

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսը» հրատարակվում է Հայկական ՍՍՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և սպասարկում է հողագիտության, բուսաբանության, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաբժշկության, կենսաֆիզիկայի, մանրէաբանության, զենեկագիտության և բնագիտության ոլորտի կիրառական կենսաբանության այլ բնագավառների վերաբերյալ:

Կաժանորդագրին է ճ ու. 40 կ. Կաժանորդագրությունն ընդունվում է Առևտրային բանկի րաժանմունքներում:

«Биологический журнал Армении» публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, биофизике, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии.

Подписная цена за год 3 руб. 40 коп. Подписку на журнал можно производить во всех отделениях Союзпечати.

Խմբագրական կոլեգիան՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Ն. Ավետիսյան, Յո. Ս. Ալեքսանյան, Հ. Գ. Բակլաճյան, Մ. Ա. Գալստյան, Բ. Բ. Հակոբյան, Կ. Ս. Հարությունյան (պատասխանատու խմբագիր), Ս. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Գ. Ա. Ղանդիլյան, Կ. Գ. Ղարազոյցյան, Ս. Մ. Մոսիսյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ):

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (նախագահ), Լ. Լ. Անրաժաճյան, Վ. Յ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Ս. Գաբրիելյան, Ա. Ա. Գալստյան, Ա. Լ. Բոբոստյան, Գ. Ա. Խորշոդյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Է. Է. Հովսեփյան, Է. Ս. Ղազարյան, Ս. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չալախյան, Կ. Ս. Չոբոսյան:

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

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

Պատասխանատու թիվը՝ Կ. Գ. Կարազոյցյան

Տեխ. թիվը՝ Լ. Ա. Անրաժաճյան

Տնտեսվածում է 15.05.1989 թ. Ստանդարտներին կից 26.07.1989 թ. ԲՓ 04027.

Բուժարտ. № 1. 70x100 մմ. Վերստային տպագրություն, Մու. թղթի թիվ 3 142 մմ. Սղ. թղթի թիվ 8, 23.

Սղ. թղթի թիվ 7, 72. Երան 652. Հոժիտ 341. Սղ. թղթի թիվ 7616.

Դրես թիվը: 375019, Երևան, ք. Մարշալ Բաղրամյան, 24 ր, կոմ. 11, տ. 58-01-97.

Իժատելստվո Ակադեմիա ինսկ Արմյանսկոյ ՍՍՐ, Երևան.

ք. Մարշալ Բաղրամյան, 24 ր.

Տիպոգրաֆիա Իժատելստվո ԱՄ ԱրմՍՍՐ, Երևան-19.

ք. Մարշալ Բաղրամյան, 24.

Պետրոսյան Գ. Հ. Սպիտակուցի առաջնային կառուցվածքի կազմության սկզբունքը քաջաձայնաբանության շարքում IV. Ամինսիստոնների կողմնակիցի և սյարթ թվերի բաշխման առնչության դասակարգումը Պարզ թվերի որոշարկույթը և բաշխումը բնական թվերի բազմության մեջ	525
Պետրոսյան Թ. Ա. Վրաստանի կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ փոփոխությունները Երասխա HeLa Ըձ-ԳՆԹ-ը SV2 նեո բջիջների տրանսֆորմացիոն համախաղանությունը բարձրացնող գործոն	533
Մեայականյան Կ. Ա., Փայլազյան Ա. Ա., Շահինյան Կ. Ա., Հակոբյան Տ. Ն., Հարությունյան Լ. Ա. Բարանթի սպիտակուցները երկրազաղարամասային լուծալուստումը	533
Տիկունով Բ. Ա., Սարգսյան Ա. Է., Կալիբաջյան Մ. Ա., Հովհաննիսյան Ա. Տ. Ակտոմիոցիների ձրկու կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ միանակները. կայունությունը զեկազմավորող ազդեցությունների նկատմամբ	546
Միլեասրեկյան Լ. Ա., Վարդանյան Պ. Ա., Միմոնյան Ա. Կ., Փանոսյան Կ. Հ. Յորնինգ-գիները ԳՆԹ-ի որոշ կառուցվածքային առանձնահատկությունների ուսումնասիրության շարքում	551
Ալանյան Ա. Լ. Չոսֆոնիպազների դիմերային մեների և ժողբարդի գերազանցողի նախնային ֆոսֆոնիպազների կոնյուպասների ստացումը	556
Մարտիրոսյան Կ. Մ., Կաղայան Ս. Ա., Բակունց Ի. Ս., Մխիթարյան Գ. Ա., Հարությունյան Ս. Ն. Արևելադարձի նկատմամբ ջեկլազային համակարգիչի գործունեության մոդուլացիոնը Ա. Ֆոսֆոնիպազի միջոցով	562
Սելիսյան Մ. Ա., Մելիք-Ազատյան Ս. Ա., Մխիթարյան Վ. Կ. Ազմուկի ազդեցությունը կայունություններում Վ. Կարոպանյի ազդեցությունը լիպիդային գերօքսիդացման պրոցեսի վրա առնետների լյաբրում և սրտում	566
Մինասյան Ս. Մ., Հովհաննեսյան Ա. Ս. Ընդհանուր թրթուման ազդեցությունը կատիոնամիներների և սերտոնինի բանակության վրա մազարների մակերիկամների, արյան և մեղի մեջ	571

ՀԻՄՆՈՍ ՀԱՂՈՒԹՈՒՄՆԵՐ

Կրիկոսյան Խ. Վ., Ավանեսյան Ա. Ա., Միմոնյան Թ. Հ., Հարապետյան Ս. Ն. Մազեխական կաշտի ազդեցությունը նյարդային բջիջ կենդանական ուղեղամասի և ջրային լուծույթների կենդանազորակառուցության վրա	576
Աղայան Ա. Նա., Համբարձումյան Տ. Կ., Մարտիրոսյան Կ. Կ., Պետրոսյան Լ. Ս. Ընդհանրային լիպոսոմների թաղանթի մեջ համազգայնացիների կերտման որոշումը ֆուոբանցենտային անիդոտրոպիայի մեթոդով	579
Ներսեսյան Ա. Ա., Հարությունյան Թ. Մ. Միկրոմիջուկների ուսումնասիրությունը շտրոբակ երակազմավորումներով հիվանդների մոտ ջիմիաթերապիայի ժամանակ	581
Կրիկոսյան Լ. Ս. Թիմոցիանների բանակական տեղաշարժերն ու արյան մաքրակազմային ակտիվության փոփոխությունը ԳՆԹ-ի ազդեցության ներքո	583

ՏԵՄԻՔՅՈՒՆ ԵՎ ՈԱՆԱՎՆՑ

Նեղիբարյան Ա. Ա., Վարդապետյան Կ. Գ. Կենսաբանական մեմբրանի ֆոսֆոնիպիդային կոմպոնենտի դերը որպես կազդիոմիցիտների ֆունկցիոնալ ակտիվության կարգավորիչ նորմալում և պաթոլոգիայում	587
---	-----

ԼՐԱՏՈՒ

Մաղոսյան Ի. Մոնոկլոնալային կենսաբանության կազմավորման պատմության շարքում (Վ. Ա. Ընդհանրադրի ծննդյան 95-ամյակի առթիվ)	596
Փարսադուսյան Կ. Կ. Միջազգային սիմպոզիում «Կենսաբանական կառուցվածքների մոլեկուլային կազմակերպումը»	604
Կարբիկյան Ա. Կ. Կենսաբանական մոլեկուլային սպեկտրոսկոպիային նվիրված Լ. Համարյան թվեկյան լուսնի տեսքով	607

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Геворкян Г. А.</i> К выявлению принципа построения первичной структуры белка. IV. Систематизация соотношений кодонов аминокислот и простых чисел. Определение и распределение простых чисел по множестве натуральных чисел	525
<i>Захарян Р. А.</i> Структурно-функциональные изменения хроматина как фактор, повышающий частоту трансформации клеток HeL. Са-ДНК рSV2neo	533
<i>Мнацаканян Г. А., Казачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А.</i> Двухкоординатная солюбилизация мембранных белков	538
<i>Тикунюв Б. А., Малоян А. Э., Кайфайжян М. А., Оганесян А. Т.</i> Два структурно-функциональных состояния актомиозина: устойчивость к денатурирующим воздействиям	546
<i>Минисбекян Э. А., Вардгесянц П. О., Симоныч А. Г., Памосян Г. А.</i> К исследованию некоторых структурных особенностей ДНК злаковых	551
<i>Адамян А. Е.</i> Получение димерных форм фосфолипаз и конъюгатов фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена	556
<i>Мартirosян Д. М., Давалян С. С., Балунц И. С., Мхитарян Г. С., Айрапетян С. Н.</i> Модуляция чувствительности инкласных систем к ацетилхолину фосфолипазой A_2	562
<i>Мелконян М. М., Мелик-Агаева Е. А., Мхитарян В. Г.</i> Влияние γ -пропанола на процесс липидной пероксидации в печени и сердце крыс при воздействии шума	566
<i>Микасян С. М., Оганесян А. О.</i> Влияние общей анестезии на содержание катехоламинов и серотонина в надпочечниках, крови и моче кроликов	571

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Григорян Х. В., Аванесян А. С., Симоныч Р. Г., Айрапетян С. Н.</i> Влияние магнитного поля на электрическую активность нейтронов и электропроводность водных растворов	576
<i>Авамян С. Я., Амбарцумян Т. Г., Мариакян Г. Г., Петросян Л. С.</i> Определение включения гемоглобина в мембрану лентитиновых липосом методом флуоресцентной анизотропии	579
<i>Нерсесян А. К., Арутюнян Р. М.</i> Изучение микроядер в ретикулоцитах больных злокачественными новообразованиями при химиотерапии	581
<i>Григорян Л. С.</i> Количественные сдвиги тимоцитов и изменение мурамидазной активности крови при воздействии ПОК	583

ОБЗОРЫ И ДИСКУССИИ

<i>Енгибарян А. А., Мирагалаян К. Г.</i> Фосфолипидный компонент биологической мембраны как регулятор функциональной активности кардиомиоцитов в норме и патологии	587
--	-----

ХРОНИКА

<i>Мадоян И. К.</i> истории становления молекулярной биологии (к 95-летию со дня рождения В. А. Энгельгардта)	596
<i>Парсабян Г. К.</i> Международный симпозиум «Молекулярная организация биологических структур»	601
<i>Габриелян А. Г.</i> VI Всесоюзная конференция по спектроскопии биополимеров	607

CONTENTS

<i>Gevorgian G. H.</i> On the Revelance of Principle of Protein Primary Structure Creation. IV. Systemization of Correlation between Amino Acids Codones and Simple Numbers. Defining and Dividing of Simple Numbers in the Multiplicity of Natural Numbers	525
<i>Zakharian R. A.</i> Structural-Functional Changes of Chromatin as a Factor, Increasing the Frequency of Transformation of the Cells HeLa Ca—DNA pSV2neo	533
<i>Mnatsakanian G. A., Katakhtan A. S., Shahinian K. A., Hakobian V. N., Harutunian A. A.</i> Two-Component Solubilization of Membrane Proteins	538
<i>Tikunov B. A., Maloyan A. E., Kayfajian M. A., Hovhannestan A. Y.</i> Two Structural-Functional States of Actomyosin: Stability to Denaturing Influences	546
<i>Minashehian L. A., Vardevanian P. O., Simonian A. G., Panosian G. A.</i> To the Study of Some Structural Peculiarities of Cereals DNA	551
<i>Ayanian A. Ye.</i> Receipt of Dimer Forms of Phospholipases and Conjugates of Phospholipase A ₂ with Peroxidase of Horse-Radish	556
<i>Martirosyan D. M., Dadalyan S. S., Bakunts I. S., Mkhitarian G. S., Ayrapetyan S. N.</i> Modulation of Cyclic Systems Sensitivity to Acetylcholine by Phospholipase A ₂	562
<i>Melkonian M. M., Melik-Agaeva Ye. A., Mkhitarian V. G.</i> Influence of γ -Propanol on the Process of Lipid Peroxidation in the Rats Liver and Heart under the Effect of Noise	568
<i>Minasian S. M., Hovhannestan A. O.</i> Influence of Total Vibration on the Content of Catecholamines and Serotonin in the Adrenals, Blood and Urea of Rabbits	571

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Grigorian Kh. V., Avanesian A. S., Simonian R. H., Ayrapetyan S. N.</i> Effect of Magnetic Field on Electrical Activity of Neurones and Electrical Conductivity of Water Solutions	576
<i>Adamian S. Ya., Hambardsumyan T. G., Marikyan G. G., Petrosian L. S.</i> Definition of Hemagglutinin Inclusion into the Lecithine Liposome Membrane by the Fluorescent Anisotropy Method	579
<i>Nersesyan A. K., Harutunian R. M.</i> Study of Micronuclei in Reticulocytes of Patients III with Malign Newformations during Chemotherapy	581
<i>Grigorian L. S.</i> Quantitative Changes of Thymocytes and Change of Blood Mouramidase Activity under the Effect of POA	583

REVIEW AND DEBATE

<i>Yengibartan A. A., Karageuzian K. G.</i> Role of Phospholipid Component of Biological Membrane as a Regulator of Functional Activity of Cardiomyocytes in the Norm and Pathology	587
---	-----

CHRONICS

<i>Madoyan I.</i> To the Story of Formation of Molecular Biology (to the 95th Birthday Anniversary of V. A. Engelhardt)	596
<i>Parsadonian G. K.</i> International Symposium "Molecular Organization of Biological Structures"	604
<i>Gabrielyan A. G.</i> The VIth All-Union Conference on Spectroscopy of Biopolymers	607

К ВЫЯВЛЕНИЮ ПРИНЦИПА ПОСТРОЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

IV СИСТЕМАТИЗАЦИЯ СООТНОШЕНИИ КОДОНОВ АМИНОКИСЛОТ И ПРОСТЫХ ЧИСЕЛ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТЫХ ЧИСЕЛ ВО МНОЖЕСТВЕ НАТУРАЛЬНЫХ ЧИСЕЛ*

Г. А. ГЕВОРКЯН

Институт биологии МН АрмССР, Ереван

На основе суммарной электронной плотности кодирующих оснований систематизированы кодоны аминокислот в спирали Архимеда. Выявлена закономерность соотношений между ними и распределением простых чисел во множестве натуральных чисел. Выдвигается тезис об осуществлении ген-аппаратного синтеза специализированных пептидов с общибиологическим и иммуноактивным назначением. Предсказано существование еще одной генетически кодируемой аминокислоты.

Համարված էր, որ գամարային էլեկտրոնային խտության դասակարգվել են ամինաթթուների կոդոնները Արքիմեդի ստրուկտուրի մեջ: Բացահայտվել է երանց և բնական թվերի բազմություն մեջ պարզ թվերի բաշխման անընթաց օրինաչափությունը: Դրույթ է առաջադրվել բնագիտության կենսաբանական և իմունաբանական նշանակություն ունեցող մասնագիտացված սեպարիդների գիտական սինթեզի իրականացնելու մասին: Անհրաժեշտ է Լ-տանդ-կանթրոն կոդավորվող ևս մեկ ամինաթթվի գոյությունը:

According to the parameter of summary electronic density of coding bases all the codones of amino acids have been systemized in Archimed's spiral. It has been revealed the regularity of correlation between them and division of simple numbers in the multiplicity of natural numbers. An idea has been put forward about the realization of gene-apparatus synthesis of specialized peptides with general-biological and immune-active significance. It is predicted the existence of one more genetically coding amino acid.

Структура белка—систематизация простых чисел—пептидная специализация.

Ранее [2—4] нами была представлена новая система классификации природных аминокислот в спирали Архимеда. Основой для этой классификации служил примененный впервые нами параметр СЭП—биомо-

Сокращения: ХАЧ—характерное аминокислотное чередование СЭП—суммарная электронная плотность.

* 1, II и III сообщения опубликованы в № 3 (38), 1985, № 11 (40), 1987, и № 7 (41), 1988, «Биолог. ж. Армении».

лекулу, соответствующий второму уровню рассмотрения периодической организации строения вещества [6] и тем самым являющийся обобщающим критерием оценки разрозненных физико-химических, квантово-биохимических, рентгено-структурных и других данных.

Так как сегодняшний уровень развития науки не позволяет переходить от рассмотрения строения вещества (первые и вторые уровни) к исследованию строения атомного ядра (третий уровень) [6], то параметр СЭП таит в себе возможность оценки адекватной биологической организации, которая уже требует единообразного рассмотрения физико-химических, структурных и системных основ клеточных процессов.

Свидетельством такой возможности служат результаты наших исследований, показывающих, что семейственно-индивидуальной классификации поддаются как аминокислоты, жирные кислоты, сахарады, так и кодирующие основания, т. е. все функциональные единицы пяти основных компонентов клетки (ДНК, РНК, белков, липидов, полисахаридов).

Целью предприятия новытка систематизации кодонов аминокислот в ДНК, в основе которой также берется параметр СЭП. Согласно расчетам, в свободном состоянии цитозин (Ц) и тимин (Т) имеют 58 и 66 электронов, а аденин (А) и гуанин (Г) 70 и 78 электронов соответственно. Так как в ДНК эти основания, соединяясь с сахаром, теряют электрон, то реальное количество их в функционирующих триплетях будет составлять 57, 65, 69 и 77.

Необходимость рассмотрения именно кодонов ДНК продиктована тем, что в РНК тимин заменяется на урацил с количеством электронов, равным количеству электронов цитозина, что пока создает неопределенность в различительной оценке триплетов. Рассмотрение проводили по схеме ХАЧ [4], т. е. по парам аминокислот, образующих между собой комплементарно-поляризованное противостояние (с вышеотмеченным переводом оснований с языка РНК на язык ДНК).

Из табл. видно, что многие СЭП являются простыми числами, а все суммы СЭП парных аминокислот образуют одно и то же простоянное число 402, что является подтверждением факта комплементарности кодирующих триплетов. Именно это постоянное число и определяет распределение СЭП кодонов аминокислот в спирали Архимеда.

Запишем натуральные числа в спирали Архимеда в местах пересечения ее витков с радиальными лучами, исходящими из вершин звезды Давида, помещенной в ее центре (рис. 1). На радиальных лучах двух вершин одного треугольника выступают простые числа, и они образуют две группы, которые начинаются с чисел 5 и 7. Продолжением аналогичной схемы до больших чисел можно получить и идентифицировать все суммы СЭП кодонов аминокислот, а также выявить картину их систематизации (рис. 2).

Рис. 1 и 2 наглядно демонстрируют связь между распределением простых чисел и СЭП кодонов аминокислот в спирали Архимеда. Так как простые числа нерасщепляемы [1], а рибосомальный синтез пептида имеет начало и конец, мы считаем, что существует закономерная

СЭП кодонов аминокислот в ДНК*

Аминокислота	Кодон	СЭП	Разница СЭП	Сумма СЭП	СЭП	Кодон	Аминокислота
Гли	ЦЦЦ	171	60	402	231	ГГГ	Про
	ЦЦТ	179	44	402	223	ГГА	
	ЦСА	183	36	402	219	ГГТ	
	ЦПГ	191	20	402	211	ГГЦ	
Ала	ЦГЦ	191	20	402	211	ГЦГ	Арг
	ЦГТ	199	4	402	203	ГЦА	
	ЦГА	203	4	402	199	ГЦТ	
	ЦГГ	211	20	402	191	ГЦЦ	
Сер	АГА	215	28	402	187	ТЦТ	Сер
	АГГ	223	44	402	179	ТЦЦ	
Тре	АГЦ	203	4	402	199	ТЦГ	Сер
	АГТ	211	20	402	191	ТЦА	
	ТГЦ	199	4	402	203	АЦГ	Цис
	ТГТ	207	12	402	195	АЦА	
Тре	ТГА	211	20	402	191	АЦТ	Умбер
	ТГГ	219	36	402	183	АЦЦ	Три
Вал	ЦАЦ	183	36	402	219	ГТГ	Гис
	ЦАТ	191	20	402	211	ГТА	
	ЦАА	195	12	402	207	ГТТ	Гли
	ЦАГ	203	4	402	199	ГТЦ	
Лей	ГАЦ	203	4	402	199	ЦТГ	Асп
	ГАТ	211	20	402	191	ЦТА	
	ГАА	215	26	402	187	ЦТТ	Глу
	ГАГ	223	44	402	179	ЦТЦ	
Лей	ААЦ	195	12	402	207	ТТГ	Асп
	ААТ	203	4	402	199	ТТА	
Иле	ТАА	203	4	402	199	АТТ	Охре
	ТАГ	211	20	402	191	АТЦ	
	ТАТ	199	4	402	203	АТА	Тир
	ТАЦ	191	20	402	211	АТГ	
Лиз	ТТЦ	187	28	402	215	ААГ	Фен
	ТТТ	195	12	402	207	ААА	

* Образующие между собой комплементарно-поляризованное протннжтвное пары аминокислот расположены фронтально слева и справа таблицы.

связь между простыми числами и специализацией рибосомальных пептидов до сплайсинга.

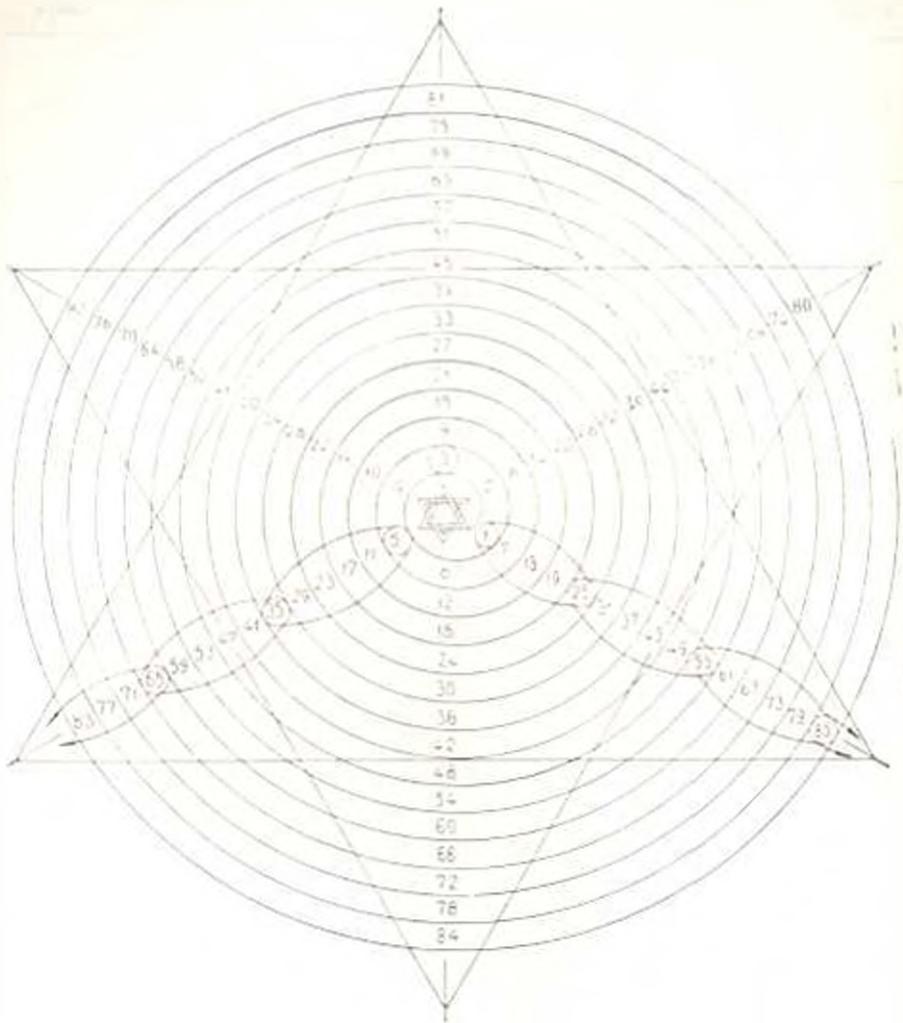


Рис. 1. Схема распределения простых чисел во множестве натуральных чисел в спирали Архимеда. Кратные пяти числа, между которыми выступают простые числа, взяты в кружки и соединены мостиками для наглядности закономерности. В центре спирали помещена звезда Давида.

По рис. 1 и 2 видно, что две группы простых чисел подчиняются следующим эмпирическим формулам:

$$N_1 = 6n - 1 \quad (1) \quad \text{и} \quad N_2 = 6n - 5 \quad (2)$$

Пример,

$$N_1 = 5 \quad (n = 1)$$

$$N_1 = 11 \quad (n = 2)$$

$$N_1 = 17 \quad (n = 3)$$

$$N_1 = 23 \quad (n = 4)$$

$$N_1 = 29 \quad (n = 5)$$

И так далее.

Пример,

$$N_2 = 7 \quad (n = 1)$$

$$N_2 = 13 \quad (n = 2)$$

$$N_2 = 19 \quad (n = 3)$$

$$N_2 = 31 \quad (n = 5)$$

$$N_2 = 37 \quad (n = 6)$$

И так далее.

Отмечаем, что 24 кодона подчиняются формуле (1) при $n=30, 32, 34, 36$; 24—формуле (2) при $n=31, 33, 35, 37$, а остальные 16 кодонов соответствуют формуле: $N_3=6n+3-3(2n-1)$ (3) при $n=28, 30, 32, 34, 36, 38$.

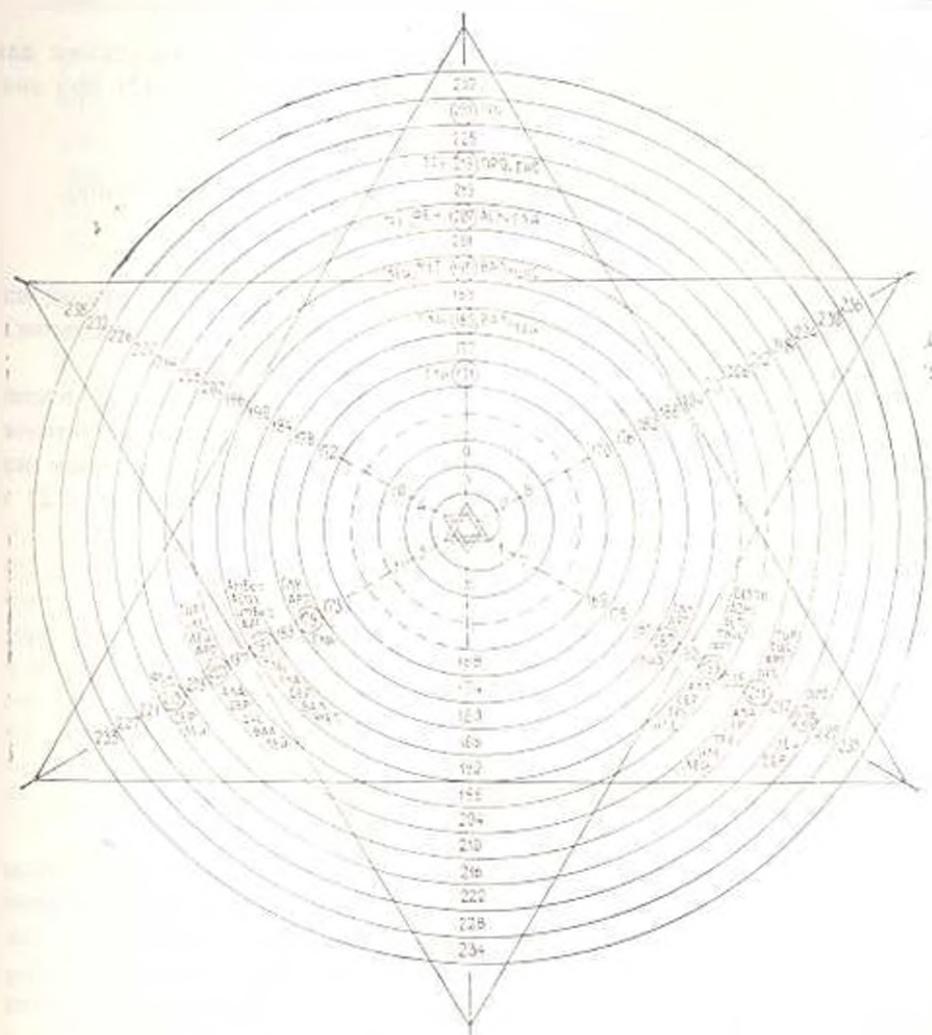


Рис. 2 Схема систематизации кодонов аминокислот по параметру СЭП в спирали Архимеда. Числа, соответствующие СЭП кодовам аминокислот, взяты в кружки. В рядом записаны соответствующие аминокислоты. В центре—звезда Давида.

Простые числа (рис. 1 и 2) через равные интервалы заключены между числами, кратными пяти, и среди них находятся также составные (не простые) числа, которые являются произведениями от умножения предшествующих простых чисел. Эти составные числа выявляются алгоритмом, который для общего случая описывается следующими тремя формулами:

$$N_4 = (6n - 1)^2 \quad (4)$$

$$N_5 = (6n + 1)^2 \quad (5)$$

$$N_6 = (6n - 1)(6n + 1) \quad (6), \quad \text{где } n = 1, 2, 3, \dots$$

Остальные смежные составные числа легко обнаруживаются следующими модификациями формулы (6):

$$N_6 = (6n - 1)(6n + 1) \quad (6a) \quad \text{и} \quad N_6 = (6n - 1)(6n + 1) \quad (6б)$$

$$n = \text{const} \quad n \rightarrow \infty \qquad \qquad \qquad n \rightarrow \infty \quad n = \text{const}.$$

Кратные пяти числа (взятые в кружки и соединенные мостиками для наглядности закономерности) задаются формулами (1) и (2) при значениях (рис. 1):

$$n = 5m + 1 \quad (1a) \quad \text{и} \quad n = 5m - 1 \quad (2a) \quad \text{соответственно,}$$

где $m = 1, 2, 3, \dots, \infty$.

Как было отмечено выше, простые числа образуют две группы, находясь на двух радиальных лучах (рис. 1 и 2) одного треугольника, вершинами которого являются простые числа 3, 5 и 7.

Возникает закономерный вопрос: все ли простые числа (за исключением 2) заключены в этих двух группах (рядах)? Для математического доказательства этого принципиального положения запишем натуральные числа с шестичленными циклами (согласно рис. 1 и 2) и приведем формулы для шести столбцов:

$6n + 1$	$6n + 2 =$	$6n + 3 =$	$6n + 4 =$	$6n + 5$	$6n + 6 =$
	$= 2(3n + 1)$	$= 3(2n + 1)$	$= 2(3n + 2)$		$= 6(n + 1)$
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24

И так далее.

Нетрудно заметить, что только формулы 1-го и 5-го столбцов не подвергаются разложению на множители и тем самым удовлетворяют условию неделимости или нерасщепляемости простых чисел [1]. Следовательно, остальные столбцы (2, 3, 4 и 6) содержат только и только составные (не простые) числа. А составные числа в ряду простых чисел легко выявляются вышеуказанным алгоритмом (формулы (4), (5) и (6) с модификациями). Формула 5-го столбца $6n + 5$ легко преобразуется в формулу (1) с одношаговым сдвигом n .

Для наглядности сказанного приводим рис. 3, на котором показано распределение простых чисел (в двух рядах) во множестве натуральных и одновременно выявляются корреляции между двумя рядами.

Нетрудно убедиться, что любые простые числа описываются формулами (1) и (2). Объединив формулы (1) и (2), можно дать обобщенную формулу определения простых чисел (произвольной величины): $N = 6n \pm 1$ (7).

где $n = 1, 2, 3, \dots, \infty$ с алгоритмическими исключениями формул (4), (5) и (6) с модификациями (6a) и (6б). Более подробное изложение не входит в задачу настоящей работы.

Приведем также эмпирические формулы систематизированных рядов [2, 4] аминокислот по параметру СЭП.

Для группы глицина:

$$N_n = 8n \quad (8) \quad \text{и}$$

Для группы пролина:

$$N_n = 8n - 2 = 2(4n - 1) \quad (9)$$

Гли	$n = 5$
Ала	$n = 6$
Сер	$n = 7$
Тре, Вал, Цис	$n = 8$
Лей, Иле	$n = 9$
Лиз, Мет	$n = 10$
Фен	$n = 11$
Тир	$n = 12$

Про	$n = 8$
Асп, Асн	$n = 9$
Глу, Гли	$n = 10$
Арг	$n = 12$

Гистидин описывается формулой $N_n = 8n + 2 = 2(4n + 1)$ при $n = 10$ (10).
Триптофан—формулой $N_{10} = 8n + 4 = 4(2n + 1)$ при $n = 13$ (11).

Таким образом, расширение сферы применения параметра СЭП биомолекул приводит не только к объяснению экспериментально установленных фактов, но и к предсказанию результатов исследований как в области биологии, так и других научных дисциплин [1, 7].

Проведенная систематизация кодонов аминокислот и простых чисел вслед за систематизацией самих аминокислот [2, 4], со всеми вытекающими отсюда последствиями для математики, физики и вычислительной техники, может привести к осуществлению не просто химического, а ген-аппаратного синтеза искомым полипептидов, в том числе и активных центров полиперриодически организованных антител против дробно индуцирующих антигенных детерминантов вирусов системно. Это важно для теоретической биологии и, возможно, актуально в борьбе со СПИД, хотя существует и другой подход [5] к этой проблеме.

По схеме ХАЧ [2, 4], как это и очевидно, можно предсказать существование еще одной генетически кодируемой аминокислоты в группе пролина, между Глу и Арг, с СЭП 86 и радикалом—47, кодоном которой является один из шести кодонов лейцина с СЭП 203 (табл. и рис. 2), ибо из всех аминокислот только у лейцина СЭП кодона повторяется дважды в одной и той же ячейке.

Известно, что в митохондриальной ДНК человека четыре кодона универсального кода—УГА, АГА, АГА и АГГ (в ДНК—АЦТ, ТАТ, ТЦТ и ТЦЦ)—меняют свой смысл и аминокислотный адрес, а в ДНК дрожжевых митохондрий четыре лейциновых кодона—ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА и ЦУГ (в ДНК—ГАА, ГАГ, ГАТ и ГАЦ) переходят к треонину, ставя под сомнение абсолютную универсальность и однозначную идентификацию генетического кода и подтверждая существование двух разных систем кодирования внутри даже одной клетки.

По табл. и рис. 2 нетрудно определить, что кодон этой предсказуемой аминокислоты может соответствовать кодону ААТ (в РНК—УУА) или кодону ГАЦ (в РНК—ЦУГ) лейцина. Предварительно назовем ее Арц (Арцах). И если эта аминокислота действительно существует, то почему до сих пор она не обнаружена? Мы допускаем, что это свя-

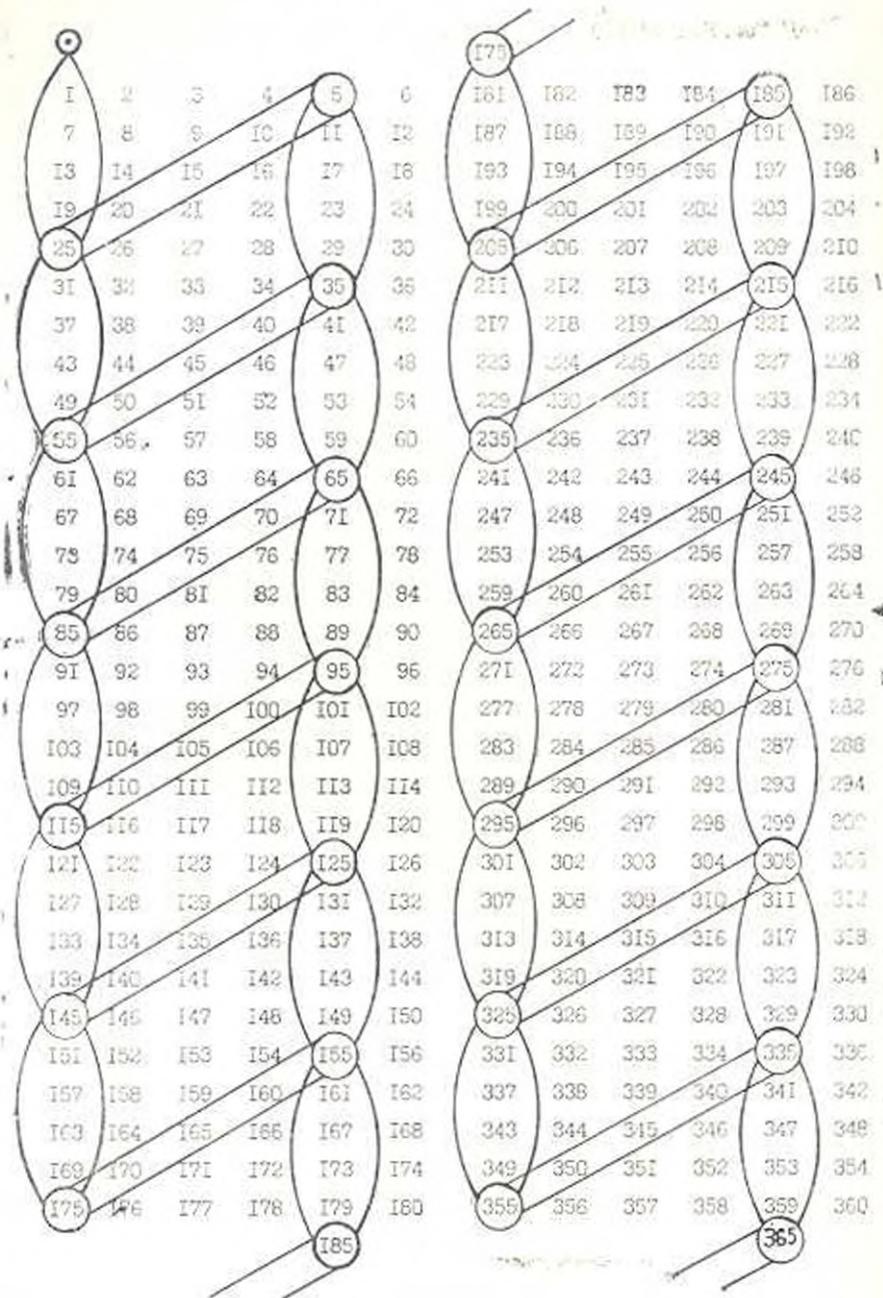
$6n+1$ $6n-1$ 

Рис. 3. Закономерность распределения простых чисел во множестве натуральных чисел. Кратные пяти числа, между которыми выступают простые числа, взяты в кружки и соединены мостиками для наглядности закономерности. Прямыми линиями между собой соединены также эти умалые числа для демонстрации корреляции и распределения двух рядов: или переходы как в рядах, так и между ними осуществлены кратными пяти числами.

зано с отмеченной Хиллманом неопределенностью биохимических методов определения структур. Допустим ее структурную трансформацию в другую аминокислоту, мы предполагаем, что ей принадлежит некая важная функциональная роль в организации биологических процессов, как в случае превращения тимина в урацил.

Факты варьирования кодонов аминокислот и результаты проведенных исследований диктуют необходимость вести целосистемный поиск действительных принципов и механизмов кодирования, исходя из реального параметра (СЭП) количественной оценки химико-биологической информации, строения биомолекул фенотипа и кодирующих оснований генотипа, взаимодействие и связь между которыми формирует и реализует все виды биологической памяти, лежащие в основе процесса восприятия, анализа, синтеза и резонансной модуляции, индукции и дедукции воли мысли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов И. М. Основы теории чисел. М., 1972.
2. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 28, 3, 216, 1985.
3. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 10, 11, 958, 1987.
4. Геворкян Г. А. Биолог. ж. Армении, 11, 7, 613, 1988.
5. Давидян Д. Б. Биолог. ж. Армении, 11, 8, 710, 1988 (Деп. в ВИНИТИ, № 6958-Б88 от 31.X.1988 г.)
6. Кедров Б. М., Трифонов Л. П. О современных проблемах периодической системы. М., 1974.
7. Шамаков В. Великие Арканы Таро. М., 1916.

Поступило 10.III 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 6 (42), 1989

УДК 577.1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ХРОМАТИНА КАК ФАКТОР, ПОВЫШАЮЩИЙ ЧАСТОТУ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК HeLa Ca-ДНК pSV2neo

Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что обработка Na-бутиратом, ДМСО, ди-РНК, дб-цАМФ повышает частоту трансформации клеток HeLa Ca-принципием ДНК pSV2 neo. У всех изученных стабильных трансформантов ген neo интегрирован в ДНК хроматина и сцеплен с фрагментами ДНК, относящимися к повторяющимся последовательностям генома. Указанные стимуляторы ДНК-опосредованной трансформации клеток HeLa значительно повышали в ядре активность Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы и долю хроматина, чувствительной к ДНКазе; деконденсированные участки хроматина были обогащены повторяющимися последовательностями генома.

Сокращения: ДМСО—диметилсульфат, дб-цАМФ—дibuтирил-п-АМФ, ди-РНК—двунивая РНК.

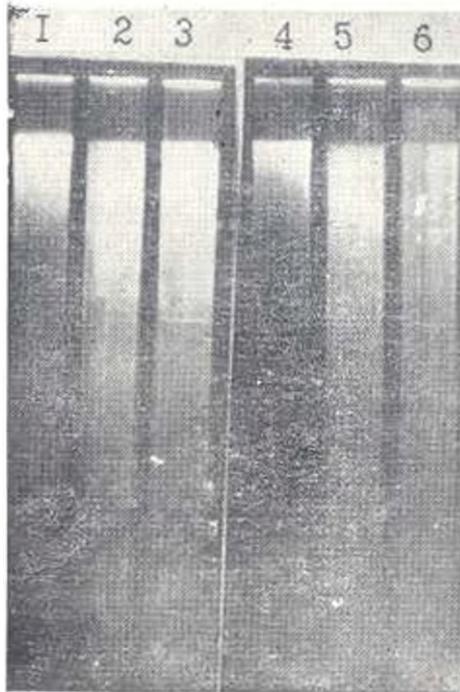


Рис. 1. Расщепление хроматина ДНК азой 1: 1,4—хроматин, полученный из шпактных HeLa; 2, 3, 5, 6—хроматин клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом, пАМФ, ДМСО, ди-РНК соответственно. Электрофорез ДНК проведен в 1,2% геле агарозы.

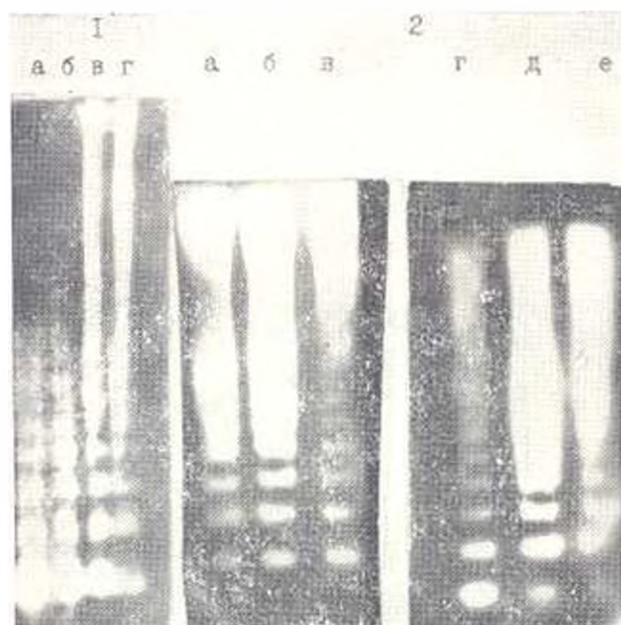


Рис. 2. Расщепление хроматина клеток HeLa Ca^{2+} -Мg зависимой эндонуклеазой (1), микрококковой нуклеазой (2). 1 а, б - хроматин клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом и цАМФ соответственно; 1 в, г - хроматин интактных клеток HeLa, 2 а, б, в, г - хроматин кя. HeLa, обработанная Na-бутиратом, цАМФ, дРНК соответственно; 2 д, е - хроматин интактных клеток HeLa.

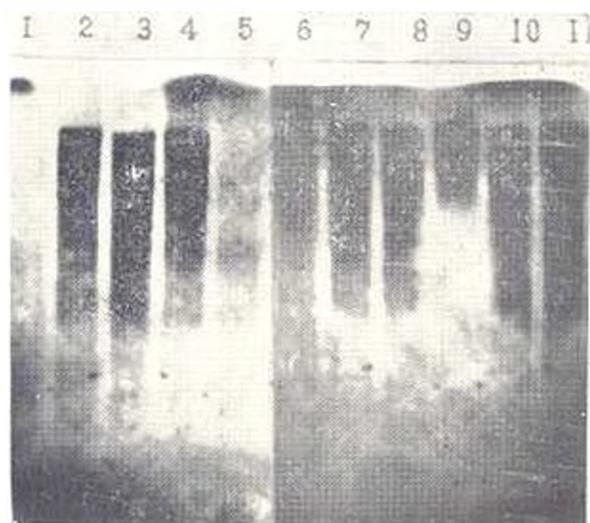


Рис. 3. Гибридизационный анализ ДНК интактных клеток HeLa, обработанной эндоуклеазой Hind III. ^{32}P -ДНК плазмид: 2, 3—p11; 4—p12; 6, 7—p28; 8—p36; 9—p105; 10, 11—p107; 15—pSV 2 neo.

Յույց է արված, որ Na-բուտիրատով, DMSO-ով, կրկնէլ-ԿՆՔ-ով, դր-ցԱՄՖ-ով մշակվումը բարձրացնում է HeLa Ca^{2+} -պրեցիպիտատով ԳՆՔ-pSV2 նեո գենների տրանսֆորմանտների (առնչականությունը) Կուրյու ուսումնասիրված կաշուն տրանսֆորմանտներում նեո գենը ինտեգրացված է ջրածառիկի ԿՆՔ-ում և միացած է ԳՆՔ-ի ալի նստերին, որոնք վերակերպում են գենոմի կրկնվող նաչորդակառույցները: HeLa բջիջների ԳՆՔ-ն ընդդրական տրանսֆորմացիայի վերը նշված ստիմուլյատորները զգալիորեն բարձրացնում են կորիզում Ca^{2+} -Mg-փոխկապակցված էնդոնուկլեոզայի և քրոմատինի բաժնի անտիօբյուրներ, որը զգալուն է ԳՆՔ-ի նկատմամբ: Քրոմատինի ղեկնղննուսցված տեղամասերը հարստացվում են գենոմի կրկնվող նաչորդակառույցներին միջոցով:

It has been shown that the treatment with Na-butyrate, DMSO, ds-RNA, db-cAMP increases the frequency of the transformation of HeLa cells with Ca^{2+} -precipitated DNA of pSV2neo. All studied stable transformants have gene "neo", integrated into chromatin DNA and cohesive with DNA fragments, corresponding to the repetitive sequences of genome. Mentioned stimulators of HeLa cells DNA-mediated transformation considerably enhance the activity of Ca^{2+} -dependent endonuclease in nucleus and the part of chromatin, which is sensitive to DNase I: Decondensed regions of chromatin have been enriched with the repetitive sequences of genome.

Клетки HeLa—трансформация—хроматин.

Трансформация клеток млекопитающих путем введения чужеродной ДНК индивидуальных генов сопровождается интеграцией вводимого гена в геном клетки, его экспрессией, стабильно и наследуемо сохраняемым изменением и фенотипе реципиентных клеток [5, 11, 12]. Вместе с тем частота стабильной трансформации, выявляемая в условиях селективного отбора, обычно низкая, и механизмы, способствующие интеграции внеклеточной ДНК в геном реципиентной клетки, недостаточно изучены. Ранее было показано, что Na-бутират [7], DMSO [10], db-РНК повышают частоту стабильной трансформации клеток высших эукариот.

Материал и методы. Для трансформации клетки HeLa культивировали Ca^{2+} -преципитатом ДНК плазмиды pSV2neo или ДНК pSV2neo, рекапсулированной в нуклеосома-РН [1], из расчета 10 мкг ДНК на 5×10^6 клеток. Эта плазида обладает устойчивостью к антибиотик у-418, токсичному для клеток эукариот [14]. После 24 ч инкубации с ДНК pSV2neo в глицириновом шоке [6] в среде добавляли одно из следующих соединений: Na-бутират 5 мМ, дибутрил-дАМФ (или 8 бром-дАМФ) 0,5 мМ, диметилсульфоксид (DMSO)—100 мМ или db-РНК—50 мкг; после 12 ч инкубации клетки HeLa (по 10^7 клеток) пересевали в чашки с новой селективной ростовой средой, к которой к 48 часу инкубации добавляли среду, содержащую 1 мг/мл антибиотика G-418 (Shering). Через 36 ч клетки HeLa высеивали в чашки со свежей средой с 1 мг/мл G-418. Среду меняли через каждые 3 дня, выростки колоний подсчитывали через 18 дней.

Клетки, выделенные из клеток HeLa, суспендировали в растворе с 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $NaCl$, 10 мМ три-НСI (рН 7,4) из расчета 1 мг ДНК/мл и обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) 5 мин при 37°. Электрофорез экстрагированной ДНК (50 мкг) проводили в 1%ном агарозном геле. ДНК в геле окрашивали этидиум-бромидом, выявляли ДНК проводили на UV-иллюминаторе (ФРГ).

Электродинамическую активность Ca^{2+} -Mg-зависимой эндонуклеазы определяли при инкубации с клетками HeLa в концентрации 75 единиц A_{260} мл в буфере (50 мМ три-НСI (рН 7,6), 25 мМ $NaCl$, 10 мМ $MgCl_2$, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,2 мМ фенолметилсульфонилфторид), содержащем 0,25 М сахарозы и 1 мМ $CaCl_2$. Реакцию останавливали 15 мМ ЭДТА (рН 7,5).

Ядра в концентрации $75 A_{260}$ мл гидролизуют микрококковой нуклеазой (1 ед на 50 мкг ДНК) в течение 5 мин в буфере, содержащем 0,25 М сахаразы, 50 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 15 мМ 2-морфоллинсульфоновой кислоты, 0,1 мМ фептасульфоклорид (рН 6,6). Реакцию останавливают добавлением EDTA до конечной концентрации 10 мМ. О глубине гидролиза хроматина судили по степени вывождения кислоторастворимых олигонуклеотидов в пределах 1—1,5%.

«Ник»-трансляцию ядер клеток HeLa проводили по описанному методу [8].

Ренатурацию ДНК проводили методом, описанным в работе [10]. ДНК, изолированную после реакции «ник»-трансляции, смешивали с немеченой ядерной ДНК, обрабатывали ультразвуком до получения фрагментов с мол. массой $500-800 \times 10^3$, денатурировали. Ренатурацию полученных фрагментов ДНК и отделение реассоциированных фрагментов ДНК от денатурированных фрагментов проводили на колонке с гидроксипатитом.

Ген neo был изолирован в составе фрагментов Bgl II/Sma I транспозона Tn-5. Для гибридизации [15] использованы меченные ³²P-Bgl II/Sma I фрагменты со специфической активностью 10^6 имп/мин на 1 мкг ДНК.

Клетки HeLa, предварительно меченные ¹⁴C-тимидином, 0,1 мКи/мл, после инкубации в течение 12 ч с Na-бутиратом, дибутирил-цАМФ, ДМСО, ди-РНК, анализируют в линейном градиенте щелочной сахаразы (5—20% сахаразы и 0,9 М NaCl)/0 мМ EDTA/0,3 Н NaOH) согласно [11]. 150 мкг клеточной ДНК расщепляли в объеме 0,5 мл эндонуклеазой Hind-III. Дигерование проводят в течение 18 ч при 16° в присутствии 5×10^3 единиц ДНК-лигазы фага T₄. ДНК выделяют стандартным методом фенольной депротеинизации, осаждают и промывают этанолом.

Полученная ДНК была ресуспендирована в 0,5 мл 10 мМ три-НСl (рН 8,0), 1 мМ EDTA и использована в трансформации *E. coli*. Трансформированные клетки суспендировали в 5 мл питательной среды и по 150 мкг суспензии высевали в чашках Петри на питательный агар, содержащий 150 мкг/мл ампициллина. В среднем на 8—5 мкг ДНК формировалась одна ампициллин-резистентная колония neo⁺.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл., обработка клеток HeLa в условиях трансформации pSV2neo Na-бутиратом, дибутирил-цАМФ, ДМСО, а также ди-РНК существенно повышали число стабильных трансформантов HeLa neo⁺.

Эффективность трансформации HeLa pSV2neo

pSV2neo	Контроль	Обработка клеток HeLa			
		Na-бутират	ди-бутирил-цАМФ	ДМСО	ди-РНК
ДНК Са-пренингит	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}
Рекон. группировочная нуклеосома (P11)	$6 \cdot 10^{-4}$	0	$1 \cdot 10^{-3}$	—	—

Полагая, что структура хроматина клеток, обработанных соединениями, повышающими частоту трансформации, изменяется таким образом, что становится возможной интеграция pSV2neo в геном относительно большего числа клеток, мы исследовали доступность хроматина клеток HeLa к ДНКазе I в условиях нашего эксперимента.

Полученные результаты (рис. 1, см вкл. I) свидетельствуют, что все использованные стимуляторы существенно увеличивают долю хроматина, гидролизуемого ДНКазой I [13]; при этом также возрастает количество ДНК, высвобождаемой в виде кислоторастворимой ДНК

Выявленные изменения в структуре хроматина клеток HeLa отражают индуцированную, возможно, избирательно в зависимости от соединения, деконденсацию хроматина с появлением участков хроматина, гиперчувствительных к ДНКазе I. Одновременно в ядрах клеток HeLa, трансформацию которых рSV2neo проводили в присутствии Na-бутирата, ДМСО, цАМФ, дн-РНК, относительно высока активность Са/Mg-зависимой эндонуклеазы, повышена доступность хроматина и к расщеплению по мононуклеосомным участкам микрококковой нуклеазой (рис. 2, см. вкл. I).

Уменьшение чувствительности хроматина обработанных клеток HeLa к ДНКазе I наступало через 48 ч после удаления Na-бутирата, ДМСО, цАМФ и замены среды на свежую. Соответственно снижалась эффективность трансформации клеток HeLa рSV2neo в 4—5 раз: 10^{-4} для ДНК Са-преципитата и 3×10^{-4} для ДНК рSV2neo, реконструированной в РН.

Аналогичным образом уменьшалась доступность хроматина HeLa к Са/Mg-зависимой эндонуклеазе и микрококковой нуклеазе.

В ряде работ было показано, что в реакции «ник-трансляции» преимущественно метятся ДНКазы I-гиперчувствительные участки хроматина [8].

Для определения природы ДНКазы I-гиперчувствительных участков хроматина была проведена реакция «ник-трансляции» хроматина клеток HeLa, необработанных и обработанных индукторами в стандартных условиях трансформации рSV2neo.

Контрольные эксперименты показали, что в отсутствие экзогенной ДНКазы реакция «ник-трансляции» протекает достаточно выраженно, по-видимому, за счет активности эндогенных нуклеаз, вызывающих единичные разрывы в ДНК. При этом в условиях воздействия Na-бутирата, цАМФ, ДМСО доступность хроматина к эндогенным нуклеазам существенно повышается.

Для характеристики природы ДНКазы I-гиперчувствительных участков «ник-транслированную» ДНК хроматина клеток HeLa (использована ДНК хроматина, «ник-трансляция» которой проводилась за счет активности эндогенных нуклеаз) смешивали с немеченой ДНК тотального хроматина, обрабатывали ультразвуком, денатурировали и использовали в реакции реассоциации.

Обнаружено, что при Cot-10 около 30% радиометки ^{32}P находится в двуспиральной форме (в контроле), около 50% — в двуспиральной форме в ДНК хроматина клеток HeLa, обработанных Na-бутиратом, цАМФ, ДМСО, при этом уровень «ник-трансляции» ДНК в 5 раз выше, чем в контроле.

Таким образом, под воздействием указанных соединений происходит активация последовательности ДНК, обогащенных повторяющимися генами.

Из данных литературы известно, что при Cot-10 реассоциируют последовательности ДНК, относящиеся к семействам высокоповторяющихся и умеренных повторов генома, составляющие для приматов 30% ДНК хроматина. Полученные результаты показывают, что

ДНК-аза I гиперчувствительные участки хроматина, индуцированные использованными соединениями, обогащены повторами относительно тотальной ДНК хроматина приблизительно в 4 раза.

С целью выяснения наличия единичных разрывов в ДНК хроматина клеток HeLa в условиях трансформации клетки HeLa после 24 ч инкубации с Na-бутиратом, дб-цАМФ, ДМСО и ди-РНК замораживали в жидком азоте и затем анализировали в линейном градиенте щелочной сахарозы (см. методы).

Практически весь меченый материал (^{14}C -ДНК) имел коэффициент седиментации около 130. В условиях же инкубации с одним из указанных соединений имела место некоторая фрагментация ДНК и в районе менее чем 40S появлялся достаточно четко выраженный пик фрагментированной ДНК. После замены инкубационной среды на свежую (см. метод трансформации HeLa) и инкубации клеток в течение 48—72 ч низкомолекулярная фракция ДНК в градиенте щелочной сахарозы исчезала из зоны низкомолекулярной ДНК, что свидетельствует о возможной репарации и лигировании, образовавшихся разрывов в ДНК. Проверка физиологического состояния клеток HeLa показала, что в условиях эксперимента менее чем один процент клеток окрашивался трипановым синим.

Для характеристики участков интеграции гена neo в геномной ДНК, мы провели трансформацию E. coli ДНК клеток HeLa-neo^r, трансформированных в условиях обработки HeLa Na-бутиратом или цАМФ (см. методы); были выделены и изучены по 5 плазмидных рекомбинантных ДНК из каждой группы трансформантов E. coli, обозначенных соответственно как p11-15 и p28, 36, 105—107. ДНК этих плазмид с мол. массой в пределах $1,5\text{--}2 \times 10^5$ была использована после обработки ультразвуком до мол. массы $7\text{--}5 \times 10^5$ в гибридизации по Саутерну [13] с ДНК хроматина HeLa, гидролизованной эндонуклеазой (рис. 3, см. вкл. I).

Из рис. 3 видно, что практически все изученные рекомбинантные ДНК содержат последовательности, повторяющиеся в геноме HeLa с достаточно высокой частотой: ДНК плазмиды pSV2neo после обработки ультразвуком до $7\text{--}5 \times 10^5$ не гибридизуется с геномной ДНК HeLa.

Полученные результаты показывают, что использованные при трансформации HeLa pSV2neo Na-бутират, дибутирил-цАМФ, ДМСО, ди-РНК повышают в клетках долю активного деконденсированного хроматина, индуцируют в нем единичные разрывы и в связи с этим, по-видимому, и активацию репарационных процессов; отмечается относительно большая доступность хроматина к ДНКазе I, микрококковой нуклеазе и Ca/Mg -зависимой эндонуклеазе; структурные изменения в хроматине коррелируют с повышением эффективности трансформации HeLa pSV2neo.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарян Р. А., Галстян Г. Г., Геворкян Н. Р., Галстян М. Г., Амирханови Л. А. Биополимеры и клетка. 1, 48—53, 1988.
2. Захарян Р. А., Азарян И., Арутюнян Дж. ДАН СССР, 5, 1251—1253, 1986.

3. Berger N. A., Petrolid S. J. Johnson E. S. Biochem. Biophys. Acta 478, 44—58, 1977.
4. Bloom R. S., Anderson J. N. Cell, 15, 141—150, 1978.
5. Cepcechi M. R. Cell, 22, 2, 179—188, 1980.
6. Frost E., Williams J. Virology, 91, 39—50, 1978.
7. Gorman C. M., Howard R. H. Nucleic Acids Research, 11, 21, 7631—7648, 1983.
8. Javaherian K., Fasman G. D. J. of Biological Chemistry, 259, 5, 3345—3349, 1984.
9. Kuo M. T., Iyer R., Schwartz R. J. Nucleic Acids Research, 10, 4565—4578, 1982.
10. Lewis W. H., Srinivasan P. R., Stokoe N. Somat. Cell Molec. Genet., 6, 3, 333—347, 1980.
11. Peilceer A., Wigler M., Axel R. Cell, 14, 1, 133—141, 1978.
12. Stilaty S. N., Apoashian H. V. Science, 220, 48, 725—727, 1983.
13. Southern E. M. J. Mol. Biol., 98, 3, 503—517, 1975.

Поступило 2.11.1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 6.(42).1989

УДК 577.352.315

ДВУХКООРДИНАТНАЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Г. А. МНАЦАКЯНИ, А. С. КАЛАЧЯН, К. А. ШАГИНЯН,
Т. Н. АКОЛЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

На основании изучения выхода белка из скелета мембраны в раствор при разных комбинациях концентраций компонентов экстракционной смеси составлены особые диаграммы. По форме так называемой линии полувыхода, проведенной на диаграмме по точкам 50%-ной экстракции белка, выявлены характерные группы среди изученных белков. Для первой группы белков характерна рН-независимость выхода. Для белков второй группы переход зависит как от рН, так и от ионной силы раствора. Линия полувыхода имеет характерную ступеньку. Переход белков третьей группы носит сложный характер зависимости как от рН, так и от ионной силы, линия полувыхода имеет множественные ступени.

Ըստ ճանաչող խառնուրդների կոնցենտրացիաները տարբեր օպտակաչափումների ազդեցության տակ մեմբրանի բազուկաբջջային բաժանումից անցած արդյունավետ յուրաքանչյուր սպիտակուցի նամար կազմվում էն խառնուրդի դիագրամները Այսպես կոչված կեսանցի դիր օպտակաչափ, որը անցկացվում է սպիտակուցի 50% էլըի կետերով, ի նաչառ էն բերվել առանձնահատուկ խմբերը Առաջին խմբի սպիտակուցների նամար քննության ընթացքում անկախ անցումը թայանքի բազուկաբջջային բաժանումից և կրողը խմբի սպիտակուցները ցուցաբերում էն անցում, որը կախված է ինչպես ընթացից, այնպես էլ յուրաքանչյուր խառնուրդի օպտակաչափումից: Երրորդ խմբի սպիտակուցները ցուցաբերում է բարդ կախիմանքային ընթացից և ինչպես օպտակաչափումից, այնպես էլ յուրաքանչյուր խառնուրդի օպտակաչափումից:

Special diagrams are constructed on the basis of study of solubilization of proteins from the membrane in case of different combinations of concentrations of the extraction mixture components. According to the form of the so-called half exit line on the diagrams formed by points of 50 per cent extraction of proteins, the characteristic groups are revealed among the tested proteins. A pH-independent passage is determined for

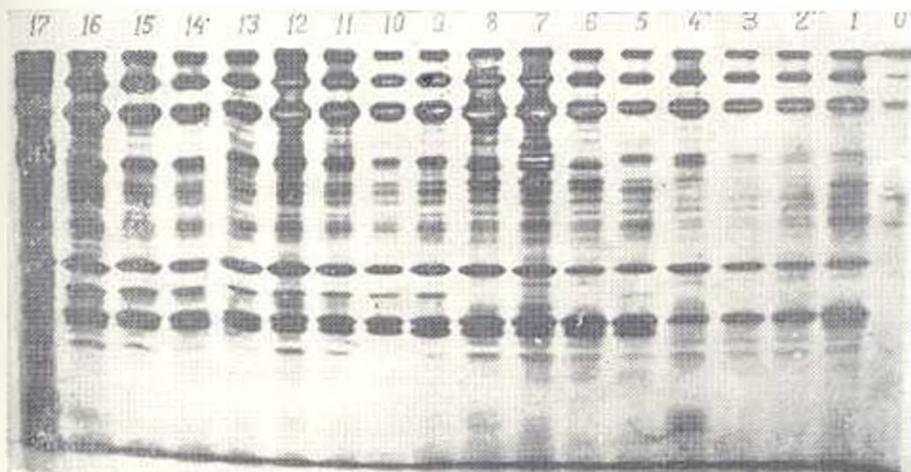


Рис. 1. ДДС электрофорез белков мембран куриных эритроцитов. Селективности мембран куриных эритроцитов проведена буферными растворами с различными значениями pH (6, 7, 8, 9) и возрастающими концентрациями NaCl (0,14 М, 0,35 М, 0,7 М, 1,1 М). Каждая точка электрофореграммы соответствует одной из 16 точек экстракции: треки 1—4 — супернатанты после экстракции 0,14 М NaCl и интервале значений pH 6—9; треки 5—8 — супернатанты после экстракции 0,35 М NaCl, pH 6—9; треки 9—12 — супернатанты после экстракции 0,7 М NaCl, pH 6—9; треки 13—16 — супернатанты после экстракции 1,1 М NaCl, pH 6—9; трек 0 — супернатант после экстракции в 10 мМ фос-НС₂ буфере pH 7,4; трек 17 — целая эритроцитарная мембрана.

the first group of proteins. The passage for the second group depends on *pH*, as well as on ionic strength of the solution. The nature of the third proteins' passage is of complex dependence on *pH* and ionic strength, as the line of half exit possesses multiple bends.

Эритроциты кур—белки мембран—линия полувыхода—двухкоординатная солибилизация.

Благодаря структурно-функциональным исследованиям молекулярных составляющих мембран в настоящее время выработаны достаточно аргументированные представления о существовании целой гаммы белок-липидных и белок-белковых взаимоотношений в структуре мембран [1]. На основании физико-химических особенностей упорядоченной структуры и аминокислотной последовательности белка возможно теоретически предсказать, насколько белок прочно связан с мембраной, является ли он интегральным, трансмембранным или же ассоциирован с мембраной периферически [5, 9]. Однако для исследования характера и динамики взаимодействия белков с ближайшим молекулярным окружением при энзиматических взаимодействиях, а также при лиганд-рецепторных взаимодействиях для оценки степени интегрированности белка в бислой в настоящее время не выработано адекватных методических подходов.

В настоящей работе описывается метод оценки сродства мембранных белков к соответствующей структуре на примере белков плазматических мембран куряных эритроцитов. Суть метода заключается в том, что проводится экстракция белков из мембраны при комбинированном воздействии двух различных солибилизирующих агентов, влияние которых на нативную структуру белка или мембраны неоднотипно. При этом следует ожидать, что изменение параметров среды приведет как к постепенному разворачиванию структур белка высшего порядка, так и к разрушению упорядоченных структур в мембране в ближайшем соседстве с молекулой белка, в результате чего ослабнут связи, стабилизирующие белок в целостной структуре, и на определенной стадии структурных переходов белок перейдет в раствор. Скорее всего такой переход обнаружится при нескольких комбинациях параметров среды, а детальное изучение особенностей перехода, на наш взгляд, позволит выявить новые структурно-функциональные закономерности комплекса белок—мембрана. Так, например, можно ожидать, что комбинирование различных концентраций солей и детергентов может быть удобной двухкомпонентной экстрагирующей средой для оценки соотношения вкладов ионных и гидрофобных взаимодействий в стабилизацию структуры мембраны, а комбинирование условий, обеспечивающих изменение ионной силы и *pH* среды, может выявить вклад в этот процесс ионных взаимодействий типа белок—окружающий раствор и структурных переходов вблизи изоэлектрической точки белка.

Материал и методика. Выделение плазматических мембран. Объектом исследования служили мембраны куряных эритроцитов. После декантации 4-месячных кур породы «белый леггорн» свежую кровь собирали в сосуд с антикоагулянтом (100 мМ 1,6-лимоннокислый, 2% D-глюкоза) из расчета 5—10 мл крови / мл антикоагулянта.

Эритроциты получали методом, предложенным Саллес и др. [13]. Плазматические мембраны из эритроцитов выделяли согласно методу Сузуки и др. [14]. Конечный осадок суспензировали в 10 мМ трис HCl буфере (pH 7.4) до концентрации 1 мг/мл по белку. Мембраны замораживали при температуре -20° и использовали на второй день.

Солюбилизация мембранных белков в двухкомпонентной среде NaCl-pH Исследование характера экстрагируемости белков из мембранного матрикса проводили в 16 отдельных пробах. В каждую пробу разливали по 100 мкл суспензии мембран (соответственно 400 мкг мембранного белка) и добавляли по 400 мкл соответствующих буферов для получения 16 типов экстрагирующих сред, в которых обеспечивается ступенчатое возрастание концентраций NaCl (0,14, 0,35, 0,7, 1,4 М) и изменение pH (6, 7, 8, 9). Экстракцию белков из мембраны проводили при температуре 0° в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Солюбилизированные белки отделяли от мембраны центрифугированием при 30 000Хg в течение 1 часа. Далее белки осаждали добавлением к супернатантам HClO_4 до конечной концентрации 3%. Осадки отделяли центрифугированием при 10 000Хg в течение 10 мин и промывали дважды холодным ацетоном. Каждый осадок растворяли в 75 мкл 1%-ного ДДС-№ и добавляли 25 мкл буфера для электрофореза (500 мМ трис HCl буфер, pH 6,8, 10% β -меркаптоэтанол, 4% ДДС-Na, 20% глицерин). Пробы кипятили в течение 5 мин и наносили на ПААГ.

ПААГ-электрофорез с ДДС. Гель-электрофорез проводили методом Лаэмман [10], используя 10%-ный гель, размером 13Х18 см, толщиной 1,3 мм, который с помощью связывающего агента Silan A-174 прикрепляли к стеклянной пластинке. В амбикетах солюбилизированного материала белок определяли методом Брэдфорда [2], используя в качестве стандарта бычий сывороточный глобин. Нагрузка на один трек при электрофорезе не превышала 100 мкг белка. После окончания электрофореза гель окрашивали 0,25%-ным раствором Кумасси R-250 в 40%-ном изопропанол и 10%-ной уксусной кислоте. Обесвеченный гель на 5 минут погружали в фиксирующий раствор, содержащий 3%-ный глицерин и 70%-ный изопропанол, и сушили на воздухе.

Денситометрирование белковых полос проводили на Ultrascan XI (4 KB).

Результаты и обсуждение. В настоящее время сравнительно детально изучен белковый состав мембран эритроцитов. Данные были получены в основном изучением солюбилизации мембранных белков разрушающими мембрану агентами и их идентификацией методом ДДС-электрофореза [11, 12, 15, 17]. Классической работой по электрофоретическому разделению белков мембраны эритроцитов человека является работа Фейрбанкса [6], в которой он предложил номенклатуру полипептидных полос, высвобождающихся в солюбилизированном ДДС материале. Из 20 полос он выделил и назвал 7 основных.

В ряде работ [3, 8, 16] описаны условия, при которых можно солюбилизировать те или иные ферменты, белки или сложные белковые комплексы.

Белки, которые вымываются из мембран при достаточно мягкой обработке, согласно литературным данным [7], составляют примерно 40% массы эритроцитарной мембраны. Они локализованы на внутренней стороне мембраны, тесно взаимодействуют друг с другом и стабилизируются преимущественно электростатическими взаимодействиями. Внутренние белки мембраны не солюбилизируются нарушением лишь ионных связей и для их дезагрегации необходимо использование неполярных детергентов [14]. Нами для солюбилизации мембранных белков использовались буфера с различными значениями pH и концентрацией

соли. После экстракции белков, их электрофореза в ПААГ и сканирования электрофореграмм для каждого белка составлялась особая таблица, составленная в виде двухкоординатной диаграммы, на осях которой отложены градиенты двухкомпонентной экстрагирующей смеси. На таблице по точкам, соответствующим 50%-ному выходу белка из мембранного матрикса, строится кривая, которая отражает граничные условия устойчивости белка в составе мембраны. В принципе по таблице и форме кривой можно описать особенности процесса диссоциации белка с мембраны и оценить вклад тех или иных взаимодействий, осуществляющих комплексобразование белок—мембрана.

На рис. 1 (рис. 1, см. вкл. II) представлена электрофореграмма мембранных белков, солюбилизованных растворами с различными значениями pH (6, 7, 8, 9) и возрастающими концентрациями NaCl (0,14, 0,35, 0,7, 1,4 М). Из рисунка видно, что при высокой концентрации NaCl эффективно высвобождает ряд белков, что свидетельствует о преимущественно электростатическом взаимодействии данных белков с мембранным матриксом. Заметны также изменения выхода в раствор в пределах одного значения концентрации NaCl в средах с различными значениями pH. Для интерпретации полученных результатов и анализа

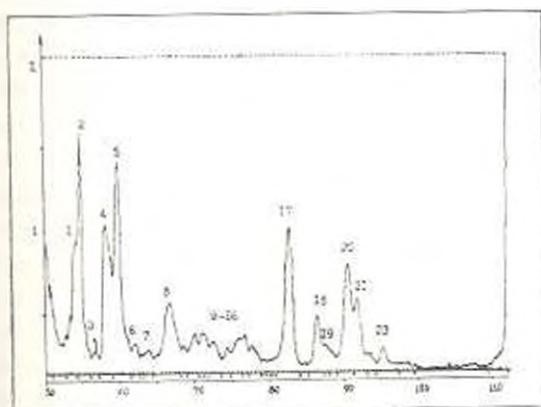


Рис. 2. Профиль трека № 15, измеренный на *Micascan XI* (ЛКВ). Прономерованные пики белковых полос идентифицированы на остальных треках.

степени сродства каждого белка со структурой мембраны при экстракции в системе NaCl—pH результаты обрабатывали следующим образом. На треке № 15 (рис. 2) наиболее значительные пики были пронумерованы от 1 до 23, далее были идентифицированы их аналоги на остальных 15 денситограммах и определены числовые величины, характеризующие содержание данного белка во всех треках. Для каждой белковой полосы, согласно рисунку рис. 3а, была составлена особая таблица (рис. 3б). На этом рисунке в качестве примера представлены абсолютные значения высот пиков белка полосы 8 на всех 16 электрофореграммах согласно нумерации на рис. 3а. Из рисунка видно, что таблица одновременно является двухкоординатной диаграммой, поскольку

на осях диаграммы, отложены градиенты обоих солюбилизирующих агентов—как концентрации NaCl, так и значения pH. Из диаграммы 3б видно, что имеет место резкий выход белка полосы 8 в раствор

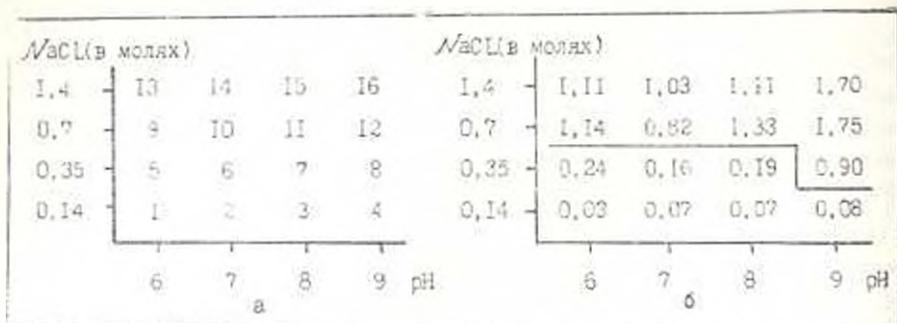


Рис. 3. а) Способ составления двухкоординатной таблицы: цифры от 1 до 16 обозначают номер трека. При построении диаграммы вместо номера трека вписывается значение концентрации белка в данном треке. б). Двухкоординатная таблица-диаграмма белка полосы 8. Числовые значения высот пиков белка полосы 8 на разных треках представлены в соответствии с нумерацией треков на рис. 3а

при переходе точек 5—9, 6—10, 7—11, 7—8. Если представить полученные результаты в виде однокоординатных кривых, характеризующих изменение выхода белка в раствор по одному параметру при неизменном другом, то получим кривые, представленные на рис. 4. Из рис.

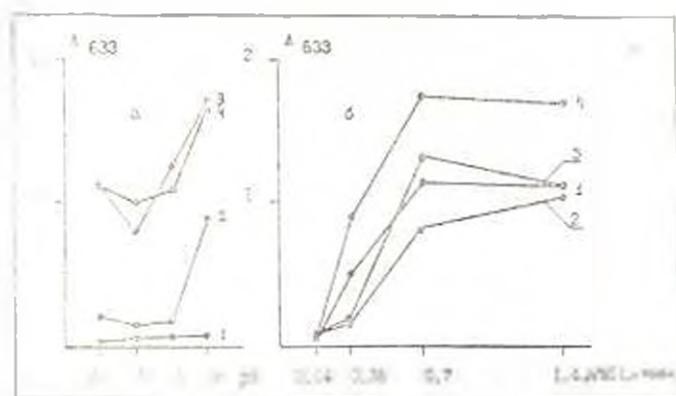


Рис. 4 а) Кривые, изображающие выход белка полосы 8 в раствор в зависимости от изменения pH при постоянном значении концентрации NaCl в среде: кр. 1—0,14 М NaCl, кр. 2—0,35 М NaCl, кр. 3—0,7 М NaCl, кр. 4—1,4 М NaCl. б) Кривые, изображающие выход белка полосы 8 в раствор в зависимости от концентрации NaCl при постоянном значении pH среды: кр. 1—pH 5, кр. 2—pH 7, кр. 3—pH 8, кр. 4—pH 9.

4а видно (кр. 1), что при 0,14 М NaCl практически весь белок находится в связанном с мембраной состоянии, изменение pH в диапазоне 6—9 не вызывает высвобождения белка. При переходе от 0,14 М к

0,35 М NaCl в среде (кр. 2) обнаруживается зависимость выхода белка в раствор от pH. Если в диапазоне 6—8 белок находится преимущественно в связанном состоянии, то при переходе от pH 8 к pH 9 наблюдается резкое увеличение его выхода в раствор. При более высоких значениях NaCl (0,7 М, 1,4 М) наблюдается некоторое уменьшение выхода белка при значениях pH 7 и 8 (кр. 3, 4). Судя по влиянию pH на характер выхода белка из структуры, либо рI белка находится в области значений pH 7—8, либо при переходе этих значений pH происходят какие-то конформационные изменения в ближайшем окружении белка.

Кривые 1, 2, 3, 4 (рис. 4, б), отражающие зависимость выхода белка в раствор от изменения концентрации NaCl в среде, напоминают кривые титрования. На кривых 1, 2, 3 точки титрования, которые соответствуют 50%-ному выходу белка из структуры, сгруппированы между 0,35 и 0,7 М NaCl, однако на кривой 4 точка титрования сильно смещена влево, т. е. при pH 9 происходит резкое изменение выхода белка в экстрагирующий раствор.

Исходя из вышесказанного можно заключить, что высвобождение из мембраны белка полосы 8 в целом зависит как от концентрации NaCl, так и от pH. Изложенный выше способ анализа и представления данных малоинформативен, поэтому нам представляется целесообразным обобщить данные с помощью так называемой линии полувыхода. Эта линия проводится по точкам 50%-ной экстракции белка в раствор (рис. 3б). Она разделяет все поле на две области. Нижняя область охватывает условия, при которых белок находится в преимущественно связанном с мембранным матриксом состоянии, а верхняя—условия, при которых белок преимущественно дезагрегирован, т. е. линия обозначает граничные условия устойчивости комплекса мембрана—данный белок в двух координатах. Если несколько разных белков имеют однотипные линии полувыходов, то правомерно утверждать о схожем характере взаимодействия этих белков с мембраной.

При подобном анализе белки, представленные на электрофореграмме, можно классифицировать по их экстрагируемости в среде NaCl-pH. Эта классификация отражает факт существования общих закономерностей ассоциации белка с исходной мембранной структурой. Классификация следующая:

1. Белки, высвобождение которых практически не зависит от изменения pH в диапазоне 6—9 (полосы 4, 5, 9, 12—16, 18, 19). Дезагрегация этих белков наблюдается только при повышении концентрации NaCl между 0,35 и 0,7 М.

2. Белки, высвобождение которых зависит от изменения как pH среды, так и концентрации NaCl (полосы 8, 10, 11, 17, 20—22). Среди белков, обнаруживающих такой тип связывания, можно выделить белок полосы 8, который рассматривался выше. Линии полувыходов для этих белков имеют две ветви. Одна из них проходит через границу 0,35 М—0,7 М NaCl, а другая—через какие-то два значения pH при 0,35 М NaCl.

3. Белки, выход которых в раствор обнаруживает сложную зависи-

№ 3(x10)				№ 4				№ 5				№ 6(x10)				№ 7(x10)			
4,0	2,1	3,4	4,3	2,9	2,4	2,4	2,2	3,3	2,9	3,3	3,4	4,0	3,2	4,5	7,4	5,1	2,1	4,2	5,3
3,5	3,0	5,0	6,4	2,6	2,5	2,6	2,1	3,0	3,1	3,2	3,3	5,2	4,0	6,4	9,6	5,1	2,7	7,4	8,0
0,8	2,0	3,2	3,4	1,3	1,2	1,0	1,0	1,3	1,5	1,5	1,5	1,1	2,7	3,4	4,1	1,5	1,6	4,2	4,4
0,5	0,7	0,8	1,1	0,7	0,6	0,8	0,9	0,9	0,9	1,0	1,2	0,5	0,4	0,4	1,0	0,5	0,6	0,6	0,7
№ 9(x10)				№ 10(x10)				№ 11(x10)				№ 12(x10)				№ 13(x10)			
4,3	5,1	4,3	5,9	4,5	5,6	6,4	6,7	5,9	5,9	5,9	7,2	3,7	4,2	4,8	5,6	3,0	3,0	4,3	4,3
5,1	3,5	5,6	6,8	8,0	6,1	7,7	6,8	8,2	6,1	8,0	8,2	5,6	5,1	6,1	6,4	5,3	4,0	5,3	5,3
1,1	1,5	2,0	2,5	1,9	4,5	5,5	5,8	2,7	4,2	4,2	4,4	1,9	2,1	2,5	2,9	1,9	1,9	2,1	2,2
1,0	0,6	0,7	0,7	1,0	0,7	0,6	1,2	1,2	0,9	0,6	0,8	1,4	0,7	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8	0,6
№ 14(x10)				№ 15(x10)				№ 16(x10)				№ 17				№ 18(x10)			
4,5	5,3	5,6	5,9	5,1	7,7	6,9	7,8	3,2	3,5	4,0	3,7	2,8	2,6	3,0	3,2	6,1	7,7	8,8	9,6
6,7	5,1	6,4	5,9	6,4	5,6	7,7	7,7	4,0	4,0	3,7	5,1	2,1	1,8	2,5	2,9	7,3	6,7	8,2	9,8
2,0	2,0	2,2	2,4	1,6	2,1	2,8	2,3	1,1	1,5	1,3	1,3	0,5	0,5	1,1	1,2	1,2	0,4	1,6	1,2
1,0	0,8	0,8	0,6	1,3	0,1	0,7	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
№ 19(x10)				№ 20				№ 21				№ 22(x10)				№ 23(x10)			
2,4	3,4	4,3	4,8	1,3	1,5	1,7	1,9	1,1	1,1	1,2	1,1	1,9	2,6	2,6	2,6	2,9	2,4	3,7	4,8
3,5	2,6	4,3	5,6	1,7	1,6	1,8	1,9	1,9	1,3	1,4	1,4	2,0	2,4	3,2	3,2	2,9	2,4	3,7	5,3
0,9	1,1	1,5	1,7	0,7	1,0	1,0	1,1	0,5	0,5	0,6	0,8	1,5	1,5	1,1	2,0	1,0	1,3	2,5	2,9
0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,4	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8

Рис. 5. Двухкоординатные таблицы-диаграммы и линии полувыходов белков, согласно нумерации на трассе № 15. Для таблиц со знаком (x10) числовые значения умножены на 10 для удобства представления данных. Для белков 1 и 2 диаграммы не составлены из-за перекрывания их полос

мость как от рН, так и от концентрации NaCl в среде (полосы 3, 6, 7, 23). При рассмотрении линии полуперехода белка полосы 23 в раствор (рис. 5) видно, что этот белок связан со структурой при всех значениях NaCl при рН 7, однако легко диссоциирует из структуры при значениях рН 8 и 9 уже при концентрации NaCl в среде 0,35 М. Вероятно, это свидетельствует о том, что при значении рН 7 большинство заряженных групп белка нейтрализуются противоионами либид собственного белка, либо ближайшего окружения.

К общим тенденциям при сольubilизации мембранных белков в системе NaCl-рН можно отнести следующие факты:

1. Уменьшение выхода многих белков в раствор при переходе от 0,7 М NaCl к 1,4 М в среде, по-видимому, связанное с конформационным изменением мембранной структуры в целом, в результате чего в среде с высокой концентрацией соли несколько снижается выход.

2. Наблюдаемое практически для всех белков, обнаруживающих рН-зависимый выход, увеличение выхода из структуры в областях с высоким значением рН, что, по-видимому, объясняется большей растворимостью белка при значениях рН, далеких от его изоэлектрической точки.

3. Ионная сила раствора является более существенным фактором для дезагрегации белка с мембраны, чем изменение рН в диапазоне 6—9.

4. Выход белков из состава мембраны носит кооперативный характер, о чем свидетельствуют кривые на рис. 4Б (1—4).

По соотношению областей 1 и 2 на диаграммах среди изученных белков можно провести сравнительную оценку их сродства к мембране. Такой анализ будет более достоверен при обобщении результатов изучения растворимости белков в других системах растворителей, в частности, в системах NaCl-тритон, NaCl-мочевина, тритон-мочевина, что позволит учесть также вклад гидрофобных взаимодействий в поддержание белка в мембране и выработать общие критерии оценки сродства белков к мембранам. В дальнейшем после подбора наиболее информативной экстрагирующей пары сред можно будет изучить влияние различных энзиматических модификаций и гормональных воздействий на статус конкретного белка в составе мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bennet V. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 373—374, 1985.
2. Bradford M. E. *Anal. Biochem.*, **72**, 248—254, 1976.
3. Clarke M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 4, 1963—1971, 1971.
4. Cuatrecasas P. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1980—1991, 1972.
5. Eisenberg D. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 595—623, 1981.
6. Falrbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. *Biochemistry*, **10**, 13, 2606—2617, 1971.
7. Hamaguchi H., Clave H. *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 320—333, 1971.
8. Kant J. A., Steck T. L. *J. Biol. Chem.*, **248**, 8457—8460, 1973.
9. Kuhn L. A., Leigh J. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 351—361, 1985.
10. Loemmli U. K. *Nature*, **227**, 680—685, 1970.
11. Liljas L., Lundahl P., Hjerten S. *Biochim. Biophys. Acta*, **372**, 327—337, 1974.

12. Miller D. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 3, 716—722, 1970.
13. Solless R., Garnier J. Biochim. Biophys. Acta, 554, 102—113, 1979.
14. Suzuki S., Suzuki K., Nakajima M., Terao T., Osawa T. Biochim. Biophys. Acta, 697, 263—270, 1982.
15. Tanner M. J. A., Boxer G. H. Biochem. J., 129, 333—347, 1972.
16. Tanner M. J. A., Gray W. R. Biochem. J., 125, 1109—1117, 1971.
17. Yu J., Fischman D. A., Stek T. L. J. Supramol. Struct., 1, 2, 233—248, 1973.

Поступило 5.11.1989 г.

Биолог ж. Армени. № 6 (42), 1989

УДК 612.744.19

ДВА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯ АКТОМИОЗИНА. УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕНАТУРИРУЮЩИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Б. А. ТИКМЯНОВ, А. Э. МАЛОЯН, М. А. КАПФАДЖИИ, А. Т. ОГАНЕСЯНИ

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

Установлено, что в двух различных состояниях актомиозина из скелетных мышц крысы обладает неодинаковой устойчивостью к денатурирующим действию мочевины и температуры. В I состоянии химическая деградация белка идет с большей степенью кооперативности, а термоденатурация наблюдается при больших температурах, чем во II состоянии. Предполагается, что в двух состояниях между актином и миозином устанавливается разное число контактов, что главным образом связано со структурными перестройками в миозине.

Հաստատված է, որ երկու տարբեր վիճակներում ախտահարված սկզբնական կառուցվածքի միջուկային և շրջանաձևային ապակառուցվածքի ազդեցության նկատմամբ I վիճակում ապակառուցվածքի ցրտիական ապակառուցվածքները և հոսքերափոխության ավելի բարձր մակարդակով, իսկ ջերմային դեկադամպումը կատարվում է ավելի բարձր ջերմաստիճաններում, քան II վիճակում նկատվում է, որ ապակառուցվածքի վիճակներում ակտինի և միոզինի միջև հաստատվում են տարբեր քանակի կոնտակտներ, ինչը գլխավորապես որոշվում է միոզինի վերակառուցմանը:

The differences in stability of the two various states of actomyosin from the rats skeleton muscles to urea and temperature denaturing action are discovered. Higher cooperativity of protein chemical destruction and higher denaturation temperature describe the I state of actomyosin complex, compared with the II state. It is proposed that in states II protein different number of contacts between actin and myosin may be formed, what mainly depends on the structural reconstructions in myosin.

Скелетные мышцы—актомиозин—денатурация.

Ранее нами было показано, что двухстадийная кинетика комплексообразования миозина с актином (СПП) и АТФазы натурального актомиозина связана с участием в этих реакциях двух типов функционально [2, 5] и структурно [3, 4] неэквивалентных белковых комплексов.

Сокращения: СПП—сулерпренипитация, АТФазы—аденозинтрифосфатазы

Расчет термодинамических параметров, характеризующих взаимодействие двух типов актомиозиновых чаетиц [6], позволил идентифицировать их как комплекс актина с двумя структурными формами миозина (конформерами согласно [1]). Обратимым переходам между двумя типами миозиновых конформеров в настоящее время отводится особая важная роль в процессах генерации или регуляции величины активного напряжения, развиваемого мышечным волокном [1].

Для выяснения природы различий двух состояний актомиозина важно знать тип контакта и характер связи между актином и миозином в данном типе комплекса. Согласно имеющимся сведениям, возможно образование сильной и слабой актин-миозиновой связи [10], однако остается неясным, в какой степени это сопряжено с миозиновыми конформерами [1]. С другой стороны, учитывая, например, неодинаковую атакуемость протеазами миозина в разных конформационных состояниях [11], можно предположить, что устойчивость двух типов актомиозиновых комплексов к действию некоторых денатурирующих факторов также будет различаться. Выяснению этого вопроса посвящена настоящая работа.

Материал и методика. Натуральный актомиозин получали из бедренных мышц крыс по методике [12]. Белок подвергали дополнительной очистке ультрацентрифугированием при 35 000 г в 0,4 М КСl и дважды ресуспендировали деминерализованной водой (рН 6,8). Миозин получали по методу [13]. Чистоту белков проверяли электрофоретически [13], а концентрацию определяли по связыванию с красителем кумаси G-250 [14].

Оптические измерения производили на спектрофотометре «Спекорд» М-10 (ГДР). Разностные спектры белковой суспензии регистрировали с использованием специального отсека для мутных проб, а термограммы плавления — с применением автоматического температурного скалера TSE-1. Градусная нарастания температуры составляла 0,4 К/мин, точность контроля $\pm 0,1^\circ$. Использовали кварцевые кюветы толщиной 1 см, конечный объем проб—3 мл. Содержимое проб постоянно перемешивали с помощью встряхивания в кюветный отсек магнитных мешалок.

Концентрации ингредиентов инкубирования среды рассчитывали по стандартным программам [9], модифицированным А. А. Кликовым (ИВФ АН СССР, Пушкин). Постоянные компоненты (в мМ): трис HCl—20, (рН 7,35), 2-меркаптоэтанол—1, Na_2EDTA —0,25 и 0,13 мг/мл белка. Варьировали условия отжаривания в каждом конкретном случае.

Результаты и обсуждение. Процесс денатурации натурального актомиозина, тестируемый по увеличению УФ-абсорбции белка, завершается при 2—3,5 М мочевины (рис. 1). Форма кривых титрования сильно различается для двух состояний актомиозина, переход между которыми достигался в данном случае изменением концентрации ионов Mg^{2+} и контролировался по кинетике СПП [2, 3, 5]. Предпочтение Mg^{2+} -зависимому варианту смены двух состояний белка было отдано с целью поддержания постоянной конечной ионной силы раствора, изменение которой могло бы повлиять на эффекты мочевины, обусловленные главным образом ионным фактором.

Низкие концентрации Mg^{2+} обеспечивают одностадийный ход СПП натурального актомиозина [4] по «высокотемпературному» типу, с участием α -конформеров миозина [6]. Для этого (1) состояния белка характерна выраженная сигмоидная форма кривых титрования мочевины

ной (рис. 1 а). Увеличение концентрации Mg^{2-} переводит актомиозин во II состояние [4], при котором миозин находится в β -форме и для которого характерен «низкотемпературный» тип СПП [6]. В этом случае сигмоидный участок кривых титрования мочевиной выпрямляется.

Качественно аналогичные различия в форме кривых титрования мочевиной для двух состояний актомиозина сохраняются и после завершения реакции СПП (рис. 1 б). Полную денатурацию при этом вызывают более высокие концентрации мочевины, что, по-видимому, связано со стабилизацией структуры актомиозинового комплекса и холде СПП.

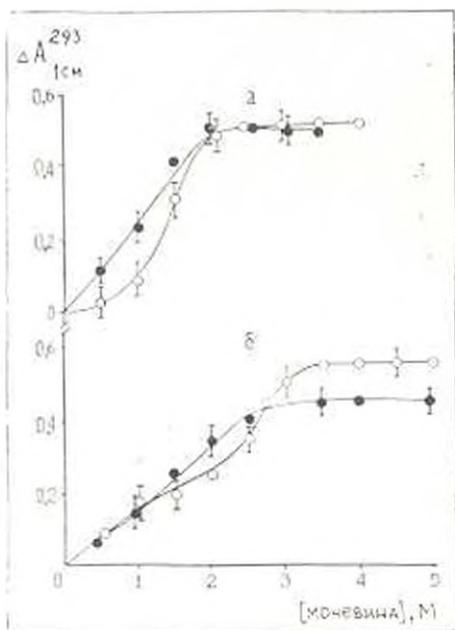


Рис. 1.

Рис. 1. Кривые спектрофотометрического титрования мочевиной нативного актомиозина скелетных мышц крысы до (а) и после (б) взаимодействия с 0,1 мМ АТФ. Светлые кружки—I состояние (0,01 мМ $MgCl_2$), темные кружки—II состояние (0,5 мМ $MgCl_2$) белка 75 мМ KCl, 0,063 мМ $CaCl_2$, 25° ΔA_{293}^{1cm} — величина УФ-абсорбции образца толщиной 1 см, определяемая по разностным спектрам.

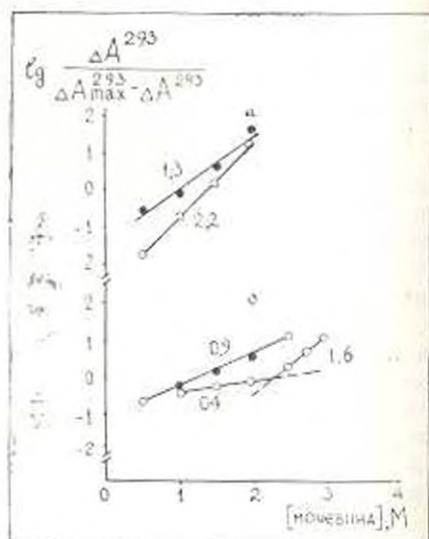


Рис. 2.

Рис. 2. Графики Хилла титрования актомиозина мочевиной (построены по кривым, представленным на рис. 1, обозначения те же) а и б—до и после взаимодействия с АТФ соответственно. Цифры—значения коэффициентов Хилла, рассчитанные по тангенсам углов наклона соответствующих кривых.

Значения коэффициентов Хилла, рассчитанные по кривым титрования мочевиной, для I состояния почти в 1,7 раза превышали таковые для II состояния как до (рис. 2 а), так и после (рис. 2 б) осуществления СПП. Это говорит о том, что в I состоянии актомиозина химическая деструкция идет с более высокой степенью кооперативности.

Небезынтересно отметить также появление излома на кривых Хилла для I состояния актомиозина после взаимодействия с АТФ.

Следовательно, изучение химической деструкции актомиозина показывает, что структурные характеристики белковых макромолекул могут сильно различаться в зависимости от их состояния. Однако на основании этих данных весьма затруднительно говорить о состоянии отдельных компонентов белкового комплекса. В этой связи нами был изучен характер термоденатурации двух типов актомиозиновых частиц.

При низкой ионной силе, обеспечивающей переход актомиозина в I состояние [2, 3], термограммы плавления характеризуются наличием относительно стабильного участка в диапазоне 20—35°, за которым следует участок обратимой денатурации белка, заканчивающийся при 63° (рис. 3а). Дальнейшее увеличение температуры вызывает коагу-

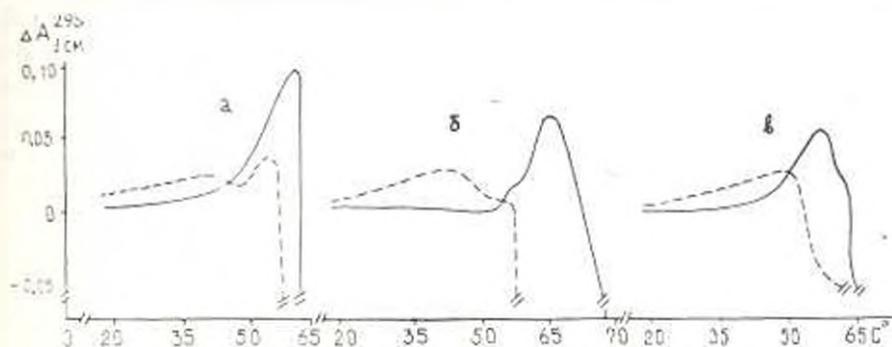


Рис. 3. Термограммы плавления натурального актомиозина (а, б) и миозина (в) скелетных мышц крысы до (а, в) и после (б) взаимодействия с 0,1 М АТФ. Условия: I состояние (сплошные линии): 50 мМ КСl (в—75 мМ); II состояние (пунктир): 150 мМ КСl (в—175 мМ). Во всех случаях ионодилась 0,05 мМ MgCl₂ и 0,037 мМ CaCl₂.

ляцию актомиозина, обусловленную необратимым нарушением структуры макромолекул и сопровождающуюся резким падением оптической плотности раствора. Обращает на себя внимание наличие второго, слабо выраженного пика на участке обратимой денатурации белка в области 55°.

Кривые плавления для II состояния актомиозина, получаемого путем повышения ионной силы раствора до 0,15 [2, 3], резко отличаются от кривых, характеризующих плавление белка в I состоянии. Во II состоянии белок менее устойчив к действию температуры и коагуляция наблюдается уже при 55—56°, т. е. при более низких температурах, чем в I состоянии. С другой стороны, явно отсутствие высокотемпературного пика 63° и более отчетливое проявление второго пика на участке обратимой денатурации в области 55°. Наконец, при температурах 39—40° во II состоянии появляется дополнительный пик, отграниченный от пика при 55° промежуточным минимумом.

После «отработки» на СПИ общая картина различий в диаграммах плавления двух типов актомиозиновых комплексов сохраняется (рис. 3б). При этом наблюдается некоторая стабилизация структуры

комплекса в I состоянии, вследствие чего высокотемпературный пик смещается от 63° до 66,5°. Процесс коагуляции при этом развивается менее резко, а пик в области 55° выглядит более отчетливым. Гидролиз АТФ актомиозином во II состоянии усиливает низкотемпературный пик при 38—40° и ослабляет пик в области 55°.

Тонкая структура термограмм плавления, по-видимому, отражает процесс тепловой денатурации главным образом миозинового компонента натурального актомиозинового комплекса, который, по данным сканирующей микрокалориметрии и собственной триптофановой флуоресценции, раскладывается по меньшей мере на четыре составляющие [8]. Более того, методами флуоресценции и светорассеяния [7] показано, что разворачивание структуры миозиновых головок, наблюдаемое при температурах выше 43°, зависит от их состояния.

Сходство термограмм плавления препаратов миозина при разных силах, обеспечивающих переход актомиозинового комплекса в два различных состояния, с термограммами, полученными для определенных состояний актомиозина (рис. 3в), также указывает на то, что температурно-индуцированные перестройки последнего ограничиваются главным образом миозиновым компонентом. Более того, в области 70—75° актомиозиновые препараты обнаруживают еще один пик плавления, отсутствующий на миозине (данные не приводятся). Это позволяет связать его появление с тепловой деградацией структуры белковых компонентов тонких нитей—актина и тропомиозина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что устойчивость актомиозинового комплекса к денатурирующим воздействиям зависит от его структурно-функционального состояния. Исследование СММ и АТФазной активности актомиозина позволило нам сделать заключение о том, что два состояния белка различаются по тому, какой тип миозиновых конформеров [1] в данных условиях комплексуется с актином [6]. В отличие от предыдущих исследований, в которых не удалось выявить существенных различий в характере распределения поверхностного заряда и величине УФ-абсорбции двух типов актомиозиновых комплексов [3], в настоящей работе показано, что I состояние актомиозина более стабильно, чем II. Это может быть обусловлено не только различиями в структурно-зависимых характеристиках (в частности, температурной устойчивости) двух разных миозиновых конформеров, но и типом образуемой ими связи с актином. Возможно, этим вызвана неодинаковая степень кооперативности процесса химической деструкции актомиозина в двух состояниях. Не исключено, что более высокая кооперативность процесса, свойственная I состоянию белка обусловлена большим, чем во II состоянии, числом контактов, обеспечивающих формирование актив-миозинового комплекса. В этой связи весьма заманчиво предположить, что в образовании комплексов I типа принимают участие обе головки миозина, и то время как структура комплексов II типа стабилизируется с помощью одной из них. По крайней мере, смещение фазы обратной денатурации актомиозина в область более низких температур при переходе от I состояния к II в свете имеющихся литературных данных [7] можно рассматривать как

результат усиления взаимодействия между миозиновыми головками. Более строгое доказательство этого положения позволило бы лучше разобраться в структурных аспектах работы миозинового мостика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леднев В. В. В сб.: Механизмы контроля мышечной деятельности. 101—123, Л., 1985.
2. Тикунев Б. А. Биолог. ж. Армения, 39, 3, 196—200, 1986.
3. Тикунев Б. А. Биолог. ж. Армения, 41, 5, 383—388, 1988.
4. Тикунев Б. А. В сб.: Биохимия и биофизика биологической подвижности. 34, Тбилиси, 1987.
5. Тикунев Б. А. Биофизика, 24, 2, 319—321, 1989.
6. Тикунев Б. А. Биофизика. (в печати).
7. Чачикян А. М., Эвма В. Л., Трезубов В. С., Омельянюк В. С., Маренич В. А. В сб.: Биохимия мышц. 105—106, Телави, 1985.
8. Шиндров Э. Л., Каличиенко Л. П., Борисова М. А., Пермяков Е. А. В сб.: Биохимия мышц. 118, Телави, 1985.
9. Fahlsto F., Fahlst A. J. *Physiol.*, 75, 463—505, 1979.
10. Greene L. E. *Biochem. J.* 29, 2120—2126, 1981.
11. Fuhrstad A., Högberg T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 958—962, 1982.
12. Schaub M. C., Partridge G., Perry S. V. *Biochem. J.*, 107, 263—269, 1967.
13. Shterick K. T., Thomas L. L., Albert N. R. *Biophys. Biochim. Acta*, 393, 124—133, 1975.
14. Spector T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 8, 142—146, 1978.
15. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, 244, 4400—4411, 1969.

Поступило 27.III 1989 г.

Биолог. ж. Армения, № 6 (42) 1989

УДК 577.963.3

К ИССЛЕДОВАНИЮ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДНК ЗЛАКОВЫХ

Л. А. МИНАСБЕКЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН, А. Г. СИМОНЯН, Г. А. НАПОСЯН

ИЭБ АН АрмССР, Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Методом термической денатурации ДНК, изолированных из сухих эмбрионов семян злаков пшеницы сортов Безостая-1, Воскеаск и Армянка-60, а также из полбы сорта Аршалуйс и тритикале сорта СпС 1, было показано, что имеются как межвидовые, так и внутривидовые различия между исследуемыми сортами пшеницы и других злаков. Они различаются по температурам плавления, профилям дифференциальных кривых плавления и содержанию ГЦ-пар.

Յորենագրիների' թերատալա -1, Ազգենակ և Արմյանկա 60 սորտերի ջորենների, ինչպես նաև Արշալույս սորտի հունարի և Սիս -1 տեխակի տրիտիկալեի սերմերի շոր սաղմերից ստացված ԳՆԹ-ների թերմիկ զենատարացիայի մեթոդի միջոցով ցույց է տրված, որ ուսումնասիրվող ջորենի տեսակների և այլ ջորենագրիների միջև զոյություն ունեն ինչպես ներտեսակային, այնպես էլ միջտեսակային տարբերություններ, նրանք տարբերվում են շարժան ջերմատրիանով, շարժան գիֆերենցիալ կորերի պրոֆիլներով և ԳՑ-զույգերի պարունակությամբ:

DNA was isolated from dry embryos of cereals seeds, from Bezostaya-1, Voskehask and Armiyanka sorts of wheats and from Arshaluys sort of *Tr. dicoccum* and Sis-1 sort of triticity. Interspecific differences were shown, as well as intraspecific ones between the studied sorts of wheats and other cereals by thermal denaturation method. These sorts differed by melting curve profiles and G—C pair content.

Злаки—ДНК—плавление—GC-содержание.

Методы молекулярной биологии дают возможность исследовать изменения, происходящие в геноме растений, в зависимости от факторов внешней среды, возраста растений, дифференциации тканей и др.

На родах *Phaseolus*, *Brassica* и др. показано, что их ядерные ДНК характеризуются асимметричным распределением в градиенте плотности хлористого цезия, что свидетельствует о гетерогенности ДНК по нуклеотидному составу [1]. На основании этого можно предположить, что высшие растения с асимметричным характером распределения ядерной ДНК являются древними аллополиплоидами, возникшими на основе гибридизации растений с различным нуклеотидным составом ядерных ДНК. Примером тому могут служить гексаплоидные пшеницы с формулой генома AABBDD, которые являются аллогексаплоидами с одним геномом диплоидных пшениц (геном А) и двумя геномами *Aegilops* (геномы В и D).

Результаты исследований Флавега [5] показали, что геномы *Triticum* и разных видов *Aegilops* имеют некоторые различия, позволяющие отличать геномы диплоидных родителей от гексаплоидных пшениц. ДНК высших растений [10] обладает различными семействами повторяющихся последовательностей и количеством их. Каждое семейство повторяющихся последовательностей ДНК в основном имеет различный состав оснований и ведет себя как кооперативно плавящееся «блочки» при плавлении. Обнаружены сортовые различия в частоте повторения фракций, уникальной ДНК пшеницы при очень широком варьировании частоты повторения у разных сортов [3], в то же время не выявлены межсортовые различия в температуре плавления, содержании азотистых оснований и др. [2]. К тому же необходимо отметить количественные различия в генетической информации между сортами и линиями мягкой пшеницы [4], диплоидных и тетраплоидных видов, включая *Triticum monosocum* и *Triticum timopheevii* [6, 7], а также внутривидовые изменения в сортах с различной плоидностью [8].

Цель настоящей работы состояла в выявлении методом термической денатурации особенностей в кривых плавления различных сортов пшениц, а также полбы и тритикале в пределах семейства и в определении параметров, характеризующих эти различия.

Материал и методика. Получение растительного материала и выделение ДНК. Препараты ДНК получали из сухих эмбрионов пшеницы сортов Безостая-1, Армянка-60, Воскевск, тритикале сорта СиС 1 и полбы сорта Аршалуис. Эмбрионы из семян злаков изолировали по методу Джонстона-Штерна. ДНК из сухих эмбрионов семян, измельченных в ступке, получали по методике Мармура [9] в буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,15 М цитрат.

Na и 0,1 M трис-НCl. Депротеинизацию проводили смесью изоамил-хлороформ, с последующей обработкой рибонуклеазой, диастазой и протазой. Дальнейшую очистку препарата проводили в NaCl и SDS. Чистоту полученных препаратов проверяли спектрофотометрически, она соответствовала оптическим параметрам по Мармуру [9]. Выделение препаратов ДНК проводили восемь раз для каждого сорта пшеницы и ячменя.

Термическая денатурация молекул ДНК. Термическую денатурацию ДНК проводили на SP-8-100 спектрофотометре (Pye Unicam, England) при концентрациях 20—30 мкг/мл в 0,1XSSC в кварцевых кюветках, герметически закрытых тефлоновыми пробками. Нагревание осуществляли температурным программным устройством с линейной скоростью нарастания 0,25 град/мин. Поглощение (A_{260}) регистрировали на программируемом микроконтроллере ИР-978 1,0. Первую производную поглощения вычисляли следующим образом. Вначале находили промежутки возрастания и убывания дифференциальной кривой плавления, затем, используя полученную информацию, на основе ортогональных многочленов Чебышева строили искомую кривую. Вычисления производили на компьютере «Электроника У-5» (СССР).

Среднее содержание ГЦ-пар ДНК определяли по ранее предложенному методу по формуле [12].

Результаты и обсуждение. Вопрос о схожести и возможных различиях между геномами высших растений и пределах вида давно исследуется учеными. Методом равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl были исследованы ядерные ДНК *T. monococtum*, (геном А), *Triticum polazo-colch.* (геномы А и В) и *Aegilops squarrosa* (геном Д), а также *Secale cereale* и межродовых гибридов *Triticum-Aegilops* и *Triticum-Secale*. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии различий между ядерными ДНК отдельных видов и межродовых гибридов подтрибы *Triticinae* в пределах чувствительности этого метода. Метод термической денатурации оказался в этом отношении достаточно чувствительным. Нам выявлены различия как межвидовые в пределах подтрибы *Triticinae*, так и внутривидовые. Наиболее интересным нам представляется тот факт, что они различаются как по температурам плавления (табл.), так и по профилям ДКП (рис.). Это можно интерпретировать как изменение состава отдельных участков ДНК от одного вида к другому. К подобным выводам склоняются также и авторы работы [10], в которой методом термической денатурации показано, что *Zea mays*, *Pisum* и *Solanum tuberosum* плавятся как дискретные, кооперативно плавящиеся сегменты с различным составом оснований. Эти сегменты или блоки различаются по среднему содержанию ГЦ-пар.

На (рис. а) представлена дифференциальная кривая плавления ДНК пшеницы сорта Безостая-1, характерный интервал плавления которой составляет $\Delta T = 11,8^\circ$, что указывает на гетерогенный состав ДНК. Пшеница сорта Безостая-1 относится к гексаплоидным пшеницам со сложным геномом AABBDD. Некоторые авторы доказывают, что доноры цитоплазмы для пшениц с геномами AABBDD, AABB и AACCC являются *Aegilops longissima*, *Aegilops aucheri* [11].

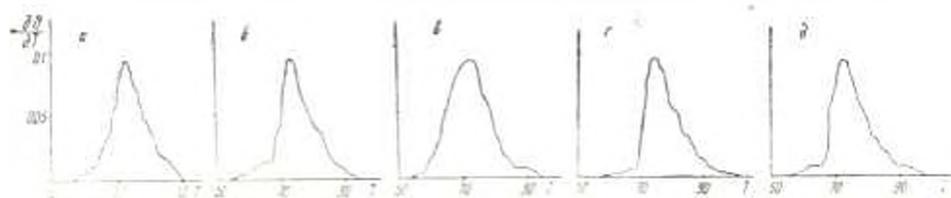
На (рис. б и в) представлены соответственно дифференциальные кривые плавления пшеницы Воскояск и Армянка-60, которые хотя и имеют одинаковые цитоплазмы, однако все же качественно различаются по геномам на субмолекулярном уровне, по температуре плавления

ния, интервалу плавления, ядерной ДНК и по форме дифференциальной кривой плавления. Полученные различия между гексаплоидными пшеницами наводят на мысль о неодинаковых источниках происхождения их геномов А, В, Д.

Характеристики ДНК различных сортов пшеницы и других злаков

п/п	Наименование	Формула генома	T (в град.)	T (в град.)	% ГЦ
1.	Безостая-1	ААВВDD	73,7±0,2	31,8	49,0
2.	Воскеаск	ААВВDD	73,0±0,3	12,1	47,1
3.	Армянка-60	ААВВDD	72,3±0,2	12,2	46,0
4.	Сис-1	ААВВRR	72,8±0,1	12,0	47,0
5.	Аршалауэс	ААВВ	74,3±0,2	12,3	50,1

Имеются отличия в формах ДКП ДНК полбы и тритикале В наших экспериментах была использована черноколосая белозерная полба сорта Аршалауэс с формулой генома ААВВ и тритикале с формулой генома ААВВRR. По всей видимости, появление нового по качеству генома RR и приводит к увеличению низкотемпературного пика плавления и общему понижению температуры плавления, а в области высоких



Дифференциальные кривые плавления ДНК злаковых: Безостая-1, Воскеаск (б), Армянка-60 (в), полба (г) и тритикале (д)

температур имеющиеся пики на ДКП ДНК полбы для ДКП ДНК тритикале сглаживаются. В результате общий профиль кривой ДКП ДНК тритикале Сис-1 смещается в область низких температур. По всей видимости, геному RR присуще количественное преобладание блоков с большим содержанием АТ-пар. Температура плавления для полбы равна $T_m = 74,3^\circ$, т. е. на $1,3^\circ$ больше, чем для пшеницы Воскеаск и Безостая-1, и на два градуса больше, чем для пшеницы сорта Армянка-60.

Появление трех выраженных пиков в области высоких температур свидетельствует о более высоком содержании ГЦ-пар в этой ДНК. И, наконец, промежуточное положение занимает ДКП тритикале сорта Сис-1. Температура плавления ДНК тритикале в наших опытах $T = 72,9^\circ$, т. е. приблизительно такая же, как и у гексаплоидных пшениц, хотя и различается по профилю ДКП.

Для всех исследуемых нами злаковых интервал плавления приблизительно равняется ($\Delta T = 12 \pm 0,2^\circ C$) для каждого сорта, данные приведены в таблице.

Среднее содержание ГЦ-пар (\bar{x}) ДНК определяли по формуле [12]:

$$\bar{x} = 1 - \frac{S}{T_{ГЦ} - T_{АТ}}$$

где S —площадь под интегральной кривой плавления ДНК, которая вычисляется в интервале плавления от $T_{АТ}$ до $T_{ГЦ}$; $T_{АТ}$ и $T_{ГЦ}$ температуры плавления поли- d (АТ) и поли- d (ГЦ) гетерополимеров соответственно.

Данные, обобщенные в таблице, показывают, что существуют различия не только между злаками в пределах подтрибы *Triticinae*, различающимися между собой по пloidности геномов, но и между пшеницами со схожими геномами.

Таким образом, установлено, что ДНК пшеницы сортов Воскесак, Безостая-1 и др. с формулой генома AABB.DD отличаются друг от друга как по форме дифференциальных кривых плавления, так и по среднему содержанию азотистых пар оснований.

Авторы выражают благодарность д. б. н., профессору Гандияну П. А. за любезные советы и ценные указания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беридзе Т. Г., Гордизе А. Д. Генетика, 9, 11, 172–174, 1973.
2. Дискалик А. П., Остапюк А. П. и др. Физ. и биол. культ. раст. 13, 5, 513–518, 1981.
3. Сивовин Ю. М., Дьяченко Л. Ф., Новогелов А. Н. Молекулярная биология, 11, 4, 877–881, 1977.
4. Carozza M. L., Giorgi L., Cremonini R. Z. Pflanzenzuchtig., 84, 254–293, 1980.
5. Flavell R., O'Dell M. Heredity, 42, 3, 309–322, 1973.
6. Furuta Y., Nishikawa K., Taniguchi T. Japan J. Genetics, 49, 4, 179–187, 1974.
7. Furuta Y., Hagi T., Nishikawa R. Wheat Int. Serv., 40, 15–16, 1975.
8. Liang G., Wang A., Phillips R. Canad. J. Genet. Cytol., 19, 425–435, 1977.
9. Marmur J. Mol. Biol., 3, 209, 1961.
10. Pivce L., Horsca P. BBA, 340, 199–207, 1974.
11. Tsunewaki, Genetics, 155–171, 1983.
12. Vardevanyan P. O., Panosyan G. N., Tiratsuyan S. G., Babayan Yu. S., Vardapetyan R. R. Studia biophysica, 97, 3, 209–212, 1983.

Поступило 5.X 1988 г.

ПОЛУЧЕНИЕ ДИМЕРНЫХ ФОРМ ФОСФОЛИПАЗ И КОНЬЮГАТОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 С ПЕРОКСИДАЗОИ ИЗ ХРЕНА

А. Е. АЛАНЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Описано применение водорастворимых имидоэфиров ДМА и ДМС для ковалентного сшивания молекул фосфолипазы A_2 . Эти же реагенты использованы для конъюгирования фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена. Исследовано влияние присутствующих в реакционной среде молекул фосфолипидов, ионов Ca^{2+} , различных избытков реагентов, а также разных рН на процесс димеризации молекул фермента.

Նկարագրված է ջրում լուծելի իմիդոէֆերների՝ ԳՄԱ և ԳՄՍ նիրառումը Ա₂ ֆոսֆոլիպազի մոլեկուլներին կովալենտ կապակցման համար նույն սեպտեմները օգտագործված են Ա₂ ֆոսֆոլիպազի կոնյուգացման համար ծոգարողիկի գերօքսիդազի հետ: Հետազոտված է սեպտիկայի միջավայրում ֆոսֆոլիպիդների մոլեկուլների առկայության, Ca^{2+} իոնների, սեպտենտի ասպեկտ քանակի ազդեցությունը, ինչպես նաև միջավայրի զանազան pH-ների ազդեցությունը ֆերմենտի մոլեկուլների դիմերացման վրա:

Use of water-soluble imidethers DMA and DMC for covalent conjugation of molecules of phospholipase A_2 is described. These reagents have been used to conjugate phospholipase A_2 with horse-radish peroxidase. The influence of presence in reaction media of phospholipid molecules, Ca^{2+} ions, different abundants of reagents and different pH on process of dimerization of the enzyme molecules is investigated.

Фосфолипаза A_2 —фосфоглицериды—яо змея—пероксидаза из хрена—конъюит.

Фосфолипаза A_2 —гидролитический фермент, катализирующий расщепление сложноэфирной связи высших жирных кислот во 2-м положении 1,2-диацил-sn-фосфоглицеридов.

Ранее нами было показано, что блокирование только ε-аминогрупп остатков лизина молекулы фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* ангидридом уксусной кислоты практически не влияет на способность фермента к гидролизу фосфолипидов [1]. Это обстоятельство дало нам возможность более широко изучить некоторые свойства фосфолипазы A_2 методом химической модификации, а именно химического сшивания белковых молекул.

В качестве ковалентно сшивающих агентов нами были применены бифункциональные реагенты различной длины алкильной цепи молекулы—водорастворимые имидоэфиры ДМА и ДМС, имеющие структуру



$n=4$ —диметиладипимидат

$n=6$ —диметилсуберимидат

Сокращения: ДМА—диметиладипимидат, ДМС—диметилсуберимидат, ТНБС—тринитробензолсульфокислота, МПКП—миниатюрный потенциал колючкой пластинки.

Выбор бифункциональных имидоэфиров в качестве модифицирующих агентов оправдан тем, что они хорошо растворяются в воде, высокоспецифично и избирательно взаимодействуют только с аминогруппами белковых молекул, образуя с ними ковалентные связи в сравнительно мягких условиях, и, что очень важно, в результате такой модификации не меняется общий заряд белковой глобулы [12].

Материал и методика. Фосфолипаза A_2 (изофермент E3) из яда среднеазнатской кобры *Naja naja oxali* была выделена и очищена по методу [2]. Использовали сефадексы G-75^{sf} (Pharmacia, Швеция), ДМА, ДМС (Serva, ФРГ), 2, 4, 6-ТНБС (Sigma, США). Яичный лецитин получали из яичных желтков по известной методике [15].

Ферментативную активность фосфолипазы A_2 определяли ранее предложенным ацидометрическим методом [13]. Измерения проводили на автотитраторе ГТЗ (Radiometer, Дания) при 37° в 10^{-2} М Трис-НСl буфере (рН 8), содержащем 0,5% детергента Triton X-100, 0,03 М NaCl, 0,02 М $CaCl_2$ и 0,7 мМ ЭДТА.

К 2 мл среды добавляли 2 мг дипальмитониллецитина в 50 мкл этанола, затем вносили 1 мкг фермента в 10 мкл воде. За единицу активности было принято количество фермента, которое вызывает в системе падение рН на 0,1 единицу за 3 мин.

Фосфолипазную активность на липидных монослоях измеряли с помощью известной монослойной техники [2, 5].

Ферментативную активность пероксидазы из хрена определяли по начальной скорости окисления *o*-дигидриды перекисью водорода [6]. Использовали 2,3 мл 0,01 М Na-фосфатный буфер в 0,1 М KNO_3 (рН 7,0), 0,07 мл 2,0 мМ раствора *o*-дигидриды в 96%-ном спирте, 0,07 мл 10 мМ раствора H_2O_2 и 0,05 мл раствора фермента концентрации 2,5–10 мМ. Увеличение оптической плотности при 460 нм после перемешивания реагентов регистрировали на приборе Specord UV-VIS (ГДР). За меру активности фермента принимали количество микромолей субстрата, окисленного за 1 с, таким количеством нативного или конъюгированного фермента, в котором содержится 1 мкмоль железа.

Для быстрого определения свободных аминогрупп белка реакцию с 2, 4, 6-ТНБС проводили в 0,1 М боратном буфере (рН 9,5). На раствор белка с концентрацией 0,1 мг/мл добавляли 10 мкл 1,1 М водного раствора реагента. Реакции останавливали через 15 мин и измеряли поглощение при длине волны $\lambda = 420$ нм.

$(E_{420} - m_{420}) = 22000 M^{-1} cm^{-1}$, $(E_{420} - m_{420}) = 10200 M^{-1} cm^{-1}$ [8].

N-концевые аминокислоты определяли в виде данисильных производных [9].

Аминокислотный состав белков устанавливали на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США) после 24 ч гидролиза в 6N HCl.

Гель-фильтрацию из сефадекса G-75^{sf} проводили в 0,05 М аммонийацетатном буфере (рН 7) на колонке (1,5×90 см) со скоростью 5 мл/час.

Сшивание двух молекул фосфолипазы A_2 бифункциональными реагентами осуществляли в 0,05 М боратном (рН 9,5) буфере или 0,05 М фосфатном буфере (рН 8,5) при концентрации белка 1 мг/мл, в присутствии 10^{-1} М $CaCl_2$ или 1 мг/мл лизолецитина. К раствору белка добавляли 10 мкм реагента (ДМА или ДМС). Через 2 ч реакцию останавливали и после быстрого обезсоливания смеси на колонке (1,5×30 см) с сефадексом G-25 белок лиофилизовали.

При проведении реакции конъюгирования фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена были взяты следующие соотношения компонентов: 10 м: фосфолипаза A_2 , 5 мг пероксидазы.

Результаты и обсуждение. Известно, что большинство фосфолипаз A_2 змеяных ядов стабильны, либо в концентрированных растворах белка находятся в форме димера [10]. С другой стороны, известно также, что из присутствующих в исходном яде нескольких изоферментов одни, например, образуют димеры при рН 7,5, а другие—их не образуют [11], причем димеробразующие фосфолипазы в основном кислые, а не димеризующиеся—щелочные.

Для α - и β -форм фосфолипазы A_2 из яда змей *Crotalus adamanteus* известно, что образование активных димерных форм в результате реассоциации диссоциированных идентичных мономеров приводит к экспозиции одного лизинового остатка на димер [14]. В отношении фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* установлено, что при молярных концентрациях выше 5×10^{-6} М белковая молекула в катализе участвует в виде димера [3, 5]. Этот факт подтверждается модификацией п-бромфенацилбромидом единственного остатка His, входящего в активный центр фермента. При указанных концентрациях, по данным аминокислотного анализа фермента, модифицируется 0,5 моль His на молекулу белка, а ферментативная активность падает до 1% от нативной [1, 3]. Эти данные дополняются результатами исследований на липидных моносолях и даже сделана попытка предложить рабочую модель димерной фосфолипазкой молекулы [5].

С целью получения химического подтверждения димерной рабочей модели фосфолипазы мы и применяли ковалентное сшивание двух молекул фосфолипазы A_2 из яда кобры водорастворимыми имидоэфиром различной длины молекулы.

Сшивание проводили в боратном (рН 8,5) или фосфатном (рН 9,5) буферах при различных концентрациях фосфолипазы A_2 ($< 5 \times 10^{-6}$ М) в условиях различных избытков реагента (до 10 мкмоль).

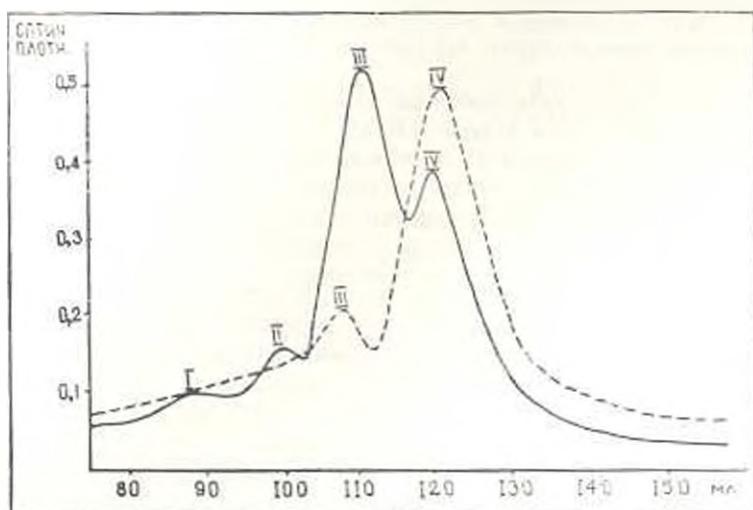


Рис. 1. Разделение ковалентно сшитых олигомеров фосфолипазы A_2 на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкой. Условия реакции: 10 мг/мл белка + 1 мг ДМА (—) или 10 мг/мл белка + 1 мг ДМС (---) рН 8,5; I—тетрамер, II—тример, III—димер, IV—мономер фосфолипазы A_2 .

Исследовано также влияние присутствующих в реакционной среде молекул фосфолипидов (1 мг/мл) и ионов Ca^{2+} (до 10^{-3} М) на процесс димеризации белковой молекулы фермента (рис. 1, 2, 3).

В отдельных экспериментах было применено как одновременное,

так и последовательное или попарное добавление компонентов в реакционную среду.

Как видно из приведенных рисунков, в идентичных условиях применение диметилсуберимидата больше способствует образованию ковалентно сшитых димеров, причем вместе с димерами образуются также тримеры и тетрамеры фосфолипаз A_2 (рис. 1). Увеличение pH среды на одну единицу особенно влияет на выход и направление реакции (рис. 2). Присутствие в реакционной среде молекул липидов спо-

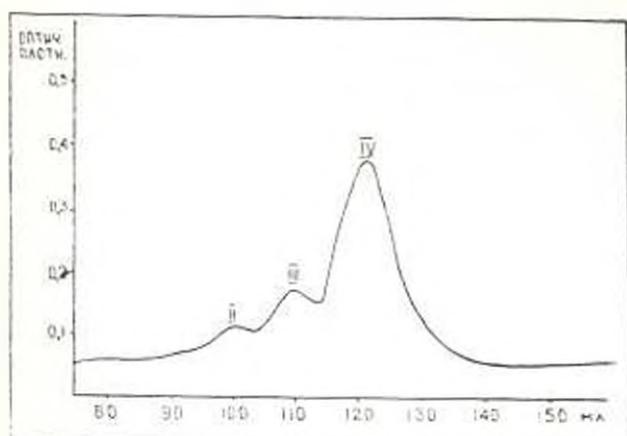


Рис. 2. То же (см. рис. 1), условия реакции: 10 мг/мл белка + 0,65 мг ДМС, pH 9,5. 1 час

способствует димеризации белковых молекул, особенно при одновременном присутствии также ионов Ca^{2+} в растворе. Однако только наличие ионов Ca^{2+} в среде практически не способствует этому процессу (рис. 3).

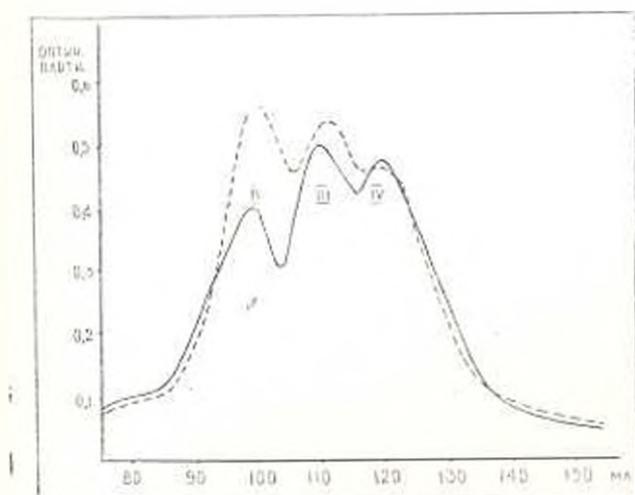


Рис. 3. То же, (см. рис. 1), условия реакции: 10 мг/мл белка + 0,65 мг ДМС, pH 8,5, в присутствии 1 мг/мл лизолецитина (—) или 1 мг/мл лизолецитина с 0,1 мг $CaCl_2$ (---).

Разделение ковалентно сшитых димеров от высших олигомеров, а также других реакционных смесей осуществляла с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 sl. Ферментативную активность выделенных димеров, а также олигомеров измеряли как радиометрическим титрованием в отношении мицеллярных фосфолипидов, так и с помощью монослойной техники [2, 5].

Оказалось, что ковалентно сшитые димеры сравнительно малоактивны (80—90%) по сравнению с нативной формой фосфолипазы A_2 . Причем при инкубации с субстратом их активность снижается не сразу, а с некоторой задержкой, слегка нарушая прямолинейность аддитивного титрования. Рассматривая процесс гидролиза фосфолипидов с точки зрения предложенной ранее димерной модели на основе монослойной техники, можно полагать, что, по-видимому, образовавшаяся ковалентная сшивка двух молекул фосфолипазы A_2 жесткая и мешает гибкому и свободному движению молекул белка в димерной структуре фермента тогда, когда они должны быстро диссоциировать, чтобы после гидролиза субстрата снова реассоциировать уже с другой единицей во вновь образовавшемся димере.

Число свободных аминокрупп белка, не участвующих в ковалентном связывании с реагентом, вычисляли путем измерения поглощения при $\lambda = 420$ нм, после их модификации 2,4,6-ТНБС в щелочной среде

$$(\epsilon_{420} \times d) = 2200 \text{ л} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}, \epsilon_{420} \text{ нд} = 1200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Наконцевым анализом ковалентно сшитых препаратов доказано, что α -аминогруппы белковых молекул свободны и не вовлечены в связывание. На основании аминокислотного анализа сшитых форм фермента, а также с помощью методики 2,4,6-ТНБС найдено, что в ковалентном связывании участвуют 2 остатка Lys на молекулу димера фосфолипазы A_2 .

К настоящему времени ряд авторов показали, что фосфолипазы A_2 из различных ядов змей обладают пресинаптической активностью — способностью нарушать процесс освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний.

С целью выяснения механизма подобного действия и выявления роли ферментативной активности белковой молекулы в пресинаптическом эффекте фосфолипазу A_2 из яда кобры *N. p. oxitans* конъюгировали с пероксидазой из хрена (М. м. 40000 Да). Последняя, как известно, является удобной меткой в гистохимических исследованиях и имеет соизмеримый с фосфолипазой A_2 (М. м. 13500 Да) молекулярный вес.

Помимо уже предложенных и известных методов для конъюгирования разных молекул белковой природы [7] применено сшивание двух белковых молекул с помощью ДМА и ДМС. В обоих случаях сшивание проведено в идентичных условиях, и выход реакции почти не обусловлен предпочтением какого-либо реагента.

Как видно из рис. 4, ковалентно сшитые конъюгаты (1:1) удается успешно разделить с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 sl. Выделенный конъюгат сохраняет ~50% фосфолипазной активности и ~40% пероксидазной активности. Последнюю измеряли по методу

изменения начальной скорости окисления о-дianизидина перекисью водорода в фосфатном буфере (рН 7,0) [6].

Известная в литературе методика определения активности пероксидазы на примере окисления пирогаллола в нашем случае не дала хорошей корреляции, а преимуществу предложенного чувствительного метода было очевидно.

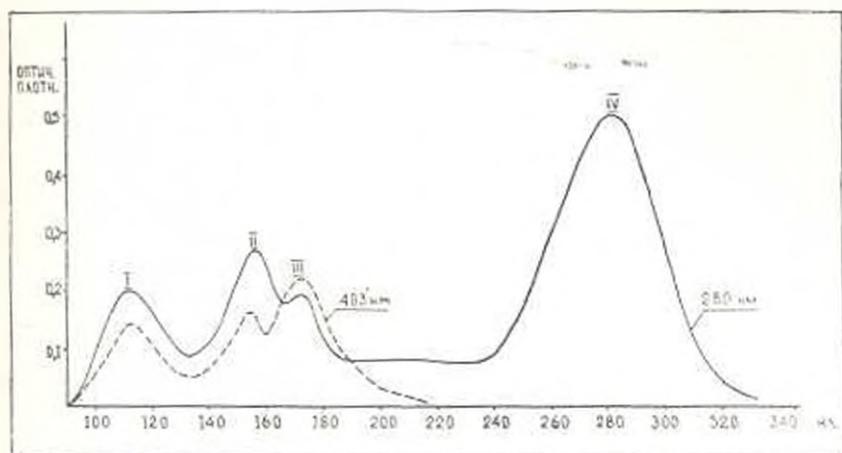


Рис. 1. Разделение конъюгата пероксидазы с фосфолипазой A_2 яда кобры на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкой (—), поглощение белка при 280 нм, (---) поглощение пероксидазы при 403 нм; I—одномерный конъюгат пероксидазы с фосфолипазой A_2 , II—конъюгат с молярным соотношением пероксидазы/фосфолипаза $A_2=1:1$, III—пероксидаза, IV—фосфолипаза A_2 .

Исследование влияния конъюгата фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена на частоту МПКП, проведенное при различных добавках конъюгата при 30° показало, что со снижением ферментативной активности конъюгированной фосфолипазы существенно снижается ее нейротоксическая активность. Установлено, что конъюгат необратимо связывается с пресинаптическими структурами и препятствует действию нативной фосфолипазы A_2 , хотя пресинаптическая активность фосфолипазы A_2 , конъюгированной с пероксидазой из хрена, сравнительно меньше активности нативной фосфолипазы A_2 [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ансалин У. Р., Айнян А. Е., Мецнерькова Е. А., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Гогилдиф И. М., Мажмажик Э. И. Биорган. химия, 6, 7, 1068—1077, 1980.
2. Ансалин У. Р., Шамбарант О. Г., Мирошников А. И. Биорган. химия, 3, 11, 1553—1559, 1977.
3. Желковскии А. М., Дьяков В. Л., Гинзман Л. М., Антонов В. К. Биорган. химия, 4, 12, 1665—1672, 1978.
4. Камчатская М. А., Коробашевская М. В., Миртынова Е. Р., Мирошников М. Л., Айнян А. Е., Грицук В. И., Мирошников А. И. ДАН СССР, 259, 5, 1271—1274, 1981.
5. Ксенжек О. С., Гевод В. С., Айнян А. Е., Мирошников А. И. Биорган. химия, 7, 11, 1686—1686, 1981.
6. Лейбенга О. В., Угарова Н. И., Березин И. В. Биохимия, 42, 8, 1372—1379, 1977.

7. *Aerameas S.* In: *Bull. Soc. Chim. B.o.*, 37, 1169, 1968.
8. *Fields R.* In: *Methods in Enzymol.*, 25 (B), 451-455, Acad. Press, New-York—San-Francisco—London, 1972.
9. *Giray W. R.* In: *Methods in Enzymol.*, 11, 139-151, Acad. Press., New-York—London, 1967.
10. *Ishimaru K., Kihara H., Ohno M. J.* *Biochem.*, 89, 2, 413-451, 1980.
11. *Maraganer J. M., Heine-Rosen R. L. J.* *Biol. Chem.*, 259, 22, 13839-13843, 1984.
12. *Roberts M. F., Deems R. A., Dennis E. J.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 5, 1950-1954, 1977.
13. *Salach J. J., Turini P., Song R., Hasler J., Singer T. P. J.* *Biol. Chem.*, 246, 2, 331-339, 1971.
14. *Wells M. A.* *Biochemistry*, 12, 6, 1086-1093, 1973.
15. *Wells M. A., Hanahan D. J.* In: *Methods in Enzymol.*, 11, 179-181, Acad. Press., New-York-London, 1969.

Получено 26.IV 1988 г.

Биолог ж Армении. № 6 (42) 1989

УДК 577.352.51:577.151

МОДУЛЯЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦИКЛАЗНЫХ СИСТЕМ К АЦЕТИЛХОЛИНУ ФОСФОЛИПАЗОЙ A₂

Д. М. МАРТИРОСЯН, С. С. ЛАДАЛЯН, И. С. БАКУНИ,
Г. С. МАИТАРНИ, С. И. АЙРАПЕТАН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что фосфолипаза A₂ увеличивает внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ и модулирует влияние ацетилхолина на систему циклических нуклеотидов.

Վայր է արված, որ Ա₂ ֆոսֆոլիպազը մեծացնում է ներքային ցԱՄՖ և ցԳՄՖ բանա՛կը և վերափոխում ազդեցիկությունը ազդեցիկությանը ցիկլիկ նուկլեոտիդների համակարգի վրա:

It is shown that phospholipase A₂ increases the intracellular concentration of both cAMP and cGMP and modulates the acetylcholine influence on the cyclic nucleotides system.

Фосфолипаза A₂—циклические нуклеотиды—ацетилхолин.

Данные о влиянии ацетилхолина на внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов противоречивы. Так, АХ увеличивал содержание цГМФ в симпатических ганглиях быка [8], но в нейрональных ганглиях висцеральной улитки несколько снижал его [1]. Было показано также, что АХ ингибирует аденилатциклазу сердечной мышцы и печени [10], однако в срезах мозгового вещества надпочечника быка он стимулировал аккумуляцию цАМФ, не влияя на активность аденилатциклазы [4].

Известно, что фосфолипаза A₂ (ФЛ A₂) оказывает влияние на внутриклеточный уровень цГМФ [9], а также может модулировать ионную проводимость и АХ-чувствительность нервных клеток [3, 7].

Сокращения: ФЛ A₂—фосфолипаза A₂; ЦК—депанденол-гидролаза

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ФЛ-А₂ на уровень цАМФ и цГМФ в условиях действия АХ.

Материал и методика. Эксперименты проводили на изолированной центральной нервной системе виноградной улитки (XII.1988). Использовали физиологический раствор следующего состава (мМ): NaCl—84, KCl—4, CaCl₂—7, MgCl₂—15, глюкоза—10, трис-HCl—10. Реактивы применяли в следующих концентрациях: АХ—10⁻⁵ М, фосфолипаза Д—20 мкг/мл (фирма Serva), дешиленовая кислота (ДК)—1,5 мМ (ТОКYO KASEI Co.ltd., JAPAN), кетамин—10⁻⁴ М (Parke Davis Company, London) ФЛ-А₂—20 мкг/мл (получена из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* Eichwald в Институте биохимии АН УзССР). Активность фермента определяли звидиметрическим методом [11], что составляет условных 33000 ед./мг.

Изменение текучести липидов под действием ФЛ-А₂ и кетамина определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена [12].

Внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ измеряли следующим образом: препарированные ганглии инкубировали в соответствующих растворах (с АХ—в течение 5 минут, в фосфорилизах—10 мин, в кетамине и ДК—30 минут), затем ганглии гомогенизировали в 50 мМ трис-HCl, содержащем 10 мМ ЭДТА (рН 7.4). Белки осаждали спиртом (96%) с последующим центрифугированием при 10000 g в течение 15 минут. Осадок промывали 70%-ным спиртом и вновь центрифугировали в течение 5 минут. Полученные надосадки объединяли и подвергали высушиванию в вакууме. Концентрацию циклических нуклеотидов определяли радиоиммунным методом [12], используя стандартный набор реактивов радиохимического центра «Amersham» (Англия).

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1, АХ не влияет на внутриклеточное содержание цАМФ. В условиях предварительной инкубации ганглиев в растворе, содержащем ФЛ-А₂, уровень цАМФ по-

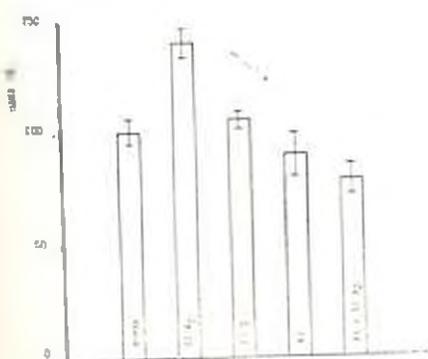


Рис. 1.

Изменение внутриклеточного содержания цАМФ в различных условиях инкубации (n=10)

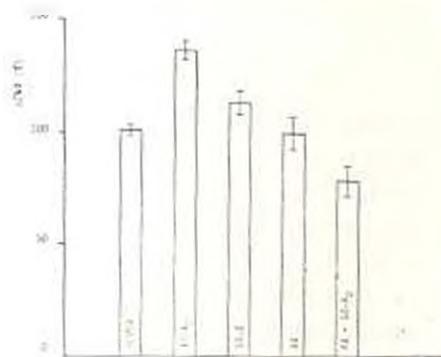


Рис. 2.

Изменение количества цГМФ (%) в различных условиях инкубации (n=10).

вышается на 40%. В этих же условиях под влиянием АХ он снижается почти в два раза. Аналогичное воздействие наблюдается и при изучении влияния АХ и ФЛ-А₂ на внутриклеточное содержание цГМФ (рис. 2). При этом ФЛ-А₂ увеличивает содержание цГМФ на 35%. Из рисунка видно также, что фосфолипаза Д не влияет на содержание циклических нуклеотидов в клетке.

Представленные данные подтверждают результаты, полученные ранее другими авторами [9], показавшими, что ФЛ-А₂ стимулирует активность циклазных систем.

Известно, что активность мембранных ферментов зависит как от липидного состава, так и от текучести липидного слоя мембраны. Исследование влияния ФЛ-А₂ на текучесть липидного слоя грубых микросомальных фракций мембраны нейрона виноградной улитки выявило снижение текучести мембраны на 8%. Для выяснения роли текучести липидов в процессе стимуляции уровня цАМФ и цГМФ фосфолипазой А₂, ганглии предварительно обрабатывались веществами модулирующими текучесть липидов (кетамин и ДК). Было показано, что как ДК (ненасыщенная жирная кислота с 10 атомами углерода в углеводородной цепи), повышающая текучесть [13], так и кетамин (2-ирто-хлорофилл-2-метиламино-циклогексана гидрохлорид, диссоциативный анестетик), уменьшающий текучесть клеточных мембран [5], не оказывают влияния на количество цАМФ (табл.). Однако предва-

Изменение уровня циклических нуклеотидов в зависимости от текучести мембраны, % n = 10

Условия инкубации	цАМФ	цГМФ
Норма	100±5	100±5
ФЛ-А ₂	140±7*	131±6*
ДК	100±9	124±8
ДК+ФЛ-А ₂	133±15*	137±8*
Кетамин	90±7	163±9*
Кетамин+ФЛ-А ₂	118±8	230±10*

* — статистически достоверное отклонение (P < 0.05)

рительная инкубация ганглиев в среде, содержащей кетамин, резко повышает содержание цГМФ в клетках. При этом сохраняется стимулирующее влияние ФЛ-А₂ на уровень цГМФ, происходит суммация эффектов кетамина и ФЛ-А₂.

Как видно из таблицы, ДК также увеличивает содержание цГМФ, хотя и в меньшей степени по сравнению с кетаминном.

Таким образом, и при увеличении, и при уменьшении текучести мембраны не меняется уровень цАМФ и увеличивается уровень цГМФ, а ФЛ-А₂ в обоих случаях сохраняет стимулирующее влияние на содержание циклических нуклеотидов. Это позволяет предположить, что модуляция чувствительности циклазных систем ФЛ-А₂ не зависит от изменения текучести липидов.

Известно, что под действием ФЛ-А₂ происходит образование свободных жирных кислот. Наряду с этим показано, что свободные жирные кислоты могут оказывать влияние на уровень цАМФ и цГМФ в клетке [6]. Полученные нами экспериментальные данные можно интерпретировать следующим образом: под действием ФЛ-А₂ происходит образование свободных жирных кислот, которые путем прямого взаимодействия с циклазными системами активируют их, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточного уровня цАМФ и цГМФ. Тот факт, что изменение текучести мембраны не влияет на эффекты ФЛ-А₂, также свидетельствует в пользу нашего предположения.

На основании вышесказанного можно полагать, что чувствительность циклических систем нейрональных мембран к АК может зависеть от степени активности фосфолипаз. Противоречивость результатов исследований, полученных при изучении влияния АХ на уровень циклических нуклеотидов, может объясняться тем, что сезонные изменения (особенно выраженные у пойкилотермных животных) могут приводить к изменению фосфолипазной активности, что, в свою очередь, может влиять на чувствительность цАМФ и цГМФ к АХ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаб. биофизики Института фотобиологии АН БССР за предоставленную возможность и помощь при измерении текучести мембранных фракций. Авторы благодарят также сотрудника Института биохимии АН АрмССР Айяна А. за помощь при определении активности ФЛ-А₂.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дабалян С. С., Азатян К. В., Айрапетян С. Н. *Нейрохимия*, 7, 1, 18—25, 1988.
2. Охунь И. М., Казар Г. Н., Волковец Т. М., Мережинская Н. В., Кочев С. В. *Биохимия*, 51, 7, 1132—1140, 1986.
3. Andreassen T. J., Doerge D. M., McNamee M. G. *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 468—480, 1979.
4. Boonyaviroj P., Cuytman J. *Pharmacol.*, 291, 241—247, 1977.
5. Familiari M. *Minerva Anesthesiol.*, 43, 435—448, 1977.
6. Golberg N. D., Liaddox M. K. *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 823—886, 1977.
7. Kimura M., Kimura I., Shikada A., Takahashi K. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 5, 2, 127—133, 1987.
8. Lee T. P., Kuo J. F., Greengard P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3287—3289, 1972.
9. Lewicki J. A., Waldman S. A., Cheng D., Ward P. *Fed. Proc.*, 42, 902, 1983.
10. Murad F., Chh J. M., Rall T. W., Sutherland E. W. *J. Biol. Chem.*, 237, 1233—1239, 1962.
11. Salach J. I., Turtai C., Song R., Hauber I., Singer T. P. *J. Biol. Chem.*, 246, 331—339, 1971.
12. Seiner A. L., Parvizu I. S., Chase L. R., Kupff D. M. *J. Biol. Chem.*, 247, 1114—1120, 1972.
13. Takenaka T., Horii H. *J. Neurobiology*, 14, 47—61, 1983.

Получено 15.11.1989 г.

ВЛИЯНИЕ γ -ПРОПАНОЛА НА ПРОЦЕСС ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ В ПЕЧЕНИ И СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ШУМА

М. М. МЕЛКОНЯН, Е. А. МЕЛИК-АГЛЕВА, В. Г. МХИТАРЯН

Ереванский медицинский институт, кафедра биохимии

Под влиянием γ -пропанола в условиях акустического стресса в печени и сердце крыс изменяется интенсивность липидной пероксидации, предотвращается снижение уровня α -токоферола, регулируется активность супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Գ-պրոպանոլի ազդեցության տակ ակուստիկ ստրեսի պայմաններում առնչված է ԼՊՊ-ը և արյանահամակարգում փոխվում է լիպիդային փոքրածաղցանի ինտենսիվությունը, կանխվում է α -տոկոֆերոլի ցածրի իջնումը, կարգավորվում է սուպերօքսիդիզիմուտազայի, գլուտաթիոնօքսիդազայի, գլուտաթիոնրեդուկտազայի, գլյուկոզ-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը:

Under the influence of γ -propanol changes the intensity of lipid peroxidation, the decrease of the level of α -tocopherol is suppressed, the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase is regulated in the heart and liver of rats under conditions of acoustic stress.

ПОЛ— α токоферол, γ -пропанол—шум.

Ранее нами были показаны выраженные изменения процессов ПОЛ и антиоксидантной системы печени и сердца в условиях акустического стресса [7, 8]. Это позволяет считать изменения в указанной системе важным патогенетическим фактором в реализации шумового воздействия. Продукты ПОЛ оказывают повреждающее действие на клетку, вызывая окисление и деградацию различных субстратов, разрушение структурных компонентов биомембран, сопровождающееся ингибированием активности ряда ферментов, нарушением процессов репарации, что в итоге проявляется в изменении интенсивности и направленности клеточного метаболизма.

В связи с вышесказанным ставится очевидной необходимостью разработки мер профилактики и лечения шумовой патологии, основанных на регуляции интенсивности процессов ПОЛ. В настоящей работе представлены результаты исследования интенсивности процессов ПОЛ, содержания эндогенного антиоксиданта α -Т, а также активности СОД, ГП, ГР, Г-6-ФДГ в печени и сердце белых крыс-самцов под действием шума (91 дБА) на фоне профилактического введения γ -пропанола.

Сокращения: СОД—супероксиддисмутазы; ГП—глутатионпероксидаза; ГР—глутатионредуктаза; γ -пропанол—2,5-дигетбутил-4-гидроксибензилпропанол, (синтезирован в НИИХИМполимер МХП); ФЛП—фоновые липидные перекиси; ПОЛ—перекисное окисление липидов; α -Т— α -токоферол; Г-6-ФДГ—глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; АЗП—аскорбатзависимое перекисное окисление; НЗП—АДФН-зависимое перекисное окисление; МДА—малоновый диальдегид.

Материал и методика. Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах массой 150—200 г, содержащихся на обычном рационе. Животные были разделены на 7 групп, крысы 1 группы служили контролем, крысы 2—6 групп подвергали действию шума (91 дБА) с максимальной энергией в области средних и высоких частот. Животные 2—7 групп получали внутривенно по схеме в течение всего эксперимента γ -пропаиол в дозе 5 мг/кг массы. Сроки действия шума составляли соответственно 1 и 8 ч, 7, 28 и 56 сут., ежедневно по 8 часов. Животных забивали декапитацией. Крысы 7 группы были забиты спустя 24 ч после введения γ -пропаиола без озвучивания («интактная группа»). Все операции проводили на холоду. Из исследования брали 5- и 10%-ные гомогенаты сердца и печени. Содержание ФЛП определяли по описанному методу [10], уровень неферментативного—АЗП и ферментативного НЗП ПОЛ—по методу [2].

Содержание α -Т определяли флуориметрически [9], активность ГП, ГР и Г-6-ФДГ—по описанным методам [3, 12, 13] с некоторыми модификациями; содержание белка—по Лоури [11].

Результаты и обсуждение. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о росте уровня α -Т в печени и сердце как интактных, так и экспериментальных крыс во все исследуемые сроки. Сдвиги наиболее выражены в сердечной мышце и свидетельствуют о выраженном превентивном действии γ -пропаиола, способствующем не только сохранению, но и накоплению α -Т в тканях, что чрезвычайно важно, поскольку у животных в условиях акустического стресса развивается недостаточность α -Т [7, 8].

Следует отметить, что уровень α -Т достиг максимальных величин у животных 5-й группы (4 недели воздействия), превысив контрольный фон в сердце и печени на 82 и 208% соответственно. Через 8 недель содержание его нормализовалось в печени, в то время как в сердце продолжало превышать контроль на 58%. Примечательно выраженное снижение уровня ФЛП в сердце и печени как интактных животных, так и подвергающихся воздействию шума в течение 4 недель. Следует, однако, отметить некоторое превышение контрольных величин ФЛП через 8 недель, что, возможно, является следствием обогащения липидов клеточных мембран полиненасыщенными жирными кислотами вследствие значительного роста α -Т в них [1]. При этом отмечается обратная корреляция между уровнем α -Т и интенсивностью индуцированных процессов ПОЛ: способность к липопероокислению в целом снижается, в особенности в НЗП системе. Значительный интерес представляет абсолютное отсутствие активации индуцированных процессов ПОЛ, в отличие от динамики, наблюдаемой как в условиях стресса без профилактики, так и при профилактическом применении α -токоферолаацетата [7]. Возможно, столь выраженный ингибирующий эффект обусловлен как непосредственно γ -пропаиолом, так и его гидроксилированными производными, обладающими высокой антирадикальной активностью, как это предполагается в механизме действия синтетических антиоксидантов из ряда экранированных фенолов [4].

Изучение активности ферментов антирадикальной защиты клетки свидетельствует о выраженном подавлении СОД, ГР и Г-6-ФДГ и активировании ГП в миокардиальной и печеночной тканях интактных животных. Однако характер сдвигов значительно меняется в условиях шумового воздействия: при этом сдвиги более выражены в печени, где про-

Таблица 1. Влияние шума на интенсивность ПОЛ и уровень α_2 -Т в печени и сердце белых крыс-самцов на фоне введения γ -пропанола (M \pm m)

Исследуемые параметры	Исследуемая ткань	Г р у п п ы						
		1	2	3	4	5	6	7
М, нмоль МДА на мг белка	печень	2,92 \pm 0,2 (4)	1,05 \pm 0,04 ²	1,14 \pm 0,16 ³	1,64 \pm 0,02 ⁴	2,9 \pm 0,22	1,33 \pm 0,13	2,3 \pm 0,13
	сердце	1,6 \pm 0,1 (48)	0,8 \pm 1,03 ²	1,0 \pm 0,15 ³	0,84 \pm 0,65 ⁴	1,3 \pm 0,05	0,8 \pm 0,02 ⁵	1,36 \pm 0,15
НЭП, нмоль МДА на мг белка	печень	2,3 \pm 0,1 (48)	0,4 \pm 0,03 ²	1,81 \pm 0,1 ³	0,7 \pm 0,03 ⁴	0,3 \pm 0,03 ⁵	6,67 \pm 0,05 ⁶	0,7 \pm 0,1 ⁷
	сердце	1,3 \pm 0,1 (48)	0,23 \pm 0,01 ²	0,8 \pm 0,05	0,23 \pm 0,02 ⁴	0,75 \pm 0,13	0,2 \pm 0,01 ⁵	0,58 \pm 0,06 ⁷
Фоновые липидные перекисей, нмоль МДА на г ткани	печень	30,3 \pm 1,6 (24)	24,2 \pm 0,6 ²	23,6 \pm 1,0 ³	17,1 \pm 0,6 ⁴	29,9 \pm 1,7	11,7 \pm 1,7 ⁶	14,5 \pm 0,4 ⁷
	сердце	26,9 \pm 1,6 (24)	21,1 \pm 0,61	18,8 \pm 0,6 ³	10,3 \pm 0,6 ⁴	23,9 \pm 1,04	31,6 \pm 0,9	18,0 \pm 0,16 ⁷
Содержание α_2 -Т, нмоль на г ткани	печень	24,6 \pm 1,1 (1)	2,0 \pm 0,4	22,8 \pm 0,4	43,2 \pm 1,6 ³	74,0 \pm 0,5 ⁵	23,2 \pm 1,1	26,4 \pm 0,4 ⁷
	сердце	26,1 \pm 1,6 (48)	35,5 \pm 0,9 ²	30,6 \pm 0,4	43,2 \pm 1,2 ³	48,0 \pm 0,1 ⁵	41,5 \pm 1,9 ⁶	30,0 \pm 0,4 ⁷

Примечание: 1) количество животных (2—7) — 9; 2) 3, 6, 5 — показатели достоверности: P<0,001; P<0,01; P<0,05.

Таблица 2. Активность СОД, ГП, ГР, Г-6-ФДГ в печени и сердце белых крыс-самцов на фоне введения γ -пропиола (M=10)

Научные параметры	Исследуемые ткани	Г р у п п ы						
		1	2	3	4	5	6	7
СОД, ед. активности на мг белка	печень	28,3±2,0 (48)	9,2±1,5 ^c	16,7±0,16 ^b	57,7±1,61 ^a	26,4±0,2	49,1±2,8 ^a	15,1±1,2 ^b
	сердце	11,6±0,5 (48)	16,4±1,2	10,2±0,2 ^b	21,9±0,4 ^a	14,3±0,8	9,6±0,1 ^a	7,3±0,2 ^c
ГП, мкмоль глутатиона на мг белка в мин	печень	0,31±0,01 (48)	0,22±0,01 ^b	0,27±0,02	0,25±0,02 ^b	0,3±0,01	0,36±0,01	0,57±0,03 ^a
	сердце	0,25±0,007 (48)	0,4±0,03 ^b	0,38±0,03 ^b	0,096±0,007 ^a	0,1±0,01 ^a	0,57±0,01 ^b	0,5±0,02 ^c
ГР, нмоль НАДФН на мг белка в мин	печень	25,0±0,7 (48)	45,0±1,0 ^a	13,5±0,5 ^c	16,9±0,4 ^c	30,0±1,0 ^a	19,8±0,4 ^c	8,5±0,6 ^b
	сердце	16,5±0,7 (48)	12,1±2,02	13,6±0,31 ^b	8,1±0,7 ^c	10,2±1,01 ^b	11,3±0,27 ^b	3,7±0,35 ^b
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФН на мг белка в мин	печень	33,0±0,1 (12)	28,0±2,9	30,0±0,8 ^b	14,7±0,67 ^a	35,1±3,08	11,17±0,7 ^a	23,7±0,5 ^b
	сердце	3,7±0,12 (12)	13,0±0,3 ^a	5,7±0,1 ^c	3,5±0,2	7,5±0,4 ^a	7,2±0,2 ^c	2,6±0,43 ^c

Примечание, см. табл. 1

слеживается общая тенденция к подавлению активности ГР, Г-6-ФДГ через 8 недель воздействия, восстановлению контрольного уровня ГП и активации СОД. В миокардиальной ткани динамика сдвигов отличается от таковой в печени, т. е. имеет место выраженная органоспецифичность сдвигов, проявляющаяся в подавлении активности ГР и СОД и примерно двукратном росте ГП и Г-6-ФДГ. Известно, что изменения активности изученных ферментов в определенной мере обусловлены концентрацией субстратов, уровнем биоантиоксидантов в тканях [5, 6], а также изменением в синтезе *de novo*, что также находится под контролирующим вниманием различных регуляторных систем.

Наблюдаемый в ходе эксперимента рост активности ГП, по-видимому, является результатом индуктивного синтеза ферментных систем утилизации и ответ на введение синтетических антиоксидантов [5], хотя возрастание уровня ФЛП к концу эксперимента свидетельствует об интенсификации процессов ПОТ и, по-видимому, значительном росте гидроперекисей жирных кислот, субстратов ГП.

Таким образом, действие γ-пропанола многогранно, и он, являясь «ловушкой» для радикалов, в то же время действует опосредованно, путем изменения уровня α-Т и активности изученных ферментов в тканях, что в результате проявляется в полном предотвращении развития дефицита α-Т и индуцированных процессов ПОТ под действием шума в изученных тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирлякова Е. Б., Кухтина Е. Н., Храпова Н. Г., Аристархова С. А. Биохимия, 17, 5, 822—826.
2. Владимиров Ю. А., Лочахов А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
3. Захаркин Ю. А. Лабор. дело, 6, 327—330, 1967.
4. Комаров П. Г., Билленко М. В., Шведова А. А., Кисан В. Е. Вопр. мед. химии, 31, 2, 10—15, 1985.
5. Ланкин В. З. Биоантиоксидант. Тез. Всесоюз. совещ., Черноголовка, 16—17, 1983.
6. Ланкин В. З. Биоантиоксидант. Тез. II Всесоюз. конф., Черноголовка, 2, 11—12, 1986.
7. Мелкоян М. М., Мелик-Азаян Е. А., Мхитарян В. Г., Аракелян А. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 8, 668, 1984.
8. Мелкоян М. М., Африкян А. Б., Рухкян А. А., Мхитарян В. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 7, 586—594, 1984.
9. Duggan D. E. Arch. Biochem., 84, 116, 1959.
10. Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M. Amer. J. Obstet. Gynecol., 135, 372, 1979.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. S., Farr A. L., Randall P. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
12. Pizzo R. E., Bartley W. Biochem. J., 112, 109, 1969.
13. Sealock J., Lindsay K. S. Analyt. Biochem., 2, 132, 79, 6.

Поступило 11.V 1988 г.

ВЛИЯНИЕ ОБЩЕЙ ВИБРАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ И СЕРТОНИНА В НАДПОЧЕЧНИКАХ, КРОВИ И МОЧЕ КРОЛИКОВ

С. М. МИНАСЯН, А. О. ОГАНЕСЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра физиологии человека и животных

Выявлены фазовые изменения содержания адреналина, норадреналина, дофамина и серотонина в надпочечниках, крови и моче кроликов при двухмесячном воздействии вибрации. После 30-дневной вибрации увеличилось содержание адреналина и норадреналина в надпочечниках, крови и усилилась их экскреция с мочой, что свидетельствует об усилении тонуса симпатической нервной системы. Уменьшение содержания катехоламинов в крови и моче в конце эксперимента указывает на подавление активности симпатико-адреналовой системы.

Քրոնիկական երկամսյա ազդեցության պայմաններում ազդրների մակերիկաններում, արյան և մզի մեջ բացառապես էն ադրենալինի, նորադրենալինի, դոֆամինի և սերտոնինի քանակության փոփոխության փոփոխությունները Քրոնիկական 30-օրյա ազդեցությունից նաև կատարել է արյան մեջ մեզում և մակերիկաններում ադրենալինի և նորադրենալինի քանակության ավելացումը, որը վկայում է սիմպաթիկ նյարդային նամակարգի յարգմանության բարձրացման մասին: Երկամսյա փորձում արյան և մզի մեջ կատեխոլամինների քանակը նվազում է, ինչը վկայում է սիմպաթիկ նյարդային նամակարգի ակտիվության նվազման մասին:

The phase changes of adrenaline, noradrenaline, dopamine and serotonin content in adrenals, blood and urine in the rabbit at the 2 months effect of vibration was revealed. At the 30 days vibration the augmentation of composition of adrenaline and noradrenaline in adrenals, blood and increase of their excretion with urine, that was apparently on account of enhancement of sympathetic nervous system activity, was observed. The decrease of catecholamine content in blood and urine, that was found at 2 months exposition of sympathetic system activity.

Вибрация—биогенные амины—надпочечники

Биогенные амины играют важную роль в механизме нейрогуморальной регуляции функций организма, процессах саморегуляции и гомеостаза, адаптационно-трофической функции нервной системы. Их значение как регуляторов приспособительных механизмов вытекает из способности быстро и интенсивно влиять на процессы метаболизма, усиливать возбуждение центральной нервной системы, участвовать в развитии эмоциональных реакций.

В последнее десятилетие внимание многих исследователей направлено на изучение состояния биогенных аминов при вибрационной патологии [2, 6, 9—11]. Однако данные о содержании катехоламинов в тканях организма в этих условиях противоречивы. Нам и удалось содержание катехоламинов и серотонина в надпочечниках, крови и моче кроликов при воздействии общей вибрации.

Материал и методика. Экспериментальные исследования проводили на 24 кроликах массой 2,5—3 кг. Содержание биогенных аминов в надпочечниках и моче определяли флюорометрическими методами [4, 8]; катехоламины и серотонин в крови — также описанными методами [13, 14]. Были проведены две серии экспериментов. В первой изучались изменения содержания биогенных аминов при воздействии вибрации разной продолжительности: 30, 60, 120 мин; во второй — на 30-й и 60-й дни воздействия (по 2 ч ежедневно при 6-дневной неделе). Животных подвергали воздействию вибрации на вибростенде ЭВ-1 (частота 80 Гц, амплитуда 0,4 мм). Контролем служили интактные кролики, такое же время находящиеся в виброкамере. Для сравнительной характеристики симпатического и адреналового звеньев симпато-адреналовой системы, выяснения различий в процессе биосинтеза и метаболизма катехоламинов были вычислены коэффициенты, характеризующие соотношения норадреналин/адреналин и норадреналин/дофамин. Полученные цифровые данные были подвергнуты машинной статистической обработке на ЭВМ ЕС 1033 по соответствующей программе.

Результаты и обсуждение. В надпочечниках интактных кроликов обнаружено сравнительно большое количество адреналина по сравнению с норадреналином, что соответствует литературным данным [3]. В крови имелось относительно большое количество адреналина и серотонина.

При воздействии вибрации в течение 2 ч наблюдались фазовые изменения содержания биогенных аминов в надпочечниках, крови, моче (табл.).

В надпочечниках при кратковременной вибрации (30 мин) снижалось содержание адреналина на 23%, норадреналина на 21% и повышался их уровень в крови и моче (соответственно на 66 и 250%).

Согласно литературным данным [1], снижение уровня адреналина и норадреналина в надпочечниках при вибрации является результатом повышения их секреторной функции.

После часовой вибрации в крови сохранялся повышенный уровень катехоламинов и усиливалась их экскреция с мочой, в основном за счет норадреналина. Если экскреция адреналина усиливается на 50%, то содержание норадреналина увеличивалось в 3 раза. Соответственно увеличивался коэффициент норадреналин/дофамин (1,02, у интактных — 0,91). В первый час воздействия вибрации выделение катехоламинов происходит в основном за счет норадреналина, что свидетельствует о значительном повышении тонуса симпатической нервной системы.

После двухчасовой вибрации исходный уровень катехоламинов в надпочечниках почти восстанавливался; в крови намечалась тенденция к уменьшению их содержания и увеличению количества серотонина. Уменьшалась также их секреция с мочой при одновременном увеличении содержания серотонина (табл.).

Изменение содержания биогенных аминов после 30-дневного воздействия вибрации свидетельствует о генерализованном ответе всех звеньев адренергической системы на вибрацию. При этом наблюдалось увеличение содержания адреналина и норадреналина в надпочечниках крови. Одновременно увеличивалась их экскреция с мочой (табл.).

Изменения содержания (мкг/г) биогенных аминов в надпочечниках, крови, моче при действии вибрации

Органы	Показатели	Контроль	1 серия			2 серия	
			время, мин			дни исследования	
			30	60	120	30	60
			Число животных	10	10	10	10
Надпочечники	A	465.8 ± 25.6	361.3 ± 24.2	321.6 ± 19.4	407 ± 28.13	583.8 ± 29.6	319.0 ± 18.4
	P		0.01	0.001	0.1	0.01	0.001
	HA	10.32 ± 0.69	8.35 ± 0.54	8.60 ± 0.73	9.91 ± 0.92	12.47 ± 0.52	9.41 ± 0.65
	P		0.15	0.05	0.5	0.02	0.5
Кровь	A	0.42 ± 0.06	1.63 ± 0.27	1.60 ± 0.33	0.31 ± 0.08	1.74 ± 0.42	0.27 ± 0.05
	P		0.001	0.01	0.5	0.01	0.01
	HA	0.005 ± 0.0001	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.0001	0.003 ± 0.0001	0.009 ± 0.0003	0.003 ± 0.0002
	P		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
	HA	0.005 ± 0.0001	0.005 ± 0.0003	0.006 ± 0.0003	0.002 ± 0.0001	0.004 ± 0.0003	0.004 ± 0.0002
	P		0.001	0.001	0.001	0.01	0.001
	5-OT	0.015 ± 0.0002	0.020 ± 0.0002	0.025 ± 0.0002	0.038 ± 0.0001	0.022 ± 0.0002	0.01 ± 0.0001
	P		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Моча	A	12.28 ± 1.14	15.95 ± 1.23	18.11 ± 1.96	10.20 ± 1.13	15.42 ± 2.0	9.47 ± 1.24
	P		0.05	0.02	0.2	0.2	0.1
	HA	0.11 ± 0.01	0.36 ± 0.09	0.41 ± 0.13	0.30 ± 0.06	0.23 ± 0.01	0.06 ± 0.02
	P		0.02	0.01	0.01	0.001	0.05
	HA	0.12 ± 0.02	0.31 ± 0.08	0.40 ± 0.14	0.18 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.14 ± 0.05
	P		0.01	0.05	0.2	0.001	0.5
	5-OT	0.09 ± 0.01	0.40 ± 0.15	0.15 ± 0.12	0.40 ± 0.08	0.35 ± 0.01	0.41 ± 0.09
	P		0.05	0.01	0.01	0.01	0.01

Полученные данные о концентрации катехоламинов в крови и увеличении их выделения с мочой свидетельствуют об усилении тонуса симпатической нервной системы в начальной фазе воздействия вибрации.

Усиление экскреции катехоламинов в этот период, по-видимому, связано как с активацией механизмов гомеостаза, так и с перераздражением периферических вегетативных образований. Увеличение содержания катехоламинов отмечено и при других стрессорных воздействиях [5, 12]. Согласно литературным данным, хронический стресс у крыс вызывает повышенную активность мозгового слоя надпочечников, что проявляется в увеличении количества адреналина и норадреналина и повышении активности ферментов синтеза катехоламинов—тирозин гидроксилазы, фенилэтанолламин-N-метилтрансферазы и дофамин-β-гидроксилазы [7].

При двухмесячном воздействии вибрации в надпочечниках уменьшалось количество адреналина, в то время как содержание норадреналина колебалось в пределах нормы. В крови снижалось содержание адреналина и норадреналина (на 32 и 40%); количество дофамина оставалось несколько повышенным по сравнению с контролем. В моче в значительной степени уменьшалась экскреция норадреналина, а содержание дофамина существенно не изменялось, одновременно повышался уровень серотонина.

Обнаруженное нами снижение выделения норадреналина с мочой при нормальной экскреции дофамина в условиях длительной вибрации, можно, по-видимому, объяснить не только дисфункцией гипоталамических образований, но и изменением функционального состояния узлов и сплетений симпатических пограничных цепочек. Известно, что большая часть норадреналина вырабатывается в скоплениях хромаффиновой ткани и симпатических нервных образованиях. Показано, что стимуляция симпатических узлов приводит к увеличению норадреналина в крови, а их удаление—к резкому снижению его содержания. В то же время удаление надпочечников лишь незначительно снижает содержание норадреналина в крови [7].

Уменьшение содержания катехоламинов в крови и моче, обнаруженное в конце двухмесячного эксперимента, свидетельствует о подавлении активности симпато-адреналовой системы, которая может подключить компенсаторные механизмы, обеспечивающие состояние гомеостаза в организме.

Итак, полученные данные показывают, что в начальной фазе действия общей вибрации повышается активность симпатического звена симпато-адреналовой системы, а при продолжительном ее действии она подавляется (симпатическое и адреналовое звенья).

ЛИТЕРАТУРА

1. Веин А. М., Матлина Э. Ш., Мурадханов М. А. Гигиена труда и проф. заболеваний, 10, 12—16, 1971
2. Дмитриев А. С., Гайц М. Ю., Лудина Т. В., Калдибо Т. С. Докл. АН БССР, 31, 6, 567—570, 1987

3. Касилья Г. Н. Некоторые гуморально-гормональные и барьерные механизмы стресса // Актуальные проблемы стресса. 100—115. Кяхинев, 1976.
4. Манухин Б. П., Бердышева Л. Б., Волина Е. В. *Вопр. мед. химии*, 21, 3, 317—322, 1975.
5. Манухин Б. П., Павлова В. И., Путинцева Т. Г., Волина Е. В., Бердышева Л. В., Курбанова Р. Д., Селиванова Г. П., Мертсон Ф. Э. *Физиол. журн. СССР*, 67, 1182—1187, 1981.
6. Манчак Л. В., Вербинца А. А., Абрагамович О. О. *Проблемы патологии и эксперименте и клинике*, 1, 162, 1980.
7. Матросов В. Д. *Физиол. журн. СССР*, 61, 3, 385—390, 1975.
8. Меньшиков В. В. *Лаб. дело*, 4, 18—21, 1961.
9. Рахманкулова Г. М. В кн. 2-я Всесоюз. конф. «Эндокринная система организма и вредные факторы внешней среды». *Тез. докл.* 69, 11., 1983.
10. Rovinski M. *Eur. J. Appl. Physiol. and Occup. Physiol.*, 55, 4, 301, 1986.
11. Staczynski T., Vegiel A., Mydra A. *Pol. tyg. lek.*, 30, 3, 1387, 1981.
12. Stepanovitch S., Nicotic E. *Experientia*, 35, 1, 111—112, 1974.
13. Vensaly A. *Pystogr. Saltst. Lund Forh.*, 29, 45—52, 1959.
14. Weissbach H., Walkes T. L., Udenertend S. A. *J. Biol. Chem.*, 230, 865—871, 1958.

Поступило 19.IV 1989 г.

Биолог ж Армениа, № 6, (42) 1989

УДК 577.252.5 577.354

ՄԱՌՆԻՍԱԿԱՆ ԳՈՒՇՏԻ ԱՂԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՅԱՐԳԱՅԻՆ ԲՉՋԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՋՐԱՅԻՆ ԼՈՒՍՈՒՅԹՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐՈԼԱՂՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Լ. Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Լ. Լ. ՍՊԻՆՍԵԱՆ, Ի. Շ. ՍԻՐՈՆՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱԳԵՏՅԱՆ

ՀեՄՀ ԳԱ փորձառական կենսաբանության ինստիտուտ, Երևան

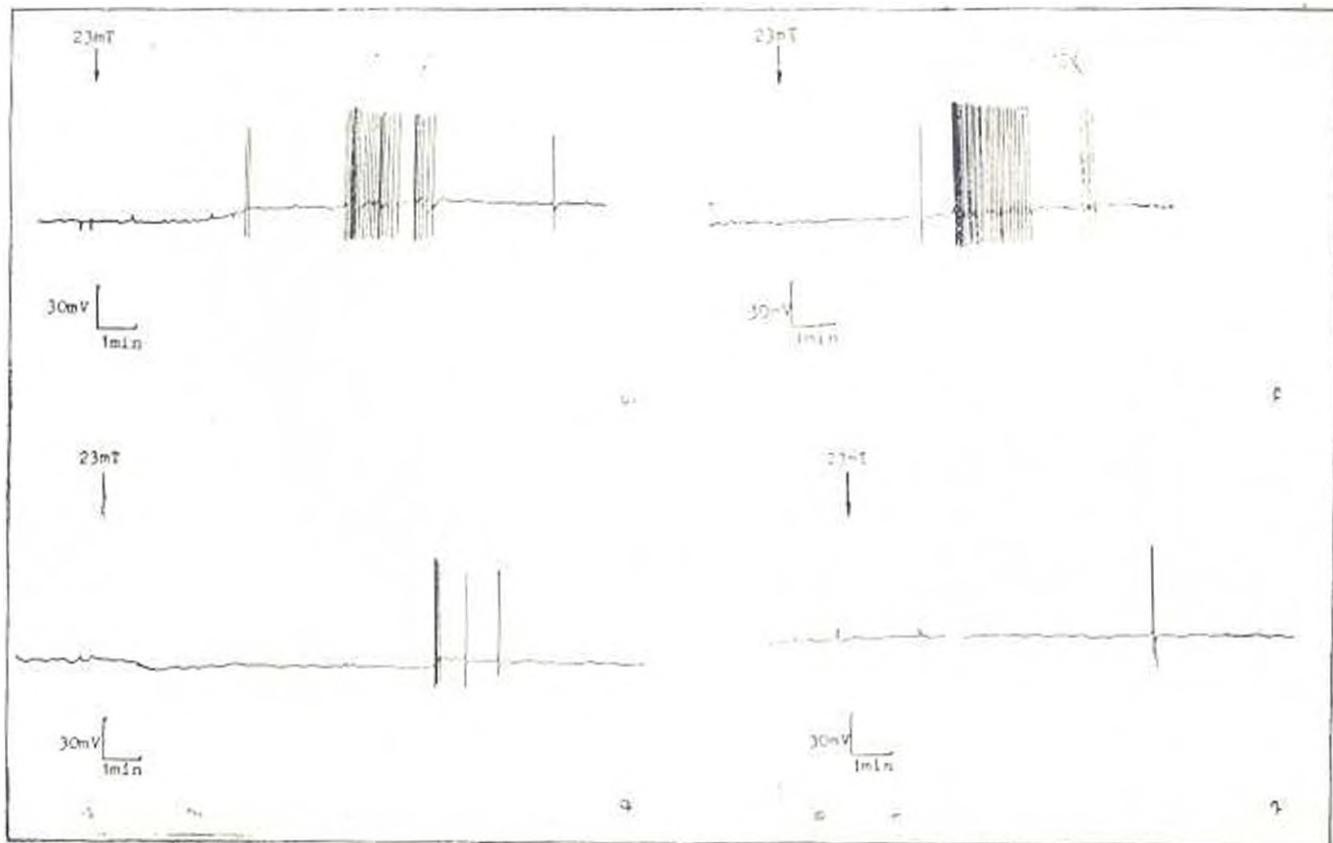
Երևանի պոլիտեխնիկական ինստիտուտ,

ՀեՄՀ ԳԱ սաղմոնոլոգիայի ինստիտուտ, Ալշատակ

Մագիստրական դասընթացի արդյունքները և կենսաբանական ակտիվությունը — կենսաբանա-դոզաբանություն:

Կենսաբանական գիտությունների վրա մազնիսական դաշտի ազդեցության տարբեր երևույթներ նկարագրված են բազմաթիվ աշխատանքներում [3, 6—9]: Հաստատված է, որ կենսաօրգանիզմների վրա կարող է ազդեցություն ունենալ բավական լավ տիրույթներում փոփոխվող ինդուկցիա և հաճախություն ունեցող մագնիսական դաշտը [5]: Առայժմ կենսաճանկարգների վրա մագնիսական դաշտի ազդեցությունը բացատրող հավասարի և բավարար սխեմայի գոյությունը չունի Սեր նախորդ աշխատանքում ցույց էր տրված, որ մագնիսական դաշտում մշակված ֆիզիոլոգիական լուծույթը ազդում է խաղողի խխունջի առանձնացված նյարդային բջջի ծավալի վրա [1]: Առաջ էր արված վարկած, որ այդ ազդեցությունը պայմանավորված է ջրի (ջրային լուծույթների) ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների փոփոխությամբ՝ մագնիսական դաշտի ազդեցությամբ, և բանի որ կենդանի օրգանիզմների հիմնական բաղադրիչ մասը ջուրն է, ապա կարելի է ենթադրել, որ կենդանի օրգանիզմների վրա մագնիսական դաշտի ազդեցության հիմնական ազդեցությունը մեկը դա օրգանիզմի մեջ պարունակվող ջրի և ջրային լուծույթների ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների փոփոխությունն է [4]:

Ելույթ և մերող ներքա աշխատանքը նվիրված է այդ վարկածի հնազա ստուգմանը: Ուսումնասիրել են արժույթի ինդուկցիայով դաշտերի մեջ մագնիսացված ֆիզիոլոգիական լուծույթի ազդեցությունը խողովի խխունջի (*Helix pomatia*) նկյունի էլեկտրական ակտիվության վրա՝ Փորձերը կատարվել են հունվար-փետրվար ամիսներին: Խխունջի առանձնացված նյարդախնայից (1961 թ. դեկտեմբեր) ազդեցություն էր 3 ս. ծավալ ունեցող անոթի մեջ, որի միջով իրականացվում էր ֆիզիոլոգիական լուծույթի ռոտ լուծույթի զերմաստիճանը 22—23°C: Նյարդահանգույցների թաղանթները կտրում էինք, որի շնորհիվ նկյունները ավելի մոտեցնել էին դառնում դրանցում կատարելու համար: Դրանցումը կատարվում էր ապակյա միկրոէլեկտրոդների միջոցով, որոնց մեջ լցվում էր KCl-ի 2 մոլանոց լուծույթ (էլեկտրոդի զիմադրությունը 1—15 Մոմ): Բջջից ստացված ազդանշանը ուժեղացվում էր և գրանցվում էր ԿՄ 789 բազմափող լուծույթի սարքով և 11-302 իներնպրիչով: Մագնիսական դաշտը



23 մՏ-ի ինդուկցիայով մագնիսական դաշտում մագնիսազված ֆիզիոլոգիական լուծույթի հայտնիական կիրառությունների ազդեցությունը խաղողի ինտուշի հյարդուային բջջի էլեկտրական ակտիվության վրա և բջջի հարմարումը այդ ազդակին (ա. բ. գ. դ):

նյարդահանգույցի վրա ազդելով փոփոխվում են վերջինիս բջիջների էլեկտրական ակտիվությունը.

— մազնիսացված հեղուկի նկատմամբ բջիջները ցուցաբերում են հարմարման պատասխան. ա) միևնույն բջջի վրա մազնիսացված հեղուկի մի քանի հաջորդական կիրառումների բջջի պատասխանը թուլանում է, բ) լուրարանչուր կիրառման զեպում 8—15 րոպեից բջիջը վերագառնում է իր նախկին վիճակին:

Կենսահամակարգերի վրա մազնիսական դաշտի ազդեցության մեխանիզմի մեջ ջրի և ջրային լուծույթների հատկությունների փոփոխությունը պայմանավորված ներդրման պատկերը կարելի է կոնկրետացնել միայն ավելի մանրամասն նւտազո հետազոտություններից հետո:

ՊԵՆԱԿՆԻՔՅՈՒՆ

1. Айрапетян С. Н., Богларян Р. А., Григорян Х. В., Стамболцян Х. В., Арутюкян Р. С., Григорян Т. Е. ДАН АрмССР, 32, 4, 1986.
2. Айрапетян С. Н., Рыжков Г. Е. ДАН СССР, 285, 6, 1464—1467, 1986.
3. Данилов В. Н., Паршинцев В. В., Туркин В. В. Биофизика, 29, 1, 109, 1984.
4. Класен И. А. В кн.: Омагничивание водных систем. М., 1982.
5. Пресман А. С. В кн.: Электромагнитные поля и живая природа. М., 1967.
6. Adcy W. R. Proceedings IEEE, 68, 1, 199, 1980.
7. Gould J. L. Ann. Rev. Physiol., 46, 585—98, 1984.
8. Hefoux P. Bioelectromagnetics, 8, 135—148, 1987.
9. Leucht Th. Naturwissenschaften, 74, 192, 1957.

Поступило 6.11.1989 г.

Высшие ж. Армении. № 6.(42) 1989

УДК 577.352.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА В МЕМБРАНУ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ АНИЗОТРОПИИ

Լ. Կ. ԱԴԱՅԱՆ, Դ. Գ. ԱՄԲԱՐՇՄՅԱՆ, Գ. Գ. ՄԱՐԻՔՅԱՆ, Լ. Տ. ՍԵՏՐՅԱՆ

Երևանский физический институт. ԻԿԱԶ ՍՍՏՐ

Лецитиновые липосомы—гемагглютинин—виросомы—флуоресцентная анизотропия

Слияние вируса с мембраной клетки—это процесс, который удобно моделировать, работая с выделенным вирусным белком и искусственной липидной мембраной. Липосомы с включенным в мембрану вирусным белком, так называемые виросомы, используются также в иммунологии, поскольку вызывают повышение иммуногенности в 10—30 раз по сравнению с обычными методами иммунизации [3, 7]. В связи с этим проведение структурных и функциональных исследований на модельных объектах представляет большой практический и теоретический интерес.

Сокращения: ДФГТ—1,6-дифенил-1,3,5-гексаатрен.

Для определения процесса связывания белка вируса гриппа гемагглютинина с искусственной мембраной обычно используется метод, связанный со способностью этого белка вызывать специфический гемолиз эритроцитов [5]. Недавно для этой цели был предложен метод гашения флуоресценции [6]. Нами предлагается метод флуоресцентной анизотропии для определения включения гемагглютинина в мембрану лецитиновых липосом.

Материал и методика. Липосомы получали из яичного лецитина Харьковского завода «Милект» вост. Очистку лецитина от леволецитина осуществляли с помощью окиси алюминия.

Сухую липидную смесь, полученную на роторном испарителе и очищенную от остатков хлороформа, эмульгировали вручную в течение 15 мин в 20 мМ триацетатного буфера с 130 мМ KCl, pH раствора равнялся 8,2. Концентрация липида—7,5 мг/мл. Полученную суспензию отстаивали в течение часа, а затем озвучивали в трубчатом опупулятеле с частотой 22 кГц на ультразвуковом деинтеграторе УЗДН-2 до достижения просветления и обесцвечивания. Затем суспензия отстаивалась в течение часа. Гемагглютинин вируса гриппа (H3N2) был любезно предоставлен Институтом вирусологии и вирусных лицевитион АМН СССР. Концентрация гемагглютинина составляла—150 мкг/мл. Вирусомы получали путем смешивания озвученной суспензии с равным объемом гемагглютинина и озвучивания полученной смеси в течение 20 мин в трубчатом озвучивателе [7].

В качестве флуоресцентной метки использовали ДФГТ в соотношении с липидом 1:750. Подробное описание методики приводится в работе [1]. Регистрацию спектров флуоресценции проводили на флуориметре Perkin Elmer MPF-43 A (США).

Результаты и обсуждение. Добавление гемагглютинина к липосомам в весовом отношении 1:50 и последующее совместное озвучивание суспензии приводит к образованию вирусом.

О включении гемагглютинина в мембрану судили по изменению флуоресцентной анизотропии ДФГТ. Анизотропию вычисляли по формуле

$$A = \frac{(J_{\parallel} - G J_{\perp}) - (J'_{\parallel} - G J'_{\perp})}{(J_{\parallel} + G J_{\perp}) - (J'_{\parallel} + G J'_{\perp})}$$

где J_{\parallel} и J_{\perp} — параллельная и перпендикулярная составляющая флуоресценции в условиях «холостого» опыта, то есть в суспензии без ДФГТ. G —так называемый G -фактор, представляющий собой отношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света.

Результаты опытов показали, что при включении белка в мембрану флуоресцентная анизотропия статистически достоверно ($p < 0,05$) снижается. Для липосом $g = 0,185 \pm 0,008$, а для вирусом $g = 0,159 \pm 0,008$ ($n = 4$). Уменьшение анизотропии свидетельствует о разупорядоченности структуры мембраны, связанной с встраиванием белка.

Параллельно в качестве контроля включение гемагглютинина в липосомы проверили по специфическому гемолизу эритроцитов вирусным белком [2]. С этой целью суспензию центрифугировали в течение 1 часа при 18000 об./мин, а затем супернатант и осадок (вирусомы) использовали для определения гемолиза эритроцитов человека в растворе Альсвеера. Специфический гемолиз наблюдался при дей-

ствии осадка (т. е. действительно образуются виросомы), но не супернатанта (т. е. при таком соотношении липида и белка, вероятно, весь белок включается в липидный матрикс).

Полученная суспензия виросом была устойчива в течение 10 дней. Так как известно, что закисление раствора приводит к лучшему включению белка в фосфолипидную мембрану [4], то была предпринята попытка снизить pH раствора при получении виросом до семи. Однако уже через 2—3 дня в такой суспензии наблюдалось частичное выпадение виросом в осадок. Поэтому дальнейшие опыты проводили при pH 8,2.

Таким образом, в данной работе была получена устойчивая суспензия виросом. Показано также, что включение гемагглютинина в мембрану лецитиновых липосом вызывает уменьшение флуоресцентной анизотропии, что может быть использовано в качестве теста на образование виросом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марики Г. Г., Петросян Я. С. Биолог. ж. Армении, 41, 318—322, 1988.
2. Harper T., Hulse C. Вирусология, методы, М., 1988.
3. Altson A. C., Gregoriadis G. Nature, 252, 251—254, 1974.
Dunst P. W., Heinen A., Klotz U. J. Biol. Chem., 260, 2973—2981, 1985.
4. Hoegberg R. T. C., Dale G. A. Biol. Chem., 261, 12913—12914, 1986.
5. Wessstrom O., Lyster A. FEBS Letters, 221, 61—67, 1987.
6. Oxford J. S., Hockley D. J., Heath T. F., Fattersun S. J. Gen. Virol., 52, 329—343, 1981.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОЯДЕР В РЕТИКУЛОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ

А. К. НЕРСЕСЯН, Р. М. АРУТЮНЯН

ОНЦ им. В. А. Фанарджяна МЗ АрмССР, Ереванский государственный университет

Микроядра—ретикулоциты—злокачественные новообразования—химиотерапия.

Известно, что изучение МЯ в клетках является достаточно информативным краткосрочным тестом, который в обязательном порядке входит в батарею тестов для выявления канцерогенов/мутагенов [3]. Этот тест хорошо разработан для лабораторных животных [1]. Имеются также немногочисленные данные о применимости МЯ-теста для изучения мутагенеза у людей, подвергшихся действию мутагенов в производственных условиях или химиотерапии [3]. Нам известна только одна рабо-

та, в которой показана возможность выявления МЯ в эритроцитах периферической крови человека [5]. Целью настоящей работы явилось изучение МЯ в ретикулоцитах больных злокачественными новообразованиями при химиотерапии.

Материал и методика. Изучали кровь 10 больных злокачественными новообразованиями различных локализаций, поступивших на лечение в ОНЦ им. В. А. Фанарджяна МЗ АрмССР. Мазки крови из пальца больных брали до проведения химиотерапии, включающей циклофосфан, 5-фторурацил, адрибластин, метотрексат и винбластин, и через день после ее окончания. Мазки крови брали также у 10 здоровых доноров. Мазки фиксировали в абсолютном метаноле в течение 5 мин, затем окрашивали бриллиантовым крезильным синим по ртутиной методике или акридином оранжевым (5–7 мин, 0,025 мг красителя на 1 мл фосфатного буфера при pH 7,41 [5]). Препараты, окрашенные первым методом, изучали на микроскопе МБН-6, препараты, окрашенные вторым методом,—на люминесцентном микроскопе МЛ-2 (длина волны 436 нм). Количество МЯ подсчитывали на 1000 ретикулоцитов. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Исследование МЯ у человека представляет определенные трудности, так как человеческий организм в отношении реакции МЯ в несколько раз менее чувствителен, по сравнению с организмом мышей [3]. МЯ исследовали в ретикулоцитах, так как они не выявляются в зрелых эритроцитах у людей с интактной селезенкой [5]. МЯ в зрелых эритроцитах выявляются при действии мутагенов только у лиц с удаленной селезенкой.

Исследования показали, что ретикулоциты и МЯ в них в препаратах, окрашенных бриллиантовым крезильным синим, идентифицировать сравнительно трудно. При окраске препаратов акридином оранжевым и просмотре препаратов на люминесцентном микроскопе МЯ четко идентифицируются. Зрелые эритроциты флуоресцируют желтовато-зеленым свечением, сетчато-нитчатая субстанция ретикулоцитов— ярко-красно-оранжевым свечением, а МЯ на этом фоне—желтовато-зеленым свечением. Поэтому для изучения МЯ в ретикулоцитах окраска акридином оранжевым предпочтительнее.

Результаты исследований показали (табл.), что у здоровых доноров количество ретикулоцитов с МЯ равно $0,20 \pm 0,20$. У онкологиче-

Количество микроядер в ретикулоцитах больных злокачественными новообразованиями до и после химиотерапии

Группы людей	Количество микроядер из 1000 ретикулоцитов	P
Здоровые доноры	$0,20 \pm 0,20$	—
Больные до лечения	$0,50 \pm 0,32$	$P_{1,2} > 0,05$
Больные после лечения	$2,80 \pm 0,44$	$P_{1,3} < 0,001$ $P_{2,3} < 0,01$

ских больных до проведения химиотерапии оно увеличено в 2,5 раза по сравнению с донорами, однако разница статистически недостоверна ($P > 0,05$). После проведения химиотерапии количество ретикулоцитов с МЯ увеличивается в 14 раз по сравнению с донорами и в 5,6 раз по сравнению с больными до лечения.

Повышенное количество МЯ в ретикулоцитах больных до лечения может быть обусловлено как гуморальными факторами, так и диагностическими процедурами (рентгеновским облучением) [4].

Наши исследования показали, что изучение МЯ в ретикулоцитах может служить показателем мутагенного воздействия химиопрепаратов на больных с злокачественными новообразованиями.

Следует отметить, что изучение МЯ в ретикулоцитах является очень трудоемкой процедурой, так как ретикулоциты составляют около 1% эритроцитов. Преимуществом данного метода является лишь простота приготовления препаратов.

Таким образом, несмотря на возможность выявления МЯ в ретикулоцитах человека при действии мутагенов, указанным методом из-за трудоемкости он вряд ли пригоден для исследования мутагенеза у человека исключая отдельные специальные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильинский Н. П., Ильинский И. П., Некрасов В. И. Цитология и генетика, 22, 1, 67—72, 1988.
2. Карьер М. Э., Геннинг Т. П., Иванов В. В. Labor дело, 4, 264—265, 1988.
3. Горин В. И., Ванчугова Н. Н. Эксперим. онкология, 9, 2, 8—14, 1967.
4. Ashover S. G., Kozol C. M., Patel J. V. Cancer, 61, 3, 1867—1871, 1958.
5. Schmitt R., Mautner J. T., Bartsch H. B. Cancer Res., 46, 7, 3717—3721, 1986.

Получено 20.11.1989 г.

Биол. ж. Арм. — № 6, 1989

УДК 616.441—091.8:547.392.1

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ТИМОЦИТОВ И ИЗМЕНЕНИЕ МУРАМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОК

Л. С. ГРИГОРЯН

Ереванский государственный медицинский институт, ЦНИЛ

Пероксилирование олеиновой кислоты—мурамидазная активность—timoциты.

Несмотря на достаточно убедительные данные о роли повышенной липопероксидации в повреждении жизненно важных структурных и функциональных белков, липидов, ДНК, РНК, ферментных и мембранных систем клетки [2, 5, 11, 12, 13], до настоящего времени нет сведений о роли ПОК в генезе иммунных нарушений.

Ранее нами была выявлена супрессия В-системы иммунитета (антителообразование, иммунное роеткообразование, титр гемолитинов и гемитягивининов). Для комплексной оценки иммунного статуса животных определен интерес представляет изучение Т-эвена иммуни-

Сокращения: ПОК—пероксилирование олеиновой кислоты; ПОЛ—перекисное окисление липидов; ПП—повышенная липидная пероксидация.

тега и мураמידазной активности сыворотки. Тем более, что в отношении титра мураמידазы литературные данные разноречивы [1, 6]. Это даст возможность обосновать иммунокорригирующую лечебную тактику—антиокислительную защиту иммунокомпетентных клеток.

Материал и методика. Опыт ставился на 50 крысах-самках массой 120,0±10 г. Исследовано 305 крыс.

Мураמידазу в 100% степени чистоты получали из мурамидазы по методу непосредственному непрямому методу З. В. Ермоловой, бланкетному Буларшим и Васильевым и основанному на реакции мураמידазы с бромидом Нитрогена (Gurley) [10], к действующему диоксида [11]. Доксида: мураמידазу выделяли по классической методике, а Тетрафенил-метилдицилсульфидом методом Е.С.С.К.образованию (раз. предложение № 186 от 28 июля 1984 г.).

Результаты и обсуждение. При воздействии ПОК в различных дозах (с 250 мкмоль перекисного кислорода на 1,0 г навески масла) у неиммунизированных крыс наблюдалось статистически достоверное повышение мураמידазной активности сыворотки крови (в 1,9—4,2 раза) (см. таблицу). Повышение сывороточной мураמידазы отмечалось

Влияние ПОК на количество ядерных клеток (млн) в тимусе животных, иммунизированных эритроцитами барана

Группа животных	Доза	Продолжительность введения, дни	Количество ядерных клеток в тимусе, млн					
			на 5 день иммунизации			на 7 день иммунизации		
			n	M±m	p	n	M±m	p
I—контрольная	—	—	14	43±2		14	81±5	
II—получившие ПОК	1,5 мл перорально	14	8	12±3	<0.001	14	9±1	<0.001
III—получившие ПОК	0,2 г внутривентрально	4	10	6±0,6	<0,001	10	5±0,6	<0,01
IV—получившие ПОК	0,5 мл внутривентрально	1	9	10±1	<0,001	9	7±1	<0,001

как при внутривентральном, так и при пероральном введении (дозы 0,3—1,5 мл) в течение 14 и 28 дней. Мураמידазная активность сыворотки крови контрольной группы составляли $7,08 \pm 4,7 \log_2$ (1:136±1:26), а в опытной группе (при 28-дневном пероральном введении ПОК в дозе 1,5 мл)— $9,18 \pm 5,5 \log_2$ (1:583±1:147). При 4—7- и 14-дневном воздействии той же дозой она повышается в 1,36—2,85 раза.

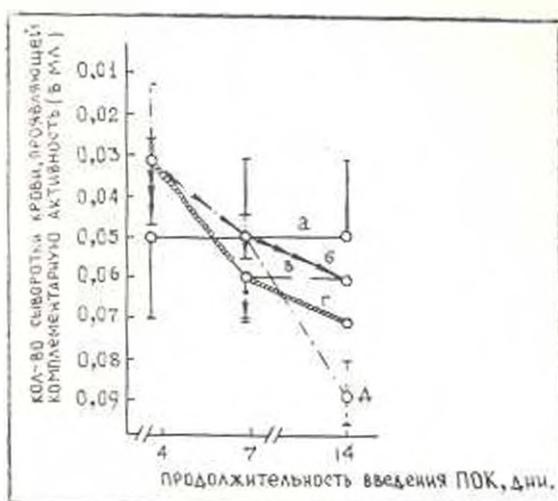
У иммунизированных животных выявлено подавление количества тимоцитов в вилочковой железе. Если в контроле на 5-й и 7-й дни иммунизации оно составляло 43 ± 2 и 81 ± 5 млн, то в опытных группах при введении 0,1; 0,2; 1,5 мл ПОК в течение 4 дней внутривентрально и 14 дней перорально— 10 ± 1 ; 7 ± 1 ; $6 \pm 0,6$; $5 \pm 0,6$ и 12 ± 3 ; 9 ± 1 млн соответственно.

У больных бронхопневмонией новорожденных детей, являющихся естественной моделью повышенной липидной перекисидации [10] (лабо-

роторному исследованию подвергнута кровь 28 новорожденных детей—16 здоровых, 12—больных). обнаружено снижение процента тимусзависимых лимфоцитов в 3,8 раза по сравнению со своим контролем.

Процент спонтанных розеткообразующих клеток с эритроцитами барана в контрольной группе составляет $24 \pm 4\%$, а в опытной— $6,3 \pm 2,8\%$.

Абсолютное количество тимусзависимых лимфоцитов в опытной группе составляло $436,73 \pm 170$.



Влияние ПОК на перекисидированной ОК на комплементарную активность сыворотки крови, а—контрольная группа, б—опытная группа, получавшая 1,5 мл ПОК перорально; в—0,3 мл ПОК перорально; г—1,5 мл перекисидированной олеиновой кислоты перорально; д—0,1 мл ПОК внутривенно.

Таким образом, как при индуцированной гиперлипопероксидации, так и при бронхопневмонии с естественным гиперлипопероксидационным синдромом имеет место снижение Т-лимфоцитов.

Перекисидированная олеиновая кислота с мультитоксичными продуктами ПОЛ способствует угнетению общего пула тимоцитов в вилочковой железе и повышению муррамидазной активности сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О. В., Васильев И. В. Липиды и их роль в биологии и медицине, 208. Томск, 1974.
2. Владимирю Ю. А., Ариков А. Н. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, 252. М., 1972.
3. Воскресенский И. Н. В кн. Липиды и организм животных и человека. Науч. соч. по проблемам биохимии животных и человека. Отв. ред. С. Е. Селурин, 36—45, 1974.
4. Габриелян Э. С., Айроян Э. А. Вазоактивные простагландины и гомеостазе мозгового кровообращения, 306, Ереван, 1983.
5. Гевондян В. С., Кюрянцева Т. П., Бархударян В. А. и др. Вопр. онкол., 25, 11 86—88, 1979.

6. Петров Р. В. Иммунология, 368, М., 1982.
7. Косан В. Е., Архипенко Ю. В., Писарев В. А., Белоусов и др. В кн.: Биофизика мембран, 88—95. М., 1981.
8. Козан А. Х., Кудрин А. Н. и др. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1, 66—67, 1979.
9. Меерсон Ф. З. Кардиология, 8, 108—111, 1979.
10. Резник Б. Я., Минков Н. П. Педиатрия, 1, 38—43, 1981.
11. Покровский А. А., Тутельман В. А. Лазерология, 382, М., 1976.
12. Domzig W., Maty F. et al. Immunology 45, 2—4, 255, 1983.
13. Goldyne M. E. Int. J. Dermatol., 16, 9, 701—712, 1977.
14. (Кемилева Л.), Кемилева З. Вилочкован железца (Прер. с болгарскога), 256.

Поступила 20.III 1989 г.

ми образованиями и функциональными назначениями [7]. В обеспечении последних ведущее место принадлежит различным белковым молекулам, образно сравнимым с айсбергами, плавающими в липидном море биологической мембраны [3]. Будучи широко распространенными в животном, растительном, микробном организмах, фосфолипиды представлены в клеточных мембранах в виде биомолекулярных слоев, характеризующихся своей упорядоченностью и строго закономерным расположением молекул [15, 17]. Последнее происходит по принципу установления гидрофобных взаимоотношений между углеводородными остатками жирных кислот фосфолипидных молекул со своеобразной ориентацией их полярных головок—остатков фосфорной кислоты, азотистых оснований и спиртов—в направлении белковых образований. Благодаря существованию гидрофильных и гидрофобных взаимоотношений между мембранными фосфолипидами и белками обеспечивается эффект кооперирования, определяющий характер энзимохимических превращений. Среди последних наиболее примечательны электротранспортирующие системы, реакции окислительного фосфорилирования и другие, эффективность функционирования которых во многом зависит от природы молекулярных разновидностей фосфолипидов, обусловленной различиями как углеводородных цепей, так и отмеченных выше полярных головок. Существующее разнообразие в картине комплементарных (спаренных) связей между жирнокислотными остатками в молекуле фосфолипида в значительной степени осложняется и присутствием в ней в качестве азотистых оснований различных аминокислот, а также фосфоаминов, комплексующихся с липоэпентидами, липоэпентидами и другими важнейшими компонентами мембраны [15]. Среди аминокислот, обнаруживающихся в результате гидролиза указанных соединений, выявлено присутствие глицина, аланина, аргинина и, что особенно важно, глутаминовой кислоты, лейцина, цистеина и аспарагиновой кислоты.

Формирование фосфолипидной молекулы, осуществляющееся преимущественно путем ферментативных реакций, протекающих в эндоплазматической сети, может частично происходить и в других субклеточных образованиях, обеспечивающих биосинтез отдельных составляющих молекул, например, азотистых оснований.

Настоящий обзор затрагивает некоторые частные вопросы, касающиеся функциональной роли фосфолипидов и продуктов их неферментативного окисления в нормалью и патологически метаболизирующих биологических системах животного организма.

Среди нейтральных фосфолипидов наибольшего внимания заслуживают фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин как основные носители полиеновых жирных кислот. Из кислых фосфолипидов в этом отношении отличаются фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и кардиолипиды, широко представленные в различных тканях, в частности миокардиальной, где они выступают в роли регуляторов реакции дыхания той цепи, протекающих во внутренней мембране митохондриального кардиомиоцита.

Будучи структурными элементами биологических мембран, фосфо-

липиды представлены в них в виде филогенетически строго упорядоченных созвездий, отдельные представители которых, преимущественно из ряда нейтральных фосфолипидов, характеризуются относительно меньшей метаболической активностью [1]. Стало быть, существование стабилизированных качественных и количественных соотношений между индивидуальными представителями этих соединений имеет существенное значение для обеспечения физико-химических свойств клеточной мембраны, ее нормального функционирования. В физиологическом статусе клетки первостепенная роль отводится фосфолипидам как создателям гидрофобного окружения для всех мембраносвязанных липидзависимых и липидоносительных ферментов. Этим, в частности, обусловлена каталитическая регуляторная роль липидов в отношении ферментных систем, катализирующих многочисленные процессы трансмембранного переноса веществ [7]. Поэтому даже незначительные отклонения в постоянстве существующих фосфолипид-фосфолипидных соотношений сопровождаются глубокими расстройствами структурной организации и функциональной активности многочисленных ферментативных систем [26, 30], завершающимися в конечном счете нарушениями мембранной функции и жизнедеятельности клетки в целом [6]. Показано, что при 3-часовой ишемии миокарда содержание фосфолипидов в сарколеммальных мембранах кардиомиоцитов убывает приблизительно на 29%, а в митохондриях — в два раза меньше. Спустя 12 ч после прекращения коронарного кровотока содержание общих фосфолипидов в зоне ишемии уменьшается на 33%, преимущественно за счет убыли содержания фосфатидилэтаноламинов примерно на 50% и фосфатидилхолинов на 25% [26]. Распад фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов, кардиолипидов и других мембранных фосфолипидов миокарда сопровождается их вовлечением в реакции образования токсических продуктов перекисной природы, играющих существенную роль в повреждении мембран кардиомиоцитов [22, 28] как соединения, обладающие мембранотоксическим, мембранолитическим действием.

С помощью искусственно достигаемой делипидизации представлялось возможным проследить за специфичностью роли индивидуальных фосфолипидов в активировании и ингибировании ферментной деятельности. Демонстрирован эффект восстановления полностью утраченной активности К-На-АТФ-азы и пируваткиназы после искусственного восстановления первоначального фосфолипидного состава данной биологической системы. Даже незначительная убыль фосфолипидного компонента биологической мембраны чревата серьезными расстройствами активности митохондриальных ферментов, в частности, ферментов электрон-транспортующей системы: цитохромоксидазы, цитохромредуктазы и др. [7]. Окисление даже 5—10% жирнокислотного остатка мембранных фосфолипидов сопровождается ощутимым уменьшением активности Са²⁺-АТФ-азы в саркоплазматическом ретикулуме. Несмотря на отсутствие четких представлений относительно природы регуляторного действия фосфолипидов на активность ферментов, значение отмеченного выше гидрофобного фактора в обеспечении каталитических свойств ферментов уже не вызывает сомнений. В настоящее время не диску-

тируется также вопрос об исключительно важной кофакторной и эффекторной роли фосфолипидов в обеспечении функциональной активности мембраносвязанных ферментов, в частности, ДНК- и РНК-полимеразы [32] и многих других ферментов [4, 7]. Примечательно, что фосфолипиды действуют не только на скорость биологического катализа, но и стимулируют чувствительность ферментов к другим аллостерическим эффекторам. Для некоторых ферментов, например, для пируваткиназы и фосфолипаз, фосфолипиды выступают в роли типичных аллостерических эффекторов, увеличивающих константу распада фермент-субстратного комплекса, а для других являются факторами, активирующими ферменты синтеза нуклеиновых кислот [4, 32] и матричной функции хроматина [27]. Обработка РНК-полимеразы органическими растворителями или фосфолипазами А и С, деградирующими фосфолипидную молекулу, сопровождается существенной утратой активности фермента. Согласно существующим и настоящему времени воззрениям, имеется определенная прямая корреляционная связь между качественными изменениями фосфолипидов и патологичностью течения процессов биосинтеза ДНК [25]. Установлено, что процесс репликация ДНК сопровождается одновременной стимулирующей реакцией биосинтеза фосфолипидов и соответствующими изменениями количественных соотношений их индивидуальных представителей [3]. Имеются указания относительно зависимости матричной активности хроматина от жирнокислотного состава фосфолипидов, контактирующих с ним [33]. Включение радиоактивности меченых аминокислот в липиды происходит значительно быстрее, нежели в нуклеиновые кислоты [29], роль фосфолипидов при этом в биосинтезе белка заключается в выполнении функции переносчиков аминокислот, с которыми они устанавливают временные, весьма лабильные связи. Аналогичные суждения встречаются в научной литературе и в отношении значения фосфолипидов в реакциях биосинтеза белка в растительных организмах. Из клеточных образований последних, отличающихся исключительно высокой степенью синтетической активности, были выделены и идентифицированы липидсодержащие комплексы с аминокислотами и протеинами.

При этом экстрагированы значительные количества свободного серина, глицина, аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также их комплексов с различными соединениями.

На основании вышесказанного складывается впечатление о важном значении фосфолипидного фактора в реализации процессов регенерации на клеточном и субклеточном уровне. Будучи многофункционального назначения, фосфолипиды принимают активное участие в поддержании как надмолекулярной организации клеточных мембран, так и в регуляции их метаболической активности [1, 15, 24], а чем не последнее место отводится процессам регуляции ионного транспорта, особенно ионов кальция. В связи с этим интенсивно разрабатываются вопросы, касающиеся активирующей и ингибирующей роли нейтральных и кислых фосфолипидов в катализе реакции гемокоагуляции [15], в частности, в процессе трансформации фибриногена в фибрин. Значение кольцевой концентрации в различных биологических системах

трудно переоценить, в частности, в функционировании Ca^{2+} -зависимой мембраносвязанной фосфолипазы A_2 , катализирующей, как известно, реакции деацилирования полненых жирных кислот из молекул мембранных фосфолипидов и способствующей интенсификации реакций свободнорадикального окисления этих соединений с образованием значительного количества токсических перекисей, обладающих мощным детергентным, мембранотоксическим, мембранолитическим действием [14, 31].

В нормально метаболизирующих животных тканях помимо основного механизма окисления энергетических субстратов, реализующихся в митохондриях с освобождением значительного количества энергии, существует и другой, менее исследованный механизм использования кислорода — оксигеназы [21], с присоединением к кислороду 1, 2 или 3 электронов и образованием активных форм кислорода: анион-радикала, перекиси водорода, гидроксилированного радикала, супероксидного радикала и других. Последние вступают в активное взаимодействие с различными клеточными субстратами, среди которых значительное место занимают липиды и особенно фосфолипиды. С включением молекулы кислорода в строение ненасыщенного жирнокислотного остатка происходит образование первичных продуктов перекисного окисления липидов в виде гидроперекисей фосфолипидов, отличающихся своей неустойчивостью. Их распад сопровождается образованием ряда вторичных и конечных продуктов липидной перекисидации, что постоянно протекает и в нормально функционирующих клеточных мембранах в строго лимитированных пределах. Это рассматривается как один из существующих механизмов естественного обновления липидного компонента биологических систем организма. Вышеизложенное свидетельствует о важном физиологическом значении продуктов липидной перекисидации, образующихся в ограниченных концентрациях, как характерного показателя нормально функционирующего организма. Установлено, например, существенное участие продуктов перекисного окисления липидов в поддержании нормального протекания процессов мембранной проницаемости [9], закономерностей скорости роста организма [31], липидного состава биологических мембран [5] и ряда других жизненно важных физиологических функций организма, обеспечиваемых, в частности, простагландинами, ключевыми промежуточными продуктами синтеза для которых служат циклические эндоперекиси [2]. Субстратом для образования последних служат полненые жирные кислоты, участие которых в реакциях простагландиносинтеза возможно лишь после их предварительного вовлечения в структуру фосфолипида. В результате каскада ферментативных превращений циклических эндоперекисей имеет место образование конечных продуктов в виде простагландинов E и G. Не менее существенны реакции перекисления липидов как необходимое промежуточное звено в биосинтезе лейкотриенов, обладающих широким спектром влияния на течение важнейших физиологических процессов. Липидным перекисям отводится не менее важная роль в формировании реакций фагоцитоза, иноцитоза, и регуляции активности некоторых мембраносвязанных ферментов [6, 7] в ту или другую сторону в зави-

симости от концентрации. Развитие отмеченных отклонений может быть следствием автоокисления ненасыщенных жирных кислот в R-положении глицеринового остатка в молекуле фосфолипида, что сопровождается деструктурированием нормальной мембраны и нарушением активности локализованных в ней ферментов, например, глюкозо-6-фосфатазы. Малым концентрациям липидных перекисей прилагается исключительно важное значение для обеспечения нормального функционирования отмеченной выше фосфатазы, митохондриальной АТФ-азы, регуляции каталитических свойств ферментов, а также их срывов, осуществляющихся различными механизмами [7]. Эффект инактивации каталитической способности фермента может осуществляться путем взаимодействия продуктов перекисного окисления липидов с сульфгидрильными группами активных центров ферментов [7, 9] за счет образования прочной связи между свободными аминогруппами белков и альдегидными и кетонными группировками продуктов перекисного окисления липидов, благодаря изменению ригидности мембранных структур [7], и, наконец, в результате гидрофобных взаимодействий [9]. Значительную роль в трансформации ферментативной активности играет изменение концентрации и композиционного состава липидов, в основном фосфолипидов [24], имеющее место при перекисном окислении липидов и считающееся явлением закономерным, отмечающимся в мембранах различного типа.

Интенсификация митотической активности клеток оказывает ингибирующее воздействие на клеточную пролиферацию и наоборот. Аналогичным образом проявление обратной пропорциональности прослеживается и до взаимозависимости между интенсивностью течения процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов и развитием болезненных состояний организма [5, 8, 10, 11, 18, 19—22].

Возможные механизмы активации процессов перекисного окисления липидов и реальные пути повреждающего действия продуктов липидной перекисидации на биологические системы достаточно обстоятельно проанализированы в многочисленных исследованиях Бурлаковой и Меерсона [6, 22]. Развивающиеся на основе токсических эффектов липидных перекисей нарушения в липид-липидных, липид-белковых взаимоотношениях приводят к соответствующим расстройствам процессов трансмембранного переноса веществ, ионной проницаемости, вязкости и жидкостности мембраны, порообразованию, нарушению липидного окружения мембранных протенинов, в первую очередь мембраносвязанных липидзависимых ферментов, и многим другим отклонениям. Обуславливая формирование нового «патологического» типа функционирования клеточной мембраны, они приводят к стартированию глубоких нарушений процессов внутриклеточного метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом. Наглядным проявлением извращенного типа функционирования клетки является расстройство ее нормальной реактивности в отношении факторов внешней среды, главным образом многочисленных нейрорегуляторных агентов как переносчиков внешних раздражений, что обусловлено отмеченными выше срывами, в том числе и потерей чувствительности мембранных рецепторов к соответствующим лигандам.

Таким образом, становится очевидным, что чрезмерно активирован-

ное состояние процессов перекисного окисления липидов может быть отнесено к категории универсальных, неспецифических реакций организма, возникающих в ответ на различные гипоксические, стрессорные, эмоциональные и прочие экстремальные факторы, вызывающие срыв метаболического гомеостаза различных тканевых систем.

Поэтому, согласно существующим воззрениям, для обеспечения нормального формирования ответной адаптационно-приспособительной реакции организма на отмеченные факторы необходимо применение средств, направленных на максимальное, но не полное ингибирование процесса перекисеобразования с ограниченным выходом липидных перекисей, необходимых для достижения эффекта адаптации организма к создавшимся для него необычным условиям существования.

До последнего времени природные антиоксиданты, и главным образом α -токоферол, рассматривались лишь как соединения с антиоксидантным действием. Значение их расценивалось с точки зрения факторов, сдерживающих темп окислительных процессов, особенно в случаях, когда размах реакций перекисеобразования достигает значительных масштабов. Однако, если антиоксидантные свойства α -токоферола охарактеризованы достаточно обстоятельно и не нуждаются в дополнительных доказательствах, то метаболические свойства этого соединения, его роль в тканевых обменных процессах заслуживают специального обстоятельного изучения.

Результаты применения α -токоферола, особенно в сочетании с некоторыми синергистами, например, с аскорбиновой кислотой, селеном, а также соединениями типа нуклеината натрия, позволяют прийти к заключению о важной роли этого антиоксиданта в реакциях тканевого метаболизма, особенно в условиях патологии. Собственный опыт по комбинированному использованию α -токоферола с нуклеинатом натрия при экспериментальном коронароокклюзионном инфаркте миокарда позволяет прийти к ряду принципиально новых заключений не только о сдерживающем действии использованного антиоксиданта на интенсивность течения процессов перекисления фосфолипидов, но и о стимулирующем влиянии его [12, 13, 16, 23], особенно в сочетании с нуклеинатом натрия, на активность ферментных систем, катализирующих начальные этапы биосинтеза фосфолипидов в перинфарктных участках миокардиальной ткани. Иначе говоря, вырисовывается отчетливая роль комбинированного применения антиоксидантов в обеспечении пула глицерофосфата как основного исходного субстрата, вовлекающегося в начальные реакции биосинтеза фосфолипидов [15, 16]. Одним из основных механизмов стимулирования процесса фосфатидагенеза при этом является активирование под действием α -токоферола, равно как и повышение активной глицерофосфатдегидрогеназы в реакции трансформации диоксиацетонфосфата в глицерофосфат. Обнаруживаемое на этом фоне максимальное упорядочение качественного и количественного состава фосфолипидов свидетельствует о том, что и дальнейшее превращение глицерофосфата в направлении ацилирования и окончательного формирования фосфолипидной молекулы протекает в нормальном темпе, значительно активируемом α -токоферолом. Следовательно, можно заклю-

чить, что α -токоферол, с одной стороны, предотвращает дальнейшее вовлечение мембранных фосфолипидов в процесс свободнорадикального перекисления, с другой—способствует путем стимулирования активности соответствующих ферментных систем восстановлению уже утраченных количеств указанных соединений.

Проведенные наблюдения показали, что одновременное применение нуклеината натрия вводит весьма положительные коррективы в общую канву восстановительного процесса [11] как соединение, вызывающее в сочетании с α -токоферолом эффект оптимальной стимуляции процессов биосинтеза белка в пораженном регионе, способствуя тем самым восстановлению в перифокальной области миокардиальной ткани утраченных структурных элементов белковой природы.

Вышеназложенное настраивает на поиск новых, более эффективных сочетаний природных и синтетических антиоксидантов с различными биостимуляторами, применение которых может способствовать более эффективному восстановлению структуры и функции элементов данной биологической системы в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аваджанов М. П. Автореф. докт. дисс., 36. Ереван, 1978.
2. Алексеева Н. С. В кн.: Простагландины. 6. М., 1978.
3. Аветисян А. В., Бурлакова Е. Б. Докл. АН СССР, 229, 1, 199, 1976.
4. Алексеева А. В., Пальмина Н. П. В кн.: Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, 81, М., 1982.
5. Бурлакова Е. В., Алексеева А. В., Молочкина Е. М. Биантиоксиданты в лучевом повреждении и его коррекция при росте, 213, М., 1975.
6. Бурлакова Е. Б. Кардиология, 8, 48, 1980.
7. Бурлакова Е. Б., Джалилова М. И., Гвахария В. О., Глушченко П. П., Молочкина Е. М., Шталако В. П. В кн.: Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, 113, М., 1982.
8. Билленко М. В. В кн.: Биантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии, 15, М., 1982.
9. Владимиров Ю. А., Арчилова А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, 252, М., 172.
10. Гельман И. А., Куликова М. К. Гиг. труда и профзаболевания, 1, 30, 1979.
11. Екштарян А. А. Автореф. докт. дисс., 3, 1985.
12. Екштарян А. А., Карасялова Я. Г. Укр. биохим. журнал, 56, 2, 146, 1984.
13. Екштарян А. А., Карасялова Я. Г., Овакимян С. С. Вопр. мед. химии, 31, 1, 43, 1985.
14. Калая В. Е., Архитекко Ю. В., Писарен В. А. В кн.: Биофизика мембран, 88, М., 1981.
15. Карасялова Я. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма, 267. Ереван, 1972.
16. Карасялова Я. Г., Овакимян С. С., Екштарян А. А., Баламян Г. С., Ордян В. В., Данилов Л. Г. В кн.: Перекисное окисление липидов в норме и патологии. Перспективы использования антиоксидантов. Тр. науч. конф., 57. Ереван, 1982.
17. Крис Е. М. Липиды клеточных мембран, 346, Л., 181.
18. Куликов Б. Ю., Ермолаева В. В., Колесникова Т. И., Молчанова Л. В., Косачикова Т. В. Вопросы мед. химии, 25, 3, 289, 1982.
19. Мерсон Ф. Э., Павлова Н. И., Коробейникова Э. П. Вопросы мед. химии, 26, 6, 827, 180.

20. Мерсон Ф. Э., Голубева Л. Ю., Касан В. Е., Шимкович М. В., Уголев А. А. В кн.: Метаболизм миокарда. 237, М., 1981.
21. Мерсон Ф. Э., Касан В. Е., Козлов Ю. П., Белкина Л. М., Архипенко Ю. В. Кардиология, 2, 81, 1982.
22. Мерсон Ф. Э. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. 263, М., 1981.
23. Погосбекян С. Д., Карагезян К. Г. Вопросы мед. физин. 2, 214, 1980.
24. Buckland H. M., Ruddle C., Wakefield I. M. Biochem Biophys. Acta, 643, 2, 363, 1981.
25. Curtain C. C. In: Research Division Chemical Technology, Melbourne S. A., 14, 1977.
26. Chien K. R., Buja L. M., Purkey P. Clin. Res., 28, 469, 1980.
27. Swarcov M. F., Cernohorsky I., Chapman D., Raultu J. Physiol. and Chem. Phys., 4, 390, 1972.
28. Guarnieri G., Framigni F., Calderera C. M. J. Mol. Cell. Cardiol., 12, 8, 797, 1980.
29. Hundler P. M. J. Biol. Chem., 234, 1466, 1959.
30. Hogberg J., Orreni S. S., O'Brien P. J. Europ. J. Biochem., 59, 2, 449, 1975.
31. Katz A., Muzumdar P. Circulat. Res., 55, 1, 1, 1981.
32. Naylor W. G., Poole-Wilson p.H. Basic Res. Cardiol., 76, 1, 1, 1981.
33. Novello F., Michiure J. N., Lonera B., Cipitani S., Manzoli F. A. Ital. J. Biochem., 24, 6, 325—331, 1976.
34. Paris S., Samuel D., Athand G. Biochimie, 56, 5, 729, 1974.

Поступило 20.I 1988 г.

К ИСТОРИИ СТАНОВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

К 95-летию со дня рождения академика В. А. Энгельгардта

Молекулярная биология, пожалуй, единственная в своем роде наука, характеризующаяся неимоверной насыщенностью открытий за исторически короткий срок. Причем почти любое из этих открытий являлось фундаментальным, формирующим новую область знаний.

Безусловно, предпосылки к возникновению молекулярной биологии складывались задолго до ее признания как отдельной науки, обладающей специфическими методами. Однако только в 50-е годы XX века она получила права гражданства среди других наук, в частности, биологических дисциплин.

До этого времени работы, посвященные изучению нуклеиновых кислот и белков, проводились как бы самостоятельно и, на первый взгляд, независимо друг от друга. Нуклеиновые кислоты рассматривались в связи с белками только в смысле попыток функциональной дискриминации этих соединений, главным образом, хранения наследственной информации. Тем более, что в 30—40-е годы* господствовало мнение, что именно белки являются самыми важными соединениями в клетке и что в основе всех жизненных функций ле-

жит деятельность белковых молекул.

Однако к концу 50-х годов исследования белков и нуклеиновых кислот сплелись в тугой узел одного фундаментального процесса в клетке — синтеза белков, т. е. реализации наследственной информации.

В 1728 году итальянский ученый Якопо Бартоломео Беккарин выделил из пшеничной муки ранее неизвестное вещество, которое назвал клейковиной. Оказалось, что это новое вещество в высушенном состоянии напоминает свернувшийся сухой белок куриного яйца. Это открытие положило начало поискам белковоподобных веществ и изучению их, как мы теперь говорим, физико-химических свойств.

К концу XVIII века термин «белок» стал применяться уже к названию веществ, характеризующихся общим признаком — свертываемостью при нагревании. Наступает период накопления данных о белковоподобных веществах, в который можно назвать описательным. Параллельно расширяется ассортимент источников растительного и животного происхождения для получения этих соединений.

Из многообразия форм долж-

* Если особо не отмечается, то имеется в виду XX век.

было вытекать и многообразие функций, выполняемых белками в клетке. Однако в то время все попытки объяснить биологическую индивидуальность белков разбивались об отсутствие данных по химическому составу этих сложных молекул.

Первые данные по элементарному составу белковых молекул были получены Гей-Люсаком и Тенаром, а в 1820 году А. Браконно обнаружил в продуктах разложения белковых веществ и аминокислоту — глицин. Последующие открытия аминокислот в составе белков (лейцин, тирозин и т. д.) свидетельствовали о том, что аминокислоты являются неотъемлемыми компонентами при построении этих соединений. Всего же было найдено 20 аминокислот, обычно встречающихся в белках.

В 30-х годах XIX века появляются первые гипотезы о строении белковых веществ, основной посылкой которых была идея о едином принципе построения молекул белков, исходящая из теории радикалов органических веществ, созданной И. Я. Берцелиусом.

В качестве радикалов, т. е. основных блоков белковых молекул, рассматривались различные производные аминокислот. К подобным гипотезам можно отнести «урентную теорию» П. Шютценберге, теорию «элементарных рядов» А. Я. Данилевского, идею «протамического ядра» А. Косселя, учение о «жирных» М. Зигфрида. Отличаясь определенным своеобразием, эти воззрения на структуру белка несли на себе общий отпечаток идеи фрагментарного строения белковой молекулы. Самое ценное в них было то, что под фрагментами, блоками авторы подразумевали

аминокислоты и их производные.

Таким образом, к концу XIX века как бы выкристаллизовалось понятие о сложной молекуле белка как некоем сочетании аминокислот. В области химии белка сложилась ситуация, гребущая появления человека, который, опираясь на данные об элементарном составе белков и фрагментов их частичной деградации, гипотезы и теории, смог бы с помощью принципиально новой методологии вывести правильную, соответствующую действительности структуру молекулы белка. Таким человеком явился крупнейший немецкий химик-органик, фактический основоположник биоорганической химии Эмиль Фишер. Он выдвинул гипотезу о том, что белки представляют собой полимеры аминокислот, соединенные амидной связью. Подобный тип связи Фишер назвал пептидной (по аналогии с пептонами — продуктами неполной деградации белков).

Казалось, проблема строения белков была решена. Однако в 20-х годах Т. Спердберг открыл, что молекулярный вес белков гораздо больше, чем представлял себе это Э. Фишер. Кроме того, из эго расчета вытекало, что форма молекул при данной массе должна быть сферической и лишь местами вытянутой, линейной.

Невозможность сочетать представления о компактности белковых молекул с пептидной теорией Фишера побудила многих ученых с сомнением отнестись к последней. Появились различные модели циклического строения белков, которые были довольно популярны в 30—40-е годы. Однако в начале 30-х годов У. Эстберг, используя метод рентгеноструктурного ана-

лиза, обнаружил, что α - и β -кератины, фиброин и коллаген, которые относятся к классу фибриллярных белков, имеют регулярную структуру с повторяющимися вдоль оси элементами. Учитывая это, Полинг и Кори в 1951 году установили, что пептидная цепь может иметь две наиболее вероятные и вместе с тем простейшие структуры— α -спираль и β -конформацию (структуру типа складчатого слоя).

Эти данные объясняли строение линейных участков молекулы белков, но вопрос о компактной упаковке полипептидных цепей в шарообразную форму глобулярных белков оставался открытым. В конце 50-х годов и эта проблема была решена, благодаря работам Дж. Кендрию и М. Перутца на примерах миоглобина и гемоглобина. Миоглобин, присутствующий в скелетных мышцах, является белком, подобным гемоглобину, но в отличие от него состоит из одной полипептидной цепи, тогда как гемоглобин—из четырех. Было показано, что α -спирали миоглобина и гемоглобина свернуты и уложены в компактную структуру. В молекуле гемоглобина отдельные полипептидные цепи (субъединицы), уложенные подобно молекуле миоглобина, соединены в одно целое с помощью малых сил взаимодействия. Таким образом, лишь к концу 50-х годов удалось полностью установить пространственное строение белковых молекул, хотя первые рентгенограммы фибриллярных белков были получены в 1918 году, а кристаллов глобулярных белков—в 1934 году. Конечно же, самым блестящим подтверждением пептидной теории Фишера явилось установление первичной структуры гормона белковой при-

роды—инсулина. А вот каким образом в клетке аминокислоты собираются в уникальные молекулы белков, невозможно было объяснить без знания биологической роли других важнейших химических соединений клетки—нуклеиновых кислот.

К концу XIX века было установлено, что клетка содержит постоянную структуру—ядро, наиболее важным компонентом которого является хроматин. Последнее состоит из измеримого числа питервидных частиц—хромосом, которое при слиянии (оплодотворение) клеток и их делении (митоз и мейоз) остается постоянным.

Чрезвычайно сложные процессы распределения хромосом при митозе и мейозе не могли выработаться в процессе эволюции без должных изощрений. Объяснение подобных явлений было дано в 80-х годах прошлого столетия видным теоретиком того времени Вильгельмом Ру. Он считал, что хромосомы представляют собой наследственный материал. Более того, он постулировал линейное расположение наследственных единиц в хромосомных нитях, не зная о том, что Мендель уже доказал существование таких единиц.

В то, что Ру понятия не имел о работах Грегора Менделя, легко можно поверить, ибо не только он, но и подавляющее большинство ученых того времени упустило из виду маленькую брошюру настоятеля Августинского монастыря города Брно под скромным названием «Опыты над растительными гибридами», которая на самом деле представляла собой фундаментальный труд по вопросам о наследственности. Мендель умер в 1884 году, по-видимому, не пред-

ставляя, какие последствия будут иметь его «прюсадебные экзерсисы».

В том же 1884 году Оскаром и Рихардом Гертвигами и Э. Страсбургером была выдвинута гипотеза о том, что именно в ядре находятся вещества—носители наследственности, которая получила свое развитие в теоретических трудах Августа Вейсмана (учение о «зародышевой и соматической плазме»). Вторичное открытие в 1900 году законов наследования Менделя Г. де Фризом, К. Корренсом и Э. Чермаком в свете данных о поведении хромосом при митозе и мейозе внесло определенную ясность в понимание механизмов передачи наследственных признаков. Таким образом, к началу XX века было уже твердо установлено, что наследственный аппарат клетки находится в ее ядре. Почему это важно?

Дело в том, что большинство ученых того времени в своих представлениях о механизмах процесса передачи наследственных факторов от поколения к поколению руководствовались наблюдениями за проявлениями внешних признаков животных и растений. А поскольку фенотип организма формируется главным образом за счет белкового материала, то ведущая роль в генетических процессах клетки приписывалась белкам. Это происходило еще и потому, что белки тогда были интенсивно изучаемыми химическими соединениями клетки и единственными, обладающими биологической индивидуальностью и специфичностью. Здесь не мешало бы отметить, что мнение о лидирующем положении белков в процессах передачи наследственной информации сохра-

нялось с некоторыми видоизменениями вплоть до 50-х годов. Однако научные факты, как улики в юриспруденции, вынуждают ученый мир признавать свои заблуждения и помогают установить истину. Хотя бывает и так, что факты существуют, но либо они интерпретируются неверно, либо сознательно отвергаются высокими научными авторитетами потому лишь, что они каким-то образом не укладываются в их концепции (история науки пестрит такими примерами), либо научные данные по тем или иным причинам до поры до времени остаются неизвестными широкому кругу специалистов, как это произошло с работой Менделя и... Фридриха Мишера.

В 1968 году швейцарский химик Ф. Мишер обнаружил в ядре клетки вещество, которое по своим свойствам резко отличалось от белков. После серии опытов и усовершенствования методов выделения ядер Мишер утвердился во мнении, что им открыто новое «семейство» химических соединений, которое он назвал нуклеином (нуклеус—латински—ядро). В 1889 году Астману удалось расщепить нуклеин на белковую и небелковую части. Эта последняя получила название нуклеиновой кислоты.

С 1900 г. по 1920 г. основные компоненты нуклеиновых кислот были уже охарактеризованы. Стало известно, что нуклеиновые кислоты состоят из четырех видов нуклеотидных оснований, пентозного сахара и фосфорной кислоты. Причем различия по сахарному остатку и асартменту нуклеотидных оснований привели к тому, что среди нуклеиновых кислот стали выделять два типа соединений: дезоксирибонуклеиновую кислоту

(ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК). Оба типа нуклеиновых кислот были обнаружены в организмах как растительного, так и животного происхождения. В то же время ДНК в отличие от РНК локализовалась исключительно в ядрах клеток. Этот факт вынуждал по-особому подходить к роли ДНК в функционировании клеток, ибо давно уже было известно, что хромосомы, материальные носители наследственных свойств организмов, также сконцентрированы в ядре. Более того, согласно теории гена Т. Моргана единицы наследственности (гены) расположены в хромосомах линейно. Поэтому вывод о том, что молекулярной основой хромосом, хранителей наследственной информации, может быть ДНК, напрашивался, казался бы, сам собой.

Однако в 30—40-х годах еще велико было «преклонение» ученых перед универсальностью свойств белков и поэтому трудно было отказать от мысли, что роль наследственного фактора клетки принадлежит молекулам небелкового происхождения. Да и физико-химические свойства нуклеиновых кислот были изучены не в той степени, как у белков. Это последнее имело существенное значение в развитии науки о наследственности, ибо, несмотря на прогресс генетики, основная концепция этой науки — концепция гена — оставалась в сущности, лишенной материального содержания.

Таким образом, в 40-х годах в научном мире успешно обрабатывалась идея о том, что молекулярной основой генетической информации может служить ДНК. Последующие годы принесли подтверждение этой гипотезы. В 1944 году

Эвери, Мак Леоду и Мак Карти удалось установить химическую природу феномена трансформации, открытого Гриффитом еще в 1928 году. Они предположили, что трансформирующим агентом является ДНК. Однако отсутствие определенных доказательств в пользу того, что в составе этого активирующего начала нет примесей белка, а также взгляды их оппонентов на ДНК как на инертное соединение, не обладающее химической и биологической индивидуальностью (например, тетра-нуклеотидная глюкоза Левиана), создали атмосферу скептицизма вокруг этого открытия.

Лишь в середине 50-х годов благодаря работам Буассена и суэртена Вандерли, Хочкиса, Чаргафа, Херши и Чейна и других исследователей стало возможным сказать: «Несмотря на нежелание многих генетиков расстаться с общепринятым когда-то взглядом, согласно которому носителем код генетической информации, локализованной в хромосомах, считали белок нуклеопротеидоз, факты, полученные при исследовании генетических типов у пневмококков, а также при изучении инфекции, передаваемой наследственными признаками у фарага, заставили большинство генетиков признать, что первичным генетическим субстратом служит ДНК».

В 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик, опираясь на рентгенограммы, полученные М. Уилкинсом и Р. Франклином, «справила Чаргафа и «спирали» Л. Полинга, предложили молекулярную модель структуры ДНК, окончательно развеяв сомнения относительно того, что ДНК является хранилищем наследственной информации и ге-

метическим материалом клетки. «Двойная спираль явилась теоретической основой, обеспечивающей быстрый прогресс в области исследования процессов передачи наследственной информации, что привело к созданию современных представлений о репликации ДНК, транскрипции и трансляции в белковом синтезе.» Экспериментальное доказательство механизма репликации ДНК, предложенного Уотсоном и Криком, было получено в оригинальных опытах Месельсона и Сталя с помощью разработанного ими метода равновесного центрифугирования и сочетания с радиоактивным мечением. Согласно этим данным, во время репликации (в данном случае, редупликации) полинуклеотидные цепи ДНК расходятся и на каждой из них строится соответствующая комплементарная копия. Если учесть, что при митозе и мейозе, а именно при передаче и распределении наследственного материала происходит продольное расщепление хромосом, то, с учетом способности ДНК редуплицироваться, становится понятным молекулярный механизм функционирования генетического аппарата клетки, в основе которого лежит матричный синтез.

Концепция матричного синтеза была высказана задолго до установления структуры и биологической роли ДНК. К сожалению, тогда матричный синтез рассматривался исключительно в связи с белками, ибо природа гена не была еще установлена, а белки были единственными из известных соединений в природе, которые обладали химической и биологической специфичностью. И хотя представления о матричном синтезе белков

в том виде, в каком они предлагались, были ошибочными, заслугу авторов этой идеи, и в первую очередь Кольцова, трудно переоценить, так как им удалось предугадать механизм фундаментального свойства живого—способности к самовоспроизводству. С некоторыми оговорками эту способность к самовоспроизводству, в принципе, можно приписать и белкам. Ведь если у ДНК существует (а мы уже знаем, что это, действительно, так) аппарат непосредственного самовоспроизводства, то у белков этот путь опосредован через нуклеиновые кислоты. Белки как бы создали в ходе эволюции способ хранить информацию о себе в ДНК, чтобы зря не «суетиться», тратить энергию и искать пути синтеза нужных в данный момент новых белковых молекул (ср. с нематричным синтезом таких пептидов, как карнозин, грамицидин). Эволюция биосинтетического аппарата белков, по-видимому, шла от безматричного синтеза пептидов к матричному синтезу белков.

Однако, чтобы полнее представить себе биосинтез белков в клетке, следовало разрешить ряд важнейших вопросов. Каким образом информация о структуре белков доходит до места их непосредственного синтеза? Как происходит перевод «языка» нуклеиновых кислот на «язык» белков? Каковы участники этих процессов? Что может служить матрицей для синтеза белков?

С установлением генетической роли ДНК был перекинут молекулярный «мостик» от механизмов передачи наследственных признаков от поколения к поколению к механизмам проявления этих при-

знаков в поколениях, т. е. наметилась очевидная связь между активностью генов и биосинтезом белков. Далее, в середине 50-х годов в клетке были открыты структуры, содержащие белок и РНК: эти частицы получили название рибосом. Было замечено, что существует определенная корреляция между биосинтезом белков и функционированием рибосом. Еще раньше Браше, Касперсон, Кедровский высказали мнение об участии РНК в синтезе белков в клетке. В свою очередь, Белозерский и А. Спирин показали наличие в цитоплазме небольшой фракции РНК (около 2%), которая отличалась от основной массы РНК неустойчивостью своего состава, что, как оказалось, было связано с синтетическими процессами у белковых молекул. Жакоб и Моно предположили существование особого семейства РНК, которые, будучи комплементарными ДНК, могут служить посредниками между ядерным аппаратом клетки и цитоплазматическим аппаратом биосинтеза белков. Этот тип РНК получил название информации (и-РНК). В дальнейшем ее стали именовать мРНК (матричная РНК). В цитоплазме мРНК соединялась с рибосомами, которые находились на стенках эндоплазматического ретикулума, где и наблюдался активный синтез белковых молекул.

В конце 50-х годов Криком была высказана идея, согласно которой должны были существовать РНК сравнительно малой молекулярной массы, РНК-адапторы, которые смогли бы, связав определенную аминокислоту, привести ее к нужному месту на матрице для синтеза белка, и, что самое главное, «уза-

пать» это место. В этот же исторический для молекулярной биологии период группа исследователей открыла новую фракцию РНК—транспортные РНК (тРНК). Кстати, ими же почти одновременно был открыт еще один участник биосинтеза белков, но уже белковой природы, так называемые «рН-5 ферменты», или амиоцил—тРНК-сингетазы. Чтобы подчеркнуть биологическую роль этих ферментов, В. А. Энгельгардт предложил называть их «кодазами». Последующие исследования тРНК, действительно, показали, что каждая молекула ее соответствует определенной аминокислоте и содержит последовательность нуклеотидов, строго соответствующую своему положению на матрице. А эксперименты по ошибочному включению аминокислот в строящуюся цепь белка окончательно доказали справедливость «адапторной гипотезы» Крика.

Таким образом, в начале 60-х годов стало очевидным, что РНК принимают непосредственное участие в функционировании аппарата биосинтеза белков. Генетическая информация о конкретном белке, заключенная в ДНК, переписывается на мРНК, затем в рибосомах происходит перевод (трансляция) нуклеиновокислотного «языка» в белковый: в роли переводчика здесь выступает тРНК. А вот ключ, которым пользуется тРНК для связывания четырехбуквенного алфавита нуклеиновых кислот с двадцатibuквенным алфавитом белков—это так называемый генетический код: каждой из двадцати аминокислот соответствует определенное сочетание трех из четырех нуклеотидов, которое называется кодоном (соответственно участок в тРНК,

«узнающий» свой кодон именуется антикодоном). С расшифровкой генетического кода стали понятны узловые моменты белкового синтеза.

Генетический код и «центральная догма» являются идейной основой молекулярной биологии, история которой, как в зеркале, отражается в представлениях о биосинтезе белков в клетке.

50—60-е годы ознаменовались лавинообразной результативностью научных фактов в молекулярной биологии. Рамки настоящей статьи ограничивают нас в описании всех тех событий, которыми был столь богат период становления молекулярной биологии. Поэтому нам приходится отбирать лишь те научные факты и идеи, которые служили краеугольными камнями в понимании общих процессов синтеза белков в клетке. В силу этого мы не вдаемся в экспериментальные детали, не проводим анализа ошибочных взглядов и углубленной интерпретации данных, приведших к открытию механизма биосинтеза белков, а также не претендуем на новизну приведенных данных, признавая их общезвестность. Мы пытаемся лишь сделать более ясной и ощутимой логическую связь в цепи белково-нуклеиновых «взаимоотношений», приведших к правильному обоснованию концепции белкового синтеза. Поэтому пусть не кажется, что путь, по которому движется наследственная информация в клетке и который в молекулярной биологии известен как «центральная догма» (ДНК→РНК→белок), в уммах ученых прокладывался также легко и просто, как это может показаться, если исхо-

дить из схемы нашего изложения, тем более, что сама «центральная догма» пережила к настоящему времени ряд существенных изменений. Не изменилась лишь основная ее идея: поток генетической информации идет от нуклеиновых кислот к белку, но не наоборот. Важно в данном случае уяснить, почему же независимые, на первый взгляд, исследования в области структуры и функций нуклеиновых кислот и белков неизбежно должны были логически сойтись в одной проблеме—биосинтезе белков? Потому, отвечаем мы, что оба эти направления в конечном счете должны были дать ответ на два фундаментальных вопроса, поставленных перед человеком природой: 1. что является хранилищем наследственной информации, т. е. памятью живой природы? 2. как реализуется эта информация, т. е. фактически, что такое жизнь в биологическом смысле этого слова?

К сожалению, в конце 70-х годов с возникновением генной инженерии в молекулярной биологии замечился отход от проблемы биосинтеза белков. «Исследователи, внесшие очень большой вклад в изучение биосинтеза белков, перешли к другим проблемам и объектам. У некоторой части биологов и химиков создалась иллюзия, что в изучении биосинтеза белков наступило затишье, что эта область стала чуть ли не «старомодной». Подобное состояние вещей не должно оставлять равнодушными специалистов в области молекулярной биологии, поскольку знание всех тонкостей биосинтеза белков, возможно, и есть ключ к пониманию загадки жизни.

И. МАДОЯН

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР»

С 19 по 24 июня 1989 г. в Москве проводился симпозиум «Молекулярная организация биологических структур», собравший свыше 500 исследователей в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии из 20 стран мира. Мероприятие подобного рода проводилось впервые за последнее десятилетие, организаторами его были Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха и Московский университет. Председателем оргкомитета являлся проф. Б. Ф. Поглазов. Общее число пленарных и стендовых докладов превысило 350. На симпозиуме одновременно действовало 8 секций: «Перенос энергии через мембраны» (председатели — А. А. Красновский, В. П. Скулачев и Д. Н. Осгровский); «Бактериофаги» (Б. Ф. Поглазов и А. Н. Туркин); «РНК-вирусы» (В. И. Агол и Д. Т. Атабеков); «Мульти-субъединичные ферменты и ферментные комплексы» (Н. Б. Ливанова и Б. И. Курсаев); «Клеточная подвижность» (В. И. Гельфанд); «Сократимость мышц» (Д. И. Левинский и Н. В. Гусев); «Биосинтез белков» (А. С. Спирин и Л. П. Овчинников) и «Нуклео-протеины» (А. Д. Мирзабеков и М. Д. Фрайк-Каменецкий).

Симпозиум открылся лекцией всемирно известного ученого Р. Mitchell «Протоны F_0-F_1 АТР-азы, как они действуют», в которой он представил историческую перспективу развития предложенной им еще в 1961 г. химико-биологической теории окислительного фосфорилирования. Им была приведена схема, согласно которой протонный насос выкачивает протоны из

матрикса через мембрану митохондрий. Mitchell привел данные, свидетельствующие о наличии гребусмой стехиометрии процесса: на каждые два протона, прошедшие через мембрану, синтезируется одна молекула АТФ. По Mitchell, митохондриальная система состоит из ряда полипептидных цепей. Главным компонентом является так называемая F_1 -АТРаза с молекулярным весом 360 000 (п. β), у которой остальные три δ-субъединицы встроены в мембрану и обеспечивают присоединение к ней АТРазы. Истинным каналом, через который протоны проникают через мембрану, служит, по-видимому, протеолипад, присоединенный к другому фактору, F_0 . На нем имеются участки, взаимодействующие с ингибиторами переноса энергии.

С пленарными докладами по секции нуклеопротеинов выступали А. Travers (Конформация ДНК и структура хроматина), Е. Di Mauro и соавт. (Зависимые от топологии ДНК-белковые взаимодействия), А. Д. Мирзабеков (Динамика активности хроматина), R. Kahmann и др. (Механизм сайт-специфичной рекомбинации в фаге MU) J. O. Thomas (Взаимодействия гистон-ДНК и структуре и сверхструктуре хроматина), A. Sentenac (Полимеразы РНК и факторы транскрипции), С. М. Миркин и соавт. (Протонированные структуры ДНК), J. L. Hamlin и др. (Анализ хромосомных репликаций в амплифицированном демеле дигидрофолатредуктазы в клетках CHO), Р. Н. Саганик и др. (Молекулярная организация хлоропластов и митохондрий растений регуляция транскрипции).

Секция по мультиферментным комплексам и мультисубъединичным ферментам привлекла внимание специалистов, занимающихся каскадными механизмами усиления и распространения гормональных сигналов в клетке, мультиферментными системами, участвующими в синтезе и деградации углеводов. В числе докладчиков здесь были Л. М. С. Heilmeyer (Младший), D. J. Graves, T. Keleti, Б. И. Курганов и В. А. Ткачук, а также ряд других известных специалистов. В докладе «Молекулярные основы интеграции сигнала киназой фосфоорилазы» Heilmeyer остановился подробно на двух путях передачи внеклеточного сигнала на киназу фосфоорилазы—посредством взаимодействия адреналина с рецепторами на клеточной поверхности и вызванной ацетилхолином деполяризации. Вторыми посредниками в передаче этих сигналов являются cAMP и Ca^{2+} , вызывающие переход указанного фермента в активную форму. С помощью клонирования cДНК выявлена первичная структура α - и β -субъединиц киназы, идентифицированы домены, по которым происходит присоединение кальмодулина. Graves осуществил экспрессию cДНК каталитической γ -субъединицы этой киназы на бактериальном объекте. Изучалось взаимодействие этой субъединицы с кальмодулином и участие специфической фосфопротенилфосфатазы—кальцинейрина—в дефосфорилировании комплекса киназы фосфоорилазы. В докладе Курганова и Любарева получила развитие идея о метаболитах как комплексах последовательно действующих метаболических ферментов. С помощью компьютерного моделирования сконструирована гипотетиче-

ская структура метаболита цикла трикарбоновых кислот. Сходным проблемам было посвящено выступление академика АН ВНР Keleti: «Роль фермент-ферментных взаимоотношений в контроле над метаболизмом». Он сообщил о существующих экспериментальных данных, свидетельствующих о наличии ансамблей ферментов, осуществляющих сопряженные и (или) «тоннельные» реакции, приводящих к переработке внешнего субстрата в конечный продукт метаболизма. Осуществлены расчеты катализа как для ферментов, подчиненных кинетике Михаэлиса-Ментен, так и для аллостерических ферментов, соответствующих моделям Моно-Шанже или Кошланда-Немети-Филмера. Ткачук и соотр. представили данные об участии гуаниннуклеотид-связывающих регуляторных белков в процессах гормональной регуляции в клетках млекопитающих.

В секции, относящейся к структуре рибосом и регуляции инициации, приводились новые факты, касающиеся трехмерной структуры и картирования рибосомальной РНК (J. A. Lake и др.), взаимодействия между фактором элонгации и рибосомами (W. Möller и др.), свойств бактериальных синтетаз аминокислот-РНК (R. Lehmann и др.), механизма трансляционного контроля экспрессии генов у *E. coli*, влияния фосфорилирования факторов инициации на скорость синтеза белка (J. W. B. Hershey и др.; G. Kramer и др.), управления трансляцией путем фосфорилирования фактора элонгации I (S. Ejiri и др.) и т. д.

По секции «Сокращение мышц» привлекли внимание доклады М. F. Morales» (Природа и передача со-

кратительной силы в актомиозине»), Р. Schepp и др. («Макромолекулярный ансамбль и каталитическая функция иозина»), Т. П. Сеене («Гормональная регуляция скорости обновления сократительных белков скелетных мышц»). Интересные сообщения были представлены также по секциям «Бактериофаги», «РНК-вирусы» и «Клеточная подвижность». В последней секции развернулась оживленная дискуссия о роли микротрубочек в структурной организации клеток и их взаимосвязь с циснами, транслокации этих образований, вызванной кинезином (H. Gibbons, J. K. McIntosh, В. Н. Гельфанд, R. D. Vale). Это направление можно охарактеризовать как молекулярную анамнию внутриклеточных контактов.

В работе симпозиума заметное участие приняла группа ученых из Института биохимии АН АрмССР и Института кардиологии МЗ АрмССР. По секции «Мультифункциональные ферменты» был с интересом заслушан доклад А. А. Галаяна, Н. П. Шаровой, Б. Я. Гурвич. «Фосфодиэстераза циклических нуклеотидов и 5'-нуклеотидаза сопряженная система функционально связанных ферментов». Авторами показано, что обе ферментативные активности не разделяются при использовании различных способов очистки белков. Сочетание обеих активностей значительно ускоряет последовательность протекающих реакций $\text{cAMP} \rightarrow 5'\text{-AMP} \rightarrow \text{аденозин}$. Вопрос о мультиферментной системе или о одном бифункциональном ферменте остается пока дискуссионным (Г. К. Парсаланян и Д. П.

Тер-Татевсян представили данные о существовании множественных форм фосфопротеинфосфатаз мозга и белковых регуляторов их активности. Эти ферменты оказались подконтрольными вторичным посредникам (cAMP) и N -ацетиласпарату. Оживленную дискуссию вызвала предложенная Г. А. Геворкяном концепция о регулярности молекулярных соотношений генетической кодируемых аминокислот, изложенная им в докладе «Техника и дискуссия круглого стола». В зависимости от суммарного числа электронов, природные аминокислоты он распределил по спирали Архимеда, и они образуют функциональные группы. Соответствующие этим аминокислотам кодоны образуют фундаментальные противостоющие в структуре дуплицированной ДНК. Два сообщения были представлены в рамках секции в области молекулярной кардиологии. В докладе М. А. Кайфаджян, С. С. Оганесяна и А. Т. Оганесяна приведены новые данные о молекулярной гетерогенности и ионной регуляции контрактильного аппарата в различных участках сердца. Б. А. Тигунца и соавт. обсудили с участниками симпозиума результаты структурных характеристик двух функционально неэквивалентных состояний актомиозинового комплекса.

Значение симпозиума определяется не только его информативностью, но и возможностью возникновения и укрепления неформальных контактов между специалистами из разных стран, дальнейшей кооперации их научной деятельности.

VI ВСЕСОЮЗНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО СПЕКТРОСКОПИИ БИОПОЛИМЕРОВ

В Харькове 11—14 октября 1988 г. состоялась VI Всесоюзная конференция по спектроскопии биополимеров. Организаторами ее были Научный совет АН СССР по проблемам биологической физики, Академия наук УССР, Институт радиофизики и электроники АН УССР и физико-технический Институт низких температур АН УССР. В работе конференции активное участие принимали и ученые Армении: представители кафедр биофизики и молекулярной физики ЕрГУ, Кироваканского педагогического Института, Института экспериментальной биологии АН АрмССР. Область их интересов — теоретические и экспериментальные исследования структурных особенностей нуклеиновых кислот и их взаимодействия с различными лигандами. Часть работ была выполнена ими в сотрудничестве с коллегами из Москвы и Харькова.

Доклады были представлены по следующим темам: спектроскопическое исследование нуклеиновых кислот и их компонентов; спектроскопические подходы к изучению структуры белков; спектральные проявления внутримолекулярных движений в белках; спектроскопические исследования комплексов нуклеиновых кислот с ионами и красителями; температурные и фотондуцируемые конформационные изменения глобулярных и мембранных белков; спектроскопические исследования комплексов нуклеиновых кислот с антибиотиками и белками; спектральные проявления гидратации биополимеров; новые методические подходы в спектро-

скопии биополимеров; прикладные проблемы спектроскопии биообъектов.

В работах, посвященных спектроскопическим исследованиям нуклеиновых кислот и их компонентов, широко использовалось весьма информативное сочетание теоретических и экспериментальных подходов, устанавливающих связь между физическими характеристиками и структурой молекул (Любченко Ю. Л. с соавт., Москва; Благой Ю. П. с соавт., Харьков и др.). Методами инфракрасной ультрафиолетовой спектроскопии, комбинационного рассеяния, кругового дихроизма и люминесценции изучались межмолекулярные взаимодействия оснований нуклеиновых кислот, их гидратация и самоассоциация, процессы протонирования и таутомерные равновесия. Особый интерес представляло исследование производных нуклеиновых кислот, обладающих высокой биологической активностью: антиметаболитов, мутагенов, в частности, противоопухолевого препарата 6-тиогуанина. Ряд докладов был посвящен свойствам комплексов различных лигандов (антибиотиков, противоопухолевых и иных красителей) с нуклеиновыми кислотами. (Пермогоров В. Н. и др., Москва, Веселков А. Н. и др., Севастополь, Бабаян Ю. С. и др., Ереван, Фиреман Э. В. и др., Ленинград, Бакулев В. М., Ленинград, Умская В. Н. и др., Ленинград).

Излагались результаты исследования гетеромолекулярных взаимодействий нуклеиновых кислот и их компонентов с антибиотиками, синтетическими олигопептидами, ги-

стонами и другими белками. Большое внимание уделялось связыванию с нуклеиновыми кислотами антибиотиков и противоопухолевых соединений (антрациклинов, мито-ксантрона, карминомицина, дауномицина), поскольку именно нуклеиновые кислоты являются важнейшей мишенью их действия. Комплексообразование, в зависимости от количества молекул лиганда, приходящегося на пару нуклеотидов, может происходить по типам интеркаляционного или внешнего электростатического взаимодействия. Эти типы связывания можно различать по спектрам флуоресценции и поглощения. Методами флуоресцентной спектроскопии и кругового дихроизма были изучены структурные переходы в олигомерах гистонов, нуклеосомах и хроматине (Рамм Е. И. с соавт., Ленинград, Сиволоб А. В., Драган А. И., Остапец Н. Н., Киев). Экспериментально и теоретически изучались особенности взаимодействия одно- и двухвалентных ионов с ДНК при разных соотношениях Me^{2+} . Отмечалось значительное многообразие взаимодействий в системе $Me-H_2O$ -ДНК (Брегадзе В. Г. и др., Тбилиси, Сорокин В. А. и др., Харьков, Казарян Р. И. и др., Пушкино, Касьяненко Н. А., Ленинград, Корнилова С. В. и др., Харьков, Ереван).

Обсуждались спектроскопические подходы к изучению структуры белков. Широко дискутировался вопрос относительного вклада в энергетический баланс сил, обеспечивающих стабильность белков, таких, как водородные связи, ван-дер-ваальсовы, электростатические, гидрофобные взаимодействия и связи со структурой воды. При экспери-

ментальном изучении использовалось то обстоятельство, что степень чувствительности различных спектроскопических методов к разным уровням структурной организации белковых молекул различна.

К примеру, метод собственной триптофановой (или тирозиновой) белковой флуоресценции дает информацию о локальном микроокружении флуоресцирующих хромофоров белка. В сочетании с дифференциальной сканирующей микрокалориметрией, позволяющей получать интегральные характеристики белка как целостной системы, в ряде работ рассматривались взаимодействия белков с катионами, различными лигандами, взаимодействия субъединиц в белковом комплексе.

Кальнин Н. Н., Веньяминцов С. Ю. (Пушкино), Шаронов Ю. А. с соавт. (Москва) Болотина И. А., Морозов Н. Ю., Чехов В. О. (Москва) показали, что возможность таких достаточна давно используемых методов, как 1H -ЯМР-спектроскопия ИКС, КД, магнитный круговой дихроизм, еще далеко не исчерпаны.

Наряду с традиционными методами применялись новые, такие, как метод двухквантовой аффинной модификации (Бенимецкая Л. З. с соавт., Новосибирск) и лазерной корреляционной спектроскопии (Бабенко А. Ю. с соавт., Гатчина).

Были изложены результаты исследования температурных и фотоиндуцированных конформационных изменений глобулярных и мембранных белков. Во многих работах предпринимались попытки найти однозначное соответствие между конформационными изменениями в белках и их функциональной активностью (Соколов К. В. с соавт.,

Москва, Мажуль В. М. с соавт., Минск и др.).

В работе Жуковского А. П. с соавт. (Ленинград) показано, что при вариации температуры в диапазоне 10—50° конформация белка сохраняется, однако происходят локальные структурные изменения, имеющие отношение к функционированию белков. Предполагается, что тем самым обеспечивается способность белков к самоподдержанию устойчивой, функционально активной пространственной организации.

В докладах по спектральным проявлениям внутримолекулярной подвижности были представлены работы по влиянию гидратации, температуры, мутационных замен аминокислот на внутримолекулярную динамику глобулярных белков в растворах и кристаллах. При этом использовались методы ЯМР, ИК-спектроскопии, дейтерообмена, флуоресцентной спектроскопии с пикосекундным временным разрешением, рэлеевское рассеяние мессбауэровского излучения, РРМИ (Крупянский Ю. Ф. с соавт., Москва, Журавлева Т. В. с соавт., Москва, Лебедев Ю. О., Абатуров Л. В., Москва). Для детального анализа динамического поведения молекул разработан новый метод обработки мессбауэровских спектров—метод мессбауэровской фурье—спектроскопии (Шайтан К. В. с соавт., Москва). В качестве объекта при исследовании быстрых (10^{-8} — 10^{-11} с) изменений структуры белков часто выбирается миоглобин кашалота, пространственная структура которого хорошо известна (Арбух Р. И. с соавт., Пуццано).

Имеется иерархия амплитуд и времен релаксаций. Показано, что из движений трех типов локально-

го, сегментального и вращения молекул как целого—главным является вклад сегментального движения (Киваева Л. С. с соавт., Пуццано, Казань).

Формирование устойчивой конформации биополимеров возможно лишь в водном окружении, поэтому много внимания уделяется экспериментальному и теоретическому изучению особенностей гидратации биополимеров (Малеев В. Я. с соавт., Гасан А. И., Бельбух Т. В., Перский Е. Э., Веревицын А. Г., Харьков, Абатуров Л. В., Москва, Теллухин А. В., Полтов В. И., Пуццано, Юхневич Г. В., Москва). Во многих работах подчеркивалась связь между характеристиками гидратного окружения и функциональным состоянием биополимеров. В ряде работ изучена гидратация белков и нуклеиновых кислот в присутствии глицерина, широко используемого в криобиологии и криомедицине (Валков В. В., Харьков, Зинченко В. Д., Харьков).

В последние годы предпринимаются попытки перейти от исследования физико-химических свойств изолированных молекул и их комплексов к изучению свойств тех же молекул в тканях, к структуре и свойствам функционирующих молекул. Ограниченность физических методов исследования преодолевается изучением одних и тех же молекул в растворе и клетках, сочетанием различных методов исследования одних и тех же объектов, как можно меньше влияющих на исследуемые свойства молекул.

В последние годы возрос интерес к спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^3P , ^{31}P , ^{39}K , ^{59}Co , что обусловлено возросшей информативностью в связи с применением специальных импульсных

последовательностей, позволяющих идентифицировать в спектре сигналы низкомолекулярных соединений.

Были изложены и некоторые теоретические подходы, например, помогающие существенно повысить точность разложения сложного спектра на полосы отдельных электронных переходов и значительно облегчить сопоставление экспериментальных данных с теорией (Морозов Ю. В., Москва). Впервые осуществлена и исследована адресованная лазерная модификация (расщепление в заданном месте) молекул нуклеиновых кислот, применяемая для направленного изменения их структуры (Штокман М. И., Новосибирск). Эти нелинейно-оптические эффекты использова-

лись и для определения положения активного центра фермента (в фермент-субстратном комплексе).

На последнем заседании были представлены доклады, касающиеся прикладных проблем спектроскопии биополимеров. Обсуждалось применение спектроскопии для диагностических целей, при изучении химиотерапевтических препаратов и т. д.

В заключение участники конференции отметили высокую информативность спектроскопических подходов, значительность полученных результатов, разнообразие применяемых методов, а также хорошую организацию конференции.

А. Г. ГАБРИЕЛЯН