бактериальной суспензии обусловлено выбросом веществ из клеток в среду, было обосновано тем, что при изолировании электрода от клеток с помощью коллодийного мешочка он не может реагировать на снижение E_h на клетках при добавлении глюкозы, поскольку нарушается его контакт с ними, и, следовательно, за низкие значения E_h ответственна именно среда, а не клетки [2—4]. Наши исследования показали, что величина ОВП среды, отделенной от клеток, отличается от редокс-потенциала суспензии бактерий примерно на 100 мВ, в то время как отличие E_h осадка от E_h бактериальной суспензии составляет 200 мВ (рис. 1 *а*). В другом случае (рис. 1 *б*) при добавлении глюкозы разница в значениях E_h суспензии и осад-

ка составляла 200 мВ, а для суспензии и надосадочной жидкости — 370 мВ, при этом E_h осадка клеток бактерий на 200 мВ более отрицателен. На основании полученных данных мы приходим к выводу, что изменения ОВП происходят на мембранах бактериальных клеток и уже как вторичный процесс отражаются на редокс-состоянии суспензии клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Глаголев Л. Н.* Тез. симп. ФЕМО. 172. Пушино. 1983.
2. *Октябрьский О. Н., Пшеничнов Р. А.* Микробиология, 51, 515, 1982.
3. *Октябрьский О. Н., Смирнова Г. В., Зеленин Е. Н.* Биофизика, 22, 831, 1984.
4. *Работнова И. Л.* Роль физико-химических условий (pH и rH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. М., 1957.
5. *Eisenstadt E.* J. Bacteriol., *112*, 264, 1972.
6. *Goldenberg H.* Biochimica et Biophysica Acta, *694*, 203, 1983.
7. *Kaback H. R.* Methods in Enzymol., 22, 99, 1971.
8. *Regen D. M., Schraw W. P., Tapley K. J. and Jultao S. F.* Biochimica et Biophysica Acta, *641*, 62, 1981.
9. *Robillard G. T., Konings W. N.* Biochemistry, *20*, 5025, 1981.
10. *Robillard G. T., Konings W. N.* Eur. J. Biochem., *121*, 597, 1982.
11. *Robillard G. T., Konings W. N.* Plasmalemma and Tonoplast Funct. Plant. Cell. Proc. Int. Workshop. Strasbourg, Sept. 8–11, 1981, 313, 1982.

Поступило 19.11.1988 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 615.281:547.447.5:466.22

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОХЛОРИДА ЭТИЛОВОГО ЭФИРА N-/β-(п-ХЛОРБЕНЗОИЛ) ЭТИЛГЛИЦИЛГЛИЦИНА

Ю. З. ТЕР-ЗАХАРЯН, Р. В. АГАБАБЯН, А. Г. АГАБАБЯН, Г. А. ГЕВОРКЯН, О. Л. МИДЖОЯН

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Миджояна
АН АрмССР, Ереван

Показано, что новый β-аминокетон—гидрохлорид этилового эфира N-/β-(п-хлорбензоил)этилглицилглицина *in vitro* характеризуется широким спектром антибактериального действия, особенно в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных культур. Соединение сохраняет антибактериальную активность и в опытах *in vivo*.

Բետա-ամինակետոն՝ N/β-(պ-քլորբենզոիլ) էթիլգլիցիլգլիցինի էթիլ եթերի հիդրոքլորիդը in vitro ունի հակաբակտերիալ ազդեցության լայն սպեկտր, հատկապես դրամ-դրական և որոշ դրամ-բացասական միկրոօրգանիզմների նկատմամբ։ Միացության հակաբակտերիալ ակտիվություն պահպանվում է նաև in vivo փորձերում։

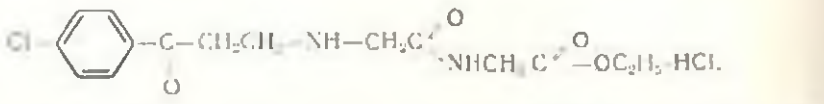
Beta-aminoketone, the hydrochloride of the ethyl ester of N-/β-(p-chlorobenzoyl) ethylglycylglycine *in vitro* is characterized by a broad spectrum

Сокращения: ТСХ—тонкослойная хроматография, МПК—минимальная подавляющая рост концентрация, МПД—максимально переносимая доза.

of antibacterial effect, especially against gram-positive and some gram-negative cultures. The compound maintains its antibacterial activity in *in vivo* experiments as well.

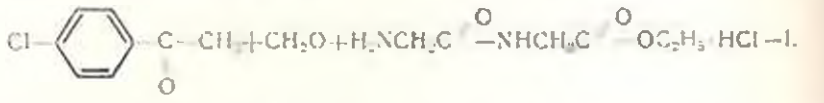
Гидрохлорид этилового эфира N-/β-(п-хлорбензоил)этил/глицилглицина—антибактериальная активность—диоксидин.

В ряду β-аминокетонов, как известно, найдены соединения с выраженной антибактериальной активностью [4, 7, 8]. Ранее нами было показано, что среди аминокислотных производных β-аминокетонов есть малотоксичные соединения, обладающие антибактериальным действием [1]. В продолжение работ в этом направлении был впервые синтезирован β-аминокетон—производное эфира глицилглицина I и изучены его антибактериальные свойства.



I

Материал и методика. Гидрохлорид этилового эфира N-/β-(п-хлорбензоил)этил/глицилглицина (I) получен аналогично аминокислотным производным β-аминокетонов [1] реакцией Манниха из п-хлорацетофенона, параформальдегида и гидрохлорида этилового эфира глицилглицина (II):



Строение соединения I подтверждено данными ИК-спектроскопии, чистота—элементным анализом и ТСХ. Гидрохлорид этилового эфира глицилглицина (II) получен по описанной методике [3]. ТСХ проведена на пластинках с закрепленным слоем силикагель—гипс, элюент—н-бутанол—этанол—уксусная кислота—вода, 8:2:1:3. ИК-спектры сняты на спектрометре UR-20 (ГДР).

Антибактериальная активность впервые синтезированного соединения—гидрохлорида этилового эфира N-/β-(п-хлорбензоил)этил/глицилглицина (I)—изучена в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Антимикробное действие соединения I *in vitro* определяли общепринятым методом серийных разведений на мясопептонном бульоне (pH 7,2—7,4) в отношении разных видов бактерий, приведенных в табл. 1. Посевная доза культуры—$1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл среды. Контролем служили пробирки со средой без соединения. Результаты опытов учитывали после инкубации бактерий в течение 18—20 ч при 37°. Определяли МПК соединения, выраженные в мкг на 1 мл. В качестве контрольного препарата был взят диоксидин [5]—растворимый антибактериальный препарат широкого спектра действия, применяемый для лечения тяжелых форм гнойно-воспалительных процессов, вызванных грамотрицательной флорой или стафилококком. Соединение I и диоксидин испытывали в параллельных опытах.

Острую токсичность определяли при однократном подкожном введении белым мышам. Определяли также МПД.

Изучение антибактериального действия соединения I в опытах *in vivo* проводили на модели стафилококковой и дизентерийной инфекций, вызванной внутрибрюшинным введением культуры [6]. Использовали заражающие дозы, вызывающие 100%-ную гибель нелеченых (контрольных) животных. Соединение I вводили в дозе 1000 мг/кг однократно, подкожно. Активность оценивали по суммарной продолжительности жизни мышей на протяжении всего срока наблюдений, выраженной в мыше-днях и в процентах по отношению к максимально возможной продолжительности жизни в данной группе животных при наблюдении в течение 10 суток [6]. Достоверность различий в продолжительности жизни леченых животных по сравнению с контрольными устанав-

лявали по альтернативной форме учета реакции с вычислением критерия χ^2 [2]. Использовано 110 белых беспородных мышей обоего пола массой 17—19 г.

Результаты и обсуждение. Изучение соединения I показало, что оно, как и диоксидин, характеризуется широким спектром антибактериального действия, уровень которого зависит от вида бактерий (табл. 1). Более чувствительны к нему грамположительные бактерии, из грамот-

Таблица 1. Спектр антибактериального действия гидрохлорида этилового эфира N-[8-(п-хлорбензоил)этилтаниллизина

Микроорганизм	МПК, мкг/мл	
	Соединение I	Диоксидин
St. aureus 209р, чувствительный	35	60
St. aureus пенициллинустойчивый	17	60
St. albus	35	120
Str. faecalis	4	30
Micrococcus H.	17	60
Sarcina lutea	17	60
B. megaterium	35	30
B. mesentericus	35	60
E. coli	620	15
Sh. dysenteriae Flexneri	70	3,5
S. typhi abdominalis	310	3,5
Ps. aeruginosa	35	60
Proteus vulgaris	310	3
P. rettgeri	150	150
P. mirabilis	310	15
Enterobact. aerogenes	35	15
Str. faecalis alcaligenes	35	60

рицательных — *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterium aerogenes*, *Streptococcus faecalis alcaligenes*, МПК которых находится в пределах до 30 мкг/мл. Для подавления роста других грамотрицательных микробов необходимы более высокие концентрации. Соединение I в отношении стафилококков и стрептококка несколько (до 3,5 р з) активнее диоксидина, уступая ему или находясь на одном уровне в отношении других тест-микробов.

Поскольку изучаемое соединение оказалось наиболее активным в отношении грамположительных кокков, его действие было испытано на различных штаммах стафилококка и фекального стрептококка. Использовали чувствительные и клинические антибиотикустойчивые штаммы стафилококков. Как видно из табл. 2, соединение I подавляет рост стафилококков в концентрации 4—70 мкг/мл, стрептококка — 4—17 мкг/мл. Диоксидин подавляет рост этих культур в концентрации 30—250 мкг/мл и 30—60 мкг/мл соответственно. Высокочувствительные стафилококки, МПК которых составляет 4—8 мкг/мл, выявлены как среди чувствительных (шт. 91), так и антибиотикустойчивых (шт. 4074, 5468) стафилококков. Рост других штаммов, независимо от их устойчивости, соединение I подавляет в концентрации 35—75 мкг/мл. По-видимому, противостафилококковая активность не зависит от антибиотикустойчивости, что ценно, так как на сегодняшний день поиск подобных препаратов актуален. Соединение I к тому же активно в отношении *E. aero-*

Таблица 2. Противококковая активность гидрохлорида этилового эфира N-[β-(п-хлорбензоил)этил]глицилглицина

Соединение	Минимальная подавляющая рост концентрация, мкг/мл																
	Staph. aureus														*Str. faecalis*		
	чувствительные				устойчивые к												
					пенициллину					метицил-лину		метициллину и оксацил-лину		цефорину			
	4—0	91	99	121	21п	1	39	47—0	88п	129р	64	5	4074	5468	1413	Ви 0—79	ATCC 8043
I	35	8	35	35	35	35	35	35	35	70	70	35	1	4	17	4	17
Диоксидин	120	120	60	60	120	120	120	250	250	250	120	70	30	30	60	30	30

genes, Str. faecalis alcaligenes, Ps. aeruginosa, Bac. megaterium, Bac. mesentericus, вызывающих трудно поддающиеся лечению инфекции.

Итак, опыты *in vitro* показали, что новый аминокетон—производное глицилглицина—характеризуется широким антибактериальным спектром действия, обладая выраженной активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных тест-культур.

Определение острой токсичности показало, что МПД изучаемого соединения составляет 2000 мг/кг.

Результаты изучения лечебного действия соединения I приведены в табл. 3, откуда видно, что оно проявляет противостафилококковую ак-

Таблица 3. Химиотерапевтическое действие соединения I при генерализованной стафилококковой и дизентерийной инфекции

Микроорганизм	Соединение		Число животных	Выжило	Суммарная продолжительность жизни животных		
					абс.*	%	P**
Золотистый стафилококк	штамм 4—0	I	15	7	70/150	40	<0.001
		контроль	10	0	0/100	0	
	штамм *Smith*	I	5	4	40/50	80	<0.001
		контроль	5	0	0/50	0	—
	штамм 186	I	5	1	12/50	24	<0.001
		контроль	5	0	0/50	0	—
Дизентерийная палочка	штамм 121	I	10	5	50/100	50	<0.001
		контроль	10	1	10/100	10	—

Примечание: * числитель—число мыше-дней в данной группе, знаменатель—максимально возможное число мыше-дней при наблюдении в течение 10 суток.

** Вероятность отсутствия различий между опытом и контролем.

тивность; при стопроцентной гибели контрольных животных изучаемое соединение на стафилококковой модели продлевает суммарную продолжительность жизни зараженных животных на 20—80% в зависимости от заражающего штамма. Соединение I обладает лечебным действием и при дизентерийной экспериментальной модели.

Результаты исследований на примере стафилококковой и дизентерийной инфекций белых мышей показали, что соединение I сохраняет антибактериальную активность и в организме животных.

Таким образом, получено новое малотоксичное соединение—гидрохлорид этилового эфира N-(β-(п-хлорбензоил)этил/глицилглицина, которое обладает выраженной антибактериальной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агабабян А. Г., Геворкян Г. А., Дургарян Л. К., Власенко Э. В., Агабабян Р. В., Тер-Захарян Ю. З., Тумаджян А. Е., Аюян Н. А., Мнджоян О. Л.* Хим.-фарм. журн., *18*, 691, 1984.
2. *Беленький М. Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. 30, Рига, 1959.

3. *Гринштейн Д. Ж., Винц М.* Химия аминокислот и пептидов. Пер. с англ. 425. М., 1965.
4. *Кудрин А. Н., Воробьев В. Г.* Аминокетоны. М., 1970.
5. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. 2, М., 298.
6. *Надейская Е. Н.* Методы экспериментальной химиотерапии. 109, 143, М., 1971.
7. *Dimmock J. R., Nyathi C. B., Smith P. J.* J. Pharm. Sci., 67, 1513, 1978.
8. *Schönenberger H., Bastug H.* Arzneim.-Forsch., 21, 68, 1971.

Поступило 7.VII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.15:591.8

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИДАЗЫ *D*-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

С. П. ОГАНЕСЯН, А. Г. БАБАЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Выделена и очищена оксидаза D-аминокислот из плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3. В очищенном препарате обнаружены два белка, обладающие D-аминокислотной оксидазной активностью. Изоферменты очищены в 65 и 60 раз, выход составляет 38 и 30% соответственно. Изучены некоторые их физико-химические свойства.

Մեղրաջրի վրա անեցված Aspergillus niger R-3 անբջիջ էքստրակտից անջատվել և մաքրվել է D-ամինաթթվային օքսիդազը: Մաքրված պրեպարատում հայտնաբերվել են D-ամինաթթուների օքսիդազային ակտիվությամբ օժտված երկու սպիտակուցներ: Ուսումնասիրվել են դրանց որոշ ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Երկու իզոֆերմենտները մաքրվել են 65 և 60 անգամ, ելքը համապատասխանաբար կազմել է 38 և 30 տոկոս:

D-amino acid oxidase has been isolated and purified from the cell-free extracts of *Aspergillus niger* R—3, grown on the molasses. The existence of two proteins with D-amino acid oxidase activity has been identified in the purified preparation. Some of their physico-chemical properties have been investigated. The degrees of purification of the isoenzymes are 65 and 60, the yield 38 and 30 per cent, respectively.

Плесневые грибы-Aspergillus niger—оксидаза D-аминокислот.

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3.)—фермент, катализирующий окислительное дезаминирование аминокислот с образованием соответствующей α-кетокислоты и аммиака. Имеет широкое биологическое распространение, обнаружен как в прокариотических, так и эукариотических органах. Однако физиологическая роль и значение D-аминокислотных оксидаз окончательно не выяснены.

Исследование D-аминокислотных оксидаз представляется актуальным как в связи с решением вопроса о физиологической их роли, так и в прикладном отношении, поскольку его можно применять для разрушения D-аминокислот в рацемических смесях с целью получения оптически чистых природных аминокислот.

Цель настоящего исследования заключалась в очистке и исследовании некоторых физико-химических свойств оксидазы D-аминокислот

из плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3, используемых в производстве лимонной кислоты.

Известна методика получения очищенного препарата оксидазы D-аминокислот из дикого штамма [7]. В нашей лаборатории разработан более простой способ получения частично очищенного препарата фермента и из штамма *Aspergillus niger* R-1 [3]. Данная работа представляет собой усовершенствование указанных способов получения очищенного препарата оксидазы D-аминокислот.

Материал и методика. Объектом исследований служили плесневые грибы *Aspergillus niger* R-3, полученные из Спитакского завода по производству лимонной кислоты. Культуру выращивали на отходах сахарного производства—мелассе.

Питательную смесь готовили следующим образом: 40 г мелассы растворяли в 40 г кипяченой охлажденной водопроводной воды, pH среды доводили до 7—10%-ным раствором Na_2CO_3, затем добавляли 2 мл 10%-ного раствора желтой кровяной соли и смесь кипятили в течение получаса для осаждения тяжелых металлов.

Объем доводили до 1 л кипяченой водой, добавляли 10 мл 1%-ного раствора KH_2PO_4 и 1 мл 1%-ного раствора $ZnSO_4$. Посев производили при температуре 42°, инкубацию—в термостате в течение четырех суток при температуре 32°. Полученную поверхностную культуру гомогенизировали в 0,05 М K/Na фосфатном буфере в течение 10 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Эльвержем-Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 11.000 об/мин в течение 30 мин.

Для определения оксидазной активности пробу инкубировали при 37° в течение 60 мин в 0,05 М K/Na фосфатном буфере (pH 8,3) в присутствии 10 мкМ аминокислоты. Реакцию останавливали 20%-ным ТХУ, после чего в экстракте определяли выделившийся аммиак микродиффузионным методом Зелинсона и модификации Силаковой [11]. Белок определяли по методу Лоури [9] и спектрофотометрически на СФ-16 (при 280 нм). Активность фермента выражали в мкМ аммиака, выделившегося при часовой инкубации на 1 г мицелия. Удельную активность выражали в мкМ NH_3 на 1 г белка.

Результаты и обсуждение. В целях получения активного препарата оксидазы D-аминокислот предварительно изучали динамику образования фермента у производственного штамма *Aspergillus niger*, цикл развития которого длится семь суток. Данные табл. 1 показывают, что активность оксидазы в клетках плесневых грибов проявляется на второй день инкубации и достигает максимального уровня на четвертый день. Ранее используемый нами штамм *Aspergillus niger* R-1 проявлял максимальную активность на третьи сутки роста [2].

Таблица 1. Активность оксидазы *D*-аминокислот в динамике роста плесневых грибов *Aspergillus niger R-3*

Дни инкубации	Количество биомассы	Активность, мкм NH_3 на 1 г мицелия	Дни инкубации	Количество биомассы	Активность, мкм NH_3 на 1 г мицелия
1	0,5	0	5	8,0	15
2	2,8	5	6	8,0	12,5
3	6,0	12,5	7	7,0	10
4	9,0	21,5			

Исследования показали также, что в клетках исследуемого штамма фермент имеет цитоплазматическую локализацию. Это согласуется с литературными данными, касающимися *Aspergillus niger* [2, 7]. В от-

личие от них, у дрожжей фермент локализуется в митохондриях [1]. Дальнейшие исследования мы проводили на клеточном экстракте четырехсуточной культуры. В следующей серии экспериментов была осуществлена очистка фермента (табл. 2).

Таблица 2. Этапы очистки оксидазы *D*-аминокислот из *Aspergillus niger* R-3

Этапы очистки	Объем, мг	Белок, мг	Активность фермента, мг·Ч	Удельная активность	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	25	351	90	0.2	1	100
Экстракт	21	200	86	0.5		
Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$ с последующей гельфильтрацией на сефадексе G-200	20	9	63	7	35	70
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ—сефадексе А-25						
Изофермент I	12	2.6	34	13	65	38
Изофермент II	12	2.4	27	12	60	30

На первом этапе бесклеточный экстракт подвергали обессоливанию сульфатом аммония. Активность фермента обнаруживалась во фракции белков, осаждаемых при 40—80%-ном насыщении сульфатом аммония, режим центрифугирования—11.000 об/мин в течение 30 мин. Осадок сульфатно-аммонийного препарата белков растворяли в 0.05 М K/Na фосфатном буфере (pH 8,3) и подвергали гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200 (65×80 см), уравновешенной тем же буфером. Профиль элюции с сефадекса G-200 представлен на рис. 1. Активность оксидазы проявляется во фракциях 9—15. В результате ферментный препарат очищается в 35 раз. Выход составляет 70%.

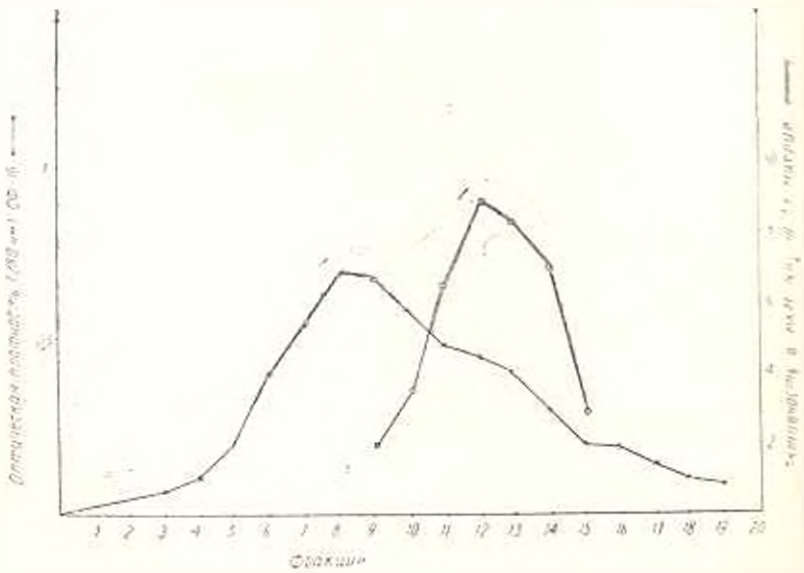


Рис. 1. Активность D-аминокислотной оксидазы после гельфильтрации на сефадексе G-200.

Полученные активные фракции подвергали дальнейшей очистке с помощью метода ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 (3×20 см), уравновешенной 0,05 М К/Na фосфатным буфером, pH 8,3. Объем фракции 4 мл, скорость элюции 1 мл в 1 мин. Белки, не связавшиеся с ионообменником, вымывались тем же буфером. Элюцию оставшихся на колонке белков проводили с помощью возрастающей концентрации NaCl—0,05, 0,1, 0,15, 0,2 М. Профиль элюции с сефадекса А-25 представлен на рис. 2.

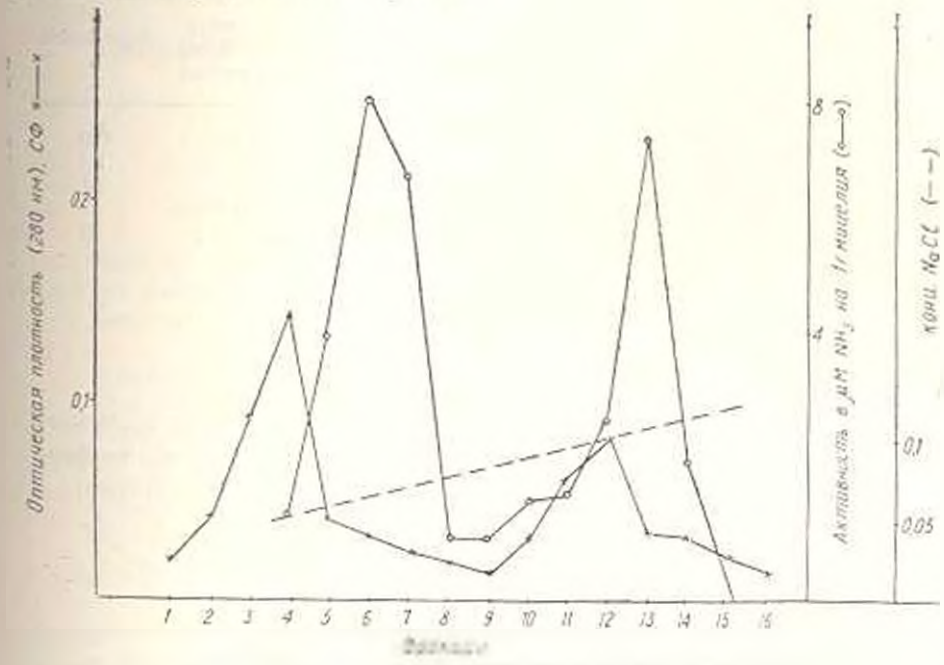


Рис. 2. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-25.

В результате ионообменной хроматографии были получены две белковые фракции, обладающие D-аминокислотной оксидазной активностью. Первая элюируется 0,05 М К/Na фосфатным буфером, а вторая — 0,1 М NaCl. Очевидно, получены два изофермента оксидазы D-аминокислот почти с одинаковой удельной активностью (12 и 13) и степенью очистки (30 и 32). Выход при этом составлял 38 и 30% соответственно. Таким образом, разработанная методика позволяет получать высокоактивные препараты изоэнзимов оксидазы D-аминокислот из производственного штамма *Aspergillus niger* R-3 с высоким выходом. Следует отметить, что в литературе известно наличие изоэнзимов оксидазы D-аминокислот лишь у *Trigonopsis variabilis* [1]. Дальнейшие исследования были посвящены изучению некоторых свойств обнаруженных изоферментов.

В табл. 3 представлены данные по субстратной специфичности изоэнзимов I и II, согласно которым как по субстратной специфичности, так и по интенсивности дезаминирования изученные белки близки. В обоих случаях дезаминируются шесть из десяти использованных D-аминокислот, причем с одинаковой интенсивностью. Исключение составляет лишь D-аланин, который дезаминируется в 2,5 раза интенсивнее изо-

ферментом II, по сравнению с первым. Изоферменты не проявляли активности по отношению к L-аминокислотам. Изучение влияния различных концентраций субстрата (D-метионина) на интенсивность дезаминирования показало, что насыщение фермента субстратом происходит при концентрации 5 мкМ.

Таблица 3. Дезаминирование аминокислот очищенными препаратами изоэнзимов (I и II) оксидазы *D*-аминокислот из *Aspergillus niger* R—3

Субстрат 181±10 мкМ	Изоэнзим I		Изоэнзим II	
	Активность, мкМ NH_3 на 1 г мицелия	Активность, %	Активность, мкМ NH_3 на 1 г мицелия	Активность %
D-метионин	6.2	100	5.6	100
D-α-аминомасляная кислота	5.2	84	4.8	85
D-аланин	1.6	26	3.9	67
D-валин	2.7	41	2.5	45
D-н-валин	2.9	47	2.8	50
D-триптофан	0	—	0	—
D-пролин	0	—	0	—
D-серин	0	—	0	—
D-лизин	0	—	0	—
D-аргинин	0	—	0	—
L-валин	0	—	0	—

Значение K_m определяли по методу Лайнуивера-Бэрка с использованием пяти концентраций субстрата (рис. 3). Установлено, что изоферменты близки по сродству к субстрату (0,75 и 1 мкМ соответственно).

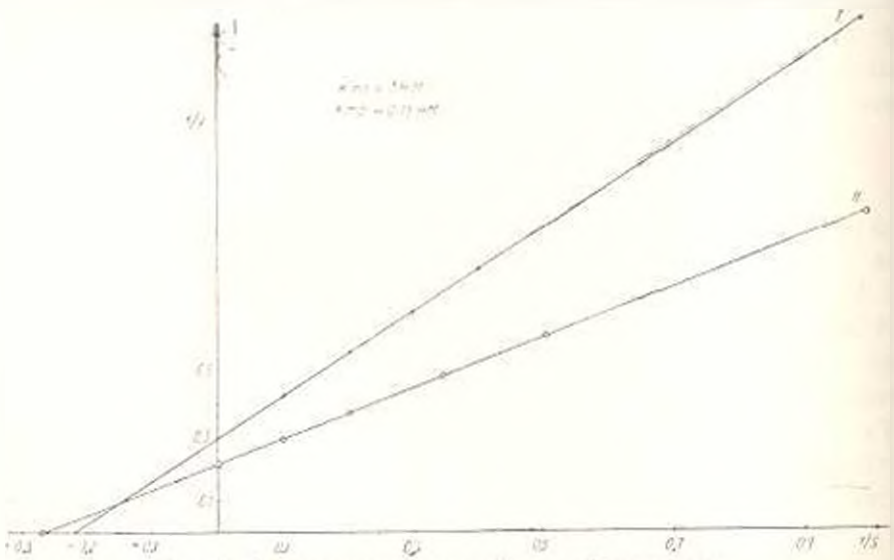


Рис. 3. Определение значения K_m для D-метионина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Багдасарян Е. Г., Даштян М. А.* Авторск. свид. № 780533.
2. *Даштян М. А., Оганесян С. В.* Биолог. ж. Армении, *36*, 11, 1983.
3. *Оганесян С. В., Даштян М. А.* Биолог. ж. Армении, *37*, 5, 1984.
4. *Силахова А. И., Труш Г. П.* Вопросы мед. химии, 8, 538—545, 1962.
5. *Berg Clarence P., Roden Franz* Anal. Biochem, *71*, 213—222, 1976.
6. *Curly Bruno, Ronchi Severino.* Biochem. et biophys acta, *327*, 2, 1973.

7. *Kishore G., Vaidenathan G. S.* Indian J. Biochem. Biophys., 13, 1973.
8. *Kubicek—Pranz Eva M.* J. Appl. Biochem., 7, 2, 101—113, 1985.
9. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J.* Biol. chem., 193, 1951.
10. *Simonetta M. P., Venoni M. A.* Ital. J. Biochem., 35, 1, 52A—54A, 1986.
11. *Szwajcer E., Mosbuck K.* Biotechnol. Lett., 7, 1, 1985.

Поступило 22.IX 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 591.526

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ, ЦИНКА И КОБАЛЬТА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОКОПЛАВОВ *GAMMARUS LACUSTRIS*

Р. О. ОГАНЕСЯН, Н. С. ОСТРОВСКИЙ, А. К. ОВСЕПЯН

Севанская гидробиологическая станция АН АрмССР, г. Севан

Удельная смертность бокоплавов *Gammarus lacustris* находится в степенной зависимости от концентрации ионов Cu, Zn, Co. Наибольшее токсическое действие на бокоплавов оказывают ионы Cu, затем Zn и Co.

Gammarus lacustris տարատեսակների անհատական մահացության կախումը Cu-ի, Zn-ի, Co-ի իոնների խտությունների քանակից է։ Կոպեպոդների վրա ամենից բունավոր ազդեցություն են ունենում Cu-ի իոնները, այնուհետև Zn-ինը և Co-ինը։

Specific mortality of *Gammarus lacustris* is degree related to the concentrations of Cu, Zn, Co ions. More toxic effect on *Gammarus lacustris* have Cu ions, then Zn and Co.

Бокоплавы Gammarus lacustris — удельная смертность — ионы меди, цинка, кобальта.

Изучение выживаемости животных под воздействием разных концентраций токсических веществ служит важным этапом токсикологических исследований. В настоящей работе приводятся результаты изучения зависимости удельной смертности бокоплавов *Gammarus lacustris* Sars от концентрации ионов разных металлов.

Материал и методика. Исследования проводили в 1983 г. в лабораторных условиях. Рачков с массой тела 28±3 мг по 10 экз. помещали в широкие цилиндрические сосуды с растворами разных концентраций солей $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$ и с отстоянной водопроводной водой (в качестве контроля). Концентрации ионов металлов использованные в экспериментах (рис. 1—3), подбирались таким образом, чтобы выживаемость гаммарусов изменялась в широких пределах. Опыт и контроль ставились в четырех повторностях. Наблюдения велись ежедневно, а в отдельных случаях (при высокой смертности рачков) — 2—3 раза в сутки. В течение всего эксперимента животных не кормили, поскольку растворенное органическое вещество, неизбежно появляющееся в воде при кормлении, может связывать ионы металлов с образованием малотоксичных комплексных соединений. Продолжительность экспериментов составляла 14 суток. Через каждые двое суток растворы и вода в контроле менялись. Температура растворов была близка к среднелетней температуре воды в зоне обитания рачков и составляла в опытах с ионами меди 18,3±0,4°, с ионами цинка — 19,1 ±0,8°, с ионами кобальта — 19,7±0,8°.

Одним из наиболее информативных показателей изменения численности животных в эксперименте при нулевой рождаемости служит удельная смертность особи (d(1), сут$^{-1}$).

---

* Островский Н. С., Овсепян А. К. Экспер. водн. токсикол. (Рига), 11, 85—91, 1986 г.

$$d(t) = -\frac{dN}{dt}\cdot\frac{1}{N},$$

где N и dN/dt—соответственно численность и абсолютная скорость уменьшения численности животных в момент времени t.

Средняя удельная смертность организмов (d, сут$^{-1}$) в эксперименте рассчитывалась по формуле [1]:

$$d = \frac{\ln N_1 - \ln N_2}{t_2 - t_1},$$

где N_1 и N_2—численность животных в последовательные моменты времени t_1 и t_2 (сут). Расчет летальных концентраций ионов металлов проводился по схеме, предложенной нами ранее*.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных данных (рис. 1—3) показал, что величины удельной смертности гаммарусов при низких концентрациях ионов меди (до 0,04 мг/л), цинка (до 0,1 мг/л) и кобальта (до 0,8 мг/л) статистически не отличаются от контрольных и составляют 0,077±0,017, 0,082±0,020 и 0,075±0,019 сут$^{-1}$ соответственно. В диапазоне более высоких концентраций меди (0,05—0,18 мг/л), цинка (0,12—1,4 мг/л) и кобальта (1—40 мг/л) зависимости удельной смертности рачков от концентраций ионов металлов в растворе (С, мг/л) хорошо аппроксимируются следующими степенными функциями:

для ионов меди

$$d = 1890 \cdot C^{2,45}, \quad (2)$$

для ионов цинка

$$d = 1,28 \cdot C^{1,183}, \quad (3)$$

для ионов кобальта

$$d = 1,125 \cdot C^{0,671}. \quad (4)$$

Удельная смертность рачков, рассчитанная по уравнениям (2)—(4), обусловлена не только гибелью животных в результате токсического действия ионов металлов, но и смертностью, связанной с условиями их содержания в эксперименте. Поэтому удельная смертность, обусловленная только токсическим действием ионов меди (d_{Co}), цинка (d_{Zn}), кобальта (d_{Co}) представляет собой разность между величинами, рассчитанными по уравнениям (2)—(4), и удельной смертностью рачков в контроле:

$$d_{Cu} = 1890 \cdot C^{2,45} - 0,077, \quad (5)$$

$$d_{Zn} = 1,28 \cdot C^{1,183} - 0,082, \quad (6)$$

$$d_{Co} = 0,125 \cdot C^{0,671} - 0,075. \quad (7)$$

Основываясь на этих уравнениях, несложно определить летальные для гаммарусов концентрации ионов металлов за любое количество суток. В качестве примера приведем расчет Cl_{50} ионов меди за четверо суток. В соответствии с уравнением (1) определим величину d_{Cu} при условии, что за 4 суток погибает 50% рачков. Тогда

$$d_{Cu} = \frac{\ln 100 - \ln 50}{4} = 0{,}1733 \text{ сут}^{-1}.$$

Приравняв правую часть уравнения (5) к 0,1733 сут$^{-1}$, определим концентрацию ионов меди, вызывающую 50%-ную гибель бокоплавов за первые четверо суток:

$$CL_{50} = \left(\frac{0{,}1733 + 0{,}077}{1890}\right)^{1/3{,}45} = 0{,}075 \text{ мг/л}.$$

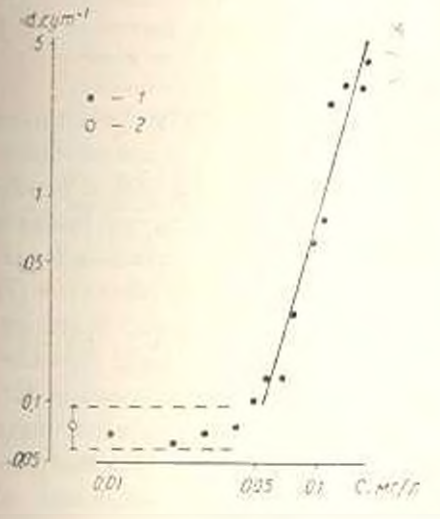


Рис. 1.

Рис. 2.

Рис. 1. Зависимость средней удельной смертности бокоплавов *G. lacustris* за время их жизни в эксперименте (d, сут$^{-1}$) от концентрации ионов меди (C, мг/л). 1 — опыт, 2 — контроль. Пунктирные линии — доверительные интервалы удельной смертности гаммарусов в контроле с надежностью 0,95.

Рис. 2. Зависимость средней удельной смертности бокоплавов *G. lacustris* за время их жизни в эксперименте от концентрации ионов цинка. Обозначения, как на рис. 1.

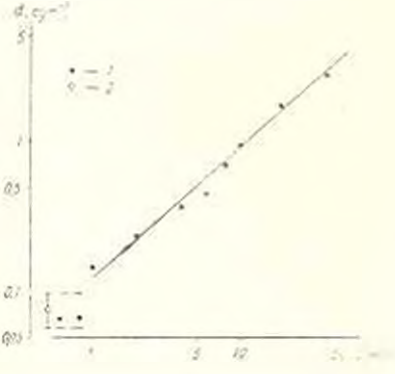


Рис. 3. Зависимость средней удельной смертности бокоплавов *G. lacustris* за время их жизни в эксперименте от концентрации ионов кобальта. Обозначения, как на рис. 1.

Для сравнения в таблице приведены концентрации ионов меди, цинка и кобальта, вызывающие 50%-ную гибель рачков *G. lacustris* (CL_{50}) за 1, 4, и 10 суток.

Концентрации ионов меди, цинка и кобальта (мг/л), вызывающие 50%-ную гибель рачков *G. lacustris* за 1, 4 и 10 сут (рассчитаны по уравнениям (5)—(7))

Ионы металлов	Сутки		
	1	4	10
Cu^{2+}	0.105	0.075	0.164
Zn^{2+}	0.651	0.256	0.164
Co^{2+}	8.04	2.20	1.18

Как видно, концентрации ионов меди, цинка и кобальта, вызывающие 50%-ную гибель рачков за сутки, в 1,6; 4,0 и 6,8 раз соответственно выше, чем концентрации ионов этих металлов, вызывающие подобный эффект за 10 суток. Данные таблицы свидетельствуют также о снижении токсического действия ионов металлов на *G. lacustris* в следующем порядке: Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}. С помощью уравнений (5)—(7) можно рассчитывать CL_0, т. е. максимальную концентрацию ионов металлов, при которой удельная смертность гаммарусов в опыте статистически не отличается от таковой в контроле. Приравняв уравнения (5), (6) и (7) к нулю, для ионов меди получим $CL_0 = 0{,}053$ мг/л, ионов цинка $CL_0 = 0{,}98$ мг/л, для ионов кобальта $CL_0 = 0{,}556$ мг/л. Следовательно, максимальные концентрации ионов металлов, вызывающие такую же смертность гаммарусов, как и в контрольных условиях, убывают в следующем порядке: Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}. Это подтверждает сделанный выше вывод об относительно высокой токсичности ионов меди и относительно низкой — ионов кобальта.

Таким образом, зависимость удельной смертности рачков *G. lacustris* в эксперименте находится в степенной зависимости от концентрации ионов меди, цинка и кобальта. Полученные соотношения между удельной смертностью рачков, обусловленной исключительно токсическим действием ионов меди, цинка и кобальта, и концентрациями ионов этих металлов позволяют вычислить для исследованных ионов летальные концентрации в пределах от CL_0 до $CL_{<100}$ за разные интервалы времени. Приведенные результаты свидетельствуют о снижении токсического действия ионов металлов на рачков *G. lacustris* в следующем порядке: Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}.

Поступило 28.IV 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 11, № 5, 1988 УДК 574.6+628.515+628.31

ПРИМЕНЕНИЕ ОБОБЩЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ К ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ РЕЧНОГО СТОКА НА СОСТОЯНИЕ ВОДЫ оз. СЕВАН

Г. П. ПИРУМЯН, Ю. И. СКУРЛАТОВ, Л. Г. МХИТАРЯН, А. И. МАРТИРЯН, И. М. БОЛДЫРЕВА

Ереванский государственный университет, Институт химической физики АН СССР, Москва, Севанская гидробиологическая станция АН АрмССР

Применены параметры самоочищающей способности и редокс-состояния природной воды совместно с биотестированием культурой инфузорий для оценки влияния стока р. Гаварагет на состояние водной среды оз. Севан. Показано, что сток р. Гаварагет нетоксичен и не оказывает отрицательного влияния на редокс-состояние воды.

Օգտագործված են բնական ջրի ինքնամաքրման հատկության և օքսիվեր-վիճակի պարամետրերը ինֆուզորիայի կուլտուրայով կենսատեստավորման հետ համատեղ Սևանա լճի ջրային միջավայրի վիճակի Գավառագետ գետի հոսքի ազդեցության գնահատման համար։ Ցույց է տրված, որ Գավառագետ գետի հոսքը տոքսիկ չէ և բացասական ազդեցություն չի ունենում ջրի օքսիվեր-վիճակի վրա։

The parameters of self-cleaning ability and redox-state of natural waters with biotesting of infusoria cultures to evaluate the influence of the meander of Gavaraget river on the state of the aqueous medium of Sevan lake have been used. It has been shown that Gavaraget river meander is not toxic and has no action on the redox state of the water.

Вода оз. Севан—самоочищающая способность—редокс состояние.

Самоочищающая способность и редокс-состояние природной воды могут рассматриваться как один из наиболее важных показателей качества природной воды, характеризующих не только направленность и интенсивность химических процессов самоочищения, но и токсические свойства воды в отношении гидробионтов [3].

Нами применены подходы [3] с параллельным токсикологическим контролем [1] к оценке влияния речного стока на состояние водной среды оз. Севан в районе впадения в него р. Гаварагет (основного притока Малого Севана).

Материал и методика. Биотестирование. Инфузория класса *Ciliata* подкласса *Holotricha*, отряда *Hymenostomata*. *Tetrahymena pyriformis* очень чувствительны к достаточно малым концентрациям загрязняющих веществ, попадающих в водные экосистемы. Короткий жизненный цикл развития инфузорий дает возможность быстро выявить характер действия токсикантов. Простота культивирования, доступность проведения исследований позволяют использовать этот тест-объект не только в лабораторных, но и полевых условиях.

Показателем токсичности испытуемой пробы являются подавление скорости прироста клеток инфузорий (в хроническом опыте в течение 96 ч) и их гибель (в остром опыте—15 мин, 1 ч).

Сокращения: ПНМД — параниторозодиметпланилин.

В лабораторных условиях инфузории культивируются на питательной среде (углекислосолевая дрожжевая) при температуре 18—22°.

Исследуемые пробы воды разливают в пробирки (высотой не более 5 см), число повторностей 5—10. Разбавляющей водой и контролем служит питательная среда, разбавленная в 10 раз. Общий объем жидкости не должен превышать 5 см. В каждую подготовленную пробу вносят по 0,04 мл 7-суточной культуры инфузорий. Перед микроскопированием опытные пробирки тщательно встряхивают и под микроскопом (марки МБС, МБС-1) в 5 каплях подсчитывают количество клеток инфузорий. Окуляр наводится на каплю, и в поле видимости подсчитываются инфузории, затем окуляр переводится на другую каплю и производится такой же подсчет и т. д. Для экспресс-оценки токсичности пробы воды численность живых клеток контролируется через 15 мин и через 1 час. На хроническом опыте—через 21, 48, 72, 96 ч в одно и то же время. О токсичном действии пробы воды судят по выживаемости и характеру движения инфузорий (нормальное, замедленное, вращательное, маятникообразное, резкое изменение направления движения).

Критерием токсичности служит показатель размножения, за который принимается относительный прирост численности клеток в 1 мл исследуемой пробы воды. Значение относительного прироста клеток (K) в i-повторности, где i—пробегает значение от 1 до 5÷10 и рассчитывается следующим образом:

$$K = \frac{B^{i}_{кон.} - B^{i}_{нач.}}{B^{контр.}_{кон.} - B^{контр.}_{нач.}},$$

где $B^{i}_{нач.}$—среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в начальный момент измерения в i-повторности (получается усреднением по всем каплям); $B^{i}_{кон.}$—среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в конечный момент измерения в i-повторности; $B^{контр.}_{нач.}$—среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в начальный момент измерения в контроле; $B^{контр.}_{кон.}$—среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в конечный момент измерения в контроле.

Пробу воды следует считать токсичной при значении $K<0,5$ при разбавлениях не более чем 1:10.

Достоверность отклонения показателей определяется по критерию Стьюдента [2].

Модифицированный метод фотоколориметрического определения малых количеств перекиси водорода. Для определения малых количеств перекиси водорода в водных растворах использована реакция пероксидазного окисления лейко-формы красителя кристаллического фиолетового—4,4′,4″-метилиденбис(N,N-диметиланилина) [5, 6].

Суть метода заключается в появлении интенсивного поглощения света на длине волны 592 нм при смешении проявляющего раствора (лейко-основание, пероксидаза хрена, ацетатный либо фосфатный буфер, pH 4.5) с анализируемой пробой природной воды. Окраска появляется вследствие пероксидазного окисления лейко-основания.

Коэффициент экстинции красителя близок к 10^5 моль$^{-1}$ см$^{-1}$, чувствительность метода достигает $\sim 10^{-7}$ М H_2O_2. Для регистрации оптической плотности может быть использован либо спектрофотометр или фотоколориметр. Для приготовления растворов брали стандартные химреактивы.

Натурные измерения проводили в июле 1987 г. в районе 16.00—17.00 ч. (когда происходит максимальная наработка H_2O_2) в условиях солнечной погоды и при умеренном волнении воды. Природную воду исследовали без дополнительной обработки.

Для определения в водной среде ОН-радикалов параметры ингибиторной способности в отношении процессов радикального самоочищения—$\sum_i k_i[S_i]$ [7] измеряли с помощью красителя ПНДМА. Эта величина в разных типах природной воды и в разное время года колеблется от 10^3 сек$^{-1}$ для наиболее чистых водоемов до $3 \cdot 10^6$ сек$^{-1}$ [3] для наиболее загрязненных.

Способность природной воды к наработке H_2O_2 под действием УФ-излучения оценивали путем облучения проб воды фильтрованным УФ-светом лампы ПРК-2 (фильтр БС-3, λ=313—365 нм). Согласно данным [4], такой фильтрованный свет можно использовать для моделирования фотохимических реакций, индуцированных солнечным излучением.

Результаты и обсуждение. Как видно из приведенных данных (таблица), в районе впадения р. Гаварагет в оз. Севан обнаруживается максимальное содержание H_2O_2, что объясняется притоком органических веществ—продуцентов H_2O_2. Об этом свидетельствует, в частности, высокое значение параметра $\sum_i K_i[S_i]$ в заливе и нижнем течении р. Гаварагет (проба № 3).

Показатели к оценке влияния стока р. Гаварагет на состояние воды оз. Севан

№ пробы	Место отбора пробы	Содержание H_2O_2, моль·л	Коэффициент токсичности, $K_т$ (за 24 ч)	$\sum_i k_i[S_i]$, $сек^{-1}$	Скорость наработки H_2O_2 под действием УФ-света моль·час$^{-1}$
1	Залив оз. Севан в устье р. Гаварагет	$5 \cdot 10^{-8}$	0,5	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
2	Устье р. Гаварагет (застойная зона)	$1,5 \cdot 10^{-7}$	0,8	$5,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
3	Р. Гаварагет (в 200 м от устья)	не обнаружена	0,6	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$2,25 \cdot 10^{-4}$
4	Оз. Севан (вдали от устья р. Гаварагет фон)	не обнаружена	0,2	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$

Сравнение величин $\sum_i K_i[S_i]$ в застойной зоне (проба № 2) и в заливе (проба № 1), разделенных наносами донных отложений, свидетельствует об отсутствии интенсивного водообмена между ними. Близкие значения $\sum_i K_i[S_i]$ р. Гаварагет (проба № 3) и залива устья реки (проба № 4) показывают, что преобладает подземный сток р. Гаварагет в оз. Севан.

Снижение параметра $\sum_i K_i[S_i]$ в застойной зоне (проба № 2) свидетельствует о высокой эффективности процессов радикального самоочищения в этой зоне.

В естественных условиях образование H_2O_2 в природной воде происходит в основном в результате фотохимических превращений растворенных веществ под действием УФ-составляющей солнечного излучения.

Данные таблицы выявляют качественную корреляцию между величиной $\sum_i K_i[S_i]$ и скоростью фотохимической наработки H_2O_2. В то же время не обнаруживается корреляции между скоростью фотохимической наработки H_2O_2 и ее стационарной концентрацией в тех же пробах воды. Это свидетельствует о неодинаковой эффективности в этих же пробах процессов, приводящих к разложению H_2O_2.

Интересно отметить, что добавки супероксиддисмутазы (активность 3000 ед/мг, М=32000) в количествах порядка 10 мг/л не влияют на скорость образования H_2O_2. Следовательно, в изученной пробе (№ 4) воды оз. Севан супероксидные радикалы, предшествующие H_2O_2, гибнут в основном в результате их диспропорционирования.

В таблице приведены также результаты биотестирования снеже-отобранных проб воды. В качестве количественного показателя токсичности брали $K_т$. Считается, что пробы воды с $K_т \geqslant 0,5$ нетоксичны.

Следовательно, сток р. Гавараget нетоксичен. Варьирование K_1 в пределах 0,66—1.0 в пробах обусловлено неодинаковым содержанием в них питательных веществ. Можно заметить корреляцию между пробой № 1 и пробой № 3, как и при сравнении величин $\sum_i K_i [S_i]$. Полную нетоксичность воды в застойной зоне (проба № 2) можно объяснить повышенной самоочищающей способностью природной воды в этой зоне. Удивительно, что в фоновой точке (проба № 4) обнаружена хроническая токсичность ($K_1 = 0{,}2$). Движение клеток было заторможено и их форма меняясь по сравнению с контролем. Тем не менее после 48—72-часовой экспозиции токсичность исчезла, и во всех пробах воды $K \geqslant 0{,}9$. Очевидно, что при длительных хронических опытах состояние воды в пробах меняется и наиболее информативными следует считать экспрессные методы биотестирования.

Полученные данные показывают, что сток р. Гавараget нетоксичен и не оказывает отрицательного влияния на редокс-состояние водной среды оз. Севан.

Предлагаемая методика, дополненная кинетическими и гидрохимическими показателями, позволит полностью охарактеризовать влияние речного стока на состояние воды в водоеме.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Болсмрева Н. М., Шпотова Т. В., Штамм Е. В., Эрнестова Л. С., Скурлатов Ю. И.* Водные ресурсы. 10, 1987.
2. *Плохинский Н. А.* Биометрия. М., 1970.
3. *Скурлатов Ю. И., Эрнестова Л. С., Штамм Е. В., Шпотова Т. В., Калинин В. Б.* Докл. АН СССР. 276, 4, 1014—1016, 1984.
4. *Эрнестова Л. С., Скурлатов Ю. И., Бокман Л., Зепп Р., Шпотова Т. В.* Метеорология и гидрология. 10, 59—67, 1985.
5. *Draper W. M., Crerby D. G.* Arch. Environ. cont. toxicol., *12*, 121, 1983.
6. *Mottola H., Simpson B., Gorin G.* Anal. chem., *42*, 410, 1970.
7. *Stamm E. V., Purmal A. P., Skurlatov Yu. I., Travin S. O., Ernestova L. S.* Fundamental Research in Homogeneous Catalysis, *3*, Gordon and Breach Science Publishers, 1219—1233, 1986.

Поступило 11.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.152:576.851

ИНУЛИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ У РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

З. Г. АВАКЯН, Н. А. АПВАЗЯН, Э. Г. АФРИКЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Инулин—фруктоза—топинамбур.

Инулин представляет большой интерес для производства фруктозы, сахаристых продуктов и этанола [5—7]. В качестве основного источника инулина рассматривается топинамбур (земляная груша) и цикорий. Содержание инулина в клубнях топинамбура составляет в среднем 18—20% (на сырой вес), и при обычной урожайности его возможно обеспечить получение не менее 5 т/га фруктозы.

Инулиназа, гидролизующая инулин с образованием фруктозы, обнаружена в основном у гибридов и дрожжей, из которых предпочтение отдается *Debaryomyces, Pichia Kluyoieromycesa* [1—4]. Систематического исследования распространенности инулиназы у различных групп микроорганизмов не проводилось. В настоящей работе представлены результаты изучения инулиназной активности у различных групп микроорганизмов, в особенности аэробных спорообразующих бактерий.

Материал и методика. Объектами исследований являлась 721 культура различных микроорганизмов, преобладающее большинство которых было выделено и идентифицировано в лаборатории спорообразующих бактерий Института микробиологии АН Арм. ССР. Культуры выращивали на пептон-дрожжевой среде, содержащей (%): пептон—1,0; дрожжевой экстракт—0,1; инулин—0,1; глицерин—0,2. Инулиназную активность определяли по образованию фруктозы клетками односуточной культуры в реакционной среде, содержащей 0,5% инулина в течение двух часов при 10°. Фруктозу выявляли качественно добавлением 10% NaOH и тонкослойной хроматографией в растворителе—бутанол:уксусная кислота:вода в соотношении 4:1:1:

Фруктозу идентифицировали глюзарбитуровой кислотой.

Результаты и обсуждение. Подытоженные в табл. 1 и 2 данные показывают, что продуцирование инулиназы является видовой специфичностью. Фитопатогенные бактерии, а также термофильные, алкалифильные и ацидофильные бациллы лишены способности синтезировать этот фермент.

Широко распространены продуценты инулиназы среди мезофильных бацилл, грибов и дрожжей. Этим свойством характеризуются все культуры, относящиеся к группе *Bacillus albidus*. Более половины изу-

Таблица 1. Инулиназная активность культур разных групп микроорганизмов

Группы микробов	Изучено штаммов	Обнаружено продуцентов инулиназ
Бациллы мезофильные	250	39
Бациллы термофильные	61	0
Ацидофильные термофильные бациллы	6	0
Алкалифильные бациллы	36	0
Грибы	117	29
Дрожжи	14	
Клубеньковые бактерии	58	2
Фитопатогенные бактерии	45	0
Актиномицеты термофильные	12	0
Психрофильные микроорганизмы	9	0

Таблица 2. Инулиназная активность аэробных спорообразующих бактерий

Виды и группы бацилл	Количество испытанных штаммов	Обнаружено продуцентов инулиназ
Bacillus subtilis-mesentericus	65	12+++
Bac. licheniformis	8	1+++
Bac. brevis	7	0
Bac. pumilus	6	0
Bac. mycoides	10	0
Bac. thuringiensis	24	0
Bac. coagulans	2	0
Bac. circulans	3	0
Bac. laterosporus	2	1
Bac. polymyxa	25	11+++
Bac. sphaericus	16	0
Bac. megaterium	23	2++ 8+
Bac. laosus-agglomeratus	8	5+++ 1+
Bac. albidus	5	5+++
Bac. granulosus	2	2++
Bac. gasificans	5	1+++
Bac. alvei	3	0
Всего	213	48

ченных штаммов *Bac. laosus-agglomeratus* обладают высокой инулиназной активностью. Активные продуценты инулиназы редко обнаруживаются в группе *Bac. subtilis, Bac. megaterium*. К слабоактивным штаммам относятся также культуры группы *Bac. polymyxa*, у которых действие инулиназы наблюдается через 20 ч, тогда как активные штаммы уже через 1—2 ч превращают инулин в фруктозу.

К активным продуцентам инулиназ относятся также грибы и дрожжи. Из 117 изученных штаммов различных видов грибов 29 обладают высокой инулиназной активностью, большая часть которых приходится на *Aspergillus niger*.

Инулиназная активность полностью отсутствует у культур *Bac. mycoides, Bac. sphaericus, Bac. alvei, Bac. laterosporus, Bac. coagulans, Bac. circulans, Bac. thuringiensis*.

В результате проведенных исследований установлено, что среди мезофильных бацилл имеются культуры с высокой инулиназной активностью, которые являются богатым источником фермента и могут быть использованы для получения фруктозы из инулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bajon A. M., Gutraud J. P.* Biotechnol. Bioeng., 27, 1983.
2. *Beluche Z., Gutraud J. P., Galzy P.* Folia Microbiol., 25, 32, 1980.
3. *Demeulle S., Gutraud J. P., Galzy P.* Leitshrift fur Allgemeine Mikrobiologie. *21*, 3, 181, 1981.
4. *Gutraud J. P., Demeulle S., Galzy P.* Biotechnol. Letters, 3, 12, 683, 1981.
5. *Gutraud J. P., Galzy P.* Enzyme Microb. Technol., 3, 305, 1981.
6. *Klerstan M. P. J.* Biotechnol. Bioeng., 20, 477, 1978.
7. *Klerstan M. P. J.* Process Biochem., 5, 2, 1980.

Поступило I.VII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 616—009—097

ИНДУКЦИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЫШИНОЙ ОПУХОЛИ С ПОМОЩЬЮ КСЕНОГЕННОЙ РНК

Н. П. МЕСРОПЯН, А. В. МОВСЕСЯН, Н. Г. БАЛАБАДЖЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН, Ю. Т. АЛЕКСАНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

РНК—противоопухолевая резистентность.

Возникновение, рост и метастазирование злокачественного новообразования находятся в тесной зависимости от способности защитных сил организма противостоять развитию опухолевого процесса. Противоопухолевая сопротивляемость—это комплекс реакций организма, направленных на торможение или подавление опухолевого роста. Весьма актуальным направлением в иммунологии опухолей является разработка способов индукции противоопухолевой резистентности [2—4, 8]. В этой связи представляется важным использование различных способов гетерогенизации опухолевых клеток. Установлена способность гетерогенизированных с помощью РНК опухолевых клеток повышать иммунитет к сингенной опухоли [5—7, 9]. Однако этот вопрос исследован недостаточно.

В настоящей работе представлены результаты изучения возможности индукции резистентности у мышей к сингенной опухоли с помощью клеток этой опухоли, обработанных препаратом ксеногенной РНК.

Материал и методика. Исследования проведены на мышах-самках линии СЗНА (питомник «Раппполово»). Использованы длительно культивируемые клетки линии МГХХIIа, полученные из солидной формы перевиваемой мышиной гепатомы ХХIIа [1]. Препараты РНК получали методом фенольной депротеинизации [10] из селезенок крыс, иммунизированных дважды с недельным интервалом клетками асцитной формы опухоли МГХХIIа, образовавшейся после прививки мышам СЗНА клеток линии МГХХIIа. Взвесь опухолевых клеток в дозе $5 \cdot 10^7$ вводили внутрибрюшинно, а также подкожно в равном объеме адъюванта Фрейнда. Мышей иммунизировали трехкратно с тринадцатидневным интервалом опухолевыми клетками в дозе

Сокращения: ОК—опухолевые клетки; РНК инг.—РНК, полученная из селезенок нормальных крыс; РНК иммунная—РНК, выделенная из селезенок, которым вводились опухолевые клетки.

$1 \cdot 10^6$, предварительно инкубированными с препаратом гетерологичной РНК при 37° в течение трех часов. Концентрация препарата РНК в инкубационной смеси составляла 2 мг/мл. Контролем служили мыши, иммунизированные опухолевыми клетками, конъюгированными с РНК, выделенной от интактных крыс, и группа животных, которым прививали опухолевые клетки, конъюгированные с препаратом РНК, предварительно инкубированным с РНКазой. Обработку РНК РНКазой проводили при 37° в течение 15 мин. Конечная концентрация ее составляла 10 γ в 1 мл. Контролем служили также мыши, которых иммунизировали опухолевыми клетками, инкубированными в тех же условиях в растворе Хенкса. Спустя 11 дней после последней инъекций подопытным животным прививали обработанные РНК опухолевые клетки в дозе $3 \cdot 10^6$. Определение жизнеспособности используемых клеток методом окраски (трипановый синий) показало, что она, по сравнению с контролем, не снижается после инкубации клеток с препаратом РНК.

Результаты и обсуждение. Из данных, представленных в табл. 1, видно, что из 30 подопытных мышей опухоль появилась только у двух, тогда как у контрольных животных отмечалась 100%-ная прививаемость опухоли. Следовательно, трехкратная иммунизация мышей опу-

Таблица 1. Влияние гетерологичной иммунной РНК на прививаемость опухолевых клеток

Группа животных	Иммунизация 3-кратная (интервал) 2 недели)	Доза прививаемых клеток	Прививка	Доза прививаемых клеток	Количество животных в группах	Количество животных с принявшейся опухолью	Процент прививаемости
I	ОК—РНК иммунная	$1 \cdot 10^6$	ОК—РНК иммунная	$3 \cdot 10^6$	30	2	6,7
II	ОК+РНК иммун. обраб. РНК-азой	$1 \cdot 10^6$	—	—	20	20	100
III	ОК+РНК интактная	$1 \cdot 10^6$	—	—	20	20	100
IV	ОК	$1 \cdot 10^6$	ОК	$3 \cdot 10^6$	20	20	100

Примечание: так как у контрольных животных отмечалась 100%-ная прививаемость ОК, во время каждой иммунизации бралась новая группа (20) контрольных животных.

холевыми клетками, обработанными иммунной РНК, вызывает стойкую резистентность мышей к этой опухоли. Установлено также, что индуцированная таким способом противоопухолевая резистентность сохраняется у значительной части животных (54,6%) довольно длительное время (1 год), по истечении которого при повторной прививке отмечается прививаемость опухоли в 46,4% случаев (табл. 2).

Механизм противоопухолевого действия РНК изучен недостаточно. Возможно, она влияет на опухоль через какие-то механизмы, опосредованные защитными системами организма, подобно интерферону. Нельзя исключить и предположения, что под действием РНК изменяется антигенность опухолевых клеток, в результате чего усиливается иммунный ответ на опухоль. Наконец, возможно, ксеногенная РНК стимулирует синтез иммунных лимфоцитов, обладающих цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно сделать заключение, что при иммунизации мышей опухоле-

Таблица 2. Длительность сохранения противоопухолевой резистентности у подопытных животных

Группа животных	Иммунизация 3-кратная (интервал 2 недели)	Доза иммунных лейкозных клеток	Прививка	Доза прививаемых клеток	Количество животных в группах	Количество животных с приживлением опухолью	Процент приживаемости
Опытная	ОК+РНК иммунная	[illegible]	ОК+РНК	$3 \cdot 10^5$	28	13	46.4
Контрольная	ОК	$1 \cdot 10^6$	ОК	$3 \cdot 10^5$	60	60	100

выми клетками, конъюгированными с ксеногенной иммунной РНК, индуцируется выраженная противоопухолевая резистентность.

Изучение иммунологического статуса мышей с индуцированной противоопухолевой резистентностью является задачей наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексанян Ю. Т., Басмаджян М. Е., Мовсесян К. С., Манукян Л. А., Геворкян С. В.* Бюлл. эксп. биол. и медицины, *73*, 5, 94—95, 1972.
2. *Городилова В. В., Басин М. Н.* Иммунология опухолевого роста. М., 1983.
3. *Матэ Ж.* Активная иммунотерапия рака, иммунопрофилактика и иммунореабилитация. М., 1980.
4. *Муценице А. Я., Фердат А. К.* В кн. Вирусы и терапия опухолей. Рига, 1978.
5. *Николин В. П.* Изв. Сибирск. отд. АН СССР, 10, 143—146, 1973.
6. *Ронжевская Т. М., Черниченко Л. Н., Рыкова В. И., Мартынова Р. П.* Изв. Сибирск. отд. АН СССР, 10, 138—142, 1973.
7. *Kern D. H., Pilch Y. H.* Ann. N. Y. Acad. Sci., *332*, 196—206, 1979.
8. *Miculska Z. B., Smith C., Alexander P.* Nat. Cancer Inst., *36*, 29—35, 1965.
9. *Pilch Y. H., Ramming K. P.* Meth. Cancer Res., 9, 195—254, 1973.
10. *Scherrer K., Darnell J. E.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 486—490, 1962.

Поступила 10 VII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 616.155.1—097

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ В СУПЕРНАТАНТАХ СУСПЕНЗИИ ОБРАБОТАННЫХ УЛЬТРАЗВУКОМ ЭРИТРОЦИТОВ

Т. И. ГАРЕГИНЯН

Ереванский медицинский институт, кафедра биологической и медицинской физики

Ультразвук—эритроциты—антигены системы АВ0.

Ранее было показано изменение степени экспрессии антигенов системы АВ0 в мембранах эритроцитов под действием импульсного ультра-

Сокращения. УЗ—ультразвук.

звука в режиме бегущей волны [5, 6]. Однако это явление остается недостаточно изученным, так как не дана количественная характеристика «выхода» антигенов в зависимости от длительности, интенсивности озвучивания и частоты самого ультразвука.

Нами была предпринята попытка определить количество отщепленных от эритроцитов белковых молекул по величине светопоглощения в области максимума (280 нм).

Материал и методика. В опытах были использованы эритроциты крови доноров мужского и женского пола среднего возраста, выделенные центрифугированием с последующим трехкратным промыванием физиологическим раствором.

Концентрацию белковых молекул в надосадочной жидкости оценивали по калибровочной кривой чистого альбумина сыворотки (Венгрия).

Ультразвуковое воздействие на суспензию эритроцитов осуществляли при помощи ультразвуковых генераторов «УЗТ-101», «Ультразвук 15» с частотой ультразвука 0,88 МГц и «УЗТ-306» с частотой ультразвука 2,64 МГц в диапазоне интенсивностей от 0,4 до 1 Вт/см² в режиме амплитудно-импульсной модуляции при длительности импульса 4 мсек. Усредненную по площади и по времени интенсивность ультразвуковой волны излучающей поверхности преобразователя определяли по радиационному давлению прибором ИМУ-3. Среднюю по времени интенсивность внутри кюветы определяли колориметрированием с помощью пяти последовательно соединенных медно-никелевых термопар по описанной методике [4]. Ультразвуковое воздействие проводили при 37°. Точность поддержания температуры составляла ±1°.

Время отделения супернатанта после озвучивания суспензии минимизировано с целью исключения ресорбции антигенов. Предварительные эксперименты показали, что в процессе озвучивания не происходит осаждения и слипания эритроцитарных клеток, поэтому мягкое смешивание суспензии в процессе озвучивания исключалось.

В каждой серии экспериментов было использовано 15 проб суспензии. Результаты измерений на спектрофотометре СФ-26 обработаны статистически с определением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ количества белковых молекул в надосадочной жидкости после центрифугирования (1500—2000 об/мин) показал наличие линейной зависимости появления белков в растворе только первые 15—20 мин в течение озвучивания. Степень отщепления белковых молекул антигенов и, вероятно, других мембраносвязанных белков сильно зависит от частоты ультразвука. Так, при частоте 0,88 МГц отщепление белковых молекул в течение первых тридцати минут в десять раз интенсивнее, чем при частоте 2,64 МГц. В этих условиях гемолиз эритроцитов не происходит ввиду меньшего повреждения мембран эритроцитов, ибо в надосадочной жидкости количество белков незначительно. Нужно отметить, что слабый эффект ультразвука с более высокой частотой связан со сдвиговыми напряжениями акустических микротечений [2], отчего зависит эффективность действия ультразвуковой волны на клетку. Однако это предположение, несмотря на некоторую убедительность, нуждается в дальнейшем подтверждении.

Данные таблицы свидетельствуют о зависимости выявляемого количества белковых молекул в надосадочной жидкости от длительности, интенсивности и частоты ультразвука. Видно также, что при одинаковой интенсивности (0,4 Вт/см²) отщепление белка начинается с третьей минуты озвучивания и достигает максимального значения на трид-

цатой минуте, после чего резко замедляется выход белков. В первом приближении это можно объяснить обратным оседанием белков на мембранах эритроцитов с нарушенной структурой [1]. При расчете на один эритроцит отщепление белков достигает $3 \cdot 10^9$ молекул на одну клетку. Такое соотношение достаточно значительно и может играть роль в изменении физико-химических свойств эритроцитов.

При более высокой частоте ход процесса такой же, однако количество отщепленных белковых молекул значительно меньше. . Максимальное значение выхода белков в супернатанте также отмечается при 20—30-минутном озвучивании.

Результаты обработки эритроцитов в суспензии ультразвуком интенсивностью от 0,4 до 1,0 Вт.см$^{-2}$ в импульсном режиме 4 мс

Время, мин	Количество проб	Частота ультразвука			
		0,88 МГц		2,64 МГц	
		концентрация биомакромолекул, мкг/мл	количество молекул, „смытых" с одного эритроцита, молекул $\cdot 10^9$	концентрация биомакромолекул, мкг/мл	количество молекул, „смытых" с одного эритроцита молекул $\cdot 10^9$
—	15	81,20±1,30	—	81,20±1,30	—
1	15	26,20±2,95	0,285±0,010	1,99±0,08	0,022±0,001
3	15	68,42±1,85	0,743±0,020	12,56±0,14	0,136±0,002
5	15	101,26±2,03	1,10 ±0,022	20,78±0,97	0,226±0,011
10	15	158,74±1,98	2,159±0,022	25,31±0,77	0,275±0,008
20	15	270,62±2,33	2,939±0,025	31,50±1,13	0,342±0,012
30	15	290,92±3,27	3,160±0,036	33,63±1,01	0,365±0,011
40	15	288,58±3,91	3,134±0,042	32,41±2,21	0,352±0,013
50	15	286,16±7,47	3,108±0,081	32,58±0,90	0,354±0,010
60	15	283,78±2,62	3,082±0,028	33,10±1,01	0,360±0,011

Таким образом, можно предположить, что процессы, протекающие на молекулярном и структурном уровнях в мембранах эритроцитов, независимо от частоты действующего ультразвука, по своей природе одинаковы и скорее всего различаются по интенсивности наступающих изменений.

Полученные результаты позволяют заключить, что изменения физико-химических свойств эритроцитов при обработке ультразвуком, в частности, обусловлены отщеплением белков антигенной и другой природы от их мембран. Их количественный анализ можно легко провести с помощью определения количества белков в надосадочной жидкости, в то время как качественный состав их можно определить методом электрофоретического разделения [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Акопян В. Б.* Ультразвук в биол. и мед., Пущино, 1981.
2. *Акопян В. Б., Саравзян А. П.* Акуст. журн., *25*, 3, 462—463, 1979.
3. *Баранова В. С., Гарегинян Т. Н., Тихонова С. В.* В кн.: Тр. Всесоюзн. конф. «Ультразвук в сельском хозяйстве», Рязань, 1987.
4. *Маргулис М. А.* Журн. физ. химии, *18*, 1, 23, 1979.

5. *Пирузян Л. А., Маев Р. Г., Никогосян М. М., Койфман М. М., Корнева З. И.* Биофизика, *31*, 2, 269—273, 1986.
6. *Pinamonti S., Gallenga P. E. and Mazzeo V.* Ultrasound in Med. & Biol., 8, 6, 1982.

Поступило 24.XI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 579.64:631.484

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АЗОТОБАКТЕРА В ОБНАЖЕННЫХ ПОЧВОГРУНТАХ ОЗЕРА СЕВАН

В. Г. НИКОГОСЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Озеро Севан—азотобактер—нитрогеназная активность.

Ранее было показано, что азотобактер широко распространен в некоторых обнаженных почвогрунтах оз. Севан [2, 3, 6]. Установлена азотфиксирующая активность обнаженных почвогрунтов, исследованы некоторые сравнительные морфологические особенности представителей азотобактера, распространенных в воде и почвогрунтах [2]. Однако азотфиксирующая активность смешанных и чистых культур азотобактера, выделенных из обнаженных почвогрунтов оз. Севан, до настоящего времени не изучена. Исследование этого вопроса имеет теоретическое и практическое значение для эффективного освоения освобожденных из-под воды территорий.

Материал и методика. Изучали 60 культур *Az. chroococcum*, выделенных в 1982 г. из обнаженных почвогрунтов в районе Вардениса и Ераноса, в том числе *Az. chroococcum* ИНМИА В-6166 и *Az. chroococcum* ИНМИА В-6167 (остальные штаммы приводятся согласно оригинальной нумерации). Для сравнения изучали штамм *Az. chroococcum* 53 из коллекции ВНИИ сельхозмикробиологии (по нумерации ИНМИА *Az. chroococcum* В-6111).

Азотфиксирующую способность смешанных и чистых культур азотобактера определяли ацетиленовым методом ежедневно в процессе развития культуры на агаризованной среде Виноградского (3 мл) в течение четырех суток [5]. Нитрогеназную активность рассчитывали по количеству восстановленного ацетилена (мкмоль/час) [1].

Результаты и обсуждение. Исследованиями установлено, что выделенные культуры азотобактера относятся к виду *Az. chroococcum*.

Изучение нитрогеназной активности показало, что смешанные культуры не во всех случаях проявляют высокую азотфиксирующую активность. Нитрогеназная активность половины чистых культур азотобактера, выделенных из микробных ассоциаций, на 1,7—20,4% выше таковой соответствующей смешанной культуры, у остальных культур она на 7,7—24,3% ниже (табл.). Это, видимо, объясняется видовым составом микроорганизмов в смешанных культурах и особенностями их взаимодействия. Наличие симбиотического, метабиотического и антагонистического взаимодействия между азотобактером и другими микроорганизмами было показано ранее [4, 7, 8].

Изученные культуры азотобактера отличаются от *Az. chroococcum* В-6111 по интенсивности роста и динамике нитрогеназной активности. Ряд штаммов—Е-2-1, Е-11-1, Е-1, Е-4, Е-6, Е-12 и Е-13—по уровню азотфиксации превосходят *Az. chroococcum* В-6111.

Нитрогеназная активность некоторых смешанных и чистых культур азотобактера

Смешанные культуры	Активность нитрогеназы, мк моль C_2H_4 час					Чистые культуры	Активность нитрогеназы, мк моль C_2H_4 час					Активность чистой культуры, % от смешанной
	дни				сумма		дни				сумма	
	I	II	III	IV			I	II	III	IV		
Е—1	2.0	1.8	1.6	1.3	6.7	Е—1—1	1.7	1.8	1.3	0.8	5.6	83.6
Е—2	2.0	1.8	1.6	0.4	5.8	Az. chr. В—6166	1.9	2.1	1.7	0.9	6.6	113.8
Е—3	2.0	2.1	1.4	0.4	5.9	Е—3—1	1.8	2.0	1.4	0.7	5.9	100
Е—4	2.0	2.1	1.6	0.7	6.6	Е—4—1	1.9	1.4	1.0	0.7	5.0	75.7
Е—5	1.3	1.7	1.8	0.6	5.4	Е—5—1	1.5	1.9	1.4	1.0	5.8	107.4
Е—6	1.9	1.8	1.6	0.9	6.2	Е—6—1	2.0	1.5	0.7	0.6	4.8	77.4
Е—7	2.0	2.1	1.3	0.4	5.8	Е—7—1	1.7	2.1	1.3	0.8	5.9	101.7
Е—8	2.0	1.8	0.7	0.4	4.9	Е—8—1	1.9	2.0	1.6	0.4	5.9	120.4
Е—9	2.1	2.1	1.0	0.1	5.2	Е—9—1	1.9	2.0	1.3	0.4	5.6	107.7
Е—10	2.1	2.0	1.1	0.3	5.5	Е—10—1	2.1	1.9	0.6	0.3	4.8	87.3
Е—11	2.0	1.8	0.9	0.9	5.6	Е—11—1	1.9	2.1	1.4	1.2	6.6	117.8
Е—12	1.9	1.8	1.4	1.4	6.5	Az. chr. В—6167	1.9	2.1	1.5	0.5	6.0	92.3
Е—13	2.0	1.8	1.1	0.3	6.7	Е—13—1	2.1	1.9	1.0	0.5	5.5	81.6
						Az. chr. В—6111	2.0	1.7	1.3	0.8	5.9	

Таким образом, по уровню азотфиксирующей способности и степени распространенности азотобактер обнаженных почвогрунтов оз. Севан, изменивших в течение ряда лет свои агрофизические свойства, не уступает азотобактеру из других почв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метод. рекоменд. по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценка их эффективности. Л., 1979.
2. *Минасян А. И.* Изв. АН АрмССР, *6*, 6, 57—71, 1953.
3. *Минасян А. И.* Прибрежные почвогрунты озера Севан, Ереван, (на арм. языке) 1972.
4. *Мишустин Е. Н., Шильникова В. К.* Биологическая фиксация атмосферного азота. М., 1968.
5. *Никогосян В. Г.* Биологический журнал Армении. *34*, 3, 269—274, 1981.
6. *Никогосян В. Г.* Вопросы микробиологии, вып. VIII (XVIII), 120—130, Ереван, 1981.
7. *Рубенчик Л. И.* Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Киев, 1960.
8. *Федоров М. В.* Биологическая фиксация азота атмосферы. М., 1965.

Поступило 4 V 1987 г.

ՏԵՍՈՒԹՅՈՒՆ և ԲԱՆԱՎԵՃ · ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 612.821.2+577.23

О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ НАУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

Г. Е. ГРИГОРЯН, А. М. СТОЛЬБЕРГ, С. Н. АЙРАПЕТЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
лаборатория биомембран, Ереван

Дается обзор работ по изучению молекулярных процессов, лежащих в основе кратковременной и долговременной памяти. Обсуждаются некоторые пути дальнейшего углубления анализа молекулярно-клеточных механизмов научения.

Հոդվածում ամփոփվում են ժամանակակից գիտության նվաճումները վարքի և հիշողության պրոցեսների նեյրոֆիզիոլոգիական, իոնային և մոլեկուլյար կենսաբանական մեխանիզմների ուսումնասիրման ասպարեզում։ Քննարկվում են այդ պրոբլեմի հետագա ուսումնասիրման որոշ ուղիներ։

Review of the works concerning the problem of molecular processes underlying short-term and long-term memories has been presented. Some ways of further deepening of analysis of cellular-molecular basis of the learning are discussed.

Память—научение—нейрон—натриевый насос—фосфорилирование.

Вопрос о научении—центральная проблема для исследователей поведения. Хотя по традиции она находилась главным образом в ведении нейропсихологов, становится очевидным, что решить ее (т. е. выяснить механизмы научения и памяти), не выходя за пределы психологии, вряд ли удастся. Для этого необходимо привлечь также нейрофизиологические и нейрохимические подходы и концепции. Однако выяснилось, что «биоэлектрическая» теория научения и памяти не может объяснить всю сложность и разнообразие целого ряда фактов [11, 15, 17, 39, 41, 49]. Ее восполняют нейрохимические исследования, которые проводятся в двух главных направлениях: изучения химии синапсов [12, 48] и внутриклеточных молекулярных структур [4, 30, 31, 35, 40, 47, 51, 53]. Результаты изучения нервной регуляции синтеза макромолекул (РНК и белков) в общем позволяют предположить, что они играют определенную роль в процессах реорганизации пластичности нервных клеток и приобретении индивидуального опыта животного в це-

Сокращения: цАМФ—циклический аденозин-3,5—монофосфат, УР—условный рефлекс, ПТП—посттетаническая потенциация.

лом. Но остается неясным, несут ли они просто какую-то общую функцию в метаболизме клетки, или же их роль в явлениях научения и памяти специфична, уникальна [4].

Наибольший прогресс был достигнут в исследованиях Кэндела, Эллена, Фарли и сотр. [13, 14, 16, 21, 23, 26, 29, 33, 34, 37, 38, 43, 45, 52]. Основываясь на достижениях в области изучения метаболической регуляции возбудимости нервной клетки [2, 8, 9, 26], они разработали новые экспериментальные подходы, значительно расширив возможности анализа молекулярно-клеточных механизмов кратковременных следовых явлений (память) в центральной нервной системе беспозвоночных животных применительно к простым моделям ассоциативного и неассоциативного научения.

Кэндел и сотр. исследовали механизм кратковременной сенситизации рефлекса отдергивания жабры и сифона у аплизии после болевой стимуляции хвоста. Была изучена нейронная сеть рефлекса и показано, что нейрофизиологическим механизмом, лежащим в основе сенситизации, является гетеросинаптическая фасилитация [13, 14, 29, 33, 43]. Затем, с помощью квантового анализа, было обнаружено, что облегчение синаптической передачи между механосенсорными и моторными нейронами происходит за счет увеличения количества выделяемого медиатора из терминалей сенсорных нейронов. Причем изменений в чувствительности постсинаптической мембраны при сенситизации рефлекса не было выявлено [3, 13, 14, 29, 33, 43]. Заслуга Кэндела и сотр. в том, что им удалось показать, каким образом может изменяться при научении количество выделяемого из пресинаптических нейронов медиатора. При сильной и длительной стимуляции сенситизирующей коннективы в абдоминальном ганглии аплизии увеличивается содержание цАМФ [14, 33, 43]. Эффект сенситизации можно было имитировать, инкубируя ганглий в серотонине. Введение цАМФ в тело сенсорного нейрона имитировало эффект пресинаптической фасилитации. Электрофизиологический анализ реакции сенсорных нейронов показал, что при сенситизации реакции отдергивания жабры увеличивается ширина спайка нейронов на 15—20%. Инкубация ганглия в серотонине имитировала эффект уширения потенциала действия и реакции постсинаптического мотонейрона, вызванных стимуляцией сенситизирующей плеврально-абдоминальной коннективы [13, 14, 29, 33, 43]. Увеличение ширины спайка сенсорных нейронов при действии серотонина оказалось зависимым от концентрации внеклеточного кальция. Известно, что усиление выхода кальция в терминаль приводит к увеличению выброса медиатора. Кэндел и Клейн предположили, что изменения, наблюдаемые в соме сенсорных нейронов, отражают изменения, происходящие в терминалях. Чтобы выяснить, за счет чего увеличивается ширина спайка—за счет прямой активации кальциевых каналов, или другого, опосредованного механизма,—были проведены эксперименты с фиксацией потенциала и фармакологической блокадой проводимости каналов. Обнаружено, что серотонин и сенситизирующая стимуляция коннективы не приводят к активации кальциевого тока, а инактивируют калиевый ток, возникающий на стадии реполяризации потенциала действия [3,

29, 33, 43, 45, 50]. Таким образом, увеличение входа кальция в сенсорный нейрон при сенситизации было потенциалзависимым, связанным с инактивацией реполяризующего калиевого тока. Инактивируемый калиевый ток, по своим характеристикам, не связан с калиевыми каналами известного типа, в связи с чем был выделен в особый S-ток [29, 33, 43, 45]. Для выяснения молекулярных механизмов инактивации S-калиевого тока были проведены опыты с инъекцией каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы в сенсорные нейроны [43], в которых наблюдалось такое же увеличение ширины спайка, как в случае с серотонином или цАМФ. Инъекция ингибитора протеинкиназы предотвращала уширение спайка при инкубации в серотонине [29, 33, 43, 45]. Полученные данные указывают на то, что молекулярным механизмом инактивации S-калиевого тока является цАМФ-зависимое фосфорилирование канальных белков. Итак, сложилось целостное представление о молекулярно-клеточном механизме кратковременной сенситизации рефлекса отдергивания жабры и сифона у аплизии, включающее следующую последовательность событий:

Болевое раздражение хвоста	Активация модуляторных интернейронов	Выделение нейромодуляторного медиатора в области сенсорно-моторных синапсов рефлекса отдергивания жабры и сифона
Увеличение аденилатциклазной активности сенсорных нейронов	Увеличение уровня цАМФ	Увеличение активности цАМФ-зависимой протеинкиназы
Усиление фосфорилирования в сенсорных нейронах	Понижение калиевой проводимости	Увеличение ширины спайка в сенсорных нейронах
Потенциал-зависимое увеличение входа Ca	Увеличение количества выделяемого сенсорными нейронами медиатора	Увеличение ВПСП в мотонейронах отдергивания жабры и сифона
Повышение спайковой активности мотонейронов	Усиление поведенческой реакции отдергивания жабры и сифона	

Изучался также процесс α-ассоциативного научения у аплизии [29, 33, 38, 43, 50, 54]. С этой целью вырабатывали α-УР, сочетая слабое тактильное раздражение жабры и сифона с болевым раздражением хвоста. В результате был достигнут эффект более сильного отдергивания органа, раздражение которого сочеталось с безусловным стимулом [33, 43]. Разрабатывая подход к анализу молекулярных механизмов α-УР, авторы исходили из представления о родстве сенситизации и УР. Было высказано предположение, что сочетание условного и безусловного стимулов ведет к специфичному усилению активности конвергентных для условного и безусловного раздражителей нейронов [43].

В опытах на полуинтактном препарате вырабатывали клеточный аналог УР, сочетая внутриклеточную деполяризацию сенсорных нейронов плеврального ганглия с сильным ударом по хвосту. Получен эф-

фект повышенной возбудимости сенсорных нейронов, который определяли по изменению амплитуды возбудительного постсинаптического потенциала в мотонейронах [54]. Для выяснения молекулярных процессов, лежащих в основе изменений возбудимости сенсорных нейронов, были проведены эксперименты на изолированных кластерах сенсорных клеток плеврального ганглия [50]. При сочетании калиевой деполяризации (имитирующей спайковую активность, вызываемую условным стимулом) с инкубацией клеток в серотонине, имитировавшем эффект безусловного стимула, найдено, что уровень цАМФ в кластерах нейронов, где производили сочетанное предъявление стимулов, значительно превосходил уровень цАМФ в нейронах, где стимулы предъявляли в случайном порядке. Для сенсорных клеток плеврального ганглия аплизии было показано, что серотонин увеличивает уровень цАМФ, т. е. активирует аденилатциклазу [50]. Предшествующая действию серотонина калий-вызванная деполяризация приводит к потенциалзависимому входу кальция в сенсорные нейроны. При сочетанном предъявлении стимулов увеличение содержания цАМФ в сенсорных нейронах объясняется взаимодействием Ca^{2+} с аденилатциклазной системой. В частности, предполагается наличие Ca^{2+}-чувствительной аденилатциклазы [29, 50, 54]. Следует сказать, что механизм взаимодействия Ca^{2+} и аденилатциклазной системы может быть и другим [7, 20, 22, 44, 45]. Тем не менее предложена схема молекулярных процессов α-обуславливания у аплизии: условный стимул, вызывающий вход Ca^{2+} в сенсорных нейронах, при сочетании с безусловным приводит к активизации аденилатциклазной системы, к усилению фосфорилирования S-калиевых каналов и выброса медиатора именно в тех сенсорных нейронах, рецептивное поле которых подвергалось условному раздражению. В результате усиливается моторная реакция при раздражении именно этого рецептивного поля.

В исследованиях на аплизии не изучался истинный УР, когда применяемый «индифферентный» стимул сам по себе не способен вызвать безусловнорефлекторную реакцию. Молекулярные механизмы истинного УР успешно изучались на гермиссенде [3, 21, 23, 26, 33, 34, 45]. У этого моллюска в естественных условиях наблюдается положительный фототаксис. В то же время он избегает попадания в турбулентные среды. Сочетая световой стимул с вращением гермиссенды, можно выработать УР избегания света [3, 23, 33]. Изучена зрительно-вестибулярная нейронная сеть этого рефлекса. Найдено, что в результате обучения происходит увеличение входного сопротивления и ответа на свет в фоторецепторных клетках типа В. Тот факт, что эти изменения не связаны с изменением синаптического притока, а носят постсинаптический характер, доказывают опыты с изоляцией фоторецепторных клеток типа В. Изолированные клетки обученных животных сильнее реагировали на включение света и внутриклеточную деполяризацию, чем таковые псевдообученных [23, 33]. Специальная роль клеток типа В в обучении была продемонстрирована тонким экспериментом. Животных препарировали и сочетали вспышки света с искусственной деполяризацией клетки типа В, имитируя, таким образом, эффект синаптического входа

из вестибуло-зрительного тракта, возникающий при вращении. Через несколько дней после процедуры сочетаний животных тестировали. Оказалось, что те, которым предъявлялись сочетания, проявляли значительно большее подавление положительного фототаксиса, чем ложнооперированные [33]. Ионную природу повышения возбудимости клеток типа В при научении изучали в опытах с фиксацией потенциала и фармакологической блокадой проводимости ионных каналов. Было найдено, что увеличение входного сопротивления в клетках типа В происходит за счет уменьшения раннего и Са-активируемого калиевых токов, а также увеличения кальциевого тока [3, 21, 23, 33]. В результате сочетания света с вращением значительно увеличивается уровень внутриклеточного Ca^{2+}. С этим и связывается молекулярный механизм изменения проницаемости ионных каналов клеток типа В. В опытах с ионофоретическими инъекциями цАМФ-зависимой, Са-кальмодулин-зависимой протеинкиназ и протеинкиназы С [21, 23, 26, 33, 34, 45] обнаружено, что инъекция цАМФ-зависимой протеинкиназы уменьшает задержанный калиевый ток и не имитирует, таким образом, эффекты научения [23]. Инъекция Са-кальмодулин-зависимой протеинкиназы уменьшает ранний калиевый ток, но не влияет на Са-активируемый калиевый и кальциевый токи, изменяющиеся при научении [21, 23, 33, 45]. Все эффекты научения имитирует инъекция протеинкиназы С [34] и инкубация клетки типа В в серотонине. На проинкубированные в серотонине клетки инъекция протеинкиназы С не оказывает воздействия [34]. На этом основании была выдвинута гипотеза о молекулярном механизме научения: условный стимул (свет) приводит к выделению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, безусловный—к выделению серотонина и активации протеинкиназы С, степень активности которой будет связана с уровнем свободного внутриклеточного Ca^{2+}. В результате фосфорилирования калиевых и кальциевых каналов увеличивается входное сопротивление и усиливается возбудимость фоторецепторной клетки типа В [34]. Ca^{2+}-зависимым фосфорилированием каналов объясняет научение и Элкон [23, 33], хотя специфическое для сочетаний повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} он связывает с кумулятивной деполяризацией и входом Ca^{2+}-потенциалзависимым образом.

Фосфорилирование ионных каналов не является единственно возможным механизмом формирования клеточно-молекулярного следа памяти. Интересные данные [28, 32, 33, 46] были получены при изучении длительного изменения электрической активности нейронов гиппокампа на примере ПТП. Длительная тетанизация входов в зубчатую извилину поля СА-1, СА-3 гиппокампа вызывает длительную синаптическую фасилитацию, которая может продолжаться много дней. Необходимым опосредующим ПТП медиатором является глутамат. Блокада глутаматного рецептора предотвращает развитие ПТП. Для ПТП критическую роль играют изменения концентрации внутриклеточного кальция. Инъекция этиленгликоль тетраацетиловой кислоты (хелатора Ca^{2+}) предотвращает ее развитие. Экспериментально найдено увеличение связывания глутамата в срезах гиппокампа при развитии ПТП. Кальций стимулирует эффект усиления связывания глутамата, но это

влияние кальция блокируется лейпептином—ингибитором Ca^{2+}-активируемой протеиназы кальпаин-1. Кальпаин-1—это протеиназа, атакующая белок цитоскелета фодрин. Использование антител к фодрину предотвращает увеличение связывания глутамата в ответ на добавление Ca^{2+} [28, 33, 46]. На основании этих экспериментов была высказана гипотеза о молекулярно-клеточном механизме ПТП, согласно которой цитоскелет регулирует поверхность нейрона и изменяет количество рецепторов на мембране. Большинство исследователей связывают постсинаптические изменения в количестве рецепторов на мембране с увеличением внутриклеточного Ca^{2+}. Линч и Бодри полагают, что внутриклеточный Ca^{2+} появляется главным образом из внутренних депо. Его возрастание активирует протеиназу кальпаин-1, которая, осуществляя протеолиз цитоскелетного белка фодрина, разрыхляет цитоскелет, что и приводит к увеличению количества глутаматных рецепторов [46]. Эккле выдвинул подобную гипотезу, полагая, что Ca^{2+} входит извне и действует не только на цитоскелет, но и на белковый метаболизм, чем и объясняется долговременный характер изменений в потенцированных синапсах [32]. Таким образом, индуцированные кальцием изменения белкового метаболизма и количества рецепторов на мембране также могут быть механизмом памяти.

Следует отметить, что на нейронах виноградной улитки был найден и другой механизм регуляции количества рецепторов на мембране, осуществляемый через насосвызванные изменения объема нейрона и соответственно количества рецепторов [1]. С другой стороны, известно, что Ca^{2+} ингибирует активность Na-насоса [5, 42]. Поэтому нельзя исключать и роль Na-насоса в феномене увеличения количества глутаматных рецепторов на срезах гиппокампа.

Роль Na-насоса в научении исследовалась на цыплятах [36, 47]. Избегательное поведение одночневных цыплят при клевании бусинки оказалось удобной моделью для изучения динамики формирования памяти на целостном организме. Цыплятам предъявляли бусинку, помещенную в аверсивный для них раствор метилантранилата ($NH_2C_6H_4COOCH_3$). После аверсивной пробы цыплята переставали клевать эту бусинку. С помощью введения в мозг KCl, LiCl, уабаина и циклогексимида удавалось вызвать амнезию, развитие которой зависело от времени введения препарата. В первые 10 мин после аверсивной пробы амнезия вызывалась KCl и LiCl, но не уабаином или циклогексимидом. С 10-й по 30-ю мин память оказывалась чувствительной к уабаину, но не к циклогексимиду. Через 30 мин после аверсивной пробы она становилась чувствительной к ингибитору синтеза белков циклогексимиду [12, 18, 36, 47, 55]. Марк выдвинул гипотезу, согласно которой первая фаза памяти связана с изменением электровозбудимых свойств мембраны нейронов и поэтому блокируется KCl и LiCl, вторая—с активацией Na-насоса и восстановлением ионного градиента. Восстановление Na градиента активирует транспорт аминокислот в нейроны, обеспечивая, таким образом, переход к долговременной памяти, зависимой от синтеза белка [47]. Следует сказать, что в нейронах стриатума цыплят после аверсивной пробы было найдено увеличение чувствительности

постсинаптических рецепторов к ацетилхолину [51]. В то же время на нейронах виноградной улитки нами была показана корреляция между активностью Na-насоса и средством ацетилхолиновых рецепторов [24]. Допускается, что влияние активности Na-насоса на хемочувствительность мембраны осуществляется через систему фосфорилирования мембраны [24]. Поэтому его роль в обучении может быть более значительной, чем предполагалось ранее [12, 18, 36, 47, 53]. Изменение активности Na-насоса в результате процедуры обучения может влиять на клеточную активность и электрогенным путем. При проверке гипотезы Кэндела относительно молекулярного механизма сенситизации на нейронах пиявки было установлено, что серотонин и цАМФ модулируют у нее рефлекс сокращения и плавания. В механосенсорных нейронах типа Т серотонин сильно уменьшает фазу гиперполяризации, которая обычно следует в этих нейронах после вспышки пачечной активности [27]. Ставится вопрос: связано ли это с блокадой калиевого тока или с подавлением работы Na-насоса [27]. Серотонин, как известно, активирует в ряде нейронов аденилатциклазу, а есть данные, согласно которым накопление цАМФ до 50% снижает активность Na, K-АТФазы [5]. Надо признать, однако, что вопрос связи между системами фосфорилирования и Na-насосом в процессе научения нуждается в дальнейшем систематическом исследовании, что является предметом наших исследований.

Процессы кратковременной и промежуточной памяти связаны с активацией систем внутриклеточных вторичных посредников, модулирующей активности уже существующих ферментов и структурных белков, и не связаны с синтезом новых белков [13, 14, 18, 33, 37, 43, 51, 53].

Для обеспечения долговременного запоминания при научении необходимы изменения в синтезе белков, процессе транскрипции [18, 19, 37, 43, 51]. Временная блокада синтеза белков у позвоночных и беспозвоночных в определенный период после научения не приводит к нарушению кратковременной, но нарушает долговременную память [18, 31, 33, 36, 37, 43, 51, 53]. Поэтому предполагается, что есть гены и белки, необходимые для формирования долговременной памяти, но не нужные для формирования кратковременной [37, 43, 51]. Согласно гипотезе Кэндела, активация генов при научении может происходить в результате действия вторичных посредников на геном. Как показывают данные исследований, проведенных на аплизии и гермиссенде, накопление Ca^{2+} и цАМФ внутри нейронов при научении может происходить с самого начала. В начале их действие состоит в усилении фосфорилирования мембранных белков. С углублением процесса научения накопление Ca^{2+} и цАМФ может привести к репрессии и дерепрессии генов, изменениям в процессе синтеза белка [10, 19, 37, 43]. Длительность сохранения вызванных научением изменений зависит от того, какие гены изменили при этом свою активность. Активация эффекторных генов приводит к запоминанию информации на несколько дней, т. е. на период, равный времени полужизни информационной РНК и белка. Репрессия или дерепрессия регуляторных генов, согласно гипотезе Кэндела, ведет к длительным изменениям в синтезе белка [43]. Кэндел строит

молекулярную модель долговременной памяти, проводя аналогию с процессом клеточной дифференциации. В процессе клеточной дифференциации гормоны и факторы роста приводят сначала к временной активации эффекторных генов, а при длительном воздействии они меняют действие регуляторных генов, приводя к дифференцировке и росту клеток. Морфологические данные о росте числа синаптических контактов при долговременной сенситизации у аплизии и постсинаптической потенциации в гиппокампе также свидетельствуют в пользу проведения аналогии между механизмом долговременной памяти и клеточной дифференцировки [43]. Потребность в активации синтеза белков при формировании долговременной памяти сама по себе еще не говорит о синтезе специфичных для процесса обучения белков. Этот вопрос был изучен на цыплятах [51]. При инъекции радиоактивно меченой фукозы (6-деоксигалактоза), необходимой для синтеза гликопротеидов, обнаружилось специфичное для научения увеличение содержания гликопротеинов в стриатуме мозга цыплят. Этого не наблюдалось у цыплят, которых после процедуры обучения подвергали электрошоку. Последний вызывал амнезию, нарушая формирование долговременной памяти. В эксперименте с блокадой синтеза гликопротеинов было показано, что синтез гликопротеинов необходим для формирования долговременной памяти. В мозг вводили аналог фукозы, 2-деоксигалактозу, которая препятствует синтезу гликопротеинов из фукозы. Оказалось, что при инъекции в первые два часа после научения возникает амнезия. При более поздней инъекции она не имеет места [51]. Не показано, однако, что синтез гликопротеинов достаточен для формирования долговременной памяти. Учитывая роль систем фосфорилирования при научении, можно предположить возможное изменение содержания и фосфопротеинов. Этот вопрос подлежит дальнейшему анализу.

Таким образом, несмотря на ряд достижений, появление гипотез и программ исследования молекулярных основ долговременной памяти и процесса перехода от кратковременного к долговременному запоминанию [18, 37, 43], проблема по существу остается почти не изученной. В целом, исследования по выявлению молекулярных механизмов как кратковременной, так и долговременной памяти находятся на начальном этапе развития. Однако успехи последних десятилетий открывают новые возможности для анализа, и перспектива понимания молекулярных процессов, лежащих в основе научения и памяти, начинает принимать зримые очертания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Айрапетян С. Н., Арванов В. Л., Сулейманян М. А.* В кн.: Биофизика мембран. 168. М., 1981.
2. *Берридж М.* В мире науки. 12. 98. 1985.
3. *Гайнутдинов Х. Л., Штарк М. Б.* Новые механизмы ассоциативного обучения. Препринт № 243. Новосибирск, 1984.
4. *Гэйто Дж.* Молекулярная психобиология. М., 1969.
5. *Глебов Р. Н.* Усп. совр. биол., *91*, 3, 433, 1981.

6. *Гусельников В. И., Пиеоварсо А. С.* Биол. науки, 4, 66, 1980.
7. *Дьяконова Т. Л.* В кн.: Всесоюзн. конф. по нейронаукам. 23, Киев, 1986.
8. *Иверсен Л.* В кн.: Мозг. 141, М., 1982.
9. *Костюк П. Г.* Нейрофизиология, *16*, 3, 286, 1984.
10. *Костюк П. Г.* Кальций и клеточная возбудимость. М., 1986.
11. *Котляр Б. И.* Пластичность нервной системы. М., 1986.
12. *Кругликов Р. И.* Нейрохимические механизмы обучения и памяти. М., 1981.
13. *Кэндел Э.* Клеточные основы поведения. М., 1980.
14. *Кэндел Э.* В кн.: Мозг. 59, М., 1982.
15. *Рабинович М. Я.* Замыкательная функция мозга. М., 1975.
16. *Соколов Е. Н.* Журн. высш. нервн. деят., *36*, 2, 252, 1986.
17. *Сторожук В. М.* Нейронные механизмы обучения. Киев, 1986.
18. *Питоловский Л. Е.* Усп. физиол. наук., *17*, 2, 83, 1986.
19. *Штарк М. Б., Колпаков В., Фукс Б. Б.* Усп. совр. биол., *78*, 1, 76, 1974.
20. *Щербатко А. Д.* В кн.: Всесоюзн. конф. по нейронаукам. 190, Киев, 1986.
21. *Acosta–Urquidi J., Alkon D.* Neury J. Science, *224*, 1254, 1984.
22. *Alema S.* Met. Ions Biol. Syst., *17*, 275, 1984.
23. *Alkon D.* Science, *226*, 1037, 1984.
24. *Ayrapetyan S. N., Arvanov V. L., Maginyan S. B., Azatyan K. V.* Cell. Mol. Neurobiology, *5*, 3, 231, 1985.
25. *Brons J., Woody C. D.* J. Neurophysiol., *44*, 4, 605, 1980.
26. *Browning M. D., Huganir R., Greengard P.* J. Neurochem., *45*, 1, 11, 1985.
27. *Brunelli M., Demontis G., Traina G.* J. Physiol. (Gr. Brit.), *369*, 110, 1985.
28. *Burns N. R.* Nature, *313*, 178, 1985.
29. *Byrne J. H.* Trends Neurosci., *8*, 11, 478, 1985.
30. *Corning W., John E.* Science, *134*, 1363, 1961.
31. *Davis H. P., Squire L. R.* Psychol. Bull., *96*, 3, 518, 1984.
32. *Eccles J. C.* Neuroscience, *10*, 9, 1071, 1983.
33. *Farley J., Alkon D.* Ann. Rev. Psychol., *36*, 419, 1985.
34. *Farley J., Auerbach S.* Nature, *319*, 220, 1986.
35. *Gerard R. J.* Verbal Learning, Verbal Behavior, 2, 22, 1963.
36. *Gibbs M. E., Ng K. T.* Neurosci. Lett., 2, 165, 1976.
37. *Goelet Ph., Castellucci V. F., Schacher S., Kandel E. R.* Nature, *322*, 419, 1986.
38. *Hawkins R. D., Abrams T. W., Garew T. J., Kandel E. R.* Science, *219*, 400, 1983.
39. *Hebb D.* The organization of Behavior Wiley, N. Y., 1949.
40. *Hyden H.* In: On the Biology of learning, Harcourt, USA, 95, 1969.
41. *John E.* In: Ann. Rev. Physiol., 23, 451, 1961.
42. *Kalman M.* Exp. Brain Res., *60*, 2, 380, 1985.
43. *Kandel E. R., Schwartz J. H.* Science, *218*, 433, 1982.
44. *Kononenko N. I., Kostyuk P. G., Shcherbatko A. D.* Brain Res., *376*, 2, 239, 1986.
45. *Levitan I. B.* J. Membr. Biol., *87*, 177, 1985.
46. *Lynch G., Baudry M.* Science, *224*, 1057, 1984.
47. *Mark R.* In: Brain Mechanisms in Memory and Learning., 217, N. Y., 1979.
48. *Matthews D.* In: Brain Mechanisms in Memory and Learning., 197, N. Y., 1979.
49. *Morrell F.* Physiol. Rev., *41*, 442, 1961.
50. *Occorr K. A., Walters E. T., Byrne J. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *82*, 8, 2548, 1985.
51. *Rose S.* New Scientist, *112*, 40, 1986.
52. *Sahley Ch.* Trends Neurosci., *8*, 10, 423, 1985.
53. *Tsukada Y.* Handb. Neurochem., *8*, 357, 1985.
54. *Walters E. T., Byrne J. H.* Science, *219*, 405, 1983.
55. *Watts M. E., Mark R. F.* Brain Res., *25*, 2, 420, 1971.

Поступило 5.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 595.7;591.151

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КАЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ФОЛИДОЗА ТРЕХ ВИДОВ ЯЩЕРИЦ РОДА *LACERTA*

Л. С. МЕЛКУМЯН, Е. Г. ТОРОСЯН

Армянский педагогический институт им. Х. Абовяна, Ереван

Перспективным подходом к исследованию микроэволюционных процессов оказывается изучение элементарных дискретных признаков фенотипофенов.

Задача настоящего исследования—изучить характерные особенности изменчивости по ряду признаков популяций трех близких видов ящериц—полосатой (*Lacerta strigata* Eichw.), прыткой (*L. agilis brevicaudata* Pel.), средней (*L. trilineata media* Bedr.), обитающих на разной высоте над уровнем моря в пределах АрмССР.

Материал был собран из нескольких пунктов (популяций). Полосатая ящерица—из трех пунктов Араратской долины: совхоз им. Кирова (n=38), Мецамор (n=29), Демирчи (n=26); одного пункта на севере Армении: с. Севкар Иджеванского р-на (n=33)—на высоте 800—900 м над ур. моря; из 4-х пунктов в бассейне оз. Севан: Аревик (n=43), Памбак (n=29), Арцванист (n=31), Норадуз (n=47)—на высоте 1900 м над ур. моря. Прыткая ящерица—из 4-х пунктов на высоте 1750—1900 м: Анкаван Раздапского р-на (n=7), Кучак Апаранского р-на (n=22), Ахтамар Севанского района (n=53), Мартуни Мартунийского р-на (n=32). Средняя ящерица—из ущелья с. Бжни в Раздапском р-не на высоте 1450 м (n=15) и окрестностей с. Ап... Котайкского р-на на высоте 2200 м (n=20). На этом материале учитывали 10 признаков фолидоза, отражающих особенности строения следующих щитков головы: 1—задиеносовых и переднескуловых, 2—предглазничных, 3—верхне-губных до подглазничного, 4—верхнегубных позади подглазничного, 5—нижнегубных, 6—нижнечелюстных, 7—надглазничных, 8—верхнересничных, 9—верхневисочных, 10—глазнично-височных. Все признаки учитывались на обеих сторонах тела. В работе приводится средняя для двух сторон частота встречаемости.

Анализ изменчивости качественных признаков фолидоза трех близких видов ящериц рода *Lacerta* дал возможность сделать следующие заключения.

1. Фенотипический подход перспективен для изучения внутривидовой изменчивости и межвидовых различий между близкими видами ящериц, обитающих на разных высотах над ур. моря.

2. Анализ частот встречаемости различных качественных признаков фолидоза (фенов) выявляет различия даже между близко обитающими предгорными и горными популяциями как одной зоны, так и различающимися по высоте местности.

3. Анализ изменчивости признаков позволяет обнаружить тенденцию к увеличению числа щитков у более высоко расположенных местообитаний популяций. Это может быть связано с увеличением линейных размеров при переходе из предгорной зоны в высокогорье.

4. Обнаруживается большой диапазон варьирования и появление редких фенов у высоких местообитаний популяций. Это, видимо, можно объяснить нарушением стабильности развития на периферии ареала вида.

13 с., библиогр. 7 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ № 1115-В88, от 24.II 1987 г.

Поступило 13.V 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.1 636.5:612.393

ДИНАМИКА МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ КУРИНОГО ЭМБРИОНА ПРИ СКАРМЛИВАНИИ КУРАМ-НЕСУШКАМ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Д. С. БАЛАСАНЯН, Л. Р. КАНАЯН, Т. Р. БАРХУДАРЯН

Ереванский зооветеринарный институт, лаборатория обмена веществ

Работа посвящена изучению изменений процесса митотического деления гепатоцитов эмбриональной ткани в разные сроки инкубации яиц при скармливании курам-несушкам янтарной кислоты.

Куры опытной группы помимо основного рациона получали янтарную кислоту из расчета 8 мг на голову в сутки. После 50 дней скармливания курам янтарной кислоты яйца кур обеих групп 3—4-дневного сбора инкубировали. На 11,5, 18,5 и 21-е сутки (период вылупления) эмбрионального развития у зародышей извлекали печень. Проводилось вскрытие яйца, препарирование печени. Индекс митотической активности определяли путем подсчета клеток, находящихся в отдельных фазах.

Результаты опытов показали, что у интактных эмбрионов снижение активности деления печеночных клеток сопровождается снижением интенсивности увеличения печени. Янтарная кислота способствует повышению активности пролиферации гепатоцитов в ходе развития зародыша. Среднее значение митотического индекса клеток печени зародышей опытных групп превышает контрольный уровень. Наибольшая разница отмечена в период вылупления цыплят. Если активность деления клеток печени интактных эмбрионов в указанный срок принять за 100%, то у опытных она составит 177.7%. Индексы отдельных фаз митоза также превышают контрольные показатели. Относительное ко-

личество профаз и метафаз в начальные сроки инкубации у контрольных эмбрионов составляет 0,25 и 0,13%, а у опытных—0,32 и 0,24%. Процент ана- и телофаз в опытной группе повышается до 0,03 (в контроле—0,01%). Сдвиги в процентных отношениях отдельных фаз митоза позволяют допустить, что скармливание курам несушкам янтарной кислоты способствует некоторому оживлению процессов пролиферации клеток печеночной ткани эмбрионов.

При сравнении митотической активности печеночных клеток с интенсивностью роста печени отмечается некоторое кажущееся противоречие. Показатели интенсивности роста печени в опытной группе несколько снижены по сравнению с контрольным. Это объясняется тем, что, возможно, в результате активации янтарной кислоты метаболических процессов ядер, способствующих уменьшению продолжительности клеточного цикла, происходит некоторое ускорение завершения формирования печени. Подобное действие янтарной кислоты, по-видимому, в значительной степени определяется его влиянием на энергетический механизм гепатоцитов.

6 с., табл. 2, библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ № 3066-В87, от 21.XII 1987 г.

Поступило 30.IX 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 547.96:597.553.2:577.1

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ СЕВАНСКОГО СИГА

С. С. МИСИРЯН

Севанская гидробиологическая станция АН АрмССР, лаборатория экспериментальной экологии

Проблема обеспеченности рыб пищей может быть решена путем определения интенсивности ассимиляторных процессов, прежде всего белкового синтеза.

Нами изучалось содержание водорастворимых белков в органах (печени, мышцах, мозге, сердце) севанского сига в различные периоды годового жизненного цикла. Количество белка определяли по методу Лоури.

Как показали результаты исследований, максимальное количество водорастворимых белков на протяжении всего годового цикла сига содержится в печени. Во всех исследованных органах в декабре месяце наблюдается значительное увеличение абсолютных количеств белка по сравнению с октябрем. Таким образом, преднерестовый и нерестовый периоды сопровождаются интенсивным белковым синтезом.

В апреле отмечается падение абсолютных количеств белка во всех органах, особенно в мышцах. Эти данные свидетельствуют о том, что в зимние месяцы 1985 г. питание сигов было неполноценным.

В начале весенне-летнего периода (май) в органах сига наблюдается незначительное увеличение белка. В нагульный период (сентябрь) количество его в мышцах и в мозге почти выравнивается. В октябре (преднерестовый период) мышцы вновь занимают второе место в таблице после печени по содержанию белков.

При сравнении данных 1985 и 1984 годов становится очевидным, что в 1985 г. абсолютное количество водорастворимых белков, содержащихся в исследуемых нами органах севанского сига, выше чем в 1984 г. Отмеченный факт может свидетельствовать об улучшении кормовой базы в указанный период.

Количественный метод определения содержания абсолютных количести водорастворимых белков в различных органах севанского сига можно будет использовать в качестве чувствительного теста-метода для прогнозирования состояния популяций рыб в меняющихся условиях среды.

13 с., табл. 3, библиогр. 19 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ № 3047-В88, от 20.IV 1988 г.

Поступила 13.II 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 619:618.5:577.18

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ КОРОВ ПРИ ЗАДЕРЖКЕ ПОСЛЕДА

А. М. БАДАЛЯН

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

Предполагается, что одной из причин патологии родового акта у коров является нарушение баланса эстрогенов и прогестерона в крови в период, предшествующий отелу.

Целью настоящей работы было исследование уровней эстрадиола 17 β, прогестерона, простагландина $F_{2\alpha}$, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, пролактина в крови коров с нормальным течением отела и при задержке последа свыше 12—24 часов.

Концентрацию половых гормонов в крови 12 коров определяли радиоиммунологическим методом.

Исследования показали, что содержание половых гормонов в крови коров, кроме пролактина и ФСГ, в время родов снижается. Особенно резко (в 5 раз) снижается концентрация прогестерона. Эти сдвиги при нормальном отеле закономерны и коррелируют с характерными изменениями физиологических функций в этот период.

Аналогичная направленность изменений концентрации гормонов отмечается и в крови коров с задержанием последа, однако здесь имеются количественные различия. При задержании последа, который является основным местом синтеза прогестерона, содержание его уменьшается в 1,6 раза, а при нормальном отеле в 5 раз.

Сравнение данных гормональной картины предродового периода выявило достоверно пониженную концентрацию эстрадиола 17 β, простагландина $F_{2\alpha}$ и пролактина, при относительно неизменной концентрации прогестерона. Следовательно, повышение количественного соотношения прогестерона и вышеуказанных гормонов перед отелом может свидетельствовать о возможности патологического течения родов.

Полученные результаты показывают, что роды сопровождаются характерными сдвигами в гормональном статусе организма. При задержании последа, концентрация исследованных гормонов, кроме прогестерона, понижается, количество прогестерона же в 3,3 раза превышает норму. Изменение соотношения эффекторных половых гормонов в пользу прогестерона перед родами может быть использовано для прогнозирования задержания последа. Концентрационные сдвиги гонадотропных гормонов в данной патологии менее выражены и прогностической ценности не имеют.

6 с., библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ. № 1440-В88, от 24.II 1988 г.

Поступило 20.X 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988 УДК 577.151.017.2.577.152.31

АКТИВНОСТЬ ФОСФАТАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ТОНКИХ КИШОК

Г. Т. АДУНЦ, И. Г. АСЛАНЯН, Л. В. САРКИСЯН, Л. Н. ТЕР-ТАГЕВОСЯН, Г. Г. АДУНЦ, А. А. ГАСПАРЯН

Институт биохимии АН АрмССР

Особая роль в пристеночном пищеварении отводится фосфогидролазам, выполняющим важные функции при всасывании пищевых гидролизатов. Поскольку ткани развивающегося организма отличаются от тканей взрослого животного как по химизму, так и по структуре и функциональным свойствам, представлялось целесообразным изучить особенности некоторых фосфатаз отдельных отделов тонких кишок у разных возрастных групп самцов белых беспородных крыс: ФГФазы, щелочной и кислой фосфатазы, ацетилфосфатазы и АТФазы.

Большинство исследователей считают, что проксимально-дистальные градиенты распределения различных ферментативных активностей имеют приспособительное значение. Изменение условий работы желудочно-кишечного тракта неизбежно приводит к их перераспределению. Наиболее принципиальные различия между каудальными и передними сегментами сводятся главным образом к тому, что в передних отделах происходит интенсивный полостной и мембранный гидролиз пищевых полимеров, тогда как в дистальных осуществляются в основном процессы всасывания воды, солей, желчных кислот и многих других компонентов, поступающих в пищеварительную полость в составе секретов.

Полученные данные свидетельствуют о разнонаправленности в динамике активности отдельных фосфатаз тонкого кишечника в ходе ин-

дивидуального развития, связанной, по всей вероятности, с неоднозначностью функций, выполняемых ими в этой ткани. Связанные с общими метаболическими изменениями, вызванными ростом и старением организма, эти сдвиги обусловлены также изменением характера питания и пристеночного пищеварения в ходе развития организма.

Таким образом, взаимодействия пищевых веществ на стадии мембранного гидролиза оказываются различными в каждый момент в разных отделах кишечной полости одного и того же животного. Это, по-видимому, имеет важное значение не только для понимания особенностей естественного пищеварения, но и для оценки последствий патологии определенных отделов тонкой кишки.

7 с., библиогр. 16 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ, № 1443-В88, от 24.11.1988 г.

Поступило 12.II 1987 г.

Биолог. ж. Армении т. 41, № 5, 1988 УДК 635.64:581.19

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ И СОЗРЕВАНИЯ ПЛОДОВ ТОМАТА

А. Г. АВАКЯН, Т. Г. СТЕПАНЯН, Е. О. ТАРОСОВА

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

Содержание органических кислот является одним из важных критериев оценки питательно-ценных компонентов в плодах томата. Нами изучена динамика накопления органических кислот и основных компонентов в процессе формирования и созревания плодов с целью выявления зависимости между процессами образования, накопления, отдельными этапами развития растений и биологическими особенностями сорта.

В плодах томата обнаружены щавелевая, винная, лимонная, яблочная, янтарная и малоновая кислоты, основными являются лимонная и яблочная.

Содержание кислот изменяется в процессе формирования и созревания плодов. Так, зеленые плоды обладают небольшим количеством лимонной кислоты, но по мере их созревания содержание ее увеличивается, достигая максимума в зрелых плодах, и затем снижается в перезревших. Напротив, содержание яблочной кислоты постепенно снижается в процессе созревания плодов.

Установлено, что с повышением содержания лимонной кислоты уменьшается количество яблочной, что указывает на определенную взаимосвязь между этими кислотами.

Содержание янтарной кислоты увеличивается до стадии бланжевой зрелости. В перезревших плодах количество лимонной и яблочной кислот уменьшается, а янтарной увеличивается.

Винная и щавелевая кислоты обнаруживаются в сравнительно небольших количествах.

Органические кислоты играют особую роль в процессе созревания плодов.

На начальных этапах роста плоды обладают небольшой кислотностью, но по мере их формирования и особенно при созревании происходит интенсивное накопление органических кислот, которое достигает максимума на последних этапах созревания. Образование органических кислот связано с процессом дыхания и диссимиляцией углеводов, а различия их в содержании являются следствием различных соотношений скоростей ферментативных реакций цикла трикарбоновых и дикарбоновых кислот.

Данные свидетельствуют, что в процессе формирования и созревания плодов наибольшее содержание питательно-ценных компонентов отмечено в плодах съемной зрелости, а ухудшение их качества—в процессе перезревания.

Динамика накопления органических кислот в процессе созревания у сортов неодинаковая, каждому сорту свойственна определенная кислотность, зависящая от его биологических особенностей.

8 с. 3 илл., табл. 1, библиогр. 3 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНИТИ, № 9069-В87 от 24.XII 1987 г.

Поступило 3.IX 1987 г.

ЦЕННОЕ РУКОВОДСТВО

Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений. Справочник в 2-х томах, под ред. А. А. Герасименко. М., «Машиностроение», 1987, т. 1—688 с., т. 2—784 с., с ил.

Надежность и долговечность использования металлических, полимерных и других материалов в значительной мере определяются решением проблем защиты их от коррозии, старения и биоповреждений. От этого во многом зависит успешное выполнение реализуемых в нашей стране важнейших программ в области композиционных материалов и машиностроения.

Издание рецензируемой книги весьма своевременно и актуально. Несмотря на то, что работа издана как «Справочник», она является фактически основательным руководством с подробным изложением фундаментальных и прикладных аспектов проблем коррозии, старения и биоповреждений. Двухтомное издание состоит из 10 частей, в которых рассмотрены самые разнообразные вопросы, касающиеся характеристики, классификации и методов защиты от коррозии и биоповреждений. Авторский коллектив представлен ведущими и квалифицированными специалистами нашей страны. Каждая глава снабжена списком основной литературы, а в приложениях представлен большой справочный материал по существующим стандартам, системам и методам определения процессов коррозии и биоповреждений. Имеется предметный указатель, весьма полезный для пользования столь разнообразным материалом.

В книге обобщен огромный фактический материал, опубликованный в литературе и полученный авторами. Разумеется, не все разделы равнозначны, однако сам по себе огромный труд, проделанный авторами, особенно редактором книги А. А. Герасименко, в систематизации этих данных заслуживает высокой оценки. В книге приводится достаточно полный объем сведений, необходимый специалисту, работающему в области коррозии и биоповреждений. Излагаемый материал удачно снабжен схемами и таблицами, а разделы, посвященные химии процессов, технологии и т. п., вполне доступны специалистам биологического профиля.

Большим достоинством рецензируемой книги является комплексный подход как к характеристике процессов коррозии и биоповреждений, так и методам защиты от них. Значительное место уделено трактовке физико-химической и электрохимической природы процессов, вызываемых различными агентами, в том числе микроорганизмами. Вопросы микробных повреждений и биокоррозии рассматриваются в одной части и девяти главах. Наряду с прикладным материалом, в этих главах приводятся общие сведения о микроорганизмах и микробиологических процессах повреждения различных классов материалов и сооружений.

К сожалению, рецензируемая книга не лишена недочетов. Поскольку книга фактически является руководством, авторы могли более подробно осветить ряд общих положений по механизмам и природе различных процессов коррозии и биоповреждений, в особенности композиционных материалов. В книге много досадных опечаток в названиях микроорганизмов. Имеются неточные формулировки. Например, исследованиями последних лет достоверно установлена стимуляция анаэробной коррозии при применении катодной защиты. Не обосновано заявление, что сульфатвосстанавливающие бактерии являются основными разрушителями нефти и нефтепродуктов и для их роста необходимы углеводороды. В анаэробных условиях железобактерии не имеют никакого отношения к электрохимической коррозии. В литературе имеется немало сведений о стимуляции активности микробов под давлением.

Не вызывает сомнений необходимость переиздания рецензируемой книги как фундаментального и практического руководства. При этом желательно переработать и дополнить ряд разделов с учетом достижений науки за последние годы.

Э. К. АФРИКЯН