

ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Ք Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

Զախարյան Ռ. Ա. ԳնԹ-ի միջնեկներումային ֆրագմենտացիան մարդու սպիտակուցային լիմֆոցիտներում՝ ինդուցված ինտերֆերոն-β-ով և նրկապիրազային ՌՆԹ-ով	3
Զախարյան Ռ. Ա. Hela բջիջներ, մարդու ֆիբրոբլաստների վերջնական տարրերական և Ca ²⁺ -նրկապիրազային ՌՆԹ պրոլիֆերացիայի պրոցեսների կարգավորումը Մանուկյան Ն. Կ., Նուսնյան Լ. Բ., Փակավազյան Զ. Գ. Բույրաբային շնչառական կենտրոնի էներգետիկ ռեակցիաների միկրոէլեկտրաֆիզիոլոգիական ուսումնասիրումը Թալաթյան Կ. Ս. Բաբայան Կ. Ս., Բաբայան Լ. Կ., Բաբայան Լ. Կ., Մարգարյան Ն. Ռ., Զախարյան Ռ. Ա., Հակոբյան Ժ. Ի., Կարազյոզյան Կ. Գ. Վերջային պրոցեսի ընթացքի կադմարումական բնութագրումը նրկապիրազային ՌՆԹ լուծույթում ցածր հաճախականության ուլտրաձայնի ազդեցության տակ	9 17
Նուրանյան Ն. Ի., Զարաֆյան Ի. Մ., Համբարձումյան Ն. Ս. Ֆոսֆատազների ինհիբիտորների ազդեցությունը E. coli տարրեր շտամերի աճի վրա	22
Աղամյան Ն. Ի., Սահակյան Ա. Կ., Միհայան Ս. Մ., Մանուկյան Ն. Կ. Կնզկի շարժիչ գոտու ազդեցությունը Դեյտերսի անդամատակային կողմից էներգետիկ ափսոսանքային ժամանակահատվածի ազդեցության պայմաններում	26
Կարապետյան Ռ. Ի., Հովհաննիսյան Ա. Ի., Հակոբյան Ն. Ն. Կատապալին Դ-ն առնետների որակից. մարդու, որոշ նատուրալներ և ազդեցությունը ալտերացիայի և տրոպոմիդների վրա	30
Մարգարյան Վ. Ա. Միախոտի տրանսգրենսիվ փոփոխականությունը	34

ՀԱՄԱՌՈՑ ՀԱՎՈՐՈՒՄՆԵՐ

Պողոսյան Կ. Զ., Զախարյան Ա. Ե., Մալիկյան Ա. Ռ., Փանոսյան Կ. Զ. 17 Բ. էստրադիոլի ազդեցությունը առնետների լյարդի միջուկային Բադանթների ինքնաբերական ընթացիկ էներգետիկայի վրա	45
Զախարյան Ա. Կ., Պողոսյան Կ. Զ., Փանոսյան Կ. Զ. էստրադիոլի և հիդրոկորտիզոնի ազդեցությունը առնետների միջուկային Բադանթների լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացման վրա	47
Հովհաննիսյան Ռ. Ս., Սարգսյան Ս. Վ., Սահակյան Կ. Լ., Հանանյան Ա. Ս. ԱՏՖ-ի, Եստրադիոլի կենտրոնացումը և դանդաղեցված ֆուոտրենցինցիայի մեծությունը որպես հիդրոէկենոմակարգների պահպանության համակցության ֆունկցիոնալ ցուցանիշներ	50

ՏԵՄԱԹԵՄԱՆ ԵՎ ՐԱՆԱՎՆՈՒ

Մաղոյան Ի. Ա. Ֆերմենտային համակարգերի ադապտացիայի մեխանիզմների ուսումնասիրության ստրատեգիկ մոտեցումներ	54
Խալիլյան Կ. Վ. Միտոքոնդրիոնների և ընդհանրապես ներքինի տրանսֆորմացիայի լուծումը	60

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Захарян Р. А. Межнуклеосомальная фрагментация ДНК в лейкомиических лимфоцитах человека, индуцированная интерфероном-β и деРНК	3
Захарян Р. А. Регуляция Ca ²⁺ -деРНК процессом пролиферации и термической дифференцировки фибробластов человека, клеток Hela	9
Манукян Н. К., Нерсисян Л. Կ., Бахладжян Գ. Г. Микроэлектронфизиологическое исследование реакций нейронов области бульбарного дыхательного центра на раздражение переднего вентрального ядра талามуса	17
Галстян Ст. М., Шарафян А. К., Барсегян А. А., Маргарян Н. Р., Захарян Р. А., Ахоян Ж. Н., Карагезян К. Г. Морфологическая характеристика течения раннего процесса под воздействием низкочастотного ультразвука в растворе деРНК	22
Налбандян Н. Г., Зарафян Н. М., Амбарцумян Н. С. Влияние ингибиторов фосфатазы на скорость роста различных культур E. coli	26
Адамьян Ц. И., Саакян С. Г., Минасян С. М., Манукян Н. К. Влияние раздражения моторной зоны коры на активность нейронов вестибулярного ядра Дейтерса до и после воздействия вибрации	30

<i>Карапетян Р. Г., Оганисян А. Н., Акопян Т. Н.</i> Катепсин Д из сердца крыс	34
Очистка, некоторые свойства и действие из актомиозин и тропомиозин	
<i>Маркарян В. А.</i> Трансгрессивная изменчивость у табака	38

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Погосян Г. А., Закарян А. Е., Цагикян А. Р., Паносян Г. А.</i> Влияние 17 β -эстрадиола на спонтанную хемилюминесценцию ядерных мембран печени крыс	45
<i>Закарян А. Е., Погосян Г. А., Паносян Г. А.</i> Влияние эстрадиола и гидрокортизона на перекисное окисление липидов ядерных мембран печени крыс	47
<i>Оганисян Р. О., Саркисян С. А., Саакян Д. Л., Унианян А. С.</i> Концентрация АТФ, хлорофилла «а» и величина замедленной флуоресценции как функциональные показатели планктонного сообщества гидроекосистем	50

ОБОЗРЫ И ДИСКУССИИ

<i>Мадоян И. А.</i> Стратегические подходы к изучению механизмов адаптации ферментных систем	54
<i>Давидян Д. В.</i> Природа энергетической трансформации митохондрий и хлоропластов	60

CONTENTS

<i>Zakharian R. A.</i> Internucleosomal digestion of DNA in man's leucemic lymphoblasts induced by Interferon- β and dsRNA	3
<i>Zakharian R. A.</i> Regulation of Ca ²⁺ -dsRNA proliferation processes and terminal differentiation of human fibroblasts, HeLa cells	9
<i>Manoukian N. K., Nersesian L. B., Baklavajian H. G.</i> Microelectrophysiological investigation of neuron reactions of bulbar respiratory centre region upon the irritation of thalamus front ventral nucleus	17
<i>Galstian St. M., Sharafian A. K., Euseghlian A. A., Margarian N. R., Zakharian R. A., Hacopian Zh. I., Kuragyozyan K. G.</i> The morphological characteristic of wound process course under the influence of low-frequency supersound in dsRNA solution	22
<i>Nalbandian N. G., Zarafian I. M., Hambartsumtun N. S.</i> The influence of phosphatase inhibitors upon the growth speed of <i>E. coli</i> different cultures	26
<i>Adamian Ts. N., Sahakian S. G., Minasian I. M., Manoukian N. K.</i> The influence of motor area cortex irritation upon neuron activity of Noylars vestibular nuclei before and after the vibration influence	30
<i>Karapetian R. G., Hovhannissian A. I., Hacopian T. N.</i> Cathepsin D from rat heart: cleaning, some characteristic and effect on actomyozin and tropomyozin	34
<i>Margarian V. A.</i> Transgressive variability in tobacco	38

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Poghossian G. H., Zakarian A. E., Tsaghikyan A. R., Panosian G. H.</i> The influence of 17 β -estradiol on spontaneous chemiluminescence of rat liver nuclear membranes	45
<i>Zakarian A. E., Poghossian G. H., Panosian G. H.</i> Estradiol and hydrocortison influence on rat liver membrane lipids' peroxidative oxidation	47
<i>Hovhannissian R. O., Sargsian S. A., Sahakian D. L., Hunanian A. S.</i> Concentration of ATP, «a» chlorophyll and the size of decelerating fluorescence as functional indicators of hydnecosystems' plankton association	50

REVIEWS AND DISCUSSIONS

<i>Madoyan I. A.</i> The strategic approach studies of ferment systems adaptation mechanism	54
<i>Davudian V. D.</i> Nature of energetical transformations of mitochondria and chloroplasts	60

МЕЖНУКЛЕОСОМАЛЬНАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК В ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ ЛИМФОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННАЯ ИНТЕРФЕРОНОМ- β И ДС-РНК

Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии Армении, Ереван

Сочетанное воздействие интерферона- β и поли (ИП) приводит к гибели лейкемических лимфобластов человека, повышая в последних концентрацию цитозольного свободного Ca^{2+} за счет входа внеклеточного Ca^{2+} , активируя фосфолипазу A_2 и Ca^{2+} -зависимую эндонуклеазу, фрагментирующую ДНК хроматина по межнуклеосомальным участкам на фоне истощения клеток АТФ и НАД⁺. Активация эндонуклеазы наступает в результате транслокации цитозольного Ca^{2+} в ядра лимфобластов с участием кальмодулина.

Բնութֆերոն β -ի և պոլի (ИП)-ի համակցված փոխազդեցությունը առաջ է բերում լիզինիկ լիմֆոբլաստների կործանում, մեծացնելով վերջինիս մեջ ցիտոզոլային ազատ Ca^{2+} կոնցենտրացիան ի հաշիվ ոչ բջջային Ca^{2+} -ի մուտքի, ակտիվացնում է ֆոսֆոլիպազա A_2 -ին և Ca^{2+} -փոխկապակցված էնդոնուկլեոմալային մասնատում են ցրտատինային ԴՆԹ-ին միջնուկլեոսոմային համակցաների՝ ԱՆՑ-ի և ՆԱԴ⁺-ի քլիզների քայքայման ֆոնի վրա:

Էնդոնուկլեազի ակտիվացումը պայմանավորված է այն մասնակի, երբ կալմոդուլինի մասնակցությամբ լիմֆոբլաստների կործանում տեղի է ունենում ցիտոզոլային Ca^{2+} -ի տրանսլոկացիայի:

Combined effect of Interferon- β and poly (I. C) causes the destruction of leucemic lymphoblasts, increasing the concentration of cytosole free Ca^{2+} resulting from the uptake of extracellular Ca^{2+} , activating phospholipase A_2 and Ca^{2+} -dependent endonuclease that fragmentates DNA of chromatin to internucleosomal sections on the background of ATP and NAD exhaustion. Activation of endonuclease results from the translocation of cytosole Ca^{2+} into the lymphoblasts nuclei in the presence of calmodulin.

Интерферон-индуцируемая РНК-лейкемические лимфобласты-фрагментация ДНК

Феномен одновременной дезинтеграции лимфоцитов, вызванной адренокортикальной стимуляцией и выбросом в кровь глюкокортикоидных гормонов, и стимуляции новообразования зрелых форм лейкоцитов широко представлен в лимфонной ткани.

Впервые нами [1, 2], а затем и другими авторами [16, 17] было показано, что летальное воздействие глюкокортикоидов на чувствительные к ним клетки лимфонной ткани *in vitro* и *in vivo* опосредо-

вано активацией Са/Mg-зависимой эндонуклеазы, осуществляющей накапливаемую [7] межнуклеосомальную фрагментацию ДНК. Описанное явление получило название «запрограммированной гибели» клетки [17]. Впоследствии было показано, что цитотоксические Т-лимфоциты, киллерные клетки, диоксины убивают незрелые тимоциты, также активируя в последних процесс межнуклеосомальной фрагментации ДНК ядер [10, 18].

В данном сообщении впервые показано, что сочетание воздействия интерфероном- β и поли (И:Ц) приводит к гибели лейкоэмических лимфобластов человека, повышая в последних концентрацию цитозольного свободного Ca^{2+} за счет входа внеклеточного Ca^{2+} , активируя фосфолипазу A_2 и Са-зависимую эндонуклеазу, фрагментирующую ДНК хроматина по межнуклеосомальным участкам на фоне истощения клеток АТФ и НАД $^{+}$. Активация эндонуклеазы наступает в результате транслокации цитозольного Ca^{2+} в ядро лимфобластов с участием кальмодулина.

Материал и методика. Лейкемические лимфобласты были изолированы из гепаринизированной периферической крови больных в острой стадии лимфобластической лейкемии в градиенте Ficoll-Hypaque [3]. 50×10^6 клеток лимфобластов культивировали в питательной среде ДЕМЕ, содержащей 10% сыворотки теленка, 2 мМ/л глютамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, в условиях воздействия интерферона- β человека и двуспиральной РНК, поли (И:Ц). Клетки лимфобластов культивировали в течение 16 ч (37°C) в присутствии 150 ед/мл интерферона, после 3-кратной промывки средой ДЕМЕ к ним добавляли 1 мл раствора поли (И:Ц) 10 или 46 мкг/мл, через 1 ч инкубации лимфобласты промывали, инкубировали в ДЕМЕ 14 ч и лизировали [8].

Клетки промывали в PBS (0°), осаждали центрифугированием 300 г при 4° , суспендировали в 1,5 мл буфере с 0,2 М/л трис (pH 8,0); 0,1 М/л ЭДТА; к суспензии добавляли равный объем 0,2 М/л трис (pH 8,0); 0,1 М/л ЭДТА, 2%-ный додецилсульфат натрия протениазу-К, 50 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 8 ч при 37° . ДНК выделяли экстракцией фенолом, затем фенол/хлороформом и хлороформом до получения ясной интерфазы.

Водную фазу диализовали при 4° против 50 мМ/трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl и инкубировали 2 ч при 37° в присутствии 100 мкг/л РНКазы.

Электрофорез образцов ДНК по 10 мк проводили в 1,8%-ном геле агарозы.

ДНК в геле перекрещивали этидиум бромидом в течение 10 мин в 90 мМ/л трис (pH 8,25), 90 мМ/л борной кислоты, 2,5 мМ/л ЭДТА; отмывали гель в том же буфере без этидиум-бромида в течение 30 минут. Содержание Ca^{2+} в цитоплазме лимфобластов определяли с помощью Quin-2 M [12].

Лимфобласты (50×10^6 кл), преинкубированные в течение 16 ч с интерфероном- β в среде RPMI 1640, инкубировали затем с 5 мкМ Quin-2 M 15 мин и далее инкубировали в течение 14 ч с поли (И:Ц). Образцы клеток отбирали по 1 мл, промывали (30 сек, 1500 x g), суспендировали в 2 мл буфера Кребса-Хенселейта (37°) и измеряли содержание Ca^{2+} [12].

Добавление 10 мМ ЭДТА к промытым клеткам не меняло степени интенсивности флуоресценции, что свидетельствовало об удалении всей внеклеточной краски.

Концентрацию НАД $^{+}$ и АТФ в клеточном экстракте определяли по описанной методике [3, 14].

В качестве ингибитора кальмодулина и стимулятора активности протениназы-С (ПКС) соответственно были использованы кальмодазолюм (P 24571, Boehringer Mannheim) и фторбл-12, 13-дибутират («Sigma»).

Количественная оценка степени фрагментации ДНК. Лимфоциты (50×10^6 кл/мл и RPMI-1640), культивируемые в течение 16 ч с интерфероном- β (150 ед/мл), были инкубированы с поли (И:Ц) (10 или 45 мкг/мл); затем с целью лизиса клеток 2 мл образцов смешивали с 3 мл 20 mM ЭДТА, 0,5 тритон X-100, 5 mM трис-HCl (pH 8,0) при 6° и инкубировали в течение 15 мин при 0°. Лизат центрифугировали при 0° $27.000 \times g$ в полученном надосадке и осадке, суспендировали в 10 mM трис-HCl 1 mM ЭДТА (pH 8,0), определяли ДНК по методу, описанному в работе [6]. Об активности фосфолипазы A_2 судили по высвобождению $1\text{-}^{14}C$ -арахидоновой кислоты из предварительно меченных арахидоновой кислотой лимфоцитов.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показана межнуклеосомальная фрагментация ДНК хроматина лейкоцитарных лимфоцитов человека, индуцированная интерфероном- β и поли (И:Ц). Сочетанное



Рис. 1. Межнуклеосомальная фрагментация ДНК хроматина лейкоцитарных лимфоцитов человека. Электрофорез ДНК, изолированной из фрагментов хроматина: Слева направо 1, 2, 5, 6—фрагменты хроматина, изолированные из лейкоцитарных лимфоцитов, обработанных интерфероном- β и поли (И:Ц); 3, 4—контроль, хроматин, обработанный микрококковой нукleaseй.

воздействие интерферона и поли (И:Ц) вызывало фрагментацию ДНК хроматина лимфоцитов во всех изученных образцах крови, полученных от 4 доноров, больных лейкоемией. Интерферон или только поли (И:Ц), каждый в отдельности, в используемых концентрациях не вызывали фрагментации ДНК. Морфологический анализ показал, что индуцированная фрагментация хроматина положительно коррелирует с увеличением в обработанных образцах числа клеток с конденсированным хроматином и числа нежизнеспособных клеток (по окрашиванию нейтральным красным). При этом степень фрагментации ДНК в хроматине находилась в прямой зависимости от количества поступающего внеклеточного Ca^{2+} в лимфоциты (рис. 2, табл. 1).

Одним из возможных последствий увеличения количества поступающего в лимфоциты Ca^{2+} может быть активация Ca^{2+} зависимого фермента фосфолипазы A_2 , роль которой состоит в образовании 1-ацилфосфоглицеридов и свободных ненасыщенных жирных кислот, некоторые из которых, в частности арахидоновая, гамма-линоленовая, эйкозатриеновая кислота, вызывают повреждения ДНК избиратель-

тельно в опухолевых клетках и лизируют их. Согласно полученным данным, ненасыщенные жирные кислоты в опухолевых клетках индуцируют образование свободных радикалов, перекисей, которые в свою очередь подавляют активность Са-АТФазы [15] и вызывают существенное повышение уровня цитозольного Ca^{2+} [13], что, вероятно, может активировать Са-зависимую эндонуклеазу и вызвать фрагментацию ДНК. Как бы то ни было, данные, полученные нами (табл. 2), показывают, что под влиянием интерферона- β и поли (И:Ц) в лимфо-

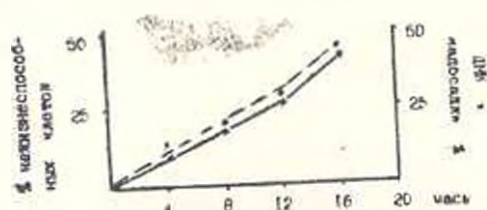


Рис. 2. Степень фрагментации хроматина, выраженная в % ДНК, обнаруживаемой в надосадке ($27.000 \times g$), относительно всей ДНК, по оси ординат — время культивирования лимфобластов в присутствии поли (И:Ц) после предварительного воздействия интерфероном- β в течение 16 часов.

Таблица 1. Содержание Ca^{2+} и степень фрагментации ДНК хроматина лимфобластов, обработанных интерфероном- β и поли (И:Ц)

Обработка клеток	Ca^{2+} в цитоплазме, нМ	ДНК в надосадочной фракции, %
Необработанные лимфобласты	80	5
Инф 150 ед/мл, поли (И:Ц) 10 мкг/мл	240	15
Инф 150 ед/мл, поли (И:Ц) 45 мкг/мл	450	28
Инф 150 ед/мл, поли (И:Ц) 10 мкг/мл ЭГТА 8 мМ	70	2

Таблица 2. Выпоебждение ^{14}C -арахидоновой кислоты из предварительно меченных лимфобластов под влиянием интерферона- β и поли (И:Ц)

Время инкубации лимфобластов с поли (И:Ц), мин после воздействия интерфероном- β в течение 16 часов	^{14}C -арахидоновая кислота, имп/мин
0	125 ± 5
30	540 ± 25
60	660 ± 31
120	810 ± 42

бластах происходит активация фосфолипазы A_2 и высвобождение ненасыщенных жирных кислот, в частности ^{14}C -арахидоновой кислоты, что в свою очередь также может поддерживать биохимические сдвиги, способствующие вхождению в клетки внеклеточного Ca^{2+} , активации Са-зависимой эндонуклеазы и фрагментации ДНК.

Изучение уровня НАД $^+$ и АТФ в лимфобластах после воздействия

кальмидазолнума, и инкубировали 10 мин в присутствии 0,1 мкКи/мл $^{45}\text{Ca}^{2+}$, 1 мМ АТР, 1 мМ НАД⁺ и 300 нМ Ca^{2+} [9].

В аналогичном эксперименте кальмидазолнум был заменен форбол-12,13-дибутиратом (100 нМ). Как видно из табл. 4, как кальмидазолнум так и форбол-12,13-дибутират не подавляют накопление свободного Ca^{2+} в питоцеле лимфобластов, вместе с тем они тормозят включение Ca^{2+} в очищенные ядра лимфобластов и степень фрагментации ДНК.

Полученные данные свидетельствуют, что транслокация Ca^{2+} из цитоплазмы в ядра лимфобластов, индуцированная интерфероном- β и поли (ИЦ), опосредована кальмодулином, Ca^{2+} -связывающая активность которой может быть подавлена ингибитором кальмодулина или активацией в клетке протеинкиназы-С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарян Р. А., Погосян Р. Г. Докл. АН АрмССР, **IXVII**, 2, 110—114, 1978.
2. Захарян Р. А., Эколог. журн. Армении, **38**, 3, 232—239, 1985.
3. Berger H. A., Berger S. J., Sicorski G. W., Catino D. M. Exp. Cell Res., **137**, 79—88, 1982.
4. Berger H. A., Berger S. J., Sudar D. C., Distelhorst C. W. J. Clin. Invest., **79**, 1558—1563, 1987.
5. Berger S. J., Sudar D. C., Berger H. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., **134**, 227—232, 1986.
6. Burton K. Biochem. J., **62**, 315—323, 1956.
7. Compton M. M., Cidlowski J. A. Endocrinology, **118**, 35—45, 1986.
8. Distelhorst C. W., Benutto B. M., Griffith R. C. Blood, **66**, 679—684, 1985.
9. Jones D. P., Mc. Conkey D. J., Nicotera P., Orrentus S. J. Biol. Chem., **264**, 11, 6398—6403, 1989.
10. Mc. Conkey D. J., Hartzell P., Duddy S. K., Hakansson H., Orrentus S. Science, **242**, 256—259, 1988.
11. Mc. Conkey D. J., Nicotera P., Hartzell P., Bellomo G., Wyllie A. H., Orrentus S. Arch. Biochem. Biophys., **269**, 1, 365—370, 1989.
12. Nicotera P., Hartzell P., Baldi C., Svensson S. A., Bellomo G., Orromus S. J. Biol. Chem., **261**, 14628—14635, 1986.
13. Nicoterra P., Hartzell P., Davis G., Orrentus S. FEBS Lett., **209**, 139—144, 1986.
14. Sims J. L., Berger S. J., Berger H. A. Biochemistry, **22**, 5188—5194, 1983.
15. Thor H., Smith M. T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S. A., Orrentus S. J. Biol. Chem., **257**, 12419—12425, 1982.
16. Umansky S. R., Korat B. A., Hellpovitch P. A. Bloch. Biophys. Acta, **655**, 9, 1981.
17. Wyllie A. H. Nature, **284**, 555—556, 1980.
18. Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Currie A. R. Int. Rev. Cytol., **68**, 251, 1980.

Поступило 12 VIII 1990 г.

РЕГУЛЯЦИЯ Ca^{2+} -дсРНК ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, КЛЕТОК HeLa

Р. А. ЗАХАРЯН

Ca^{2+} комплексы дсРНК, поли dA, поли dT, низкомолекулярной РНК дрожжей оказывают достаточно выраженный митогенный эффект на фибробласты человека на ранних стадиях размножения фибробластов в культуре; на более поздних стадиях культивирования клеток Ca^{2+} -дсРНК стимулирует процесс терминальной дифференцировки, индуцируя синтез группы протеинов, характерных для постмитотической популяции фибробластов человека, претерпевших процесс терминальной дифференцировки.

Ca -дсРНК оказывает стимулирующее влияние на транскрипцию генов c-fos и c-jun в фибробластах и HeLa-S-3.

Երկզրթու ԲՆԲ-ի Ca^{2+} -կոմպլեքսները, պոլի dT, պոլի dA, դրոժմերի ցածրմոլեկուլային ԲՆԲ-ն ինդուցիруют են բավական լավ արտահայտված միտոգեն ազդեցություն մարդու ֆիբրոբլաստների վրա և ֆիբրոբլաստային կուլտուրաներում՝ վերջինիս բազմացման վաղ փուլերում: Ավելի ուշ փուլերում Ca^{2+} -էրկզդ. ԲՆԲ-ի բեղինների կուլտիվացիան առաջ է բերում վերջնական տարրերակում՝ պինթեզելով պրոտեինային խմբեր, որոնք հատուկ են մարդու ֆիբրոբլաստների հետմիտոտիկ պոպուլյացիային. դրանք էլ մտնում են վերջնական տարրերակի պրոցեսների մեջ:

Ca complexes of dsRNA, poly dA, poly dT of low molecular RNA of yeast make enough expressed mitogenic effect on human fibroblasts in early stages of fibroblasts proliferation in culture; in later stages of cell cultivation Ca -dsRNA stimulated the process of terminal differentiation inducing the synthesis of a group of proteins characteristic for postmitotic population of human fibroblasts undergoing the terminal differentiation process.

Ca -dsRNA caused a stimulating effect of c-fos and c-jun gene transcription in fibroblasts and HeLa-S-3.

Фибробласты человека—клетки HeLa— Ca^{2+} -дсРНК.

Антипролиферативный эффект двуспиральной РНК поли(И·Ц), обнаруженный на целом ряде клеточных линий, обусловлен прежде всего активацией системы 2'-5'-олиго-А-РНКазы-1 и дсРНК зависимой протеинкиназы. Он проявляется в достаточно выраженной форме и в условиях отсутствия интерферона на клетках карциномы легкого, HeLa, фибросаркомы. Вместе с тем, как недавно было показано, поли(И·Ц) способен индуцировать митогенный эффект в фибробластах ВА1 В-3Г3 в противоположность антипролиферативному воздействию интерферона, аналогично фактору роста из тромбоцитов [24]. Более того, пролиферативный, митогенный эффект поли(И·Ц) на клетках фибробластов усиливается в присутствии антител к интерферону-В [19]. Последнее обстоятельство свидетельствует в пользу того предположения, что в клетках одних тканей отсутствие интерферона не

препятствует проявлению антипролиферативного эффекта дсРНК, в других — исключение воздействия интерферона способствует потемнению пролиферативного эффекта. Ранее нами [1—5], а затем и другими авторами [11, 12, 20, 22] было показано, что ренессанс нуклеиновых кислот, в том числе и двуспиральных РНК, на плазматической мембране клеток млекопитающих носит высокоспецифический характер и обусловлен взаимодействием различных типов полинуклеотидов с различными рецепторами, молекулами-протеинами на поверхности мембраны клетки.

Одновременно нами было показано [6], что интерферон-индуцирующая активность дсРНК в комплексе с Ca^{2+} возрастает в 4—5 раз, дсРНК в комплексе с Ca^{2+} отличается от натриевой соли дсРНК более высокой антивирусной активностью, что позднее было подтверждено [7].

В настоящем сообщении представлены результаты изучения влияния Ca^{2+} -комплексов различных типов полинуклеотидов-дсРНК, РНК из дрожжей, поли dA, поли dT — на процессы пролиферации и дифференцировки фибробластов кожи человека, влияние Са-дсРНК на транскрипцию протоонкогенов *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* в фибробластах и клетках HeLa-S-3.

Материал и методика. Фибробласты человека получены из биопсийного операционного материала кожи, которую обрабатывали описанным методом [15]. Кожу разрезали на фрагменты 1 см³, переносили в чашки Петри, заливали средой Игла в модификации Дулбекко, содержащей 20% сыворотки теленка, 500 ед/мл пенициллина, 700 ед/мл стрептомицина и инкубировали при 37° в атмосфере 95%-ного воздуха и 5%-ного CO_2 . Питательную среду меняли ежедневно. Через 3 недели первичную культуру фибробластов обрабатывали 0,05%-ным трипсином и 0,1%-ным ЭДТА [8] и субкультивировали при еженедельном переносе в постве-е с плотностью 10^5 клеток на чашку Петри. В экспериментах использовали мезотетские активно (до 15 недель) культивируемые фибробласты и постмитотические фибробласты, находящиеся в условиях стационарного роста в культуре в течение 6 недель. При изучении влияния полинуклеотидов на процессы пролиферации фибробласты культивировали в среде ДМЕМ + 7% сыворотки теленка.

Клетки HeLa-S-3 выращивали в среде Игла, содержащей 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 1% глутамин (200 мМ) и 15% сыворотки теленка. Использовали клетки HeLa в логарифмической фазе роста, синхронизированные в поздней G1 и ранней S фазе. Синтез ДНК в культуре HeLa и фибробластов определяли по включению [³H]-тимидина в ТХУ-осаждаемый материал клетки. 5×10^5 клеток инкубировали с [³H]-тимидином (1 мкКю/мл) в течение 5 часов. Затем клетки промывали физиологическим буфером и лизировали в течение 1 часа, 40° буфером, содержащим 1% SDS, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-НСl (pH 7,5), 80 мкг/мл протеиназы; к лизату добавляли 100 мкг ДНК и смесь осаждали равным объемом 20%-ной ТХУ при 4°. Осадок, после осаждения, промывали 10%-ной ТХУ при 4° и просчитывали в сцинтилляционном радиочетчике SI-30 (Франция).

Для изучения влияния Са-дсРНК на экспрессию генов *c-fos*, *c-jun* и *c-myc* в клетках HeLa клетки культивировали до полного монослеса, затем их инкубировали с полинуклеотидами и добавляли 2-аминопурины в концентрации 10 мМ.

Для анализа м-РНК к концу периода инкубации клеток с Ca^{2+} -дсРНК, Са-РНК из дрожжей фибробласты промывали изотоническим раствором NaCl и тотальную РНК выделяли гуанидин-изотиоцианат CsCl методом; м-РНК анализировали по Нортерну [9]; в качестве зонда для м-РНК *c-fos* использовали плазмиду pc-fos-3 [13]; для идентификации м-РНК *c-myc* использовали экзон-1 гена *c-myc* (Amersham).

м-РНК с-jun: идентифицировали [18]; для идентификации м-РНК рецептора эпидермального фактора роста использовали 3'-ClA1 фрагмент м-ДНК гена РЭФР [21]. Проба-зонды были мечены [^{32}P]-СТР (300 Кю/ммоль; «Amersham») методом ин-трансляции.

Включение [^{35}S]-метионина в белки. Фибробласты культивировали в [^{35}S]-метионин α с 1200, 400 Кю/ммоль) 18 ч и после лизиса гомогенат (около 10^5 нм/мин) анализировали в дуверном электрофорезе в полиакриламидном геле [16].

Фибробласты человека обрабатывали 10 мкг/мл дсРНК в течение 18 часов.

В экспериментах использовали Са-дсРНК с мол. массой $1,5 \times 10^5$ Дальтон из *Sacharomycetes cerevisiae*, тотальную низкомолекулярную Са-РНК из дрожжей («Calbiochem»); Са $^{2+}$ -полидезоксиденин (поли-dA), Са-полидезокситидин (поли-dT) фирмы «Miles», Са $^{2+}$ -соль полинуклеотидов получали растворением полинуклеотидов в среде, содержащей 50 мМ СаCl $_2$.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, 10 мкг/мл Са-дсРНК через 4 ч после воздействия стимулировала включение метил-[^3H]-тимидина в ДНК митотически активных фибробластов человека (5 недель субкультивирования) на 30%. Аналогичным эффектом обладала Са-РНК из дрожжей. Вместе с тем, поли-dT и поли-dA (по 5 мкг/мл) обладали более выраженным эффектом стимуляции включения тимидина в ДНК, соответственно на 100 и 50%.

Влияние полинуклеотидов на включение [^3H]-тимидина в ДНК фибробластов человека и клеток HeLa

Полинуклеотиды	Фибробласты		Клетки HeLa
	5 недель субкультивирования	15 недель субкультивирования	
	[^3H]-тимидин нм, мин/10 6 клеток		
Контроль	48×10^3	44×10^3	32×10^3
Са $^{2+}$ -дсРНК	65×10^3	38×10^3	21×10^3
Са $^{2+}$ -РНК	62×10^3	52×10^3	—
Са $^{2+}$ -поли dT	97×10^3	75×10^3	72×10^3
Са $^{2+}$ -поли dA	79×10^3	69×10^3	62×10^3
Са-дсРНК + 2-с-м-пури (10 мМ)	—	—	13×10^3

Одновременно Са-дсРНК и РНК активировали в митотически активных фибробластах процесс транскрипции протоонкогенов c-fos, c-myc, c-jun; активация этих генов наступала уже через 2 ч после воздействия полинуклеотидов (рис. 1). Координированная экспрессия генов c-fos, c-myc, c-jun наблюдалась во многих клетках уже на ранних стадиях митотической стимуляции [17], хотя и в некоторых клетках положительная коррелятивная связь между активацией указанных протоонкогенов и процессами пролиферативного роста не обнаружена [10, 14].

Полученный нами результат свидетельствует о том, что митогенный эффект использованных полинуклеотидов на фибробластах человека сопровождается определенной активацией этих генов.

Несколько иным было влияние Са-дсРНК на рост митотически активных фибробластов человека в относительно поздний период раз-

множения клеток (15 недель субкультивирования). В этом случае Са-деРНК не стимулировал включение тимидина в ДНК, наблюдалось некоторое подавление синтеза ДНК, включение транскрипции гена *c-myc*, существенно не менялся пониженный уровень транскрипции генов *c-fos*, *c-jun*. Поли dT, поли-dA, РНК дрожжей стимулировали включение тимидина в ДНК соответственно на 75, 30 и 20 %.

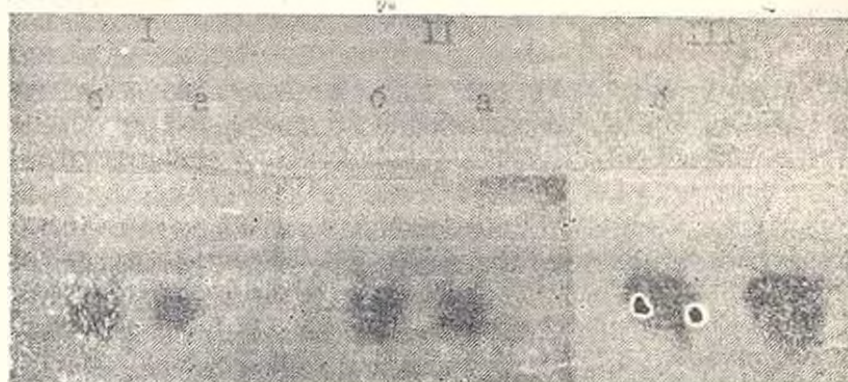


Рис. 1. Идентификация транскриптов гена *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* в митотически активных (5 недель субкультивирования) фибробластах кожи человека через 2 ч после воздействия Са-деРНК. I—*c-fos*, а—контроль, б—Са-деРНК; II—*c-myc*, а—контроль, б—Са-деРНК; III—*c-jun*, а—контроль, б—Са-деРНК.

Изучение профиля синтезируемых белков (рис. 2) показало, что в митотически активных фибробластах человека (15 недель субкультивирования) сохраняется в основном тот же профиль синтезируемых

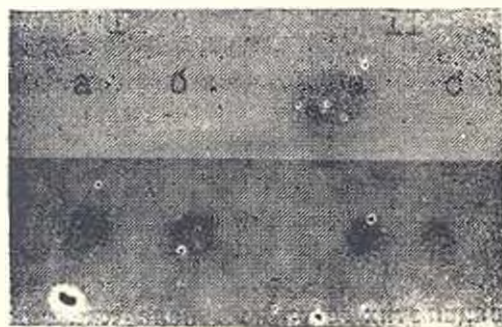


Рис. 2. Идентификация транскриптов гена *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* в фибробластах. I—*c-fos*, а—контроль, б—Са-деРНК; II—*c-jun*, а—контроль, б—Са-деРНК.

белков, что и в митотически активных фибробластах, субкультивированных в течение 7 недель [8]; вместе с тем под влиянием Са-деРНК наблюдалась индукция синтеза группы протеинов с мол. массами 45—35 кД, характерных для постмитотической популяции фибробластов человека, претерпевающих процесс терминальной дифференцировки (3 недели культивирования в условиях стационарного роста).

Согласно полученным данным, использованные полинуклеотиды

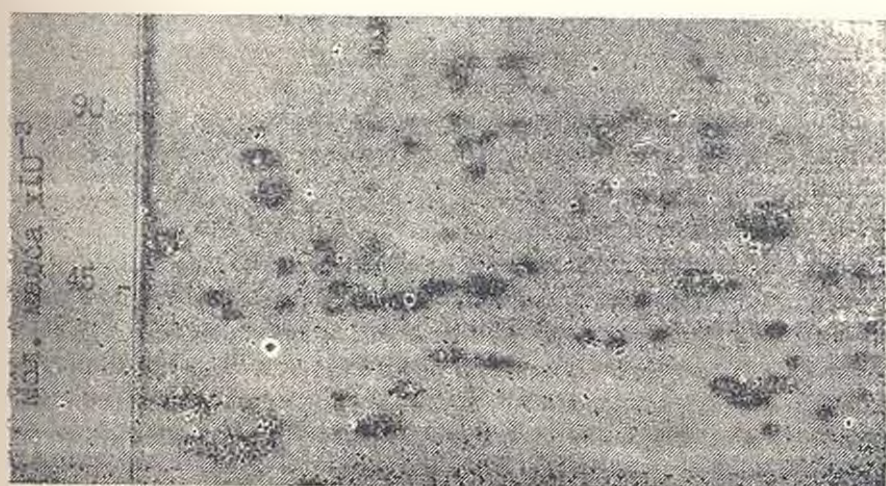
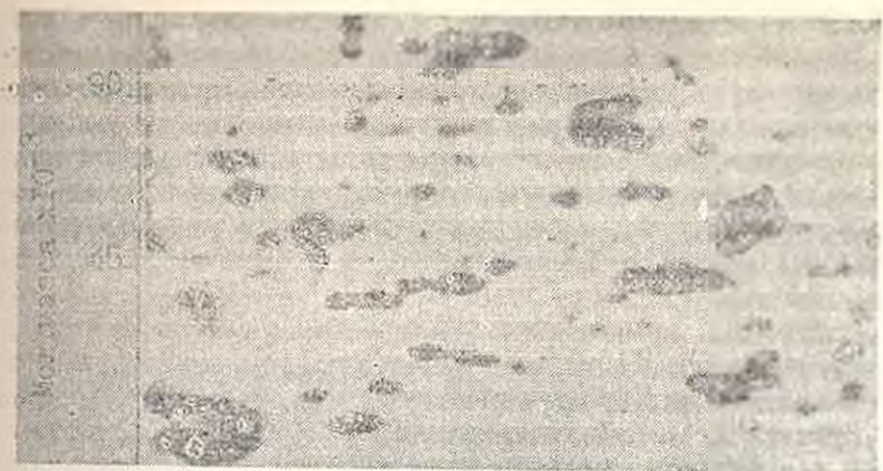


Рис. 3. Идентификация в двумерном 15% ПААГ электрофорезе $[^{35}\text{S}]$ -меченных протеинов митотически активных фибробластов (15 недель субкультивирования) до и после воздействия Са-дсРНК (авторрадиография). I—контроль, II—после воздействия Са-дсРНК, III— $[^{35}\text{S}]$ -мечение протеинов постмитотической популяции фибробластов (3 недели культивирования в условиях стационарного роста) ИЭФ в градиенте рН 3—10, 7500 В/г, слева направо.

оказывают различное влияние на процессы пролиферации фибробластов человека. Поли dA, поли dT, РНК дрожжей стимулируют процесс пролиферации фибробластов независимо от периода культивирования клеток. Са-дсРНК повышает синтез ДНК в фибробластах на ранних стадиях размножения, на более поздних же стадиях культивирования клеток он стимулирует синтез протенин, характерных для стадий терминальной дифференцировки фибробластов кожи человека.

Синтетические и природные полинуклеотиды различной структуры неодинаково влияют на пролиферацию трансформированных эпителиальных клеток HeLa-S-3 (табл. 1). ДсРНК в концентрации 10 мкг/мл к 4 ч воздействия ингибировал на 25% включение [³H]-тимидина в ДНК HeLa, Са-дсРНК подавлял синтез ДНК на 40%. Поли dA, поли dT стимулировали включение тимидина в ДНК клеток HeLa.

ДсРНК не влияла на активность изучаемых протоонкогенов в течение 30 мин и 3 ч воздействия. Са-дсРНК только через 4 ч вызывала активацию транскрипции генов c-fos, c-jun, не индуцируя активность гена c-myc (рис. 4).

Использование 2-аминопурина, специфического ингибитора процесса транскрипции генов c-fos, c-jun [23], совместно с Са-дсРНК существенно, на 60%, ингибировало включение тимидина в ДНК. Полученная корреляция свидетельствует о возможной роли продуктов экспрессии генов c-fos, c-jun как отрицательных регуляторов, сдерживающих по типу обратной связи антипролиферативный эффект дсРНК на клетки HeLa. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Са-формы полинуклеотидов, РНК дрожжей оказывают достаточно выраженное митогенное влияние на фибробласты человека, Са-дсРНК повышает в определенной степени синтез ДНК в фибро-

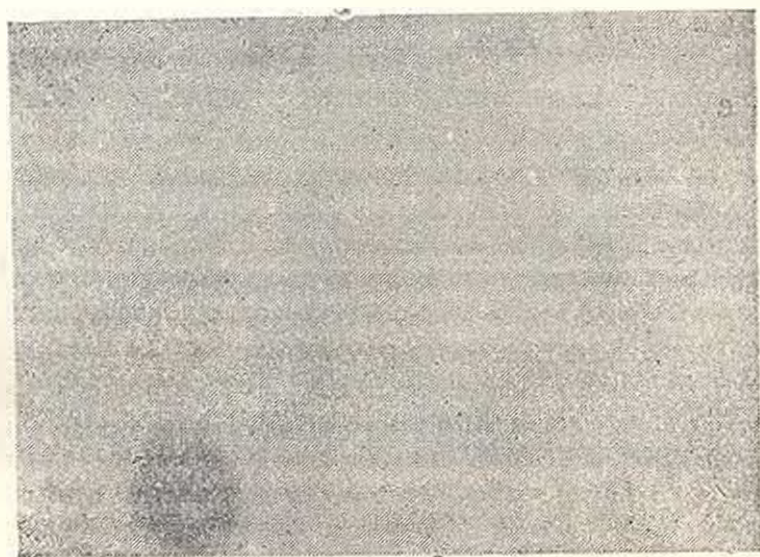


Рис. 4а.

бластах на ранних стадиях размножения в культуре; на более поздних стадиях культивирования клеток Са-дсРНК стимулирует процесс терминальной дифференцировки: комбинированное применение Са-дсРНК с Са-поли, dA, Са-поли dT может быть использовано в клинической медицине в целях стимуляции процессов пролиферации и терминальной дифференцировки фибробластов и эпителиальных клеток и заживления ран различной этиологии, особенно в случаях торможения и вялого протекания терминальной дифференцировки фибробластов и клеток эпителия

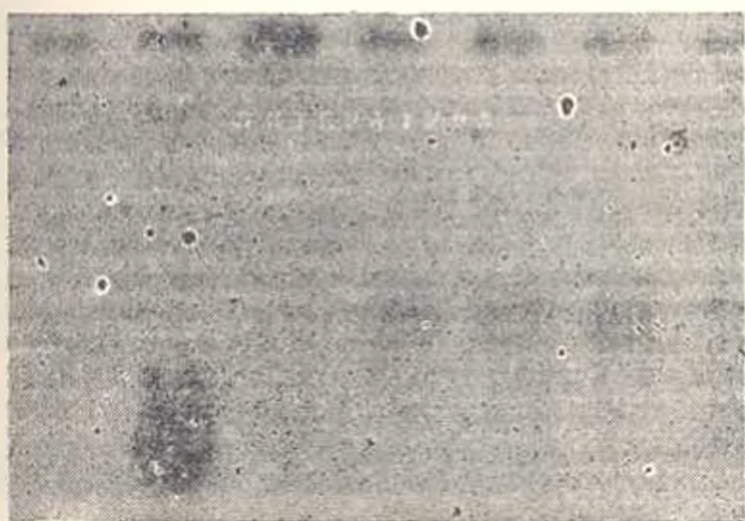


Рис. 4. б. Идентификация транскриптов гена *c-fos* (а), *c-jun* (б) в клетках HeLa под воздействием Са²⁺-дсРНК. Справа налево: 1—контроль, м-РНК выделена из клеток HeLa, культивированных до полного моноста; 2, 3—положительный контроль индукции в HeLa синтеза м-РНК гена *c-fos* (а) и *c-jun* (б), под воздействием гормонов: эпидермального фактора роста (ЭФР) через 30 мин и 4 ч; 4, 5—воздействие дсРНК через 30 мин и 4 ч; 6, 7—воздействие Са²⁺-дсРНК через 30 мин и 4 ч; с-РНК *c-fos* (а) и м-РНК *c-jun* (б) (2,2 т. л. о.).

Автор благодарит проф. Шинизу Н. и Гамо Ш. (Япония) за помощь в получении некоторых экспериментальных данных и в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян А. Г., Арабаджи А. Г., Захарян Р. А. ДАН СССР, 298, 5, 1250—1253.
2. Захарян Р. А. Тез. докл. IV августовского симп. СССР—ФРГ. Структура и транскрипция генома, 19. Преван, 1981.
3. Захарян Р. А., Корсаков К. Г. В сб. Структура и функция белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI двустороннего симп. СССР—Франция, 132, 1982.
4. Захарян Р. А., Габриелян А. А., Савваткина Н. А. Методы молекулярной биологии, 8, 1, 34—35, 1980.
5. Захарян Р. А., Савваткина Н. А., Арабаджи А. Г., Биологический журнал Армении, 22, 9:10, 923—926, 1979.
6. Рухляк Л. А., Захарян Р. А. В сб. Лекарственные и биологически активные вещества в минеральном и селенитовом водах, 89—94, 1976.

7. Секодова Т. М., Редомская Н. А., Антонов А. Ю., Сустина Н. А., Ершов Ф. И., Преображенская Н. К., Мирская Л. Л. В сб. Изучение индуктора интерферона—двухцепочечной РНК в различных биологических системах. Рига, 47—53, 1989.
8. Bayreuther K., Rodemann H. P., Hommel R., Dittmann K., Sailer M., France P. I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5112—5116, 1986.
9. Colotta F., Lampygnant M. G., Potentatutit N., Dejane E., Mantovani A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 1101—1110, 1980.
10. Coughlin S. R., Lee W. M. F., Williams P. W., Giels M. G., Williams C. T. Cell, 43, 243—251, 1985.
11. Gabor G., Bennett R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 3, 1034—103, 1984.
12. Loke S. L., Stein C. A., Zhang X. H., Mori K., Nakanishi M., Subasingne C., Cohen K. S., Neckers L. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 3474—3478, 1989.
13. Mitchell R. L., Zokas R. D., Yerna I. M. Cell, 40, 203—217, 1983.
14. Owen T. A., Cosenza S. C., Soprano K. J. J. Biol. Chem., 262, 1511—1517, 1987.
15. Rodemann H. P., Bayreuter K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5130—5134, 1984.
16. Rodemann H. P., Bayreuter K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2086—2090, 1986.
17. Rollins B. Z., Stiles C. D. in vitro Cell Dev. Biol., 24, 81—84, 1988.
18. Ryseck R. R., Hirai S. I., Yanlu M., Bravo R. Nature, 331, 535—537, 1988.
19. Vitcek K., Kohase M., Henriksen-De Stefano J. Cell. Physiol., 130, 37—43, 1987.
20. Yakubov L. A., Deeva E. A., Zarytova V. E., Ivanova E. M., Rytel A. S., Yurchenko L. V., Vlassov V. V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6451—6458, 1989.
21. Yamada H., Koizumi S., Kimura M., Shimizu N. Exp. Cell Research, 184, 90—98, 1989.
22. Yoshida I., Azuma M., Kawai H., Fisher H. W., Suzutani T., Sakuma T. J. of Interferon Research (in press), 1989.
23. Zinn K., Keller A., Whittemore T. M., Mantatis T. Science, 240, 210—213, 1988.
24. Zullo J. N., Cochran B. H., Huang A. S., Stiles C. J. D. Cell, 43, 793—800, 1985.

Поступило 12.VIII 1990 г.

МИКРОЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИЙ НЕЙРОНОВ ОБЛАСТИ БУЛЬБАРНОГО ДЫХАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА НА РАЗДРАЖЕНИЕ ПЕРЕДНЕГО ВЕНТРАЛЬНОГО ЯДРА ТАЛАМУСА

Н. К. МАНУКЯН, Л. Б. ПЕРСЕСЯН, О. Г. БАКЛАВАДЖЯН

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армении, Ереван

Установлены подавляющие и возбуждающие эффекты с выраженным преобладанием подавляющих влияний на импульсную активность инспираторных, экспираторных и неспецифических (т.е. дыхательной активности) нейронов. Выявлены более низкие пороги вызова реакций инспираторных нейронов по сравнению с экспираторными.

Ենթադրելի ենթադրված կենդանիների մոտ բնական շնչառության պայմաններում միկրաէլեկտրոդային մեթոդով ուսումնասիրվել է թալամուսի AV կորիզի ցածր և բարձր հաճախականությամբ զրգոման ազդեցությունը Լրկայնաձիղ ուղեղի փոքրյին շնչառական կորիզի առանձին նեյրոնների ակտիվության վրա: Բացահայտվել են ճնշող և զրգովածային էֆեկտներ: Յուրյց է տրված ներշնչողական, արտաշնչողական և ոչ ակնցիֆիկ (առանց շնչառական ակտիվության) նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության վրա զրգոման առավելագույն ճնշող ազդեցությունը:

The influence of high frequency stimulation of the nucleus antero-ventralis of the thalamus on the activity of single neurons of the bulbar respiratory center was studied in anesthetized cats with normal respiration. It was shown inhibitory and excitatory influence with predominantly inhibitory effects on spike activity on inspiratory, expiratory, as well as nonspecific (nonrespiratory) units in the region of ventral respiratory nucleus. Mechanisms of the modulatory influence of the antero-ventral region of the thalamus on the activity of bulbar respiratory neurons are discussed.

Булбарные дыхательные нейроны—спайковая активность—переднее вентральное ядро таламуса—электрическая стимуляция.

В ряде электрофизиологических исследований установлена мощная просоциальная висцеральных афферентных систем не только в специфические, но и в неспецифические и ассоциативные ядерные образования таламуса [1, 3, 9 и др.]. Исходя из этих данных можно полагать, что нейроны таламических структур выполняют не только релейные функции проведения висцеро-соматических афферентных сигналов, но и рефлекторные. В литературе имеются некоторые данные об участии таламических ядер в процессах регуляции кардио-васкулярных функций [5 и др.].

Учитывая координацию и сопряженность деятельности центральных систем управления сердечно-сосудистой и дыхательной функций, мы впервые провели микроэлектрофизиологическое исследование характера влияния неспецифических, ассоциативных и специфических ядерных образований таламуса на активность нейронов области бульбарного дыхательного центра.

В настоящей работе приведены результаты изучения особенностей влияния переднего вентрального ядра (nucleus anterior ventralis,

п. AV). одного из несенсорных релейных ядер таламуса 1, 6, и др.] на спайковую активность инспираторных, экспираторных и неспецифических (без дыхательной активности) нейронов области вентрального дыхательного ядра.

Материал и методика. Эксперименты проводили на наркотизированных (55 мг/кг хлоралдола и 5 мг/кг нембутала, внутривенно), спонтанно дышащих кошках. Животное фиксировали в стереотаксическом приборе и после удаления части мозжечка обнажали дорсальную поверхность продолговатого мозга. Наблюдая область локализации вентрального дыхательного ядра (ориентиром служила задвижка) спайковую активность одиночных дыхательных нейронов отводили экстракционно стеклинными микроэлектродами, заполненными 2M раствором дихлорнокислого калия (диаметр кончиков 1,5–2,0 мкм). Потенциалы действия нейронов через катодный электрод отводили на вход усилителя переменного тока и регистрировали на одном из каналов двулучевого осциллографа. Для идентификации базальных дыхательных нейронов одновременно с импульсной активностью нейрона на втором канале осциллографа регистрировали внешнее дыхание животного при помощи угольного датчика, подключенного через мостовую схему к усилителю постоянного тока. Осциллографическую регистрацию записывали на пленку в непрерывном режиме посредством фоторегистратора «Nihon Kohden». Спайковую активность нейронов обрабатывали на анализаторе STA-1024 (Венгрия) и записывали двухкоординатным способом в виде гистограмм частичного распределения импульсов и дыхательных залпов. В зависимости от характера разрядной активности нейрона временной интервал, в котором отсчитывали количество импульсов, подбирали разным 200 или 500 мс (шаг анализа). Раздражение п. AV производили при помощи импульсами (0,5 мс 10–50 имп/с, 7–10 В, 10–20 с) с помощью концентрических электродов, ориентированных в исследуемую область по координатам стереотаксического атласа Джаксона и Аймон-Маршана. В конце опыта раздражаемые структуры электролитически разрушали и осуществляли их гистологический контроль.

Результаты и обсуждение. Изучены реакции 51 инспираторных, 29 экспираторных и 28 неспецифических нейронов области вентрального дыхательного ядра. Из них реактивными оказались 78,4% инспираторных, 75,8% экспираторных и 71,4% неспецифических нейронов соответственно. Низкочастотная стимуляция п. AV 5 имп/с не оказывала влияния ни на один тип реактивных нейронов. Раздражение частотой от 10 до 50 имп/с вызвало односторонний эффект, который был более выражен при частоте раздражения 30–50 имп/с. Из 10 реактивных инспираторных нейронов подавление активности наблюдалось у 35 нейронов (87,5%), активация—у 5 нейронов (12,5%). Подавление активности выражалось в уменьшении средней частоты импульсов в залпе на $40,3 \pm 1,5\%$, активация—в увеличении средней частоты импульсов в залпе на $37,8 \pm 2,2\%$. Такая же направленность изменения импульсной активности наблюдалась и в популяции экспираторных нейронов. Из 22 реактивных экспираторных нейронов подавление активности наблюдалось у 20 нейронов (90,9%), активация—у двух (9,1%). При этом подавление активности выражалось в уменьшении средней частоты импульсов в залпе на $35,9 \pm 1,3\%$, усиление активности—в повышении средней частоты импульсов в залпе на $30,6 \pm 1,6\%$. Анализ гистограмм частичного распределения разрядов в дыхательных залпах показал, что при подавлении актив-

ности тестируемых нейронов наряду с уменьшением средней частоты импульсов в дыхательных записях наблюдалось удлинение межзачленных интервалов, свидетельствующее об урежении дыхания (рис. 1 А, Б). На фоне же облегчения активности инспираторных и экспираторных нейронов увеличение средней частоты импульсов в записях сопровождалось, напротив, укорочением длительности межзачленных интервалов, что свидетельствует об учащении внешнего дыхания (рис. 1 В, Г).

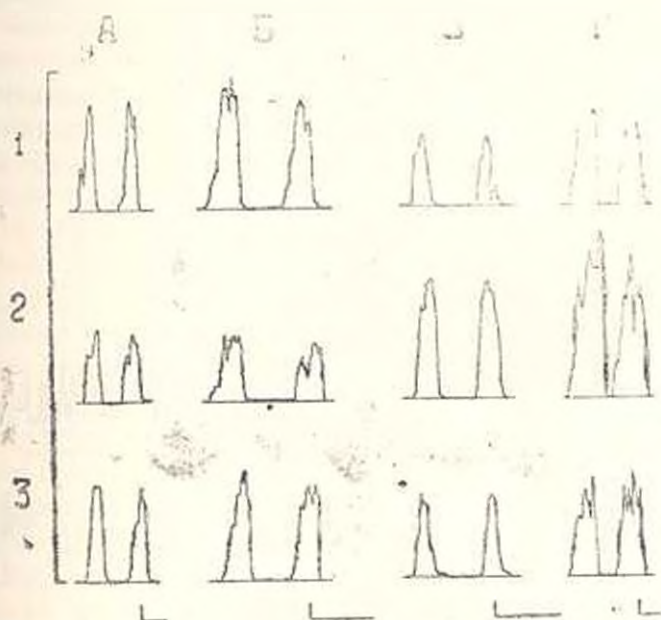


Рис. 1. Гистограммы импульсной активности бульбарных дыхательных нейронов в норме и при частотном раздражении п. AV таламуса. А.—подавляющий эффект экспираторного нейрона (шаг анализа 20,0 мс), В—возбуждающий эффект инспираторного нейрона (шаг анализа 200 мс), Г—возбуждающий эффект экспираторного нейрона (шаг анализа 500 мс): 1—до раздражения, 2—в условиях раздражения, 3—после прекращения раздражения. По оси абсцисс—время, по оси ординат—количество импульсов в интервалах, соответствующих шагу анализа. Масштабы абсциссы и ординаты соответственно 5 с и 5 имп.

Сравнение пороговой интенсивности раздражения модулирующей активности инспираторных и экспираторных нейронов показало, что порог более низкий для инспираторных единиц.

Как отмечено выше, в п. AV зарегистрирована активность 20 неспецифических нейронов. При частотном раздражении п. AV у 13 нейронов (65%) наблюдалось подавление, у 7 (35%)—облегчение спайковой активности. Эффект подавления выражался в уменьшении средней частоты импульсов в записи на $39,6 \pm 3,8\%$, облегчения—в увеличении средней частоты импульсов в записи на $38,3 \pm 4,3\%$. Подавляющий и активирующий эффекты раздражения п. AV на неспецифические нейроны представлены на рис. 2, (1, 2) соответственно.

Следует отметить, что в нескольких случаях одновременного отведения кончиком микроэлектрода импульсной активности дыхатель-

лого и неспецифического нейронов при частотной стимуляции п. AV, могли наблюдаться не только однонаправленные, но и разнонаправленные влияния. Так, например, при подавлении активности инспираторного нейрона выявлялась активность фоновомолчащего неспецифического нейрона, при подавлении активности дыхательного нейрона не наблюдалось изменения разрядной активности неспецифического.

Итак, нами впервые установлено, что высокочастотное раздражение п. AV таламуса вызывает выраженную модуляцию импульсной активности инспираторных и экспираторных нейронов продолговатого мозга со значительным преобладанием тормозного влияния. В связи с этим интересно отметить, что при изучении механизма влияния п. AV таламуса на функциональное состояние сердца также выявлены отрицательные хронотроп-, батмо- и дромотропные эффекты.

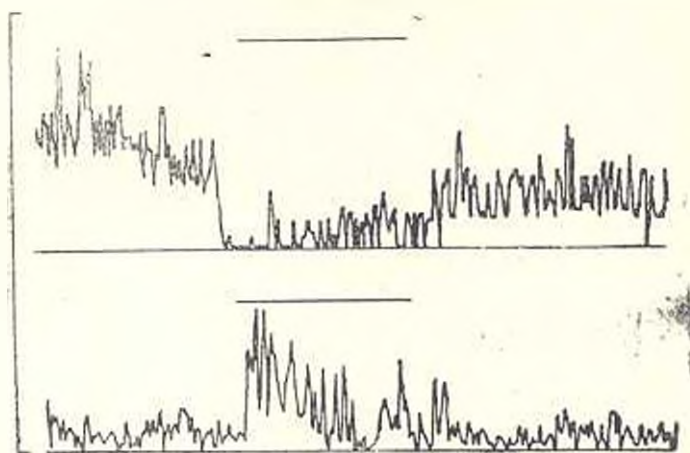


Рис. 2. Гистограммы импульсной активности неспецифических нейронов области бульбарного дыхательного центра в норме и при частотном раздражении п. AV таламуса. 1—Подавляющий эффект, 2—возбудительный. По оси абсцисс—время, по оси ординат—количество импульсов в интервалах, соответствующих шагу анализа, равному 200 мс. Над гистограммами сплошной линией отмечено время раздражения. Масштаб:

Какими путями реализуется это влияние, пока не известно. Морфологических, гистохимических или электрофизиологических данных о наличии прямой моносинаптической связи п. AV таламуса с нейронами области вентрального дыхательного ядра нет. Являясь одним из звеньев большого лимбического круга Пейпеца (гипоталамус—п. AV таламуса—лимбическая кора—гиппокамп—свод—гипоталамус) [11] и имея тесные взаимосвязи с гипоталамусом и лимбической корой, п. AV свое влияние на активность вегетативных нейронов продолговатого мозга может осуществлять через эти структуры. Однако в наших предыдущих исследованиях показано более выраженное облегчающее, чем подавляющее влияние гипоталамуса на импульсную активность бульбарных дыхательных нейронов [2, 8]. Нами установ-

лено, что при раздражении висцерального, переднего поля лимбической коры происходит также подавление или облегчение активности дыхательных нейронов с преобладанием подавляющего влияния [7]. Очевидно, наблюдаемые нами эффекты электрической стимуляции п. AV опосредованы через корковые структуры гипоталамо-лимбического круга, участвующего в формировании эмоциональных, поведенческих и вегетативных компонентов адаптивных реакций организма. Эффекты могут быть опосредованы и через моторную и орбито-фронтальную кору, в связи с наличием прямых связей п. AV с этими областями неокортекса [4, 6]. Нужны, конечно, дополнительные исследования для окончательного выяснения этого вопроса. Но предложенная нами гипотеза представляется интересной, так как указывает на дифференцированное влияние различных структур гипоталамо-лимбического круга Пейпса на вегетативные компоненты поведенческих реакций. Очевидно, круг Пейпса является одной из гомеостатических систем регуляции вегетативной нервной активности, и как любая гомеостатическая система содержит активирующие (гипоталамус), так и подавляющие (п. AV таламуса, лимбическая кора) звенья, поддерживающие гомеостаз возбудимости бульбарных респираторных нейронов. Существуют, конечно, и другие корково-подкорковые круги, как, например, орбито-фронтальная кора—височная доля коры—дорсомедиальный таламус—амигдала—орбитофронтальная кора [10] или септо-гипоталамо-септальная, п. AV таламуса—лимбическая кора—п. AV таламуса системы [12 и др.]. Все это свидетельствует об исключительной сложности механизмов супрабульбарной регуляции дыхательной функции организма.

Заслуживают внимания данные об отсутствии одностороннего действия п. AV таламуса. При электрической стимуляции одной и той же области этой структуры можно получить как подавляющий, так и облегчающий эффекты. Как объяснить неоднозначное, разнонаправленное влияние одной и той же области п. AV таламуса на дыхательные нейроны, а именно преимущественно тормозное, но в некоторых случаях и активирующее действие? В виде рабочей гипотезы мы выдвигаем следующие соображения: в п. AV таламуса диффузно рассеяны как тормозные, так и активирующие нейроны с выраженным преобладанием первых. Естественно, большинство дыхательных нейронов, будучи конвергентными, находится в пуле пороговой каймы тормозного синаптического действия нейронов п. AV, и только небольшая популяция респираторных нейронов, получающая возбуждающие и тормозные влияния, находится в пуле пороговой каймы возбуждающих влияний и реагирует активацией на раздражение той же зоны п. AV таламуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетян Л. А. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1983.
2. Бахлаваджян О. Г., Нерсисян Л. Б. Физиол. журн. СССР, 63, 10, 1416—1421, 1976.

3. Дуркиян Р. А. Центральная структура афферентных систем. М., 1965.
4. Казакян В. И. В кн.: Частная физиология нервной системы. 313—382. Л., 1983.
5. Кочмаровский Н. Г. Авторсф. докт. дисс., Тбилизи, 1990.
6. Леонтьев Т. А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга. М., 1978.
7. Персесян Л. Б. Мат-лы VIII Всесоюз. конф. по электрофизиологии ЦНС, 360—381. Ереван, 1980.
8. Персесян Л. Б., Бакавскасян О. Г. Физiol. журн. СССР, 76, 5, 624—611, 1990.
9. Чернышский В. П. Нейрофизиологический анализ кортико-висцеральной рефлекторной дуги. Л., 1967.
10. Livingston K. E., Escobar A. Arch. Neurol., 24, 1, 17—21, 1971.
11. Garce J. W. Arch. Neurol. Psychiat., 33, 3, 723—738, 1937.
12. Powell E. W. Exp. Brain Res., 17, 4, 391—400, 1973.

Поступило 14.I 1992 г.

Биол. журн. Армении № 1.(16).1993

УДК 617—002.3—085—837.3

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЧАСТОТНОГО УЛЬТРАЗВУКА В РАСТВОРЕ ДЭРНК

С. М. ГАЛСТЯН, А. К. ШАРАФЯН, А. А. БАРСЕГЯН, Н. Р. МАРГАРЯН,
Р. А. ЗАХАРЯН, Ж. И. АКОПЯН, К. Г. КАРАГЕЗЯН

Ереванский государственный медицинский институт, кафедра хирургии,
Институт молекулярной биологии АН Армении, Ереван

Показана эффективность применения низкочастотного ультразвука для профилактики послеоперационного нагноения ран. Морфологические исследования подтвердили ценность этого метода.

Վերերի հետազոտման օրինակումս ցրտիակտիվի համար օգտագործել է ցածր հաճախանության ուլտրաձայնը որպես հիպոսեպտիկ միջոց օգտագործել է Տճ-Էրկապրալին հեղուկ Մարգարյանի հետազոտումները հաստատել են իրենց և Էրկապրալինի

The low-frequent ultra-sound for prophylaxis of wounds of after-operation festering is utilized. As the sound tracing medium the Ca-Domestic RNA was applied. The morphological researches corroborated the value of given method.

Римская группа — ультразвука — Ca-Эрканалов РНК — фибринов.

Многочисленные клинические исследования по использованию ультразвуковой обработки ран с целью профилактики послеоперационных нагноений свидетельствуют о том, что указанный метод результативен, дает хороший бактерицидный и бактериостатический эффект, снижает частоту раневых осложнений [3, 6, 9, 10, 12, 13]. В основе способа ультразвуковой обработки ран лежит сложный комплекс физических и биологических процессов: бактерицидное действие на микрофлору, внедрение лекарственных веществ в ткани, ускорение физиологических процессов, способствующих заживлению ран и пр. [7, 8]. Используемые при ультразвуковой санации ран различные растворы немногочисленны и в основном представлены раство-

рами антисептиков и антибиотиков, что не совсем оправдано и может привести к различным осложнениям и побочным явлениям [4, 5, 11, 16]. А ведь именно от правильного выбора рабочего раствора в определенной степени зависит эффективность проводимого озвучивания.

В настоящем исследовании представлены результаты изучения морфологических особенностей течения раневого процесса при использовании раствора РНК в качестве озвучиваемой среды при ультразвуковой санации операционных ран в условиях эксперимента.

Известно, что экзогенные РНК (нуклеинат натрия) оказывают стимулирующее влияние на восстановительные процессы в органах и тканях. Активным началом в препарате нуклеината натрия является содержащаяся в его составе двуспиральная РНК (деРНК) [2]. Существенным препятствием для парентерального введения препарата РНК, деРНК или их использования в условиях *in vivo* является высокая активность сывороточных и тканевых нуклеаз крови, биожидкостей, тканей, вызывающих деградацию вводимой РНК [18, 19]. Нами впервые использован биологически активный комплекс Са-деРНК, Са-РНК, полученный сотрудниками Института экспериментальной биологии АН Армении и устойчивый к расщеплению нуклеазами плазмы крови и экстрактов тканей [2, 11]. Установлено, что помимо стимуляции первичного и вторичного иммунного ответов РНК, и в особенности СаРНК и Са-деРНК, оказывают стимулирующее влияние на мембранные функции клетки, повышают уровень их обменяемости с клеткой с внешней средой [1, 15, 17, 20].

Эти свойства Са-РНК и Са-деРНК побудили нас исследовать их эффективность в качестве рабочего раствора при ультразвуковой санации операционных ран (с целью ускорения репаративных процессов, а также стимуляции защитных свойств макроорганизма, как местных, так и общих).

Материал и методика. Использовали 150 белых беспородных крыс-самцов массой 180—200 г. В области спинки животных с охватом ягодицы наносили гетанум рану длиной 4—5 см на всю толщину стенки. Все животные были разделены на три группы, по 50 крыс в каждой. В III группе животных рану обрабатывали ультразвуком в 2% растворе Са-деРНК в течение двух минут, после чего ушивали послойно наглухо. Контролем служили две другие группы: в I группе рану ушивали в идентичных условиях без всякой обработки; во II—обрабатывали в индифферентном (физиологическом) растворе. Для ультразвуковой обработки ран использовали специально медицинскую установку УРСК-7Н-18. Обработку проводили в режиме резонанса (частота колебаний конца волновода—26,5 кГц, амплитуда 35—40 джм).

Для морфологического исследования брали кусочки тканей стенок и дна ран размерами около 0,3×0,5×1,0 см на 2, 4, 24 часа, 4 и 6 суток. Ткани фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина и жидкости Кэриу последующей заливкой в парафин. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение. Морфологические исследования выявили почти у всех животных заживление раны первичным натяжением. Качественные особенности этого процесса достаточно хорошо изучены и общеизвестны. Для сравнительной характеристики динамики

заживления ран у разных групп животных избран метод морфометрических измерений.

На срезах стандартной толщины (10 мк) под иммерсионным объективом (ИМ 30) в 50 полях зрения у каждого животного подсчитывали количество всех клеток фибробластического ряда (перипиты, эндотелициты, тучные клетки, лейкоциты, микрофаги и т. д.). Окуляр-микрометром измеряли диаметры каждой клетки и ее ядра в случае с шарообразными клетками (два перпендикулярных диаметра—в случае с эллипсоидными клетками или ядрами), определяли наличие или отсутствие в их ядрах ядрышек.

Данные о варьировании количества клеток в зоне повреждения (2,4 ч), демаркационного воспаления (24 ч), образующихся грануляций (4, 6 сут) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Кол-во количества клеток в зоне повреждения, демаркационного воспаления, образующихся грануляций.

Группа животных	Количество клеток в поле зрения				
	2 ч	4 ч	24 ч	4 сут.	6 сут.
I группа	18.4±3.1	31.2±2.4	39.2±2.4	44.4±3.2	40.2±2.0
II группа	25.3±1.8	36.3±2.8	47.9±4.0	42.6±2.1	33.4±4.1
III группа	28.8±2.1	42.1±3.2	60.2±3.4	42.3±3.4	28.4±2.7

Среди клеток фибробластического ряда выделялись две большие группы. В первую входили малодифференцированные и юные фибробласты (небольшие или большие по размеру, округлые или острокопечные по форме) с округлым или овальным ядром с элонгацией до 1,2 (соотношение большего диаметра к меньшему) и 2—3 ядрышками. Вторая группа была представлена зрелыми фибробластами (большого размера, отростчатые или веретенообразные по форме) с опальными или вытянутыми ядрами (элонгация > 1,2) с 0—1—2 ядрышками. Количество клеток этих двух групп в процентах от абсолютного количества всех клеток, подсчитанных в срезах данного срока эксперимента, приведено в табл. 2.

Таблица 2. Количество молодых и зрелых фибробластов в % от абсолютного количества всех клеток

Группа животных	4 сутки		6 суток	
	молодые фибробласты	зрелые фибробласты	молодые фибробласты	зрелые фибробласты
I группа	53.4%	3.4%	48.9%	11.2%
II группа	46.1%	12.1%	34.7%	27.8%
III группа	33.8%	24.3%	20.6%	38.4%

Для определения динамики созревания грануляционной ткани можно пользоваться также показателями соотношения клеточных и

внеклеточных компонентов соединительной ткани (основного вещества и волокнистых структур). Для этой цели подсчитывали сумму площадей сечения всех клеток в поле зрения и определяли ее процентное отношение к площади поля зрения (табл. 3).

Таблица 3. Соотношение клеточных и внеклеточных компонентов соединительной ткани, %

Группа животных	4 сутки	6 суток
I группа	63,8%	52,4%
II группа	49,3%	38,6%
III группа	42,7%	27,3%

Таким образом, полученные нами результаты еще раз подтверждают данные литературы о том, что ультразвуковая обработка ран стимулирует пролиферацию клеток в очаге поражения, демаркационного воспаления, размножение и созревание клеток в грануляционной ткани. Значительная стимуляция репаративных процессов отмечается при сочетании использования низкочастотного ультразвука и СидсРНК в качестве озвучиваемой среды при ультразвуковой обработке операционных ран, что позволяет рекомендовать внедрение метода в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Земсков Л. М., Автореф. докт. дисс., М., 1973.
2. Захарян Р. А., Месроbian Н. П., Мовсесян А. В., Агабалян А. С., Акопян Ж. И., Экспер. онкология, 7, 3, 54—56, 1985.
3. Кабилов А. Н., Деккер А. Ф., Ситко Л. А., Ложевская Р. Г., Педдер В. В., Вестн. хир., 11, 26—29, 1982.
4. Кашкин К. П., Кирев Э. О., Тез., 175—176, М., 1979.
5. Красильников Н. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества, 339, М., 1958.
6. Лоцова Е. И. I Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции (Тез. докл.), 161—162, М., 1977.
7. Лоцлов В. И., Веденков В. Г., Орлова А. А., Тр. МВГУ им. Баумана, 3, 242, 27—31, 1976.
8. Лоцлов В. И., Веденков В. Г., Орлова А. А., Тр. МВГУ им. Баумана, 32—35, 1976.
9. Морозов Ю. И., Абрамов Е. К., Гавеский С. В., Тр. 30 Всесоюз. съезда хирургов, 73—74, Минск, 1983.
10. Оганесян М. А., Анимян П. П., Хирургия, 4, 89—90, 1983.
11. Рухкян Л. А., Захарян Р. А., Тр. Ереванск. зоовет. ин-та 59, 89—91, 1986.
12. Удой В. М., Хоменко И. М., Андрунь П. К., XXIX Всесоюз. съезд хирургов, 41—42, Киев, 1974.
13. Чаплинский В. В., Липкин М. Е., Яковлев В. С., Ежов В. М., Лопушон А. И., Хирургия, 6, 64—68, 1976.
14. Banke H., Jellinger K. Wien. Klin. Wschz., 80, 3, 43—52, 1968.
15. Han L. H., Johnson A. G. J. Immunol., 117, 423—427, 1976.
16. Maschepa P. Pren. Med. Argent., 33, 54, 1839—1846, 1967.
17. Math G., Florentin S., Olsson L., Bruelly—Rosset M., Schultz J. Cancer Treat. Rep., 62, 1613—1621, 1978.

18. Torrence P., Walters J., Auchlas C., Wietor P. Bio Chem. Biophys. Res. Commun., 52, 3, 890—899, 1973
19. Nordlung J., Wolf S., Levy H. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 133, 439—444, 1970
20. Zakharian R. A., Karagezryan K. G., Ovakimian S. S., Vardanian M. B., Gasparian H. T. ISF—IOCS World Congress, Tokyo, Absr. 3P12, 26—38, 1988.

Поступило 5.V 1990 г.

Биолог. журн. Армении № 1.(46).1993

УДК 577.214

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТАЗ НА СКОРОСТЬ РОСТА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУР *E. coli*

Н. Г. НАЦБАНДЯН, И. М. ЗАРАФЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН

Институт молекулярной биологии АН Армении, Ереван

В клетках *E. coli*/psrcC, несущих плазмиду psrcC с онкогеном v-src, обнаружена тирозинспецифическая фосфопротеникиназная активность, характерная для онкобелка pp60^{src}. Показано, что NaF подавляет скорость роста исследованных культур, в то время как ортованадат Na оказывает ингибирующее влияние на рост культуры *E. coli*/pBR322 в среднем на 15—20% глубже, чем культуры *E. coli*/psrcC. Экспрессия онкобелка src в клетках *E. coli* влияет на физиологическое состояние клеток.

Հետազոտված է ֆոսֆատազների աերդանակած ինհիբիտորների (NaF) օրթովանաղաթթվի ազդեցությունը pBR322 և psrc C պլազմիդներ կրող *E. coli* բջիջների աճի վրա: V—src օնկոգեն *E. coli*/psrc C բջիջներում հայտնաբերված է pp 60^{src} օնկոպրոթինը և նորոգի հատուկ ֆոսֆատրոտերիկնազային ակտիվություն: Յույց է տրված, որ NaF-ը միանման է ազդում բույր հետազոտված բջիջների աճի վրա, մինչդեռ Na օրթովանաղաթթուն միջին հաշվով 15—20% ավելի խորն է ճնշում *E. coli*/pBR322 բջիջների աճը քան *E. coli*/psrcC: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ src օնկոպրոթինը արտահայտությունը *E. coli* բջիջներում որդակի ազդեցություն է թողնում վերլիներին ֆիզիոլոգիական վիճակի վրա:

Two strains of *E. coli* carrying pBR322 and psrcC plasmids, were investigated in terms of influence on their growth properties of two types of phosphatase inhibitors—NaF and Na—orthovanadate. Na orthovanadate inhibits the growth rate of *E. coli*/pBR322 on 15—20% deeper than *E. coli*/psrcC. The results indicate that, expression of src oncoprotein in *E. coli* change the physiological state of the cells.

Фосфорилирование по тирозину—онкоген v-src

Онкоген v-src, кодируемый геномом вируса RSV*, кодирует белок pp60^{src}, который обладает специфической протеникиназной активностью и фосфорилирует белки-мишени по остаткам тирозина [5].

Ранее нами было показано, что клонированный в клетках *E. coli* онкоген v-src способен спонтанно экспрессироваться за счет наличия в участке генома, прилегающем к кодирующей части гена v-src, последовательностей прокариотического промотора и сайта узнавания

Сокращения: RSV—вирус саркомы Рауса.

рибосом [1]. Проявление этой активности в клетках *E. coli* приводит к ускорению синтеза ДНК и пролиферативной активности клеток. Видимо, это явление связано с фосфорилированием по тирозину дополнительных белков в клетках *E. coli* [2].

Полученные данные указывают на возможную роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности генов прокариотических клеток. Вопрос о роли фосфорилирования белков в регуляции активности прокариотических клеток до сих пор еще не нашел адекватного решения [4]. Изучение имеющейся модельной системы позволит продвинуть решение этого вопроса.

Материал и методика. В работе использовали культуры клеток *E. coli*, содержащие онкоген (*E. coli*/psrcC) и не содержащие этот онкоген (*E. coli*/pBR322). Была проведена оценка скоростей роста культур при длительных инкубациях и при добавлении в культуральную среду ингибиторов фосфатаз—NaF (ингибитор сериновых и треонинных фосфатаз) и ортованадата Na (Na_2VO_4 , ингибитор тирозина фосфатаз) [6].

Скорость роста культур оценивали по величине k ($k = \mu_0/\mu_x$, где μ_0 —удельная скорость роста культуры, выращиваемой в среде без добавок, μ_x —удельная скорость роста культур, выращиваемых при наличии ингибитора различных концентраций).

Результаты и обсуждение. Отношение удельной скорости роста культуры *E. coli*/psrcC к удельной скорости роста культуры *E. coli*/pBR322 составляло при выращивании до конца экспоненциальной стадии роста $\mu_{\text{psrcC}}/\mu_{\text{pBR322}} = 1,07 \pm 0,27$. Наблюдаемое различие невелико и статистически недостоверно. Видимо, ограничения, накладываемые методом спектрофотометрического определения скорости роста культур, не позволяют выявить статистически достоверные различия между культурами: при длительных инкубациях, тогда как использование изотопной метки выявляет существенную разницу. К сожалению, этот метод не приемлем для длительных инкубаций.

Исследовано также поведение этих культур при добавлении в среду ингибиторов фосфатаз. Ингибиторы подбирались исходя из предположения, что изменение физиологического состояния культуры *E. coli*/psrcC связано с фосфорилированием дополнительных белков клетки по тирозину. В этом случае ингибирование тирозинных фосфатаз должно было бы привести к увеличению времени жизни дополнительных фосфорилированных белков и, как следствие, к различной реакции культур *E. coli*/psrc и *E. coli*/pBR322 на ингибирование.

В табл. 1 (а) приведены данные о степени ингибирования (k) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в среду различных концентраций NaF. Видно, что NaF подавляет рост культур, причем степень ингибирования одинакова как в случае с *E. coli*/pBR322, так и с *E. coli*/psrcC.

Добавление в культуральную среду ортованадата Na приводит к совершенно иным эффектам (табл. 1б). Увеличение концентрации ортованадата Na практически не приводило к изменению величины μ , как в случае с культурой *E. coli*/pBR322, так и с *E. coli*/psrcC. Мы предположили, что отсутствие влияния ортованадата на клетки

Таблица 1. (а). Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду различных концентраций NaF.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций NaF, mM			
	50	100	150	200
psrcC	1.05±0.1	1.2±0.2	1.22±0.1	2.0±0.3
pBR322	1.10±0.1	1.18±0.2	1.22±0.06	2.0±0.4
id	0.25	0.212	0.0121	0.136

(б) Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , mM		
	0.25	0.5	1.0
psrcC	0.9±0.1	0.9±0.06	0.98±0.05
pBR3.2	1.01±0.02	0.94±0.1	1.04±0.04
id	0.625	0.663	1.296

(в) Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду CaCl₂ и различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , mM	
	0.5	1.0
psrcC	0.98±0.07	1.01±0.04
pBR322	1.17±0.1	1.23±0.2
id	3.72	2.4

E. coli связано с плохой проницаемостью этих веществ внутрь клеток. Поэтому в дальнейших экспериментах в среду добавляли CaCl₂, который, как известно, повышает проницаемость мембран клеток *E. coli*. В табл. 1в приведены данные об изменении величины *k* в зависимости от изменения концентрации ортованадата в среде при добавлении CaCl₂. Наблюдается зависящее от концентрации ингибитора изменение величины *k* в случае с культурой *E. coli*/pBR322 и практически полное отсутствие ингибирования культуры *E. coli*/psrcC. Различия, наблюдаемые между двумя культурами, достоверны по критерию Стьюдента. Сходная картина наблюдается и при использовании для инкубации бактерий минимальной солевой среды M9 (табл. 2а и б).

Таким образом, из полученных данных видно, что оба соединения NaF и Na-ортованадат в условиях *in vivo* приводят к ингибированию

Таблица 2. (а) Степень ингибирования (b) *E. coli/psrC* и *E. coli/pBR322* при добавлении в минимальную среду (М9) различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	k для различных концентраций Na_2VO_4 , mM				
	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
psrC	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.12 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.1	1.24 $\pm$ 0.13
pBR322	1.16 $\pm$ 0.2	1.12 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.12 $\pm$ 0.05	1.05 $\pm$ 0.03
id	0.314	0.77	0.444	0.821	2.06

(б) Степень ингибирования (k) *E. coli/psrC* и *E. coli/pBR322* при добавлении в минимальную среду (М9) CaCl_2 в различных концентрациях ортованадата Na.

Культуры	k для различных концентраций Na_2VO_4 , mM				
	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
psrC	1.32 $\pm$ 0.3	1.36 $\pm$ 0.2	1.36 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.01	1.5 $\pm$ 0.06
pBR322	1.53 $\pm$ 0.4	1.49 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.02	1.4 $\pm$ 0.05	1.72 $\pm$ 0.03
id	1.35	3.182	1.582	2.52	4.318

роста культур *E. coli*. Однако, если NaF в одинаковой степени ингибирует обе исследованные культуры *E. coli*, то Na-ортованадат по-разному влияет на них. Величина k в случае с культурой *E. coli/pBR322* существенно больше, чем в случае с *E. coli/psrC*. Полученные данные указывают на то, что проявление тирозинспецифической протеинкиназной активности в клетках *E. coli/psrC* приводит к изменению физиологического состояния клеток, выражающемуся в аномальной реакции клеток на ортованадат Na. Неодинаковая реакция культур на ортованадат Na указывает также на то, что изменение физиологического состояния клеток *E. coli/psrC* связано с фосфорилированием по тирозину белков в клетке, что стимулирует их пролиферативную активность. Другим возможным объяснением этого явления может быть изменение под действием ортобелка α 8с мембраны клеток *E. coli/psrC* таким образом, что она практически становится непроницаемой для ортованадата Na.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н. С., Налбандян Н. Г., Малинские Н. Н., Татосян А. Г. Мол. биол., 55, 127—133, 1989.
2. Амбарцумян Н. С., Налбандян Н. Г., Фадорова О. О., Татосян А. Г. Мол. биол., 1992 (в печати).
3. В кн. Метаболизм микроорганизмов (под ред. Н. С. Егорова), изд-во Московского университета, Москва, 1986 г., с. 114—116.
4. Corcoran A. J. Ann. Rev. Microbiol., 42, 97—112, 1988.
5. Erikson R. L., Collett M. S., Erikson A. F. Putsch. PNAS USA, 76, 6260—6264, 1979.
6. Kamps M. P., Sefton B. M. Oncogene, 2, 315—315, 1988.

Поступило 22.VII 1991 г.

ԿԵՂԵԼԻ ՇԱՐԺԻՉ ԳՈՏՈՒ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԵՅՏԵՐՍԻ ԱՆԴԱՍՏԱԿԱՑԻՆ ԿՈՐԻՔԻ ՆԵՅՐՈՆԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԹՐԹՈՒՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՄԱՆԱԽՐՈՒՄ

Շ. Ի. ԱՊԼԱՏՅԱՆ, Ո. Գ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ս. Մ. ԽՆԱՍՅԱՆ, Ն. Կ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ԱՊԱՏԱԿԱՆ ԵՄԻՍԿՈՒՄԻՆ, ՄԱՐԳՈՒ Ե ԿԵՆՏՐԱԼԻՆԵՐԻ ԻՐԻՓԻՈԳԻՏԻՅԻ ՎԵՐԻՈՆ

Կեղևի շարժիչ շրջանի տարրեր հաճախությամբ էլեկտրական խթանումը բնականոն հաղարների Դեյտերսի կորիքի նեյրոնների ակտիվության վրա թողնում է դրոշմ ազդեցություն՝ վերջինիս ղեկավարմամբ, ծածկ հաճախությամբ (5 Հց) թրթռումն ուժեղացնում է կեղևի ազդեցիկությանը և թուլացնում դրոշմ ազդեցությունը:

Изучены характер и изменение фоновой импульсной активности и реакция нейронов ядра Дейтерса на раздражении моторной области коры до и после воздействия вибрации. Раздражение моторной зоны коры вызывает усиление тормозного влияния коры на нейроны вестибулярного ядра Дейтерса всех частотных диапазонов. Низкочастотная вибрация усиливает тормозное и ослабляет возбуждающие кортикафугальное воздействие на активность вестибулярных нейронов.

Character and change of the background impulse activity and reaction of neurons of Deyters' nucleus on irritation of cortex before and after vibration influence are studied. Low-frequent vibration increases brake and decreases stimulating, corticofugal influence on the activity of vestibular neurons.

Կեղևի շարժիչ շրջան—անցատակսյին կորիք—հեյտեմային ակտիվություն:

Թրթռման պայմաններում անդաստակային վերլուծիչ խանգարումների պատճառները բացատրելու նպատակով ուսումնասիրվել է Դեյտերսի կորիքի նեյրոնների ֆոնային ակտիվության բնույթը և պատասխան ունակության կեղևի շարժիչ շրջանի էլեկտրական դրոշմանը մինչև թրթռումը և դրանից հետո:

Նյութ և մեթոդիկա: Հետազոտությունները կատարվել են հազարների վրա սուր խորձ պայմաններում: Կենդանիները թմբեցվել են քլորալոզով և նեմբուտալով (30 և 10 մգ/կգ համապատասխանաբար): Կեղևի շարժիչ շրջանի զրգոմբ կատարվել է 0,2 մմ տրամագիծ ունեցող կոնստանտանի երկրենու էլեկտրոդներով, իմպուլսի տևողությունը 0,1 մվ, հոսանքի ուժը 0,8—0,12 մԱ, լարվածությունը 1—10 վ: Հաճախությունը 8 և 64 Հց, տևողությունը 5—10 վ: Երկարաժամ ուղիղի Դեյտերսի անդաստակային կորիքի նեյրոնների իմպուլսային ակտիվությունը գրանցվել է արտաբջջային եղանակով 4 մոլ կերակրի աղի լուծույթով լցված ապակե միկրոէլեկտրոդներով (տրամագիծը 1—2 մկմ, դիամետրությունը 1,5—5 ՄՕՄ):

Դեյտերսի անդաստակային կորիքի կոորդինատները որոշվել են ըստ Կրեյդիչի (5): Նեյրոնների ֆոնային ակտիվությունը գրանցելուց հետո կենդանիները ենթարկվել են հորիզոնական թրթռման (հաճախությունը 5 Հց, տևողությունը 30 ր): Դեյտերսի կորիքի նեյրոնների ճանաչումը կատարվել է դրանց ելակետային ակտիվության հաճախեցմամբ կամ դանդաղեցմամբ, լարերիթմոսի կյոթ պատուհանը անոդով կամ կատոդով դրոշմելիս (հոսանքի ուժը 50—300 ՄԿԱ) (13):

Ազգյունեցիները և բնակավայրերը: Ուսումնասիրվել է բնականոն ճագարների Դեյտերսի կորիզի 110 նեյրոն: Գրանցվել է 2 տիպի ելակետային ակտիվություն՝ կանոնաւոր և անկանոն ռիթմով մեկական իմպուլսներ (100 քիչ՝ 90,9 %) և խմբային լիցքեր (10 քիչ՝ 9 %): Կլոր պատուհանի բևեռացմանը պատասխանել են մեկական իմպուլսային ակտիվությամբ օժտված 85 նեյրոններ, որից 22-ը (25,8 %) լիցքավորվել են 10 իմպլվ հաճախությամբ (միջիմպուլսային ժամանակահատվածը $125 \pm 12,7$ մվ): 38 նեյրոնների (44,7 %) հաճախությունը տատանվել է 11—30 իմպլվ սահմաններում (միջիմպուլսային ժամանակահատվածը $60 \pm 6,3$ մվ): 19 նեյրոն (22,3 %) ունեցել են 31—50 իմպլվ հաճախություն (միջիմպուլսային ժամանակամիջոցը $36 \pm 4,6$ մվ), իսկ 6 նեյրոն (7 %) ունեցել են 51 իմպլվ և ավելի հաճախություն:

Կեղևի շարժիչ շրջանի էլեկտրական գրգռմանը 85 նեյրոններից 72-ը պատասխանել են փուլային և տռիկ ընույթով: Ստացված տվյալների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ կեղևի շարժիչ շրջանի ցածր և բարձր հաճախությամբ էլեկտրական գրգռումը հիմնականում արգելել է Դեյտերսի կորիզի նեյրոնների ակտիվությունը (աղ.): Կեղևի արգելակող ազդեցությունը զրոսեղծվել է ելակետային ակտիվության տռիկ նվազմամբ, իսկ որոշ փորձերում զրանցվել է ակտիվության դադար 200—1000 մվ տեղոթյամբ: Կեղևի շարժիչ շրջանը խթանելիս բացահայտվել է որոշակի կապ Դեյտերսի կորիզի նեյրոնների ելակետային ակտիվության և պատասխանի մեծության հետ: Դեյտերսի կորիզի նեյրոնների ելակետային ակտիվության հաճախության մեծացմանը զուգընթաց ինչպես ցածր, այնպես էլ բարձր հաճախություններով գրգռումը ուժեղացրել է կեղևի արգելակիչ և թուլացրել զրդի ազդեցությունը:

Այսպես, եթե կեղևի շարժիչ շրջանի էլեկտրական գրգռումը (8 և 64 Հց) 31—50 իմպլվ հաճախության նեյրոնների 57,8—63 % մոտ է առաջացրել լիցքերի պակասում, ապա 50 իմպլվ և բարձր հաճախություն ունեցող նեյրոնները պատասխանել են միայն արգելակմամբ: Կեղևի շարժիչ շրջանի էլեկտրական խթանման դեպքում Դեյտերսի կորիզից պրանցված 20—22 % նեյրոնների մոտ (հատկապես ցածր և միջին հաճախության) դիտվել է հեղացնող ազդեցություն: Հիմնականում պատասխան ունակցիան զրոսեղծվել է իմպուլսային ակտիվության տռիկ հաճախեցմամբ:

Կենդանիներին ցածր հաճախության թրթուման ենթարկելուց հետո գրանցվել է 100 նեյրոն, որից 80-ը ունեցել են մեկական, 20-ը՝ խմբային լիցքերով ակտիվություն: Գրանցված նեյրոններից 70-ը պատասխանել են կլոր պատուհանի բևեռացմանը: Թրթումից հետո դիտվել է ելակետային բարձր հաճախության նեյրոնների զերակշռում, խմբային լիցքերով նեյրոնների քանակի, խմբում լիցքերի թվի ավելացում և միջիմպուլսային ժամանակահատվածի փոքրացում: Վերջինս վկայում է հոթրթուման շրջանում Դեյտերսի անդաստակային կորիզի նեյրոնների զրդողականության բարձրացման մասին: Եթե միևն թրթումը 1—10 իմպլվ հաճախության նեյրոնները կազմել են 25,8 %, թրթումից հետո նման նեյրոնների թիվը պակասել է (13,8 %) և ավելացել 50 իմպլվ և բարձր հաճախություն ունեցող միավորների թիվը: Այն կազմել է 18,5 %՝ ելակետային 7 %-ի դիմաց: Ստացված տվյալներից հետևում է, որ թրթումը ուժեղացրել է կեղևի շար-

միլ շրջանի արդեւակիւն և թուլացրել զոգիւն ազդեցութիւնը Դեյտերսի անգաստակային կորիզի ներոններէ վրա ինչպէս ցածր, այնպէս էլ բարձր հաճախութիւնով գրգռելիս: Այդ մասին է վկայում արգելակվող և զրգվող ներոնների փոփոխութեանը: Եթէ միւշ քրթումը ցածր հաճախութեամբ զրգումներ արգելակվամբ պատասխանել են դրանցած ներոնների 62,3 % -ը, ապա քրթումից հետո այն կազմել է 70 % : Նույն օրինաչափութիւնը նկատվել է նաև բարձր հաճախութեամբ զրգոնելիս (64,7 % -ից դարձել է 72,8 %) :

Այսպիսով, ստացված տվյալները վկայում են, որ կ-դ-ի շարժիչ շրջանի էլեկտրական խթանումը քրթումից առաջ և հետո էլեկտրապոն ուղեղի Դեյտերսի անգաստակային կորիզի բոլոր հաճախութիւնների ներոնների վրա հիմնականում թողնում է արգելակիչ ազդեցութիւն: Համեմատան տվյալներ ստացվել են այլ հեղինակների կողմից (2,4) : Կեղեխախոյս ազդեցութեան արգելակիչ տիպի գերակշռումը թույլ է տալիս ենթադրելու, որ անդաստակային կորիզի ներոնների իմպուլսային ակտիվութեան փոփոխութեան բրնուցթում էական դեր է խաղում կեղեի ազդեցութիւնը արգելակիչ համակարգի վրա, որոնք ներկայացված են ինչպէս կողմնային, այնպէս էլ եռհպումային հակադարձ արգելակվամբ (19) : Կեղեի վայրիջակ արգելակիչ ազդեցութիւնը, ըստ երևոյթին, սահմանափակում է անդաստակային ներոններէից եկող անընդհատ իմպուլսացիան, այսինքն ապահովում է դեպի կեղե գնացող կենսարանորեն կարեւոր ազդանշանների ընտրութիւնը (4, 5, 6) : Միևնույն ժամանակ անհրաժեշտ ինֆորմացիայի հաղորդման հուսալիութեան համար կեղեխախոյս ուղիներով համակցող կորիզներին տրվում են նաև հեշտացնող հրահանգներ :

Քրթումից հետո Դեյտերսի կորիզի ներոնների հաճախութեան տեղաշարժը դեպի բարձր ակտիվութեան միավորները, խմբային լիցքերով պատասխանող միավորների թվի ամբլացումը մասնակիորեն համապատասխանում են այն հեղինակների տվյալներին, որոնք ուսումնասիրել են անդաստակային կորիզների ներոնների ռեակցիան գլխի թեքումների, շառավղային արագացման և մարմնի ուղղահայաց ճոճումների դեպքում (1,7) : Այն փաստը, որ քրթումն ուժեղացնում է կեղեի արգելակող և թուլացնում զրգող վայրիջակ ազդեցութիւնը Դեյտերսի կորիզի ներոնների վրա, անտարակոյս, վկայում է կեղեի զրգունակութեան բարձրացման մասին : Կրական տվյալների համաձայն կեղեի վրադրումը 0,1 % ստրիխնինով առաջացնում է անդաստակային կորիզի ներոնների արգելակիչ ռեակցիաների ուժեղացում, իսկ կեղեի տարածվող ընկճումը՝ զոգիւն ռեակցիաների ուժեղացում (5) : Բերված տվյալները վկայում են, որ կեղեի կարգավորիչ ազդեցութիւն է թողնում անդաստակային կորիզների ներոնների ակտիվութեան վրա : Քրթումից հետո կեղեի արգելակիչ ազդեցութեան ուժեղացումը կարելի է դիտել որպէս պաշտպանական ռեակցիա անդաստակային ընկալիչի զրգումանը : Եթէ անդաստակային զրգումների դեպքում գլխուղեղի կեղեում չգերակշռեն արգելակիչ պրոցեսները, ապա գլխի մարմնի քանկացած թեքում կուղեկցվեր տանջալից գլխապտույտներով :

Յիսուղեղի կեղեի հանդիսանալով անդաստակա-, մարմնա-զգայական և ընդերային վերլուծիչների կարգավորիչ կենտրոն, քրթման դեպքում ինքրևս գտնվում է վերելակ բազմաթիւ իմպուլսների ազդեցութեան ներքո, որը և պայմանավորում է կեղեի վայրիջակ արգելակիչ ազդեցութեան տարբեր

Կենդանի շատիկ շրջանի կենտրոնական դրոշման սզղեցությունը Դեյանեսի կոհիգի նեյրոնների ակտիվության վրա րրրոմից առաջ (Ա) և նետո (Բ)

Նեյրոն- ների խմբերը իմպւլ իմպւլ	Նեյրոնների թիվը		Ց ա ծ ր Հաճախությամբ գրգռում						Ք ա ր ձ ր Հաճախությամբ գրգռում					
			Հաճախացում			նվազում			ուճակտիվ			Հաճախացում		
	բաց.	թիվ	բաց.	թիվ	%	բաց.	թիվ	%	բաց.	թիվ	%	բաց.	թիվ	%
1—10	22	25.8	8	36.3	11	50	3	13.6	7	31.7	12	54.5	3	13.6
11—30	38	44.7	8	21	24	63	5	13	7	18.4	26	68.9	5	13
31—50	19	22.2	3	15.7	12	63	4	21	3	15.7	11	57.8	5	26.3
51 և ավ.	6	7		5	89.3	1	16.6				6	100		
Միջին	85		19	22.3	53	62.3	13	15.2	17	20	55	64.7	13	15.2
Բ														
1—10	9	13.8	3	33.3	4	44.4	2	32.2	3	33.3	4	44.4	2	22.2
11—30	28	40	5	17.5	19	67.8	4	14.2	4	14.2	20	71.4	4	14.2
31—50	20	28.5	3	15	15	75	2	10	2	10	16	80	2	10
51 և ավ.	13	18.5		11	84.6	2	15.3				11	84.6	2	15
Միջին	70		11	15.7	49	70	10	14.2	9	12.8	51	72.8	10	14.2

ՆՈՒՄԱՐ 3

1. Дмитриев А. С., Тейц М. Ю., Дудика Т. В., Кандыбо Т. С., Ахирев О. И. Маг. VI Всес. конф. по физиол. ВНС, Ереван, 1986
2. Краснополяский С. З., Райцес В. С. Нейрофизиология, 1987, 19, 6.
3. Крейдиц Ю. В. Журн. высш. нервн. деят., 1974, 24, 4.
4. Райцес В. С., Шляховецко А. А. Физиол. ж. СССР, 1972, 58, 3.
5. Райцес В. С. 3 кн.: Современные тенденции в нейрофизиологии. Л., 1977.
6. Фанарджян Б. Б., Саркисян В. А. Сенсорные системы, 1987, 1, 1.
7. Chubb C., Fusha A., Scudder Ch. J. Neurophysiol., 1, 1. 1984.
8. Kempinsky W. H. J. Neurophysiol., 14, 3. 1951.
9. Precht W. Vestibular system. Function and morphology. New-York, 1961.

Մուտքագրված է 28. 11. 1992

Биолог. журн. Армении № 1.(46).1993

УДК 577.15234—612.744

КАТЕПСИН D ИЗ СЕРДЦА КРЫС: ОЧИСТКА, НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА И ДЕЙСТВИЕ НА АКТОМИОЗИН И ТРОПОМИОЗИН

Р. Г. КАРАПЕТЯН*, А. И. ОГАНИСЯН, Т. Н. АКОПЯН

*НИИ кардиологии МЗ Армении, ИМБ АН Армении, Ереван

Из миокарда крыс выделен катепсин D. Фермент представлен тремя изоформами со значениями pI 5,0, 5,4, 7,3; молекулярная масса его около 45 кДа. Фермент расщепляет нативный актомиозин (K_M $1,2 \times 10^{-6} M$), но не деградирует нативный тропомиозин.

Առանձին մոլեկուլային անջատվել է կատեպսին D, ներմենար ներկայացված է հիմնական (pI 5,0; 5,4; 7,3,) և նրկորդական (pI 3,5; 4,0) իզոմերներով, ներմենար մոլեկուլային մասնակցությունը 57 կԳ է: Ներմենար թայթայում է բնական ակտոմիոզինը ($K_M=1,2 \cdot 10^{-6} M$) և չի թայթայում բնական տրոպոմիոզինը:

Cathepsin D was isolated from rat myocardium. The enzyme is performed in major (pI 5,0; 5,4; 7,3) and minor (3,5; 4,0) isoforms. Molecular mass of enzyme is about 57 kDa. The enzyme degrades native actomyosin ($K_M=1,2 \cdot 10^{-6} M$), but not native tropomyosin.

Сердце—катепсин D—актомиозин—тропомиозин.

Катепсин D участвует в деградации отдельных миофибриллярных белков миокарда [5, 10], но поскольку в акте сокращения—рас-;слабления мышц участвуют белки в составе комплекса, то доступность индивидуальных белков к катепсину D может отличаться от такового в составе комплекса.

Следует отметить, что работы по изучению протеолитических ферментов мышечной ткани малочисленны. Это в основном связано

Сокращения: НАМ—нативный актомиозин, НТМ—нативный тропомиозин

с низкой протеолитической активностью мышечной ткани, особенно миокардиальной.

Целью настоящей работы было выделение катепсина D из миокарда крыс и изучение некоторых его свойств, включая действие на НАМ и НТМ¹.

Материал и методика. В опытах использованы 50 белых беспородных крыс-самцов массой 180—200 г. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декантировали, сердце отмыкали от остатков крови физиологическим раствором, очищали от остатков жира и соединительной ткани и хранили при -15° .

НТМ получали из синтетико-эфирного порошка скелетных мышц крыс по методу [4]. НАМ из скелетных мышц крыс был любезно представлен М. А. Кайфаджан (Ин-т кардиологии МЗ РА).

Активность катепсина D оценивали флуоресцентным методом, используя в качестве субстрата гемоглобин, модифицированный пиридоксаль-5-фосфатом [2]. Пробы объемом 0,6 мл содержали 0,05 М цитратный буфер, pH 3,2, 100 мкг белого субстрата и соответствующее количество фермента. После инкубации в течение 1 ч реакцию останавливали добавлением 0,13 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования pH супернатанта доводили до 5,5 1М цитратом натрия и измеряли флуоресценцию раствора при 410 нм (возбуждения 330 нм). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование фосфолиридоксильных пептидов, флуоресценции которых соответствовали величине 0,5 по шкале [1]. Удельную активность выражали в единицах активности на мг белка.

Расщепление НАМ и НТМ определяли флуоресцентным методом с помощью о-фталдигальдегида [1]. Пробы объемом 0,25—0,35 мл содержали обычно 200—400 мкг белкового комплекса в 0,05 М цитратном буфере, pH 3,2, и 50—60 мкг очищенного катепсина D. После инкубации в течение 1—4 ч при 37° реакцию останавливали добавлением перхлорной кислоты до конечной концентрации 1%. После центрифугирования 0,1—0,2 мл супернатанта смешивали в кювете спектрофлуориметра с 0,01%-ным раствором о-фталдигальдегида в количестве 0,2—0,4 мл в 0,8 М боратном буфере (pH 9,7), содержащем 2×10^{-4} М бетамеркаптоэтанол. Через 1 мин добавляли 1,5 мл H_2O и измеряли флуоресценцию при 445 нм (возбуждение при 350 нм) на спектрофлуориметре «Ferrand» (США).

Для определения K_m и V_{max} НАМ, содержащийся в пробе в концентрациях 200—1000 мкг, инкубировали с 60 мкг катепсина D в течение 1 часа при 37° .

Определение оптимума pH активности проводили в 0,025 М цитрат-фосфатном буфере при pH 2,6—7,0. Инкубационная среда содержала 300 мкг НАМ и 60 мкг катепсина D. Пробу инкубировали в течение 1 часа при 37° . Активность измеряли с помощью о-фталдигальдегида, как описано выше.

Электрофорез проводили в ПААГ по модифицированному методу Лемли [6].

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8] и Брэдфорда [3], а также по измерению поглощения при 280 нм.

Результаты и обсуждение. Очистка катепсина D. Всю процедуру очистки фермента проводили при 4° . Сердечную ткань измельчали, растирали в 0,025 М ацетатном буфере при pH 4,5, содержащем 0,2%-ный Тритон X-100 в гомогенизаторе Поттера в соотношении 1:2 (вес/объем). Полученную тканевую суспензию перемешивали в течение 20 мин, затем центрифугировали при $10000 \times g$ 30 мин. Надосадочную жидкость отделяли повторным центрифугированием при $90000 \times g$ 60 мин.

Полученный после центрифугирования надосадок наносили на колонку с SP-сефадексом C-50 ($2,5 \times 10$ см), предварительно уравновешенную 0,025 М ацетатным буфером, pH 4,5. Адсорбированные бел-

ки элюировали линейным градиентом 0—1 М NaCl. Фракции, соответствующие пикам активности, объединяли.

В препарат фермента добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 20%-ного насыщения и через 2 ч центрифугировали при $20000 \times g$ 15 мин. Белок из надосадочной жидкости осаждали добавлением сульфата аммония до 70%-ного насыщения. После центрифугирования при тех же условиях образовавшийся осадок растворяли в 0,025 М трис-HCl буфере (pH 7,6) и анализировали в течение 15 ч против 200-кратного объема того же буфера с однократной его сменой.

Препарат после диализа наносили на колонку ДЭАЕ сефадекса А-50 ($3,5 \times 10$ см), уравновешенную 0,025 М трис-HCl буфером, pH 7,6. Фермент элюировали градиентом 0—1 М NaCl. Профиль элюции показал наличие нескольких пиков активности, характерных для катепсина D, что указывает на наличие изоформ этого фермента. Активные фракции объединяли и осаждали сульфатом аммония при 70%-ном насыщении. После центрифугирования при $20000 \times g$ 15 мин осадок растворяли в 0,025 М фосфатном буфере, pH 7,6.

Раствор белка, полученный после осаждения сульфатом аммония, наносили на колонку с сефадексом G-75 ($2,5 \times 60$ см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером (pH 7,6) и фракционировали тем же буфером. Фракции, имеющие наибольшую активность, объединяли и использовали в дальнейших опытах.

Результаты очистки катепсина D из миокарда крыс.

Стадия очистки	Общий белок, уг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг
Экстракт $90000 \times g$	1895.0	3.60.0	1.72
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20—70%)			
SP—сефадекс G50	377.0	2951.0	7.8
ДЭАЭ—сефадекс А50	98.3	2570.0	26.1
Сефадекс G75	12.0	1537.0	128.0

Результаты очистки катепсина D просуммированы в таблице. Предложенная процедура очистки позволяет получить препарат фермента с удельной активностью 128 ед. акт./мг белка, что составляет 158-кратную очистку по белку по сравнению с экстрактом миокарда, полученным после центрифугирования при $90000 \times g$ в течение 60 мин. Выход общей активности составляет 47,1%.

Некоторые свойства катепсина D. Согласно полученным нами данным, очищенный препарат катепсина D сохраняет полную активность в течение 1,5—2 месяцев при хранении в 0,025 М фосфатном буфере (pH 7,6) при -15°C ; через 10 месяцев хранения при тех же условиях теряется 50% активности.

Восстанавливающий SH-группы агент дитиотрейтол в концентрации 10^{-3} М не влияет на активность фермента. Специфический

ингибитор катепсина D пепстатин в концентрации 10^{-3} М практически полностью ингибирует выделенный фермент.

Изофокусировка препарата фермента после гель-фильтрации на сефадексе G-75 в смеси 1% амфолинов (рН 3,0—10,0) позволила установить, что катепсин D в миокардиальной ткани крыс присутствует в виде трех основных изоформ со значениями pI 5,0; 5,4 и 7,3, а также двух минорных форм с pI 3,5 и 4,0, что согласуется с литературными данными об изоферментном составе катепсина D.

По оценкам разных авторов, молекулярная масса катепсина D варьирует в пределах 42—58 кДа [9, 11]. Определение молекулярной массы фермента из миокарда крыс с помощью хроматографии на колонке сефадекса G-75 ($3,5 \times 10$ см) с использованием стандартных белков позволило установить, что она составляет 45 кДа. Диск-электрофорез изофермента катепсина D со значением pI 5,4 в 10% ПААГ с 0,1% ДСН показал наличие основной полосы с молекулярной массой 57 кДа и минорной—14 кДа, которая, по-видимому, обусловлена частичным загрязнением препарата.

Дегградация актомиозина и тропомиозина катепсином D. Результаты изучения действия катепсина D на миофибриллярные комплексы НАМ и НТМ показали, что НТМ практически не расщепляется под действием фермента, в то же время идет относительно интенсивное расщепление актомиозина. Причем увеличение отношения белок/фермент увеличивает скорость деградации белка.

Результаты изучения рН-зависимости деградации актомиозина под действием катепсина D показали, что деградация белка наиболее эффективно протекает в области рН 3,0—4,0 и совпадает с рН оптимумом деградации гемоглобина [7].

Изучение зависимости начальной скорости реакции деградации катепсином D актомиозина от его концентрации показало, что полученная кривая представляет собой типичную картину насыщения и значение K_m составляет $1,2 \times 10^{-5}$ М. Отметим, что, согласно группе авторов [5], K_m деградации индивидуальных миофибриллярных белков катепсином D из сердца собаки следующие: миозина— $2,7 \times 10^{-5}$ М, альфаактина— $10,0 \times 10^{-6}$ М, актина— $13,0 \times 10^{-6}$ М и тропомиозина— $45,0 \times 10^{-5}$ М, что находится в пределах значения K_m , полученного нами. Анализ данных позволяет предположить, что катепсин D способен деградировать НАМ с равной или с большей эффективностью, чем индивидуальные белки.

Таким образом, разработан сравнительно простой метод получения очищенного препарата катепсина D из миокарда крыс, даны некоторые его характеристики и показана возможность его участия в деградации сократительных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азопьян Т. Н., Арутуныан А. А., Оганисян А. Л., Латта А., Галоян А. А. J. Neurochem., 32, 629—631, 1977.
2. Азопьян Т. Н., Арутуныан А. А., Латта А., Галоян А. А. Neurochem. Res., 3, 89—99, 1978.

3. Bradford M. E. *Anal. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
4. Greaser M. L., Gergely G. *J. Biol. Chem.*, 246, 4226—4233, 1971.
5. Jones T. L., Ogunro E. A., Samarel A. M., Ferguson A. G., Iesch M. *Amer. J. Physiol.*, 245, H294—H299, 1983.
6. Laemli U. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
7. Lapresle C., Webb T. *Biochem. J.*, 81, 455—492, 1962.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
9. Press E. M., Proteu R. R., Cerba J. *Biochem. J.*, 74, 501, 1960.
10. Schwartz W. N., Blind J. W. C. *Biochem. J.*, 167, 811—820, 1977.
11. Widerander B., Kirahka H., Schaper S., Jualler M., Kay J. Eds. Kostka V., W. de Gruyter. 117—121, Berlin, 1985.

Биол. журн. Армения № 1 (46) 1993

УДК 632.71:631.523

ТРАНСГРЕССИВНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ТАБАКА

В. А. МАРКАРЯН

Ариэнский сельскохозяйственный институт, Ереван

Установлено, что в расщепляющихся гибридных популяциях у табака проявление положительных трансгрессий по количеству листьев зависит от эффекта общей комбинационной способности родительских сортов, а их частота и степень — от типа наследования признака в F_1 . Перспективные линии в большей степени отмечались в потомстве гибрида, у которого в F_1 обнаружен отрицательный гетерозис и детерминация высокого показателя признака осуществляется рецессивными полигенами.

Հաստատված է, որ ճեղքվող հիբրիդային պոպուլյացիաների դեպի դրական տրանսգրեսիաների դրսևումը կախված է F_1 զուգակցությունների ձևախմբի մեծի ընդհանուր կոմբինացիոն ունակության էֆեկտից, իսկ նրանց համախմբականը է «ստիմուլ» առաջին սերնդում համակներին ժառանգման տիպից: Հետևարաբան «զենքը մեծ քանակությամբ հալաների դե համակառն»-յն զուգակցության սերնդում, որտեղ F_1 -ում նկատվել է բացասական հետերոզիս, իսկ առանձնաբերվող համակների բարձր ցուցանիշը պայմանավորվել է սեքսով գենների գերտեսակությամբ:

It is ascertained, that in tobacco disintegrating hybrids generations the display of positive transgressions of a number of leaves depends on the effects of general combining ability of parents' sorts, but their frequency and degree on the type heritable in F_1 . Perspective lines are mainly discovered in which in F_1 negative heterosis is observed and the high indicator of the investigated quality is connected with the activity of recessive genes.

Растения табака — трансгрессивная изменчивость — комбинационная способность — рецессивные полигены.

Впервые у внутривидовых гибридов табака трансгрессивную изменчивость по количеству и размерам листа наблюдали еще в 1921 г. [12]. В дальнейшем положительные трансгрессии были установлены также по количеству [2, 6, 8, 10, 14] и размерам листьев [9], продуктивности [3—5, 7] и другим признакам. В этих работах отмечает-

Сохранения ОКС — общая комбинационная способность, СКС — специфическая комбинационная способность, РЭ — реципрокный эффект.

ся зависимость проявления трансгрессий от генотипов скрещиваемых пар. При этом важное место придается характеру наследования признаков в F_1 и направленному отбору в старших поколениях. В большинстве случаев трансгрессивные формы выщепляются в таких гибридных комбинациях, в которых наблюдается полное или частичное доминирование признаков лучшего родителя, промежуточное наследование или сверхдоминирование в первом поколении. Установлено также, что трансгрессии не с одинаковой степенью и частотой наблюдаются по всем количественным признакам. По ряду признаков они обнаруживаются чаще, а по остальным—редко или вовсе не отмечаются. В результате направленного отбора часть трансгрессирующих признаков легко приводится в гомозиготное состояние, а другие—сравнительно трудно.

Из приведенного обзора следует, что вопросы трансгрессивной изменчивости у табака обсуждаются в литературе начала нынешнего столетия и этот феномен изучен все еще недостаточно.

В работе приводятся результаты серии экспериментов по выявлению с помощью методов математической генетики генетических причин проявления трансгрессий по количеству листьев и возможности ее прогнозирования на раннем этапе селекции. Вопросы трансгрессивной изменчивости изучали именно по количеству листьев, поскольку этот признак является не только одним из важнейших компонентов продуктивности, но и обнаруживает сильный полиморфизм среди промышленных сортов, легко поддается учету, по сравнению с другими признаками очень слабо подвержен модификационной изменчивости и, следовательно, имеет преимущественно незначительную паратипическую вариабельность.

Материал и методика. Исследования проводились на экспериментальной базе Армянской опытной станции по табаку ИПО «Табак». По дилататорной схеме скрещивали семь сортов табака (Самсун 36, Самсун 959-11, Трапезонд 42, Трапезонд 10, Остролист 44, Юбилейный и Иммуний 580), контрастных по количеству листьев, и получили 42 прямых и реципрокных гибрида, которые в 1981—1982 гг. изучали в четырехкратной повторности при полной рандомизации вариантов во всех повторениях. Каждая делянка опыта занимала 7 м². В дальнейшем исследования продолжали из трех гибридных комбинаций. Опыт закладывали в трехкратной повторности и в каждую повторность включили три блока, куда входили родительские сорта, гибриды F_1 , F_2 и F_3 . У первой гибридной комбинации F_1 состояла из 17 семей, а у второй и третьей—по 30 семей. Блоки, а также варианты в блоках размещали по принципу полной рандомизации. Площадь учетных делянок у P_1 , P_2 , F_1 и F_2 составляла 10,5 м², а у гибрида F_3 —21 м². Количественную оценку трансгрессии проводили по методике Воскресенской и Шпота [1], а комбинационную способность и детерминацию признака определяли по моделям Гриффина [11] и Хеймана [13].

Результаты и обсуждение. Результаты дисперсионного анализа показали, что изучаемые сорта и гибриды, а также вариаансы ОКС и СКС достоверно различаются по количеству листьев (табл. 1). Последнее обстоятельство указывает на то, что генетическая детерминация количества листьев обеспечивается системой, включающей как аддитивные, так и неаддитивные эффекты генон, в которой аддитивные эффекты имеют более важное значение. Недостоверность реципрок-

Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа количества листьев и комбинационной способности сортов табака

Источник варьирова- ния	Средний квадрат	
	1981 г.	1982 г.
Вариантов	53.79*	107.21*
ОКС	126.60*	162.60*
СКС	11.65*	14.81*
РЭ	0.54	0.84
Ошибка	1.09	0.51

* $P < 0.01$.

ных эффектов свидетельствует о незначительном значении цитоплазматических генов в проявлении признака.

Многолистнойю и высоким показателем эффекта ОКС (q_1) характеризуются сорта Самсун 36, Самсун 959-11 и Остроллист 44 (табл. 2). В зависимости от комбинации у гибридов F_1 отмечены отрицательный гетерозис, неполное доминирование и промежуточное наследование признака. Эффекты ОКС в основном соответствуют показателям сортов. Факт несоответствия имел место лишь во втором году исследования у сортов Самсун 959-11 и Остроллист 44.

Соотношение варiances эффектов ОКС ($\sigma^2_{\text{ОКС}}$) и СКС ($\sigma^2_{\text{СКС}}$) свидетельствует о более значительной роли аддитивных эффектов генов в детерминации количества листьев, чем неаддитивные эффекты. Исключение составляют сорта Самсун 959-11 и Остроллист 44.

Наиболее полная информация о генетической детерминации исследуемого признака получена с помощью полигенного анализа Хеймса, который имеет ряд ограничений. Одним из них является необходимость отсутствия эпистаза и генетическом контроле признака. Это доказано однородностью разности $W_i - V_i$ с помощью критерия F , которая соответственно по годам равнялась 0,402 и 0,239, и при $n=5$ (число степеней свободы) была недостоверной.

Расположение линии регрессии и величина степени доминантности $(H_1/D) \frac{1}{2} = 0,698$ и $0,683$ свидетельствуют о неполном доминировании малого числа листьев. Поскольку количество листьев мало подвержено паратипической изменчивости, графики зависимости, так же, как генетические компоненты изменчивости, в разные годы дают сопоставимую информацию. Это подтверждается также идентичным расположением сортов вдоль линии регрессии. Сорта Самсун 959-11 и Самсун 36 с максимальным числом листьев располагаются у первого конца линии регрессии; у них самая высокая сумма варiances и коварiances, т. е. многолистность сортотипа Самсун контролируется почти полностью рецессивными генами. Большее число листьев сорта Остроллист 44 управляется равным соотношением доминантных и рецессивных генов. Все сорта с малым набором листьев концентрируются в их крайней части линии регрессии, что указывает на доминантный характер генов, обуславливающих малое число листьев.

Таблица 2. Количество листьев у сортов и гибридов F_1 , эффекты ОКС (q_1) и вариссы за факторов ОКС ($\sigma^2_{q_1}$) и СКС ($\sigma^2_{\pi^2}$)

Сорт	Самсун 36	Самсун 959—11	Трапезонд 42	Трапезонд 10	Острелист 44	Юбилейный	Иммунный 580	$\hat{q}_1$	$\sigma^2_{q_1}$	$\sigma^2_{\pi^2}$
Самсун 36	54.34 53.61	55.66 54.49	44.69 41.65	44.81 42.30	50.76 49.25	42.84 40.35	43.94 39.44	5.405 4.812	29.163 23.123	10.105 10.620
Самсун 959—11	55.16 54.24	49.04 51.30	59.66 37.37	39.36 39.70	44.78 43.65	39.01 39.51	39.95 33.63	1.531 2.132	2.279 4.512	10.847 12.046
Трапезонд 42	45.60 42.9	47.35 38.65	40.02 37.01	39.11 36.84	49.82 40.42	49.05 37.84	37.43 35.24	-2.129 -2.817	4.465 7.905	1.325 1.882
Трапезонд 10	44.64 42.35	39.91 38.15	38.70 37.0	36.14 31.77	40.76 40.79	39.95 36.25	38.74 35.77	-2.578 -2.857	6.577 8.188	1.535 1.263
Острелист 44	47.34 45.78	41.01 45.27	41.32 41.35	41.89 41.99	49.51 51.21	43.35 17.39	41.74 0.65	1.780 3.499	3.102 12.211	0.681 2.239
Юбилейный	42.69 41.72	38.83 37.16	39.95 35.33	39.68 37.60	43.05 43.86	40.96 39.97	41.51 38.81	-1.570 -1.376	2.398 1.700	4.592 5.366
Иммунный 580	43.60 39.72	49.12 36.47	46.97 34.89	39.80 36.04	40.65 40.20	40.89 39.24	37.99 36.70	-2.441 -3.413	5.894 19.821	1.851 3.138

$$s_{\bar{x}} = \frac{1.017}{0.689}; s_{\bar{d}} = \frac{1.481}{0.975}; НСР_{\text{ос}} = \frac{2.902}{1.911} \cdot (\hat{q}_1 - \bar{q}_1) = \frac{0.393}{0.270}.$$

* [Примечание. в числителе приведены данные 1981 г., в знаменателе—1992 г.

Следовательно, в данной группе сортов изменения количества листьев в сторону возрастания управляются рецессивными генами, что подтверждается также величиной коэффициента корреляции между показателем признака (x_p) и суммой вариантов и коварианс ($W_2 + V_2$), который равен $r_{x_p, W_2 + V_2} = 0,204$ и $0,203$, а также параметром F , который в оба года у сортов Самсун 959-11 ($F = -78,51$ и $-88,45$) и Самсун 36 ($F = -39,35$ и $-55,27$) имел отрицательное значение. Эта информация исключительно важна для селекционеров, поскольку при вовлечении указанных сортов в гибридизацию ценные трансгрессионные формы могут выщепляться в старших гибридных поколениях, по мере перехода положительных рецессивных полигенов в гомозиготное состояние.

Именно поэтому представляло исключительный интерес изучение наследования количества листьев в потомстве гибридов, родительскими формами которых являлись вышеотмеченные сорта, и в первом гибридном поколении у них наблюдался положительный (Самсун 36 × Самсун 959-11) или отрицательный (Самсун 959-11 × Остролист 44) гетерозис, а также промежуточное (Самсун 36 × Трапезонд 42) наследование.

Как следует из данных, приведенных в табл. 3, в комбинации С-36 × С-959-11 у гибридов F_2 появляются трансгрессивные формы, их достаточно много и в семьях F_3 , но степень и частота трансгрессий в большинстве семей ниже, чем в F_2 . Из 17 изученных семей лишь у 9 наблюдалось трансгрессивное расщепление и только у двух семей — степень и у пяти — частота трансгрессий выше по сравнению с гибридом F_2 . Следует также отметить, что у всех семей выщепляются отдельные растения, которые по количеству листьев превосходят исходные генотипы в F_2 .

У гибрида С-959-11 × О-44 из 30 изученных семей F_3 трансгрессивные формы наблюдались у 9. У 8 семей степень и частота трансгрессий была гораздо выше, чем в популяции F_2 . У 5 семей средний показатель признака достоверно превосходил исходные растения в F_2 , а у остальных — наблюдалось заметное снижение показателя признака в популяциях F_3 . Частота и степень трансгрессий у этой комбинации была более выраженной, чем у предыдущей.

У гибридной комбинации С-36 × Т-42 в популяции F_2 не обнаружены растения, которые превосходят лучший родительский сорт. В потомстве одного растения, отобранного из F_2 , выщепились формы, которые по максимальному значению признака превосходили аналогичный показатель в F_2 и лучшего родителя. У остальных семей показатель количества листьев значительно уступал исходному растению, хотя большинство семей F_3 по максимальному значению признака превосходили его.

Таким образом, в расщепляющихся гибридных популяциях табака проявление положительных трансгрессий по количеству листьев зависит от эффекта общей комбинационной способности исходных

Таблица 3. Данные количественной оценки трансгрессии по количеству листьев

Родительские сорта и поколение растений у гибридов	Количество листьев на растении у гибрида F ₂	Количество листьев на растениях у исходных форм и гибридов		Степень трансгрессии	Частота трансгрессии
		максимальное значение	среднее значение		
Самсун 36XСамсун 959-11					
P ₁	—	60.6	51.1	—	—
P ₂	—	58.8	43.2	—	—
F ₁	—	63.0	47.7	—	—
F ₂	—	65.2	49.7	7.59	6.30
F ₃	48.0	63.0	52.6	3.96	5.32
F ₃	52.0	61.0	51.0	0.36	5.0
F ₃	60.0	67.8	49.1	11.82	6.59
F ₃	58.0	64.4	50.5	6.27	6.06
F ₃	59.0	64.4	51.5	6.27	6.52
F ₃	55.0	68.2	52.4	12.54	10.91
F ₃	47.0	63.0	45.3	3.96	3.14
F ₃	57.0	61.4	53.7	6.27	14.16
F ₃	55.0	62.6	48.9	3.20	6.74
Самсун 959-11XОстролист 44					
P ₁	—	58.0	46.4	—	—
P ₂	—	56.8	50.6	—	—
F ₁	—	54.8	43.9	—	—
F ₂	—	61.6	42.4	3.01	2.10
F ₃	47.0	65.2	48.5	9.03	8.26
F ₃	51.0	63.8	44.8	6.69	3.65
F ₃	50.0	69.2	53.5	15.72	21.59
F ₃	50.0	69.4	45.8	1.0	7.60
F ₃	51.0	65.6	55.0	9.70	35.71
F ₃	54.0	65.0	53.6	8.70	25.0
F ₃	58.0	65.6	52.0	9.70	16.88
F ₃	47.0	62.2	53.7	4.01	18.97
F ₃	43.0	64.6	45.2	8.03	6.49
Самсун 36XТравозонд 42					
P ₁	—	59.0	51.1	—	—
P ₂	—	42.4	35.0	—	—
F ₁	—	50.0	35.5	—	—
F ₂	—	55.0	38.9	—	—
F ₃	51.0	61.4	45.6	4.07	10.45

форм, а частота и степень трансгрессий—от характера наследования признака в первом гибридном поколении. Установлено, что наиболее ценные трансгрессионные формы выделяются в потомстве гибридов, у которых в первом поколении проявляется отрицательный гетерозис, а высокие положительные значения признака у родительских сортов контролируются рецессивными полигенами. В такой ситуации селекционерам рекомендуется внести определенные коррективы в стратегию селекции, перенося жесткую браковку на более поздние сроки, поскольку ценные генотипы могут появляться в старших гибридных поколениях, по мере перехода генотипа в гомозиготное состояние.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенская Г. С., Шпота В. И. Докл. ВАСХНИЛ, 7, 18—20, 1967.
2. Давидович С. Б. Тр. Детскосельской акклиматиз. станц., 7, 7—35, 1923.
3. Даденко В. П. Сб. тр. ВИТИМ, 162, 10—17, 1974.

4. Космодемьянский В. Н. Сб. тр. ВИТИМ, 143, 3—28, 1941.
5. Космодемьянский В. Н. В кн.: Гетерозис в растениеводстве, 193—210, Старополь, 1966.
6. Нерсисян П. М., Саакян Ж. Г. Биол. журн. Армении, 23, 1, 26—33, 1970.
7. Носова Н. Н. Сб. тр. ВИТИМ, 164, 15—22, 1977.
8. Паламирчук А. П., Богородский М. А. Сб. тр. ВИТИМ, 110, 15—77, 1934.
9. Chandry A. N., Munshi Z. J. Agric. Res., 1, 1, 116—123, 1962.
10. East E. M., Hayes H. K. U. S. Dep. Agr. Bureau of Plant Industry, 243, 1—51, 1912.
11. Griffing B. Aust. Biol. Sci., 9, 463—483, 1956.
12. Hayes H. K. Bull. Connect. Agr. Exp. State, 171, 1—45, 1972.
13. Hayman B. J. Genetics, 39, 783—809, 1951.
14. Smith H. H. Iowa State College, Press, 161—171, 1952.

Поступило 23. I 1991 г.

ВЛИЯНИЕ 17 β -ЭСТРАДИОЛА НА СПОНТАННУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН ПЕЧЕНИ КРЫС

Г. А. ПОГОСЯН, А. Е. ЗАКАРЯН, А. Р. ЦАГИКЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Стероидные гормоны—хемилюминесценция—перекисное окисление липидов—антиоксиданты—ядерная мембрана.

Общезвестно, что уровень ХЛ биологических объектов может служить интегральным показателем соотношения интенсивности ПОЛ и активности антиоксидантной системы [1, 6, 7]. Следовательно, ХЛ можно использовать как источник уникальной информации при физико-химических исследованиях тканей и клеток, в том числе биомембранных структур как в норме, так и при ряде патологических нарушений в живом организме [1].

Поскольку для молекулярной биологии и биофизики представляет большой интерес проблема гормональной активации физиологических процессов и показано, что некоторые стероидные гормоны обладают антиоксидантными свойствами [2, 3], применение метода ХЛ, на наш взгляд, может быть перспективным при исследовании этого вопроса.

В настоящем сообщении представлены результаты изучения действия 17 β -эстрадиола на спонтанную ХЛ ядерных мембран клеток печени крыс.

Материал и методика. Исследования проводили на беспородных крысах-самках массой 180—200 г 17 β -эстрадиол («Sigma», США), растворенный в пропиленгликоле, вводили интубирующим в концентрации 10 μ г на 100 г массы животного. Животных декапировали через 4 ч после введения гормона. Из клеток печени выделяли ядра по методу Блобеля и Поттера [9]. Препараты ядерных мембран получали по методу, сочетающему ДНКазную обработку с осмотическим шоком [10]. Белок определяли по методу Лоури и др. [11].

Измерение спонтанной ХЛ проводили на собранной нами квантометрической установке с применением новых электронных узлов. В качестве детектора слабых световых потоков применяли высокочувствительный мал шумящий фотоэлектронный умножитель—ФЭУ-140, работавший в режиме постоянного охлаждения. Поддержание постоянной температуры исследуемых образцов в измерительной ячейке (39 $\pm$ 0,3 $^{\circ}$ C) осуществляли электрическим термостатированием с электронным управлением нашей конструкции.

Количество одного из конечных продуктов ПОЛ ядерных мембран—МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [5].

Сокращения: ХЛ—хемилюминесценция, ПОЛ—перекисное окисление липидов, МДА—малоновый диальдегид.

Статистическую обработку результатов проводили на персональной ЭВМ—«Микрога» с помощью специально разработанной программы на языке «Бейсик».

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что ядерные мембраны клеток печени крысы при температуре 39° спонтанно излучают слабый поток печеночных квантов света в видимой части электромагнитного спектра. Интенсивность ХЛ этих мембран в условиях измерения превышает темновой фон установки больше чем в три раза, и при регистрации измеряемого сигнала в импульсном режиме отношение сигнал/фон составляет $3,56 \pm 0,55$. При введении 17 β -эстрадиола крысам отмечается увеличение интенсивности свечения испытуемых образцов по сравнению с контролем. Отношение сигнал/фон увеличивается до $6,72 \pm 0,25$, т. е. почти в два раза по сравнению с контролем. Интенсивность спонтанной ХЛ ядерных мембран в период регистрации не меняется, а ее кинетические кривые для контрольных образцов сходны.

При введении растворителя гормона—пропиленгликоля в соответствующих количествах в организм животного нами не было обнаружено существенного изменения интенсивности регистрируемой ХЛ.

С помощью применения α -нафтола была показана свободнорадикальная природа исследуемой ХЛ, интенсивность которой резко снижается от воздействия 10^{-2} М раствора ингибитора.

Во второй серии экспериментов исследовали ПОЛ мембран с помощью определения концентрации МДА. Полученные результаты показывают возрастание уровня ПОЛ после введения 17 β -эстрадиола.

Сочетанность полученных данных свидетельствует о том, что 17 α -эстрадиол стимулирует процессы ПОЛ в ядерных мембранах печени крыс.

Полученные результаты не противоречат данным [2—4], согласно которым эстрогены являются антиоксидантами ПОЛ в условиях *in vitro*.

Таким образом, полученные нами данные, вероятно, можно объяснить значительным изменением метаболизма в печени крыс под действием 17 β -эстрадиола. Увеличение интенсивности процессов ПОЛ в ядерных мембранах, возможно, связано с синтезом в присутствии гормона таких липидов ядерной мембраны, которые имеют более «жидкие» углеводородные хвосты, т. е. липиды, содержащие большее число двойных связей, ответственных за ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А. Биофизика, 32, 5, 830—843, 1987.
2. Гуксов В. М., Владимиров Ю. А., Сергеев Н. В., Садылла Р. Д. Биофизика, 19, 4, 763—764, 1974.
3. Обрицко Н. Б., Халилов Э. М. Биофизика, 22, 5, 937—938, 1977.
4. Саксонов Н. Н. Радиобиналогия, 28, 2, 262—264, 1978.
5. Стилкин Н. А., Гершицкий Т. Г. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. И. Сергеевича М., 1977.
6. Гарусов Б. Н. В тез. докл. Информационное значение сверхслабого свечения в медицине и сельском хозяйстве М., 1971.

7. Тарунов Б. Н., Иванон Н. И., Петрусович Ю. М. В кн. Сверхслабое свечение биологических систем. М., 1967.
8. Beresney R., Fink L. F., Crane F. L. *Biochim. et biophys. acta*, 203, 5, 531—546, 1976.
9. Blahel T., Potter V. P. *Science*, 154, 76—79, 1955.
10. Glass G., Frank W. *Anal. Biochem.*, 102, 2, 232—288, 1979.
11. Lowry N. Y., Rosenbrough A. L., Farr R. J., Randall R. B. J. *Biol. Chem.*, 193, 26—275, 1951.

Поступило 25.VII 1990 г.

Биол. журн. Армении № 1.(46).1993

УДК 577.3.08

ВЛИЯНИЕ ЭСТРАДИОЛА И ГИДРОКОРТИЗОНА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ЯДЕРНЫХ МЕМБРАН ПЕЧЕНИ КРЫС

А. Е. ЗАКАРЯН, Г. А. ПОГОСЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Греванинский государственный университет, кафедра биофизики

Перекисно: окисление липидов—стероидные гормоны.

ПОЛ, являясь разрушительным процессом, стимулирует изменения структурной целостности биологических мембран и приводит к появлению широкого спектра химических продуктов, таких, как малоновый диальдегид, гидроперекиси, альдегиды, кетоны и другие окисленные продукты [1, 6, 7]. Многие из этих соединений характеризуются высокой химической активностью и, если не детоксикация и запуск клеточных эндогенных механизмов, то могут взаимодействовать с ДНК и стимулировать генетические повреждения.

Малочисленность литературных данных относительно процессов ПОЛ в ядрах и ядерных мембранах, вероятно, объясняется тем, что ядерная оболочка в структурно-функциональном отношении изучена недостаточно, несмотря на возрастающий интерес к ней в аспекте ее роли в процессах специфической активации генома. Следствием этого является ограниченность информации о механизмах ПОЛ в ядре, формировании химических продуктов, их взаимодействии с составной частью ядра и биологическом значении перекисной деградации липидов ядерных мембран [14, 15].

Как известно, ядерно-мембранная структура, тесно связанная с хроматином и рибосомами, играет важную роль в реализации генной экспрессии стероидными гормонами. Кроме того, в экспериментах *in vitro* стероидные гормоны рассматриваются как антиоксиданты и процессы ПОЛ [5, 12, 13].

Целью настоящей работы явилось исследование воздействия 17 β -эстрадиола и гидрокортизона на процесс ПОЛ ядерных мембран печени крыс.

Сокращения: ПОЛ—перекисное окисление липидов, МДА—малоновый диальдегид.

Материал и методика. Использовали белых беспородных крыс обоего пола, которые содержали на стандартном рационе пивария.

17 β -эстрадиол и гидрокортизон («Sigma», США) вводили интубирующим в концентрации 10 μ и 5 мг на 100 г массы животного соответственно. Животных забивали через 4 ч после введения гормона. Ядра из клеток печени выделяли по методу Блобел и Поттера [9]. Препараты ядерных мембран получали по методу, сочетающему ДНКазную обработку [8] с осмотическим шоком [10]. Белок определяли по методу Лоури [11].

Fe²⁺-закорбатываемую реакцию ПОЛ проводили по описанному методу [1]. Количество МДА определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «СФ-46», принимая коэффициент молярной экстинкции комплексов МДА с тиобартитуровой кислотой равным $2,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Результаты и обсуждение. На начальном этапе было исследовано ПОЛ в ядерных мембранах печени крыс-самок, которым за 4 ч до декапитации вводили 17 β -эстрадиол. Кинетика накопления конечной реакции МДА с пересчетом на мг белка по ходу инкубации ядерных мембран в экспериментальной среде для контрольных и опытных образцов идентична. Она характеризуется некоторым увеличением начальной концентрации МДА в основном в первые 10—15 мин инкубации, затем остается почти без изменений. Основным результатом, полученным в этих экспериментах, является значительное увеличение содержания МДА (примерно на 5 нМ/мг белка) в опытных ядерных мембранах по сравнению с контролем.

В работах [3, 4] показано, что введение животным гидрокортизона приводит к заметному повышению общего содержания фосфолипидов ядерных мембран, сопровождающемуся значительным снижением активности фосфолипазы А₂, т. е. происходит глубокое изменение в обмене фосфолипидов в ядерных мембранах, что может быть связано с процессами гормональной активации генома. Исходя из этого, мы исследовали также действие гидрокортизона на уровень ПОЛ по схеме описанных экспериментов [3, 4]. Судя по кинетике накопления МДА во время инкубации, в первые 10—15 мин наблюдается усиленное образование его, как в случае с гидрокортизоном. Однако при введении гидрокортизона разница между содержанием МДА в опытных и контрольных образцах ядерных мембран в 5 раз больше, чем в аналогичных опытах с эстрадиолом, и составляет почти 20 нМ/мг белка, в 2,5 раза превышая свой контроль.

В связи с возможным неодинаковым протеканием реакции ПОЛ в различных компонентах клеток мы исследовали накопление МДА также в цельных ядрах, в супернатанте гомогената печени (2500 об/мин, 15 мин—фракции легких митохондрий и микросом) после введения гидрокортизона. Показано, что ПОЛ неоднозначно реагирует на действие гормона и уровень его неодинаков в различных компонентах. Установлено, что МДА более всего накапливается в целостных ядрах, хотя действие гормона в этой клеточной фракции почти незаметно. В опытных образцах ядерных мембран МДА образуется в 2,5 раза больше, чем в контроле. Что касается фракции супернатанта гомогената печени, то и ней наблюдается обратный эффект. Суммируя эти

данные, можно сделать предположение о неодинаковом изменении липидного состава в исследуемых нами компонентах клеток.

Таким образом, показано, что под действием гормона интенсивность процессов ПОЛ в ядерных мембранах повышается, а в супернатанте гомогената печени снижается. Это, возможно, связано с тем, что после активации генома гормоном происходит изменение липидного состава в первую очередь в ядерных мембранах. Биологический смысл этого процесса состоит в подготовке биологической мембраны к новым условиям деятельности. Об этом свидетельствует и уменьшение ПОЛ в супернатантной фракции. Почти одинаковый уровень ПОЛ в цельных ядрах в контроле и опыте, вероятно, объясняется наличием загрязнений, экранирующих наблюдаемый эффект. Судя по кинетическим кривым контрольных и опытных образцов, ПОЛ ядерных мембран, по видимому, связано с окислением идентичных липидных фракций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Р. А. Биофизика, 32, 5, 830—844, 1987.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
3. Геворкян Э. С., Яворян Ж. В., Паноян Г. А. Укр. биохим. журнал, 59, 5, 87—90, 1957.
4. Геворкян Э. С., Гедевосян Ю. В., Яворян Ж. В., Геворкян Г. А. Биохимия, 51, 10, 1630—1634, 1986.
5. Денисов Ю. П. Автореф. канд. дисс., М., 1974.
6. Кожанчиков Ю. П. Вопр. мед. химии, 31, 5, 2—7, 1985.
7. Benedetti A., Cumpst M. Bioelectrochem. and Bioenerg., 18, 1—3, 187—202, 1987.
8. Berezney R. D., Funk L. D. Biochim. et biophys. 273, 5, 513—516, 1970.
9. Blobel G., Franke V. Science, 154, 76—79, 1966.
10. Glasz C., Franke W. Anal. Biochem., 100, 2, 202—283, 1979.
11. Lowry O., Rosentrough N., Farr A. g. Biochem. and biophys. Res. Comm., 142, 3, 919—924, 1987; Biol. Chem., 193, 1, 263—275, 1951.
12. Nakano M., Suglaka K., Natio I. Biochem. and biophys. Res. Comm., 142, 3, 919—924, 1987.
13. Sugicka K., Shimosegawa Y., Nakano M. FEBS Letters, 210, 1, 37—39, 1987.
14. Vaca C., Wilhelm J. Biochimica et biophys. Acta, 958, 3, 375—387, 1988.
15. Vaca C., Herms—Ringdahl M. Biochim. et biophys. acta, Lipid and Lipid Metab., 100, 1, 35—43, 1989.

Поступило 25.VII 1990 г.

КОНЦЕНТРАЦИЯ АТФ, ХЛОРОФИЛЛА «а» И ВЕЛИЧИНА ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЛАНКТОННОГО СООБЩЕСТВА ГИДРОЭКОСИСТЕМ.

Р. О. ОГАНЕСЯН, С. А. САРКИСЯН, Д. Л. САЛКЯН, А. С. УНΙΑНЯН

Институт гидроэкологии и ихтиологии НАН Армении

Планктон гидроэкосистем—АТФ—хлорофилл «а»—замедленная флюоресценция.

Поиск путей преодоления трудностей в определении структурно-функциональных зависимостей в планктонных сообществах привел к применению биофизических и биохимических методов и оценок, универсальных для всех организмов, независимо от их форм и размеров. Поэтому возникла необходимость в выборе таких биофизических и биохимических параметров, которые отражают интенсивность обмена веществ и энергии, являются показателями функциональной активности клеток в различных экологических условиях и универсальны для автотрофных и гетеротрофных организмов.

Указанным требованиям соответствуют количество АТФ в автотрофных и гетеротрофных клетках (АТФ-метрия), величина функциональной активности реакционных центров хлорофилла, специфических для автотрофов (метод регистрации ЗФ), и широко известный в гидроэкологии спектрофотометрический метод определения хлорофилла «а», в известной степени не полностью характеризующий функциональную активность хлорофилла «а» и фотопигментов.

На наш взгляд, использование указанных показателей функционирования автотрофных и гетеротрофных клеток в отдельности и в различных комбинациях даст возможность гидроэкологам глубже выявлять закономерности функционирования и энергообмена внутри отдельных звеньев трофической цепи (бактерио-фито-зоопланктон) гидроэкосистем во времени и в пространстве.

Материал и методики. Исследования для выявления корреляционной связи между количествами АТФ, хлорофиллом «а», а также величиной ЗФ проводили на изолированных культурах *Chlorella vulgaris* в зависимости от их концентрации в многократной повторности. Культуру выращивали при температуре 32° в культиваторе на среде Тамия, барбатируемой воздухом, под постоянным освещением (8000 лк).

АТФ определяли люциферин-люциферазной методикой [3] на собранной нами на базе ФЭУ-79 установке с применением стандартной аппаратуры. Хлорофилл «а» определяли известным методом с помощью спектрофотометра СФ-26 [2]. Регистрацию ЗФ проводили с помощью цилиндрического фосфороскопа [1].

Полученные результаты функциональных величин были математически обработаны на ЭВМ.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы одновременно измеряли все 3 параметра на монокультуре *Chlorella*. Получена

Сокращения: ЗФ—замедленная флюоресценция.

характерная кривая зависимости между ЗФ, концентрацией АТФ и концентрацией хлорофилла «а» на основании данных 10 серий опытов (не приводится). Очевидно, что между ними существует в основном линейная зависимость. Между указанными показателями были получены довольно высокие корреляционные коэффициенты (0,67—0,89, табл.).

Значения корреляционных связей между концентрацией АТФ и хл. «а» и показателей ламеллярной флуоресценции (F_D , F_{CT}) у зеленой водоросли *Chl. vulgaris*

Y	$a + b_1$	$a \cdot x$	$a \cdot b^x$	$a + b \log(x)$
1. $K_{ATФ} - B_{xл.а.}$	0,80	0,89	0,81	0,74
2. $K_{ATФ} - K_{xл.а.}$	0,60	0,89	0,81	0,74
3. $B_{ATФ} - K_{xл.а.}$	0,80	0,89	0,81	0,74
4. $B_{ATФ} - B_{xл.а.}$	0,80	0,89	0,81	0,74
5. $K_{xл.а.} - F_D$	0,74	0,81	0,79	0,69
6. $B_{xл.а.} - F_D$	0,74	0,80	0,79	0,69
7. $K_{xл.а.} - F_{CT}$	0,67	0,77	0,70	0,65
8. $B_{xл.а.} - F_{CT}$	0,67	0,77	0,70	0,66
9. $K_{ATФ} - F_D$	0,77	0,84	0,83	0,67
10. $B_{ATФ} - F_D$	0,77	0,84	0,83	0,67
11. $K_{ATФ} - F_{CT}$	0,77	0,79	0,74	0,67
12. $B_{ATФ} - F_{CT}$	0,77	0,79	0,74	0,67

На основании полученных данных ниже приводятся логарифмические и регрессионные уравнения,

где $K_{xл.а.}$ — концентрация хлорофилла, измеренная спектрофотометрическим способом;

$B_{xл.а.}$ — биомасса водорослей, рассчитанная по $K_{xл.а.}$;

$K_{ATФ}$ — концентрация АТФ, измеренная методом АТФ-метрии;

$B_{ATФ}$ — биомасса водорослей, рассчитанная по $K_{ATФ}$;

F_D и F_{CT} — параметры ЗФ.

1. Зависимость концентрации АТФ от концентрации хл «а»:

$$K_{ATФ} = 0,13 (K_{xл.а.})^{0,89} \quad r = 0,89, \quad n = 36.$$

2. Зависимость концентрации АТФ от биомассы по хл «а»:

$$\ln(K_{ATФ}) = (-1,39 \pm 0,37) + (0,89 \pm 0,58) \ln(B_{xл.а.})$$

$$\text{или } K_{ATФ} = 0,25 (B_{xл.а.}) \quad r = 0,89, \quad n = 36.$$

3. Зависимость биомассы по АТФ, от концентрации хл «а»:

$$\ln(B_{ATФ}) = (-0,32 \pm 0,42) + (0,89 \pm 0,03) \ln(K_{xл.а.})$$

$$\text{или } B_{ATФ} = 0,40 (K_{xл.а.})^{0,89} \quad r = 0,89, \quad n = 36.$$

4. Зависимость биомассы по АТФ от биомассы по хл «а»:

$$\ln(B_{\text{АТФ}}) = (-0,29 \pm 0,36) + (0,89 \pm 0,08) \ln(B_{\text{хл. а}})$$

$$B_{\text{АТФ}} = 0,75 (B_{\text{хл. а}})^{0,89} \quad r = 0,89, \quad n = 36.$$

5. Зависимость концентрации хлорофилла «а» от F_d :

$$\ln(X_{\text{хл. а}}) = (-0,13 \pm 0,69) + (1,25 \pm 0,15) \ln F_d$$

$$\text{или } K_{\text{хл. а}} = 0,83 (F_d)^{1,25} \quad r = 0,81, \quad n = 37.$$

6. Зависимость биомассы по хл «а» от F_d :

$$\ln(X_{\text{хл. а}}) = (-0,84 \pm 0,69) + (1,25 \pm 0,16) \ln F_d$$

$$\text{или } B_{\text{хл. а}} = 0,43 (F_d)^{1,25} \quad r = 0,81, \quad n = 37.$$

7. Зависимость концентрации хл «а» от F_{ct} :

$$\ln(X_{\text{хл. а}}) = (2,35 \pm 0,44) + (1,06 \pm 0,75) \ln F_{ct}$$

$$\text{или } K_{\text{хл. а}} = 10,5 (F_{ct})^{1,06} \quad r = 0,77, \quad n = 37.$$

8. Зависимость биомассы по хл «а» от F_{ct} :

$$\ln(B_{\text{хл. а}}) = (1,64 \pm 0,44) + (1,06 \pm 0,15) \ln F_{ct}$$

$$\text{или } B_{\text{хл. а}} = 5,16 (F_{ct})^{1,06} \quad r = 0,77, \quad n = 37.$$

9. Зависимость концентрации АТФ от F_d :

$$\ln(K_{\text{АТФ}}) = (-2,35 \pm 0,62) + (1,27 \pm 0,14) \ln F_d$$

$$\text{или } K_{\text{АТФ}} = 0,06 (F_d)^{1,27} \quad r = 0,84, \quad n = 36.$$

10. Зависимость биомассы по АТФ от F_d :

$$\ln(B_{\text{АТФ}}) = (-1,75 \pm 0,62) + (1,27 \pm 0,14) \ln F_d$$

$$\text{или } B_{\text{АТФ}} = 0,17 (F_d)^{1,27} \quad r = 0,84, \quad n = 36.$$

11. Зависимость концентрации АТФ от F_{ct} :

$$\ln(K_{\text{АТФ}}) = (-0,29 \pm 0,41) + (1,06 \pm 0,14) \ln F_{ct}$$

$$\text{или } K_{\text{АТФ}} = 0,75 (F_{ct})^{1,06} \quad r = 0,80, \quad n = 35.$$

12. Зависимость биомассы по АТФ от F_{ct} :

$$\ln(B_{\text{АТФ}}) = (10,89 \pm 0,41) + (1,06 \pm 0,11) \ln F_{ct}$$

$$\text{или } B_{\text{АТФ}} = 2,23 (F_{ct})^{1,06} \quad r = 0,80, \quad n = 35.$$

Графические связи между приведенными выше показателями сгруппированы в двух характерных группах: линейной и нелинейной зависимостей.

Аналогичные опыты на монокультуре водоросли *Scenedesmys* пока не дали достоверных результатов из-за трудного разрушения клеток.

Полученные нами уравнения зависимости между указанными функциональными показателями одноклеточных водорослей *Chl. vulgaris* дают возможность с достаточной вероятностью рассчитать величину необходимого параметра при наличии одного из них.

Таким образом, математическая обработка полученных результатов показала, что между $K_{ATФ}$, $B_{ATФ}$, F_D , F_{Σ} , $K_{x_{\Sigma}}$ для монокультуры *Chl. vulgaris* существуют линейная и нелинейная зависимости.

Вычисленные логарифмические и регрессионные уравнения могут быть применены в теоретических и практических гидроэкологических исследованиях водных экосистем.

Полученные коэффициенты корреляции между количеством АТФ, хл. «а» и величиной ЗФ на монокультуре *Chl. vulgaris* ($r=0,69-0,89$) довольно значимы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Веселовский В. А., Тарусов Б. Н. Сверхслабое свечение растений и его прикладное применение. М., 1979.
2. Винберг Г. Г. Общие основы изучения водных экосистем, М., 1979.
3. Holm-Hansen O. Determination of microbial biomass in Ocean proplites. *Limnol.* 14, 5, 740—747, 1969.

Поступило 10. VI. 1992 г

Биол. журн. Армении, № 1 (46) 1993
Biological Journal of Armenia, № 1 (46) 1993

УДК 577.1+616.003.96:591.

СТРАТЕГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ THE STRATEGICAL APPROACHES TO INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF ADAPTATION OF ENZYMIC SYSTEMS

МАДОЯН И. А.

Ереванский государственный университет, кафедрa экологии и охраны природы

Дана оригинальная классификация ферментных систем. Специфичность и механизм коррекции действия ферментов рассматриваются в качестве критериев адаптации. Для характеристики молекулярно-экологического состояния ферментов вводится понятие адаптационной емкости.

The original classification of enzymic systems is given. Specificity and correction mechanism of action of ferments are discussed as the criteria of adaptation. For the description of molecular-ecological state of enzymes the concept of adaptation capacity is proposed.

Ферментные системы — адаптационная емкость.

Любой живой организм может существовать благодаря адаптации к условиям обитания. Термин адаптация получил международное признание и имеет довольно широкий спектр применения [1]. Однако в современной научной литературе пока еще не сложилось однозначного его толкования. Поэтому при рассмотрении какой-либо конкретной проблемы целесообразно дать свое понимание этого термина с тем, чтобы легче было оперировать им в специальном контексте [2], тем более, что вопросы адаптации чаще всего обсуждаются с позиций морфологии, физиологии, патологии, этологии, психологии. Мы же в своем подходе к проблеме адаптации, как одной из фундаментальных проблем биологии и экологии, сосредоточим внимание на ее биохимических аспектах. Итак, адаптация — это совокупность внутренних процессов, направленных на сохранение, восстановление или формирование комфортности данной системы. Под комфортностью мы подразумеваем состояние, когда биохимические реакции в конкретных условиях обеспечивают стационарное функционирование системы, например, клетки. В то же время сами реакции или, пернее, их механизмы должны быть оптимально приспособлены к выполнению своей биологической функции. В этом смысле биохимическая адаптация нами воспринимается в двух ипостасях: адаптации как состоянии (статическая адаптация [3]) и адаптации как процессе, развитии (динамическая адаптация [3]). Первая наблюдается по достижении гомеостаза системы, вторая — при нарушении гомеостаза, появ-

лении угрозы его смещения, а также при формировании новых систем. В последнее время с целью обозначения функциональной стороны гомеостаза (постоянство внутренней среды) было введено понятие энантиостаза (поддержание функции) [4]. Таким образом, можно сказать, что результатом биохимической адаптации является поддержание постоянства структуры и (или) функции системы. Результат этот может быть достигнут на разном временном отрезке, который зависит от характера эволюционных процессов, физиологического состояния организма (онтогенез, биологические циклы), продолжительности, интенсивности, скорости действия факторов внешней среды. По происхождению биохимические адаптации могут носить генотипический характер. В основе генотипической адаптации лежат качественные и количественные изменения наследственного материала, которые в конечном итоге приводят к эволюционно закрепленным формам биологической адаптации. Следует отметить, что адаптивные генетические модификации всегда благоприятны для организма. В противном случае они не могут считаться экологически полезными. Иначе говоря, адаптация всегда имеет „положительный смысл“ и направлена на выживаемость биологических структур. Отсюда, не всякое приспособление следует принимать за биохимическую адаптацию, а лишь то, которое способствует сохранению и восстановлению гомеостаза и энантиостаза. При изменении факторов окружающей среды включаются механизмы фенотипической адаптации. Они генетически детерминированы, но реализуются автономно от генома, который может вовлекаться в эти механизмы лишь благодаря избирательной активации отдельных генов, приводящей к синтезу макромолекул, необходимых для адаптивной регуляции.

Среди биохимических адаптивных механизмов важное место занимают ферментативные реакции, которые как бы связывают генотипические формы адаптации.

Почему же важно и нужно изучать адаптивные свойства ферментов и их систем? Кажалось бы, исследовав структурно-функциональные особенности ферментов, можно установить механизмы их действия и тем самым определить биологическую роль отдельных ферментов и даже целых ферментных систем. Однако несмотря на всю глубину и доскональность изучения физико-химических свойств ферментов, без введения понятия адаптации невозможно объяснить биологический „смысл“ таких явлений, как узнавание субстратов, специфичность действия ферментов, разнообразие последних в животном и растительном мире, регуляция и коррекция биохимических процессов, изоферментность, наличие или, наоборот, отсутствие тех или иных ферментов в конкретных организмах, наконец, сам факт существования биологических структур, подобных ферментам. Нашу убежденность в важности анализа адаптивных процессов на биохимическом уровне можно обосновать и следующим образом: для полного раскрытия „главных тем“ биологии необходимо знакомиться со всеми их вариациями — только такой сравнительный подход позволит

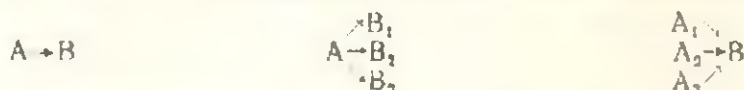
нам уяснить себе фундаментальные принципы конструкции живых организмов¹.

Осознав важность проблемы и приступая к ее изучению, следует в первую очередь разработать стратегию исследований. В этой статье мы попытаемся определить некоторые стратегические моменты в системном подходе к проблеме ферментативной адаптации. Для начала примем, что ферментная система — это комплекс субстратов, продуктов и других химических соединений, принимающих участие в катализе реакций, осуществляемых одним или несколькими ферментами. Под субстратами и продуктами подразумеваются начальные и конечные вещества не только одной, но также и цепи биохимических реакций.

Рассмотрим некоторые характерные для метаболизма ферментные системы.

I. Система одностадийного перехода субстратов в продукты:

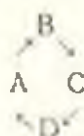
а) паритетный б) прогрессирующий в) регрессирующий



II. Система многостадийного линейного перехода субстратов в продукты:



III. Система многостадийного кольцевого перехода субстратов в продукты:



Все остальные типы ферментных систем можно принимать за различные вариации перечисленных.

Постараемся выделить особенности, характерные для каждой из указанных систем и представляющие интерес при анализе адапционных механизмов действия ферментов.

Одностадийный паритетный переход. Особенностью данной системы является то, что в ходе реакции число молекул субстрата, повлеченное в катализ, остается равным числу молекул образованного продукта: $nM_s = nM_p$. Таковы реакции взаимопревращения α - и β -сахаров, катализируемые альдозо-1-эпимеразой. Интересно, что отмеченная реакция может протекать и в отсутствие фермента, но гораздо медленнее. Это позволяет предположить, что наличие фермента является следствием эволюционно закрепленной адаптации.

Одностадийный прогрессирующий переход ($nM_s < nM_p$). Сюда можно отнести системы с участием трипсина, пепсина и других протеаз.

Одностадийный регрессирующий переход ($nM_s > nM_p$). Этой системе соответствуют реакции, осуществляемые некоторыми дегидрогеназами и полимеразам.

¹ Хочакка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988, с. 19.

Многостадийный линейный переход. Отличительной чертой этих реакций является наличие между начальным субстратом и конечным продуктом по крайней мере одной стадии с промежуточным устойчивым продуктом, который одновременно может служить субстратом в последующей реакции, катализируемой отличным от предыдущего ферментом. В качестве примера здесь можно привести процесс гликолиза.

Многостадийный кольцевой переход. Такая система складывается, когда в роли конечного продукта и начального субстрата выступает одно и то же вещество. Классическим образцом подобной системы может быть цикл лимонной кислоты [4, 5].

Приведенная классификация ферментных систем позволяет предположить, что в процессе эволюции происходила адаптация ферментов к выполнению своих метаболических функций через выбор наиболее оптимального пути их реализации. Отметим, что действия того или иного фермента в одной из четырех систем генетически задано. Иначе говоря, выбор специфического перевода субстрата в продукт можно рассматривать как генотипическую форму адаптации ферментов. Однако функционирование системы зависит также от условий среды. При их постоянстве фермент, а следовательно, и вся система будет „работать“ в режиме статической адаптации. Изменение условий окружающей среды включает механизмы динамической адаптации. В этом случае возможны следующие перестройки „работы“ фермента: 1. фермент стремится удержать систему на прежнем уровне; 2. фермент выводит систему на новый стационарный уровень; 3. происходит полное торможение активности фермента, однако целостность системы при этом сохраняется. В этом случае возможно восстановление функции системы при нейтрализации действия внешнего фактора; 4. фермент не в состоянии противодействовать деструктивному влиянию внешних факторов — наступает разрушение системы.

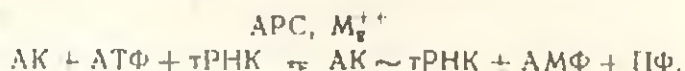
Предполагается, что в первых трех случаях происходит адаптация фермента (системы) к новым условиям. Причем, адаптация будет полной, если динамическая ее форма перейдет в статическую, то есть будет достигнуто стационарное состояние системы. Четвертый вариант соответствует ситуации, когда механизмы динамической адаптации (если они успевают включиться) недостаточны для достижения статической адаптации, иначе — обеспечения комфортности системы.

Для анализа указанных четырех вариантов реакции ферментных систем на изменения условий среды следует ввести понятие адаптационной емкости. Под адаптационной емкостью ферментной системы подразумевается резерв ее способности к реализации своей функции под влиянием внешних факторов. Она определяется значениями внешних факторов и (или) времени, в пределах которых система сохраняет свою жизнестойкость. Для каждого внешнего фактора (температура, концентрация тяжелых металлов и др.) адаптационная емкость определяется сначала отдельно. Затем влияние внешних факторов изучается в различном сочетании. После этого полученные данные вводятся в ЭВМ со специально разработанной программой. Машин-

ная обработка дает возможность сделать достоверные выводы о степени адаптированности ферментных систем. Сведения об адаптационной емкости биохимических систем помогут, с одной стороны, прогнозировать момент наступления патологии, а с другой — увеличить физиологические возможности организма.

Важно отметить, что стандартные кинетические характеристики ферментативных реакций сами по себе не дают представления о степени адаптированности ферментов при реализации своих функций [5, 6]. Уровень и стратегия обобщения данных здесь должны быть иными. Поэтому, используя классические методы исследований механизмов действия ферментов, следует подходить к понятиям скорости реакций, специфичность, узнавание, коррекция как к категориям адаптации.

В качестве объектов подобных исследований рекомендуются ферментные системы с участием аминоксил-тРНК-синтетаз (КФ 6.1.1), которые по нашей классификации могут относиться к паритетному типу:



где APC — аминоксил-тРНК-синтетаза, АК — аминокислота, ПФ — неорганический пирофосфат.

APC являются ключевыми ферментами биосинтеза белков в клетке. Они обеспечивают реализацию генетической информации вне рибосом. При этом, в силу своей биохимической роли, они проявляют исключительную специфичность по отношению к своим субстратам и обладают чувствительным механизмом коррекции своих действий [7].

Известно, что ошибка в отборе аминокислоты на стадии их активации не может быть обнаружена в процессе трансляции в силу кодон-антикодового механизма узнавания мРНК и аминоксил-тРНК. Отсюда, становится очевидным, что изменение эволюционно закрепленной адаптированности данной ферментной системы может привести к искажению генетической информации во время биосинтеза белков, а, следовательно, и к нарушению всего метаболизма.

Кинетические и структурно-функциональные аспекты APC изучаются давно и успешно, накоплен громадный фактический материал по механизму их действия [8—10]. Однако ни в одной из них не проводился анализ полученных данных на уровне экологических категорий. Используя методы биометрии [11] и данные по механизму действия и специфичности APC, мы бы смогли сделать выводы о степени надежности и адаптированности этих ферментных систем по отношению к условиям окружающей среды. Подобные исследования позволят разработать методы диагностики и прогноза состояния биологических систем при различных экологических флуктуациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хайдарлиу С. Х. Функциональная биохимия адаптации. Кишинев: Штиинца, 270 с., 1984.
2. Кук Т. Структура научных революций. М., Прогресс, 300, 1977.
3. Казначеев В. П. Современные аспекты адаптации. Новосибирск, 191 с., 1980.

4. Mangun C. P., Towles W. Physiological adaptation to unstable environments. Amer. Sci., 65, pp. 67—73, 1977.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. 1118 с., М., 1982.
6. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов, 422, с., М., 1980.
7. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. М. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК, 403, М., 1984.
8. Kissalev L. L., Favorova O. O. Aminoacyl-tRNA synthetase: some recent results and achievements. In: Advances in Enzymology: N. Y.: Wiley, pp. 141—238, 1974.
9. Söll D., Schimmel P. R. Aminoacyl-tRNA synthetases. In: The Enzymes. N. Y., London: Acad. Press, 10, pp., 489—538, 1976.
10. Schimmel P. R., Söll D. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. In: Annual Rev. Biochem., Poloc Alto: Annual Review Inc., 48, pp., 601—648, 1979.
11. Компьютерная биометрика, 222 с., М., 1970.

Поступило 20.III.1992 г.

tural energetical state of membrane in the definition of potential of rest, action, etc.

In accordance with all this one can approximately formulate the living state. The phenomenon of life is a dirigible transformation of the structure of galvanical elements in two closed double molecular layers of membrane with difference in energy of ATP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давидян Д. Б. К физико-химическим, структурным и системным основам ракового состояния клетки и онкообразования. Док. ВИНТИ. 5729—Е86, от 12.8.1986. Реферат „Бюл.-г. журн. Армении“, 39, № 9, 1986.
2. Davidian D. B. AIDS controlling system. Biolog. Journ. of Armenia, № 4 (44), p. 318, 1991.
3. Волюцкий С. С. Курс коллоидной химии. М., Химия, 1975.