

189-3/2  
1986



ISSN - 0521-1685

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე  
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИНСКОЙ ССР  
PROCEEDINGS OF THE ACADEMY OF SCIENCES  
OF THE GEORGIAN SSR

BIOLOGICAL SERIES

ბიოლოგიის  
სერია  
СЕРИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКАЯ

1986 N2 • თბილისი • თბილი  
TBILISI • TOM  
VOL.

12

СПИСОК РАЗДЕЛОВ БИОЛОГИИ,  
ПО КОТОРЫМ ПРИНИМАЮТСЯ СТАТЬИ

Теоретическая биология  
Физиология человека и животных (норм. и патол.)  
Морфология  
    Анатомия  
    Эмбриология и гистология  
    Цитология  
    Патологическая морфология  
Биохимия  
Фармакология  
Ботаника (экспер. и теорет.)  
Физиология растений  
Зоология (экспер. и теорет.)  
Энтомология  
Паразитология  
Гельминтология  
Палеобиология  
Биогеоценология  
Экология  
Микробиология  
Вирусология  
Иммунология  
Генетика  
Радиобиология  
Биофизика  
Молекулярная биология  
Бионика и биокибернетика

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე  
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИНСКОЙ ССР



# ბიოლოგიის სერია СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

ტომი 12, № 2  
Том

ჟურნალი დაარსებულია 1975 წელს  
Журнал основан в 1975 году  
გამოდის წელიწადში 6-ჯერ  
Выходит 6 раз в год

სარედაქციო კოლეგია:

მთავარი რედაქტორი ვ. ოკუჯავა  
მთავარი რედაქტორის მოადგილე თ. ონიანი  
სწავლული მდივანი გ. ბეჭაია

ლ. გაბუნია, ს. დურმიშიძე, მ. ზალიშვილი, გ. თუშანიშვილი,  
გ. კანდელაკი, კ. ნადარეიშვილი, გ. ნახუცრიშვილი, გ. სანაძე, ზ. ყურაშვილი,  
ნ. ძინიშვილი, თ. ჭანიშვილი, შ. ჭანიშვილი, ნ. ჭავჭავიძე  
პასუხისმგებელი მდივანი ს. ლაბაძე

#### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. М. Окужава  
Зам. главного редактора Т. Н. Онiani  
Ученый секретарь Г. Л. Бекаия

Л. К. Габуня, Н. А. Джавахишвили, Н. Н. Дзидзишвили, С. В. Дурмишидзе,  
М. М. Заалишвили, Г. В. Канделаки, Б. Е. Курашвили,  
К. Ш. Надарейшвили, Г. Ш. Нахуцришвили, Г. А. Санадзе, Г. Д. Туманишвили,  
Т. Г. Чанишвили, Ш. Ф. Чанишвили  
Ответственный секретарь С. Р. Лабадзе

#### EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief V. M. Okujava  
Associate Editor T. N. Oniani  
Editorial Secretary G. L. Bekaiia

Sh. F. Chanishvili, T. G. Chonishvili, N. A. Djavakhishvili, S. V. Durmishidze,  
N. N. Dzidzishvili, L. K. Gabunia, G. V. Kandelaki,  
B. E. Kurashvili, K. Sh. Nadareishvili, G. Sh. Nakhutsrishvili,  
G. A. Sanadze, G. D. Tumanishvili, M. M. Zaalishvili  
Executive Secretary S. R. Labadze

© Известия АН ГССР  
Серия биологическая, 1986

Корректор Д. Р. Арчвадзе

Сдано в набор 30.12.1985; Подписано к печати 4.04.1986; Формат бумаги  
70×108<sup>2</sup>/<sub>16</sub>; Бумага № 1; Печатных л. 6,3; Уч.-издат. л. 5,9

УЭ 06599;

Тираж 1050;

Заказ № 4273;

Цена 85 коп.

---

გამომცემლობა „მეცნიერება“, თბილისი, 380060, კუტუზოვის ქ., 19  
Издательство «Мецниереба», Тбилиси, 380060, ул. Кутузова, 19

---

საქ. სსრ მეცნ. აკადემიის სტამბა, თბილისი, 380060, კუტუზოვის ქ., 19  
Типография АН ГССР, Тбилиси, 380060, ул. Кутузова, 19

СОДЕРЖАНИЕ — შიხაბაკი — CONTENT

- 18.235
- T. M. Zaalishvili. АДФ-рибозилирование ядерных белков в эукариотической клетке 77
- ტ. ზაალიშვილი. ეუკარიოტულ უჯრედში ბირთვული ცილების ადფ-რიბოზილირება
- T. M. Zaalishvili. ADP-Ribosylation of nuclear proteins in eucaryotic cells.
- H. Z. Megrelishvili. Состояние регуляторных механизмов сердечной деятельности крыс при кровопотере после гипокинезии различной длительности 89
- ბ. მეგრელიშვილი. ვირთავეას გულის მუშაობის რეგულატორული მექანიზმების მდგომარეობა სისხლკარგვის დროს, სხვადასხვა ხანგრძლივობის ჰიპოკინეზიის შემდეგ
- N. Z. Megrelishvili. State of heart-control mechanisms in rat during the hemorrhage after hypokinesia of various duration
- B. M. Okudjava, S. D. Chipashvili, G. P. Khachaturov. Исследование влияния некоторых аминокислот на судорожную активность 96
- ბ. ოკუჯავა, ს. ჭიპაშვილი, გ. ხაჩატუროვი. კრუნჩხვითი აქტივობაზე ზოგიერთი ამინომჟავის მოქმედების მიკროფიზიოლოგიური გამოკვლევა
- V. M. Okujava, S. D. Chipashvili, G. R. Khachaturov. A Microphysiological study of the influence of some amino acids on the seizure activity.
- Z. V. Samadashvili, N. S. Gedevanishvili, L. K. Gomarteli. О функциональных связях латеральных извилин с супрасильвиевой извилиной 102
- ზ. სამადაშვილი, ნ. გედევანიშვილი, ლ. გომართელი. ლატერალური ხვეულების ფუნქციური კავშირები სუბრასილვის ხვეულთან
- Z. V. Samadashvili, N. S. Gedevanishvili, L. K. Gomarteli. Functional connections between the lateral and suprasylvian gyri.
- Э. О. Чиджавадзе, М. М. Мгалоблишвили. Влияние повреждения таламического реуниального ядра на общее поведение животного и на структуру цикла бодрствование-сон 107
- ე. ჩიჯავაძე, მ. მგალობლიშვილი. თალამური რეუნიალური ბირთვის დაზიანების გავლენა კატის ზოგად ქცევაზე და ძილ-ღვიძილის ციკლის სტრუქტურაზე
- E. O. Chijavadze, M. M. Mgaloblishvili. Effect of the lesion on thalamic reunion nucleous on the general behavior and structure of sleep-wakefulness cycle.
- Z. M. Topuria. Состояние клеток красной крови человека в старческий период жизни в норме и при хронических неспецифических заболеваниях легких (электронно-микроскопическое исследование) 116
- ზ. თოფურია. ადამიანის წითელი სისხლის უჯრედების მდგომარეობა მოხუცებულობის პერიოდში და ფილტვების ქრონიკულ არასპეციფიკურ დაავადებათა დროს
- Z. M. Topuria. The state of human red blood cells in senile period of life and during chronic nonspecific lung disease.
- З. П. Кометiani, Г. А. Зурабшвили. Анализ субстратной зависимости Na, K—АТФазы 123
- ზ. კომეთიანი, გ. ზურაბიშვილი. Na, K-ატფაზის სუბსტრატული დამოკიდებულების ანალიზი
- Z. P. Kometiani, G. A. Zurabishvili. Analysis of the Na, K-ATPase dependence on substrate.

საქ. სსრ კ. მარქსის  
სახ. საბ. რესპუბ.  
გამომცემლობა



A. I. Litvinov, G. K. Tomaradze, S. G. Surguladze, G. A. Sanadze. Влияние некоторых фитогормонов на рост культуры ткани листа тополя и образование в ней хлорофилла  
 ა. ლიტვინოვი, გ. ტომარაძე, ს. სურგულაძე, გ. სანაძე. ზოგიერთი ფიტოჰორმონის გავლენა ვერხვის ფოთლის ქსოვილთა კულტურის ზრდასა და ქლოროფილის წარმოქმნაზე

A. I. Litvinov, G. K. Tomaradze, S. G. Surguladze, G. A. Sanadze. The influence of some phytohormones on the growth and chlorophyll content in poplar leaves tissue culture.

Н. И. Махатадзе, В. В. Меунаргия, В. В. Яздовский, Ц. Н. Чагиашвили. Частота HLA генов и гаплотипов среди грузин

ბ. მახათაძე, ვ. მეუნარგია, ვ. იაზდოვსკი, ც. ჩაგიაშვილი. HLA გენებისა და ჰაპლოტიპების სიხშირე ქართველებში

N. I. Makhatadze, V. V. Meunargia, V. V. Iazdovski, Ts. N. Chagiashvili. Frequency of genes and haplotypes among georgians

135

**Краткие сообщения**  
**შოკლე ცნობები**  
**Short Communications**

Н. Н. Дзидзишвили, М. С. Хомерики. Поведенческая реакция страха кошки на раздражение дорсомедиального таламического ядра до и после повреждения гипоталамуса

ბ. ძიძიშვილი, მ. ხომერიკი. თალამუსის დორსომედიალური ბირთვის გაღიზიანებით გამოწვეული შიშის ქცევა კატებში ჰიპოთალამუსის დაზიანებამდე და დაზიანების შემდეგ.

N. N. Dzidzishvili, M. S. Khomeriki. Fear behavior elicited by the stimulation of the thalamic dorsomedial nucleus before and after hypothalamic lesion in cats.

140

УДК 577.21.577.21:577.15

БИОХИМИЯ

## АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ

Т. М. Заалишвили

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси

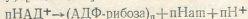
Поступила в редакцию 23.05.1985

В 60-х годах в ядрах клеток млекопитающих был обнаружен фермент поли(АДФ-рибоза)полимераза, который осуществляет превращение НАД в (АДФ-рибоза)<sub>n</sub> и АДФ-рибозилирует многочисленные ядерные белки.

Уникальная постсинтетическая модификация разных белков указывает на мультифункциональное значение процесса АДФ-рибозилирования в эукариотической клетке.

В 1963 году было установлено, что в ядерном препарате печени цыпленка НМН\* существенно увеличивает активность ДНК-зависимого фермента, включающего (<sup>14</sup>С-аденин)АТФ в кислотонерастворимый материал [15]. Эксперименты на ядерном препарате печени крыс подтвердили, что НМН на самом деле стимулирует включение АТФ в кислотонерастворимый материал. Обработка кислотонерастворимого продукта 0,5 н NaOH при 37°C в течение 18 ч не переводила его в кислоторастворимую форму. Это дало основание для заключения, что поли А не является продуктом реакции [86].

В дальнейшем, в трех исследовательских центрах независимо и почти одновременно было обнаружено, что ядерный фермент НАД-пирофосфорилаза из НМН и АТФ образует НАД, который включается в кислотонерастворимый продукт поли(АДФ-рибозу) [14, 61, 84].



Фермент, образующий поли(АДФ-рибозу), был назван поли(АДФ-рибоза) полимеразой. Некоторые исследователи называют этот фермент поли (АДФ-рибоза)синтетазой или (АДФ-рибоза)трансферазой.

Структура поли(АДФ-рибозы). Гидролиз полимера поли(АДФ-рибозы) фосфодиэстеразой змеиного яда в основном дает соединение с соотношением аденина, рибозы и фосфата, соответственно 1:2:2 [14, 30, 50, 61, 74]. Это соединение обозначается как Ψ АДФ-рибоза или изоАДФ-рибоза.

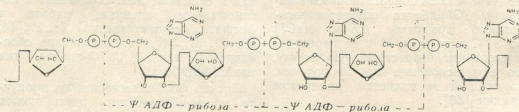
Спектр фосфодиэстеразного продукта поли(АДФ-рибозы) очень похож на спектр 5'-АМФ и не изменяется при нагревании в щелочи, тогда как спектр N<sub>1</sub>-замещенных производных N-1-(5-фосфорибозил)-АМФ, N-1-(2-гидроксиэтил)аденозина и спектр N<sub>3</sub>-замещенных производных, например 3-β-D-рибозиладенина, меняется при нагревании в щелочной среде. Спектр фосфодиэстеразного продукта сильно

\* Принятые сокращения: АМФ — аденозинмонофосфорная кислота, АДФ — аденозиндифосфорная кислота, АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НАД — никотинамидадениндинуклеотид, Нам — никотинамид, НМН — никотинамидмононуклеотид, полиА — полиадениловая кислота, РНК — рибонуклеиновая кислота, ТХУ — трихлоруксусная кислота, ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

отличается от спектров дибензилзамещенных аденинов. Поли(АДФ-рибозу) можно дезаминировать с помощью  $\text{HNO}_2$  без ее деполимеризации [14]. Эти данные указывают на то, что адениновое кольцо не участвует в связывании моно(АДФ-рибоз).

Обработка  $\Psi$  АДФ-рибозы разбавленным раствором  $\text{HCl}$  высвобождает рибозил-5-фосфат и 5'-АМФ [14]. Расход 1 моля периодата на 1 моль  $\Psi$  АДФ-рибозы показал, что только одна из двух рибоз имеет свободные гидроксильные группы в 2'С и 3'С положении [30, 74]. Эти данные говорят о том, что рибозил-5-фосфат связан с 2'С или 3'С углеродным атомом 5'-АМФ. После метилирования и последующего кислотного гидролиза рибозиладенозина, полученного путем удаления щелочной фосфатазой фосфатов от  $\Psi$  АДФ-рибозы, образуются  $\text{N}_6$ -метиладенин, 3,5-диметилрибоза и 2,3,5-триметилрибоза [20]. Таким образом, установлено существование гликозидной связи между 1'С и 2'С углеродными атомами рибоз в  $\Psi$  АДФ-рибозе.

Итак,  $\Psi$  АДФ-рибоза — это 2'-(5''-фосфорибозил)-5'-АМФ или 2'-(1''-рибозил)аденозин 5',5''-бис(фосфат). Исходя из структуры  $\Psi$  АДФ-рибозы можно представить следующую структуру поли(АДФ-рибозы):



Показано, что в ядрах печени крыс аналог олиго(АДФ-рибозы), главным образом димер, может синтезироваться из модифицированного НАД, содержащего вместо аденозина 2'-дезоксаденозин (дНАД) [83]. Следовательно, для синтеза поли(АДФ-рибозы) 2'-гидроксильные группы не являются необходимыми, или в ядрах синтезируются гетерогенные полимеры, которые содержат мономеры, связанные как 1'С—2'С, так и 1'С—3'С гликозидной связью.

В дальнейшем для выявления 3'рибозо-рибозной гликозидной связи применили метод ядерной магнитной спектроскопии. АМР-спектр рибозиладенозина был снят при 360 МГц в  $^2\text{H}_6$ -диметил сульфоксиде. Спектр показал отсутствие 2'-гидроксильных протонов в аденозине [22]. Отсутствие 1''—3' связи было показано и в других работах [54].

Надо отметить, что ранние предположения о существовании линейного высокомолекулярного полимера поли(АДФ-рибозы) отвергнуты. В ядрах тимуса теленка синтезировали поли(АДФ-рибозу) из НАД [54]. После очистки на колонке гидроксиапатита ее гидролизовали фосфолиэстеразой змеиного яда. Гидролизат хроматографировали на колонке ДЕАЕ-сефакс А-25, в присутствии 7М мочевины. Проведя анализ полученных фракций, обнаружили не только ожидаемое вещество (5'-АМФ, 2'-(1''-рибозил)аденозин-5',5''-бис(фосфат), но и новое вещество: 2'-(1''-рибозил)-2''-(или 3'')-(1''-рибозил)аденозин 5',5'',5'''-трис(фосфат). Обнаружение этого соединения, содержание которого составляет 2% от продуктов гидролиза поли(АДФ-рибозы), указывает на то, что цепь полимера является разветвленной и говорит о том, что на каждый отрезок полимера с 20—

30 мономерами приходится одно разветвление.

Методами газовой хроматографии, масспектрометрии и  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии было показано, что разветвленные участки, так же как и линейные участки поли(АДФ-рибозы), имеют (1'С—2'С) — рибозо-рибозную гликозидную связь [53].

Электронная микроскопия подтвердила образование разветвленной поли(АДФ-рибозы) *in vitro* [32]. Недавно было показано, также существ-



вание ветвистой поли(АДФ-рибозы) *in vivo* [37, 42].

Химические и физические свойства поли(АДФ-рибозы). Поли(АДФ-рибоза) характеризуется в основном свойствами полинуклеотида. Она хорошо растворяется в воде и стабильна в щелочи [23, 61, 86]. Инкубация поли(АДФ-рибозы) в 2 н КОН в течение 18 ч при 38°C переводит лишь малое ее количество в кислоторастворимую форму [61], тогда как нагревание в 1 н HCl при 100°C в течение 7 мин полностью переводит ее в кислорастворимую форму [30, 61]. Кислота разрушает поли(АДФ-рибозу), образуя аденин и рибозил-5-фосфат [74].

Гидролиз полимера поли(АДФ-рибозы) кипячением в 1 н HCl в течение 10 мин после ее дезаминирования азотистой кислотой образует гипоксантин, количество которого в гидролизате составляет 44% [74].

Очищенный полимер поли(АДФ-рибозы), содержащий 20—30 АДФ-рибозных остатков, осаждается 5%-ной ТХУ — 0,25% вольфрамат-натрия (рН 2,0), 66% этанолом — 2,2М ацетатный буфер (рН 5) или 0,5 н HClO<sub>4</sub>. Полимер осаждается также при избыточной концентрации Mg<sup>2+</sup> [24, 86]. Раствор полимера (рН 7) имеет максимум поглощения при 258 мμ, а соотношение абсорбции 280/260 равно 0,26 [24, 79, 85].

Поли(АДФ-рибоза) не разрушается ДНКазой 1 и 2, микрококковой нуклеазой, РНКазой 1 и 2, нуклеотидпирофосфатазой, а также трипсином и фосфодиэстеразой 2 [14, 30, 35, 58, 61, 74, 86].

Очистка поли(АДФ-рибозы). Синтезированная *in vitro* поли(АДФ-рибоза) впервые была очищена в 1968 году [19]. Синтезированную в ядерном лизате поли(АДФ-рибозу) после обработки ДНК-азой, РНКазой и проназой экстрагировали фенолом. Для дальнейшей очистки осаждали из водного раствора 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, растворяли в 50 мМ ЭДТА и переосаждали несколько раз этанолом. Полимер растворяли в воде и лиофилизировали. Средняя длина полимера равнялась 20 (т. е. содержала 20 АДФ-рибозных остатков). Аналогичная методика была разработана для очистки синтезированной

ванной из НАД или НМН и АТФ в ядрах печени крыс высокомолекулярной поли(АДФ-рибозы) [79]. Поли(АДФ-рибозу) отделяли от основной массы моно- или олигонуклеотидов гель-фильтрацией на колонке Сефадекс G-50. Оставшиеся примеси нуклеотидов удаляли обработкой фосфодиэстеразой селезенки, микрококковой нуклеазой и повторной гель-фильтрацией на колонке сефадекс G-50. Выход полимера составлял больше 50%. Средняя длина поли(АДФ-рибозы) равнялась 20—30.

В дальнейшем разработали более быстрый метод выделения поли(АДФ-рибозы) [87]. Синтезированную ядерным препаратом — из АТФ и НМН поли(АДФ-рибозу) после обработки проназой и фенольной экстракции наносили на колонку гидроксипатита и хроматографировали в градиенте фосфатного буфера. Таким образом, очищали поли(АДФ-рибозу) (длина цепи 17—18) от примесей ДНК и РНК. Однако большая степень очистки от примесей нуклеиновых кислот достигалась при обработке неочищенного полимера ДНКазой и РНКазой.

Разработана методика получения большого количества поли(АДФ-рибозы) [86]. После инкубирования неочищенных ядер тимуса теленка с НАД смесь поли(АДФ-рибозы), ДНК и РНК хроматографировали на колонке гидроксипатита. Этим методом из 100 мг НАД получали 10 мг полимера.

В 1980 году предложили новую методику очистки поли(АДФ-рибозы) [41]. После обработки ДНК-содержащей фракции различными нуклеазами, поли(АДФ-рибозу) эстрагировали фенолом. Водные слои, содержащие неочищенную поли(АДФ-рибозу), промывали этиловым эфиром и концентрировали. Поли(АДФ-рибозу) очищали хроматографией на колонке гидроксипатита в линейном градиенте фосфатного буфера.

Если на колонку гидроксипатита наносили смесь неочищенной поли(АДФ-рибозы) с ДНК, то после хроматографии наблюдалось четкое разделение ДНК от поли(АДФ-рибозы). ДНК элюировали 0,2 М фосфатным буфером, а поли(АДФ-рибозу) — 0,3 М. Это указывает на то, что ДНК и поли

(АДФ-рибоза) не связаны ковалентно; средняя длина полученного полимера равнялась 25; выход составлял 26%.

Все полученные полимеры, несомненно, содержат и короткие фрагменты, количество которых зависит от ткани, из которой выделены ядра, степени очистки ядер, температуры инкубации, продолжительности инкубации ядерных препаратов с предшественниками поли(АДФ-рибозы).

Для выявления существования поли(АДФ-рибозы) *in vivo* цыплятам вводили меченый  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  и  $\text{NaH}$ . После гидролиза кислотонерастворимого продукта фосфодиэстеразой получили  $\Psi$ АДФ-рибозу, т. е. то же вещество, которое получается при гидролизе синтезированной *in vitro* поли(АДФ-рибозы). Это был первый эксперимент, указывающий на синтез полимера *in vivo* [18].

Последующие работы подтвердили существование поли(АДФ-рибозы), которая была выделена из культуры мышинных L-клеток [16]. Из печени крыс выделили синтезированную *in vivo* олиго(АДФ-рибозу), связанную с гистонами (олиго(АДФ-рибозу) метили введением интраперитонеально крысам  $^{14}\text{C}$ -рибозы) [96].

Радиоиммунологическим анализом установлено существование полимера в тимусе теленка (0,02 мкг/мг ДНК), в почках (0,74 мкг/мг ДНК), в панкреасе (0,57 мкг/мг ДНК), в селезенке (0,28 мкг/мг ДНК), в мозге (0,71 мкг/мг ДНК) и в печени (2,84 мкг/мг ДНК) крыс [52, 77].

Длина цепи поли(АДФ-рибозы). Длина *in vitro* и *in vivo* синтезированного полимера (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> варьирует от 1 до 350, в зависимости от экспериментальных условий [31, 32].

Среднюю длину цепи и полимера поли(АДФ-рибозы) можно установить, измеряя радиоактивность в образцах, образовавшихся после гидролиза полимера фосфодиэстеразой змеяного яда 5'-АМФ и  $\Psi$ АДФ-рибозы по формуле: ср. дл. полимера =

$$\frac{\text{имп/мин (5'-АМФ)} + \text{имп/мин } \Psi\text{АДФ-рибоза}}{\text{имп/мин (5'-АМФ)}}$$

Измеряя радиоактивность 5'-АМФ, можно определить число цепей линейного полимера, так как при разрушении одной цепи — поли(АДФ-рибозы) образуется одна молекула 5'-АМФ.

Методом полиакриламидного гелеэлектрофореза можно определить длину цепи поли(АДФ-рибозы), состоящей из 8—33 АДФ-рибозных единиц [2].

Одновременно с этой работой была опубликована другая [88], предлагавшая отделить полимеры, отличающиеся друг от друга только одним мономером АДФ-рибозы. Когда длину полимеров, состоящих из 30, 40, 45 и 65 мономеров, определяли обычным стандартным методом, то все они состояли из 30 АДФ-рибозных единиц.

Разницу в длине полимера, определенного электрофорезом в полиакриламидном геле и обычным стандартным методом, можно объяснить тем, что одна молекула поли(АДФ-рибозы) имеет несколько одинаковых концов. Это согласуется с данными, указывающими, что полимер имеет разветвленную структуру.

АДФ-рибозилирование белков. В 1968 году [60] было показано, что большая часть синтезированной *in vitro* в ядрах печени крыс меченой (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> ассоциирована с гистонами, а меньшая с негистоновыми (остаточными)-белками и глобулинами. После хроматографии суммарного гистона на колонке КМ-целлюлозы радиоактивность содержалась во всех  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2\text{A}$ ,  $\text{H}_2\text{B}$  и  $\text{H}_3$  фракциях гистонов. (АДФ-рибоза)<sub>n</sub> была связана с гистонами ковалентной связью. Добавление к радиоактивной гистоновой фракции 2% додецилсульфата, 8М мочевины, 2М гуанидингидрохлорида, 0,01М ЭДТА или различных солей не уменьшало связанную радиоактивность. Инкубация радиоактивного материала, связанного с гистоновой фракцией в слабощелочной среде (0,25 н КОН), в течение 60 мин при 0°C переводила радиоактивный материал в кислоторастворимую форму. Методом центрифугирования в градиенте сульфата цезия было выявлено, что меченый продукт связан с белками ковалентной связью. Обработка ДНКазой, РНКазой, кислотой и щелочной фосфатазой не высвобождала радиоактивность из гистоновой фракции, тогда как обработка фосфодиэстеразой змеяного яда и протеазы переводит меченый материал в кислоторастворимую форму. Это указывает на то, что в ядрах синтезировались лишь

короткие цепи (АДФ-рибозы)<sub>n</sub>, поскольку длинные цепи кислотонерастворимы.

В отличие от печеночной ткани, в ядрах гепатомы Новикова и мозга крыс преимущественно АДФ-рибозилируются негистоновые фракции белков. Глобулиновая и гистоновая фракции АДФ-рибозилируются в меньшей степени [8, 1]. Преимущественное АДФ-рибозилирование негистоновых белков, в отличие от печеночной ткани, наблюдали также и в ядрах мышечных семенников [51]. В некоторых исследованиях [4, 5] для выявления природы связи (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками применен метод центрифугирования в градиенте плотности сульфата цезия. Показано, что даже в присутствии высоких концентраций мочевины и гуанидинхлорида комплекс (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками не разрушается, что указывает на ковалентную связь (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками. При обработке 0,2 N NaOH все длинные цепи (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> отделялись от белков и в градиенте плотности распределялись в тех же участках, что и при обработке протеазой К. Тогда как 0,4 M нейтральный гидроксилламин не был способен диссоциировать все молекулы поли(АДФ-рибозы) от белка. Аналогичные результаты были получены и при исследовании природы связи низкомолекулярных кислоторастворимых цепей (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками. Подобную картину наблюдали и в ядрах карциномы Эрлиха. Эти данные впервые четко показали АДФ-рибозилирование ядерных белков двумя типами связи: гидроксилламин-резистентными и лабильными.

В 1975 году [96] выделили синтезированной *in vivo* меченую (АДФ-рибозу)<sub>n</sub>, связанную с гистоновой фракцией из печени крыс. После разделения гистонов хроматографией на колонке выявилось, что большая часть радиоактивности была связана с гистонами Н1 и меньшая — с Н2 и Н3 гистонами. Только часть радиоактивности, связанная с белком, переходила в кислоторастворимую форму после обработки фосфодиэстеразой змеяного яда или нейтральным гидроксилламином.

В ядрах семенников форели НАД быстро включается в хромосомальные белки [99]. АДФ-рибозилируются гистон Н1, специфический белок для фо-

рели гистон Н6 и протамины. Нуклеосомные гистоны не АДФ-рибозилируются. Методом гель-электрофореза и ионообменной хроматографии выявилось ковалентное связывание (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками и то, что эта связь очень лабильна в щелочной среде.

Основываясь на том, что связь (АДФ-рибозы)<sub>n</sub> с белками не стабильна к нейтральной гидроксилламинной обработке и чувствительна к щелочному воздействию, предполагается участие карбоксильных групп, глютаминной и аспарагиновой кислот в образовании связи с АДФ-рибозой [31].

При разделении различных ядерных белковых фракций, полученных после преинкубации *in vitro* ядер печени крыс с <sup>14</sup>C-НАД, оказалось, что 40—60% включенной радиоактивности ассоциированы с гистоновой фракцией, из них половина с гистонами Н1 [76]. Степень АДФ-рибозилирования зависит от концентрации НАД. Приблизительно 60% молекул гистона Н1 модифицируются при концентрации 1 мМ НАД.

Включенный в гистоны радиоактивный материал оказался олигомером (средняя линия соответствовала тримеру). Связь олигомера с гистонами разрушалась NaOH и нейтральным гидроксилламином. Период полураспада связи — 3 мин при 37°C в присутствии 1 N NaOH и 10 мин в присутствии 1M нейтрального гидроксилламина.

Разделение АДФ-рибозилированной *in vitro* гистона Н1 химотрипсином показало АДФ-рибозилирование обеих частей молекулы гистона Н1. Двумя акцепторными участками АДФ-рибозилирования являются γ-СОО-глютаминной кислоты в позиции 2 и в позиции 116 с N-конца полипептидной цепи. В дальнейшем [10] эти же ученые фракционировали из ядер печени крыс, инкубированных с <sup>14</sup>C-НАД, гистоны (Н2А, Н2В, Н3 и Н4). Меченая АДФ-рибоза была связана со всеми фракциями гистонов, однако Н2В гистон АДФ-рибозилировался в большей степени. Связь АДФ-рибоза — гистон гидролизировалась 0,1 N NaOH и 1M нейтральным гидроксилламином. Было показано также, что акцепторным участком АДФ-рибозы является

$\gamma$ -COO<sup>-</sup> глутаминовой кислоты в позиции 2 с N-конца белка. Отмечалось также АДФ-рибозилирование  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> C-терминального лизина гистона H1 [63].

С другой стороны, показано АДФ-рибозилирование *in vivo* серин-фосфата гистона H1 в печени крыс [70, 80]. Связь серин-фосфата с АДФ-рибозой легко разрушалась в щелочной среде, но была резистентной к нейтральному гидроксилламиновому воздействию. Отмечали [81], что когда ядра печени крыс инкубируют <sup>3</sup>H-НАД радиоактивность при АДФ-рибозилировании ассоциируется с гистонами H1, H2A и, особенно, с гистоном H2B. АДФ-рибозилируются также негистоновые белки. Введение меченого аденина крысам внутримышечно показало, что в ядрах печени и тимуса крыс *in vivo* АДФ-рибозилируется не только гистон H1, но и H3. После обработки проназой и лейцинаминопептидазой из меченого гистона H3 высвобождался серинфосфатсодержащий нуклеотид, который после кислотного гидролиза давал серин-фосфат и АДФ-рибозу. Большинство комплексов (АДФ-рибоза)<sub>n</sub>—гистон H1, образовавшихся в интактных клетках HeLa из <sup>3</sup>H-аденина, содержали мономер АДФ-рибозы. Меньше, чем 1/4 часть комплекса (АДФ-рибоза)<sub>n</sub>—гистон H1 содержала олиго или поли(АДФ-рибозу), тогда как образовавшиеся *in vitro* комплексы содержали поли(АДФ-рибозу). Образованная *in vivo* связь АДФ-рибозы с гистоном H1 не разрушалась нейтральным гидроксилламиноом, а обработка комплекса щелочью (рН 10,5) высвобождала большинство, но не все АДФ-рибозные остатки. Это указывает на существование нового типа связи АДФ-рибозы с белком в интактных клетках [3].

Было установлено [6], что в ядрах опухолевых клеток Эрлиха 40% меченой поли(АДФ-рибозы) ассоциированы с нуклеосомными гистонами, а остальные 60% — с негистоновыми белками различной природы. Гистоны H2A и H4 АДФ-рибозилировались в большей степени, чем H2B и H3 гистоны. Меньше 2% тотальной радиоактивности оказалось связанной с H1 гистоном.

При анализе АДФ-рибозилированных негистоновых белков в ядрах печени крыс обнаружили АДФ-рибози-

лирование уникального белка А<sub>24</sub> [69]. Этот белок состоит из гистона H2A и негистонного белка убихитина, связанных изопептидной связью.

Наблюдали АДФ-рибозилирование панкреатического ядерного гистона H1 [72]. Уровень АДФ-рибозилирования гистона H1 возрастал с увеличением концентрации НАД. Средняя длина синтезированного полимера не изменялась при различных концентрациях НАД, вследствие чего пришли к заключению, что с увеличением концентрации НАД АДФ-рибозилируется большее количество участков гистона H1. Сравнительно малое количество АДФ-рибозы связывалось с нуклеосомными гистонами (H2A, H2B, H3). Был выявлен белок, который АДФ-рибозилировался больше, чем гистон H1. Предположили, что этот белок относится к семье НМГ белков.

В 1973 году обнаружили [9] АДФ-рибозилирование ядерной дезоксирибонуклеазы печени. В дальнейшем было показано АДФ-рибозилирование Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-зависимой эндонуклеазы [104]. (АДФ-рибоза)<sub>n</sub>, связанная с нуклеазой, была в мономерной или олигомерной форме [103]. Было показано также АДФ-рибозилирование ядерной экзонуклеазы печеночной ткани [100], АДФ-рибозилирование эндогенного белка с молекулярным весом 85 000, содержащего в частично очищенном препарате поли(АДФ-рибоза) полимеразы из тимуса теленка [25], и АДФ-рибозилирование высокоподвижных (НМГ) белков в ядрах различных клеток [29, 89].

Установлено АДФ-рибозилирование РНК полимеразы I клеток яйцевода птиц [57], топоизомеразы I тимуса теленка [21]. Не исключено также АДФ-рибозилирование ДНК лигазы II [17].

В 1976 году показали [47] возможность неферментативного АДФ-рибозилирования белков. *In vitro* при рН 7,4 и рН 9,5 были получены комплексы АДФ-рибозы (или рибозил-5-фосфата) с ДНКазой I, с гистоном H1, с бычьим сывороточным альбумином и поли L-лизинном. Связь между ними была ковалентна, образуя шифовое основание. Неферментативное АДФ-рибозилирование *in vivo* пока не обнаружено.

Была предположена возможность образования свободной, не связанной с белками поли(АДФ-рибозы) [75].

По-видимому, свободная поли(АДФ-рибоза) образуется вследствие деградации комплекса поли(АДФ-рибоза) — белок при его выделении [62] (при использовании щелочной среды не учитывался тот факт, что связь поли(АДФ-рибозы) с белками в щелочи лабильна).

Данные, касающиеся изучения АДФ-рибозилирования в растительных системах, весьма скудны. Одна из причин этого — сложность выделения высокоочищенных и физиологически активных ядер из растительной ткани [98].

Ферментативное разрушение поли(АДФ-рибозы). Известны два типа энзимов, способных деградировать поли(АДФ-рибозу). К первому типу относятся фосфодиэстеразы, которые, разрушая поли(АДФ-рибозу), образуют 5'-АМФ и рибозилфосфат из терминальных концов и ΨАДФ-рибозу.

Первым ферментом животной ткани, способным гидролизовать поли(АДФ-рибозу), оказалась фосфодиэстераза, очищенная из печени крыс. Фосфодиэстераза гидролизует Р-нитрофенольные эфиры нуклеозид-5'-монофосфатов и олигонуклеотиды, образуя нуклеозидмонофосфаты. Фермент расщепляет НАД, при гидролизе которого образуются НМН и АМФ. ДНК и РНК фермент гидролизует медленно. Фосфодиэстеразу ингибирует ЭДТА; рН оптимум фермента — 10. Фосфодиэстераза расщепляет пирофосфатные связи поли(АДФ-рибозы) экзонуклеотически с АМФ конца [27, 28, 49].

Из митохондрий печени крыс выделена фосфодиэстераза, которая гидролизует поли(АДФ-рибозу) эндонуклеотически [31]. Из растительной ткани была выделена фосфодиэстераза (в гомогенном состоянии), гидролизующая поли(АДФ-рибозу) [92]. Она не ингибируется ЭДТА, имеет оптимум действия в кислой среде (рН 5—6). Эта фосфодиэстераза отличается от других субстратной специфичностью. Фермент гидролизует фосфодиэфирные и пирофосфатные связи низкомолекулярных веществ, но не разрушает высокомолекулярные вещества, такие как ДНК из тимуса телят и РНК из дрожжей.

Ко второму типу ферментов, гидролизующих рибозо-рибозную гликозидную связь в поли(АДФ-рибозе), от-

носятся поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы. Гликогидролаза впервые была обнаружена в 1971 году в ядрах тимуса телят и печени крыс Сугимурой и Хаяши одновременно [55, 95]. Последующие работы показали присутствие поли(АДФ-рибозы) гликогидролазы в различных тканях крысы и в опухолевой ткани [11, 82].

Поли(АДФ-рибоза) гликогидролаза очищена 200 раз из тимуса телят [56]. Молекулярный вес, определенный методом гель-фильтрации и центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, оказался равным 4800 и 53000 соответственно. Фермент оптимально действует при рН 7,5, ингибируется циклическим 3':5'-АМФ, р-хлормеркурибензоатом и АДФ-рибозой. Гистоны (Н2А, Н2В и Н3) также ингибируют гидролазную реакцию. Ингибирование Н2А фракцией гистона ревертируется внесением в реакционную среду ДНК. Фермент гидролизует полимер экзонуклеотически.

Обнаружено [11] два вида поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы в семенниках крыс, удельная активность которых оказалась выше, чем у гликогидролаз из печени, мозга, селезенки и почки. Один фермент имеет оптимум действия при рН 7,25 и стимулируется КС1, для другого фермента оптимальным является рН 6,5 и он не стимулируется КС1. Оба фермента ингибируются р-хлормеркурибензоатом, рибозо-5-фосфатом, денатурированным ДНК, 3':5'-ГМФ, 3':5'-АМФ и АДФ-рибозой. Оба фермента гидролизуют поли(АДФ-рибозу) экзогенно и имеют высокое сродство к субстрату (для одного фермента  $K_m$  равна 1,52 мкМ, а для другого — 0,7 мкМ).

В 1983 году гликогидролазу очистили 12 300 раз из тимуса поросенка. Молекулярный вес фермента, определенный методом гель-фильтрации оказался равным 59000. Электрофорез очищенного ферментного препарата в присутствии додецилсульфата выявлял две полосы с молекулярными весами 61500 и 67500. Фермент ингибировался гистонами, протамином, 3':5'-АМФ, АДФ-рибозой. Однопочечная ДНК (но не двухцепочечная) также подавляет ферментативную активность [90].

Оказалось, что гликогидролаза тимуса телят расщепляет рибозо-рибозную гликозидную связь не толь-



ко в линейных, но и разветвленных участках [53].

Надо отметить, что поли(АДФ-рибоза) гликогидролаза не может разорвать связь АДФ-рибозы с белком. Новый фермент, способный к расщеплению связи моно(АДФ-рибозы) с белком очищен из печени крыс [64, 68]. Фермент оказался лиазой. Молекулярная масса АДФ-рибозилпротеин-лиазы 83 000. Лиаза расщепляет связь как между АДФ-рибозой и H<sub>2</sub>B, так и между АДФ-рибозой и H<sub>1</sub> гистонем, а также действует на АДФ-рибозил-

ние полимера поли(АДФ-рибозы) является функцией поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы.

Очищенная поли(АДФ-рибоза) полимеразы. Поли(АДФ-рибоза) полимеразы очищена из различных источников (таблица). Все очищенные полимеразы для проявления активности требуют ДНК. Лишь в одной работе [48] было отмечено, что фермент для проявления своей активности не нуждается в ДНК. Однако оказалось, что препарат фермента был загрязнен нуклеиновой кислотой, после

Таблица

Высокоочищенные препараты поли(АДФ-рибоза) полимераз

Источник	Степень очистки	Выход %	Молекулярный вес	
Хроматин печени крыс	130	22	—	[101]
Ядра печени крыс	5300	15	50000 (электрофорез в геле)	[67]
Ядра печени крыс	1004	2,1	—	[44]
Ядра асцитной карциномы Эрлиха	230	33	—	[45]
Ядра асцитной карциномы Эрлиха	698	21	130000 (электрофорез в геле)	[46]
Ядра асцитной карциномы Эрлиха	724	34	112000 (электрофорез в геле)	[33]
Тимус теленка	538	3,4	—	[65]
Тимус теленка	3111	6	120000 (электрофорез в геле)	[48]
Неочищенный экстракт фермента из бычьего тимуса	1333	17	150—160000 (гель-фильтрация)	[102]
Неочищенный экстракт фермента из бычьего тимуса	1250	14	130000 (электрофорез в геле)	[102]
			108000 (равновесное центрифугирование)	[34]
			115000 (гель-фильтрация)	
			120000 (электрофорез в геле)	
Ядра тимуса поросенка	2500	50	—	[92]
Ядра тимуса поросенка	7526	71,6	63500 (электрофорез в геле)	[93]
Ядра тимуса поросенка	9235	310	58000 (гель-фильтрация)	
Неочищенный экстракт фермента из тимуса поросенка	458	31	63500 (электрофорез в геле)	[91]
Неочищенный экстракт фермента из тимуса поросенка			112000 (электрофорез в геле)	[33]
Неочищенный экстракт фермента из тимуса ягненка	2860	4,6	175000 (гель-фильтрация)	
Неочищенный экстракт фермента из мышинных семенников	864	11	135000 (электрофорез в геле)	[71]
Ядра клеток HeLa	616	34	116000 (электрофорез в геле)	[7]
Ядра клеток HeLa	454	24	112000 (электрофорез в геле)	[33]
			150000 (гель-фильтрация)	
			112000 (электрофорез в геле)	[39]
Лимфоидные клетки человека	12700	83	116001 (электрофорез в геле)	[13]

пентапептид (про(АДФ-рибозил)глюпро-ала-лиз), но не на его производное — фосфорибозилпентапептид.

Поскольку сродство поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы к поли(АДФ-рибозе) гораздо выше, чем у фосфодиэстеразы [78] и поскольку поли(АДФ-рибоза)гликогидролаза, а не фосфодиэстераза расщепляет поли(АДФ-рибозу) в удобной форме для реэлонгации, по-видимому, *in vivo* разруше-

удаления которой фермент становится ДНК-зависимым [59]. Гистоны увеличивают ферментативную активность.

Восстановленные SH-группы необходимы для функционирования ферментов, а ионы Mg<sup>2+</sup> стимулируют или являются необходимыми компонентами ферментативной реакции.

Существенный интерес представляет вопрос о том, является или нет функ-

цией одного и того же фермента катализация двух разных по своей природе реакций: перенос АДФ-рибозного остатка НАД к акцепторному белку (например к гистону) и элонгация цепочки поли(АДФ-рибозы).

Оказалось, что в присутствии ДНК гистоны стимулировали очищенную поли(АДФ-рибоза)полимеразу из печени крыс [67], тимуса теленка [34] и клеток HeLa [39], но сами не АДФ-рибозилировались. Было показано, что гистоны аллостерически стимулируют собственное АДФ-рибозилирование поли(АДФ-рибоза)полимераза клеток HeLa [39] и тимуса теленка [12]. Согласно данным [94] полимеразы из печени крыс не способна инициировать АДФ-рибозилирование гистона H1, хотя катализирует элонгацию моно-АДФ-рибозилированных гистонов [94]. Эти данные указывают на то, что инициация и элонгация цепочки не является функцией одного и того же фермента. Однако в дальнейшем оказалось, что в присутствии ДНК и большого количества гистона H1 та же очищенная поли(АДФ-рибоза)полимераза печени крыс катализирует инициацию АДФ-рибозилирования гистона H1 [43]. Важно отметить, что полимеразы печени крыс способны катализировать не только инициацию и элонгацию, но и разветвление цепочки поли(АДФ-рибозы) [53]. Очищенная полимеразы тимуса теленка также катализирует инициацию и элонгацию поли(АДФ-рибозы) на гистон H1 [66].

В поли(АДФ-рибоза)полимеразе тимуса теленка с молекулярным весом 120000, идентифицированы три домена (с молекулярными весами 54000, 46000 и 22000 соответственно) [40]. Первый — несущий участок для связывания субстрата (НАД), второй — для связывания с ДНК, и третий — для акцепции поли(АДФ-рибозы).

Реконструкция очищенной ядерной поли(АДФ-рибоза)полимеразы клеток HeLa [38] с очищенными олигонуклео-

сомами клеток показала, что поли АДФ-рибозилировался не только фермент, но и олигонуклеосомные гистоны (H1, H2A, H2B, H3). Надо отметить, что интенсивность АДФ-рибозилирования гистонов увеличивалась с увеличением числа нуклеосом от 1 до 12.

Эти данные согласуются с тем фактом, что один и тот же фермент может инициировать и полимеризовать поли(АДФ-рибозу), а также указывают на то, что межнуклеосомные взаимодействия в олигонуклеосомах влияют на модификацию гистонов.

Как видно из таблицы, молекулярные веса некоторых поли(АДФ-рибоза)полимераз очень резко отличаются друг от друга. Это говорит о существовании различных форм фермента. Однако не исключено, что низкомолекулярные формы поли(АДФ-рибоза)полимераз являются следствием протезазного расщепления нативного фермента при его очистке [36].

Биохимическая функция НАД, как переносчика электронов в окислительно-восстановительных реакциях, четко установлена. В 60-х годах был открыт один из посттрансляционно-модифицирующих ферментов — ядерная поли(АДФ-рибоза)полимераза, с помощью которой происходит быстрое превращение НАД в (АДФ-рибозу)<sub>n</sub> и АДФ-рибозилирование многочисленных по своей природе ядерных белков. Главным местом синтеза и распада НАД в клетке является ядро [73]. Участие НАД в окислительно-восстановительных процессах не изменяет его концентрацию в клетке, тогда как поли(АДФ-рибоза)полимераза в определенных случаях существенно снижает уровень НАД в клетке [97].

Все это указывает на первостепенную важную роль АДФ-рибозилирования в эукариотических клетках.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Заалишвили Т. М., Маргиани Д. О., Тамазян А. С. Сообщения АН ГССР, 101, 3, 685—688, 1981.
2. Adamietz P., Bredhorst R., Hilz H. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 1377—1383, 1978.
3. Adamietz P., Bredhorst R., Hilz H., Eur. J. Biochem., 91, 317—326, 1978.
4. Adamietz P., Hilz H. Biochem. Soc. Trans., 3, 1118—1120, 1975.

5. Adamietz P., Hilz H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 357, 527—534, 1976.
6. Adamietz P., Klapproth K., Hilz H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 1232—1238, 1979.
7. Agemori M., Kagamiyama H., Nishikimi M., Shizuta Y. Arch. Biochem. Biophys., 215, 621—627, 1982.
8. Burzio L. O., Koide S. S., FEBS Lett., 20, 29—32, 1972.
9. Burzio L. O., Koide S. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 572—579, 1973.
10. Burzio L. O., Riquelme P. T., Koide S. S. J. Biol. Chem., 254, 3029—3037, 1979.
11. Burzio L. O., Riquelme P. T., Ohtsuka E., Koide S. S. Arch. Biochem. Biophys., 173, 306—319, 1976.
12. Caplan A. I., Niedergang C., Okazaki H., Mandel P. Arch. Biochem. Biophys., 198, 60—69, 1979.
13. Carter S. G., Berger N. A. Biochemistry, 21, 5475—5481, 1982.
14. Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strosser M. T., Mandel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 638—643, 1966.
15. Chambon P., Weill J. D., Mandel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 39—43, 1963.
16. Colyer R. A., Burdette K. E., Kidwall W. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 960—966, 1973.
17. Creissen D., Shall S. Nature, 296, 271—272, 1982.
18. Doly J., Mandel P. Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), 264, 2687—2690, 1967.
19. Doly J., Meilhac M., Chambon P., Mandel P., Hoppe-Seylersz. Physiol. Chem., 353, 843—844, 1972.
20. Doly J., Petek F. Comp. Rend. Acad. Sci. Ser. D. (Paris), 263, 1341—1344, 1966.
21. Ferro A. M., Olivera B. M. J. Biol. Chem., 259, 547—554, 1984.
22. Ferro A. M., Oppenheimer N. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 809—813, 1978.
23. Fujimura S., Hasegawa S. Biochem. Biophys. Acta, 134, 496—499, 1967.
24. Fujimura S., Sugimura T. Methods in Enzymology, 8, B, 223—230, New York: McCormick D. B., Weight L. D. (eds), Academic Press, 1971.
25. Furnezux H. M., Pearson C. K. J. Cell Physiol., 105, 401—407, 1980.
26. Futai M., Mizuno D., J. Biol. Chem., 242, 5301—5307, 1967.
27. Futai M., Mizuno D., Sugimura T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 395—399, 1967.
28. Futai M., Mizuno D., Sugimura T. J. Biol. Chem., 243, 6325—6329, 1968.
29. Giri Ch. P., West M. H. P. Smulson M. Biochemistry, 17, 3495—3500, 1978.
30. Hasegawa S., Fujimura S., Shimizu Y., Sugimura T. Biochem. Biophys. Acta, 149, 369—376, 1967.
31. Hayaishi L., Ueda K. Ann. Rev. Biochem., 46, 95—116, 1977.
32. Hayaishi K., Tanava K., Shimada T., Miwa M., Sugimura T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 102—107, 1983.
33. Holtlund J., Kristensen T., Ostvold A., Laland S. G. Eur. J. Biochem., 119, 23—29, 1981.
34. Ito S., Shizuta Y., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 254, 3647—3651, 1979.
35. Janakidevi K., Koh C. Biochemistry, 13, 1327—1330, 1974.
36. Jongstra-Bilen J., Ittel M. E., Jongstra J., Mandel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 383—390, 1981.
37. Juarez-Salinas Y. H., Levi V., Jacobson E. L., Jacobson M. K. J. Biol. Chem., 257, 607—609, 1982.
38. Jump D. B., Butt T. R., Smulson M. Biochemistry, 19, 1031—1037, 1980.
39. Jump D. B., Smulson M. Biochemistry, 19, 1024—1030, 1980.
40. Kameshita I., Matsuda Z., Taniguchi T., Shizuta Y. J. Biol. Chem., 259, 4770—4776, 1984.
41. Kanai Y., Kawamitsu H., Tanaka M., Matsushima, Miwa M. J. Biochem., 88, 917—920, 1980.
42. Kanai M., Miwa M., Kuchino Y., Sugimura T. J. Biol. Chem., 257, 6217—6223, 1982.
43. Kawaichi M., Ueda K., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 255, 816—819, 1980.
44. Kawamura M., Tanigawa Y., Kitamura A., Miyake Y., Shimoyama M. Biochim. Biophys. Acta, 652, 121—128, 1981.
45. Kristensen T., Holtlund J., Eur. J. Biochem., 70, 441—446, 1976.
46. Kristensen T., Holtlund J. Eur. J. Biochem. 88, 495—501, 1978.
47. Kun E., Chang A. C. Y., Sharma M. L., Ferro A. M., Nitecki D. Proc.



- Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3131—3135, 1976.
48. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C., Febs Lett., 84, 331—336, 1977.
  49. Matsubara H., Hasegawa S., Fujimura S., Shima T., Futai M. J. Biol. Chem., 245, 4317—4320, 1970.
  50. Matsubara H., Hasegawa S., Fujimura S., Shima T., Sugimura T., Futai M. J. Biol. Chem., 245, 3606—3611, 1970.
  51. Mennella M. R., Quesada P., Farina B., Leone E., Jones R. Biochem. J., 205, 245—248, 1982.
  52. Minaga T., Romaschin A. D., Kirsten E., Kun E. J. Biol. Chem., 254, 9663—9668, 1979.
  53. Miwa M., Ishihara M., Takishima S., Takasuka N., Maeda M., Yamaizumi Z., Sugimura T., Yokoyama S., Miyazawa T. J. Biol. Chem., 256, 2916—2921, 1981.
  54. Miwa M., Saikawa N., Yamazumi Z., Nishimura S., Sugimura T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 595—599, 1979.
  55. Miwa M., Sugimura T. J. Biol. Chem., 246, 6362—6364, 1971.
  56. Miwa M., Tanaka M., Matsushima T., Sugimura T. J. Biol. Chem. 249, 3475—3482, 1974.
  57. Muller W. E. G., Zahn R. K. Mol. and Cell Biochem., 12, 147—159, 1976.
  58. Nakazawa K., Ueda K., Honjo T., Yoshihara K., Nishizuka Y., Hayaishi O. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 143—149, 1968.
  59. Niedergang C., Okazaki H., Mandel P. Eur. J. Biochem., 102, 43—57, 1979.
  60. Nishizuka Y., Ueda K., Honjo T., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 243, 3765—3767, 1968.
  61. Nishizuka Y., Ueda K., Nakazawa K., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 242, 3164—3171, 1967.
  62. Nishizuka Y., Ueda K., Yoshihara K., Yamamura H., Take-da M., Hayaishi O. Cold Spr. Herb. Symp. Quant. Biol., 34, 781—786, 1969.
  63. Ogata N., Ueda K., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 255, 7610—7620, 1980.
  64. Oka J., Ueda K., Hayaishi O., Komura H., Hakanishi K. J. Biol. Chem., 259, 986—995, 1984.
  65. Okazaki H., Niedergang C., Mandel P. FEBS Lett., 62, 255—258, 1976.
  66. Okazaki H., Niedergang C., Mandel P. Biochimie, 62, 147—157, 1980.
  67. Okayama H., Edson G. M., Kushima M., Ueda K., Hayaishi O., J. Biol. Chem., 252, 7000—7005, 1977.
  68. Okayama H., Honda M., Hayaishi O. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2254—2257, 1978.
  69. Okayama H., Hayaishi O. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 755—762, 1978.
  70. Ord M. G., Stocken L. A. Biochem. J., 161, 583—592, 1977.
  71. Petzold S. J., Booth B. A., Leimbach G. A., Berger N. A. Biochemistry, 20, 7075—7081, 1981.
  72. Poirier G. G., Savard P. Can. J. Biochem., 58, 509—515, 1980.
  73. Rechsteiner M., Caianzarite V. J. Cell Physiol., 84, 409—422, 1974.
  74. Reeder R. H., Ueda K., Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 242, 3172—3179, 1967.
  75. Rickwood D., McGillivray A. J., Wish W. J. D. Proc. 10<sup>th</sup> FEBS meeting (Paris), 216, 1975.
  76. Riquelme P. T., Burzio L. O., Koide S. S. J. Biol. Chem., 254, 3018—3028, 1979.
  77. Sakura M., Miwa M., Tanaka M., Kanai Y., Shimada T., Matsushima T., Sugimura T. Nucleic Acids Res., 4, 2903—2915, 1977.
  78. Sau-Chi B. Y. Trends Biochem. Sci., 9, 331—332, 1984.
  79. Shima T., Fujimura S., Hasegawa S., Shimizu Y., Sugimura T. J. Biol. Chem., 245, 1327—1330, 1970.
  80. Smith J. A., Stocken L. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 297—300, 1973.
  81. Smith J. A., Stocken L. A. Biochem. J., 147, 523—529, 1975.
  82. Stone P. R., Wish W. J. D., Shall S. FEBS Lett., 36, 334—338, 1973.
  83. Suhadolnik R. J., Bauz R., Lichtenwalner D. M., Uematsu T., Roberts H. J., Sudhakar S., Smulson M. J. Biol. Chem., 252, 4134—4144, 1977.
  84. Sugimura T., Fujimura S., Hasegawa S., Kawamura Y. Biochim. Biophys. Acta, 138, 438—441, 1967.
  85. Sugimura T., Fujimura S., Hasegawa S., Shimizu Y., Okayama H. J. Vitaminol., 14, 135—142, 1968.

86. Sugimura T. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 13, 127—151, 1973.
87. Sugimura T., Yoshimura N., Miwa M., Nagai H., Nagao M. *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 660—665, 1971.
88. Tanaka M., Hayashi K., Sakura H., Miwa M. *Nucleic Acids Res.*, 5, 3183—3194, 1979.
89. Tanuma S., Johnson G. J. *Biol. Chem.*, 258, 4067—4070, 1983.
90. Tavassoli M., Tavassoli M. M., Shall S. *Eur. J. Biochem.*, 135, 449—455, 1983.
91. Tsopanakis Ch., Leeson E., Tsopanakis A., Shall S. *Eur. J. Biochem.*, 90, 337—345, 1978.
92. Tsopanakis Ch., McLaren A., Shall S. *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 774—777, 1976.
93. Tsopanakis Ch., McLaren E., Tsopanakis, Shall S. *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 932—936, 1977.
94. Ueda K., Kawaichi M., Okayama H., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.*, 254, 679—687, 1979.
95. Ueda K., Oka J., Narumiya S., Miyakawa N., Hayaishi O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 516—523, 1972.
96. Ueda K., Omashi A., Hayaishi O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 205—209, 1975.
97. Williams G. T., Johnstone A. P. *Biosci. Rep.*, 3, 815—830, 1983.
98. Willmitzer L. *FEBS Lett.*, 108, 13—16, 1979.
99. Wong N. C. W., Poirter G. G., Dixon G. H. *Eur. J. Biochem.*, 77, 11—21, 1977.
100. Yamada M., Nagao M., Miwa M., Sugimura T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 1093—1099, 1974.
101. Yoshihara K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 119—125, 1972.
102. Yoshihara K., Hashida T., Tanaka Y., Ohgushi H., Yoshihara H., Kamiya T. *J. Biol. Chem.*, 253, 6459—6466, 1978.
103. Yoshihara K., Tanigawa Y., Burzio L., Koide S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 289—293, 1975.
104. Yoshihara K., Tanigawa Y., Koide S. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 658—665, 1974.

## ეუკარიოტულ უჯრედში ბირთვული ცილების ადე-რიბოზილირება

თ. ჯაალიშვილი

მაქათველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის  
ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვ-  
ებში, ფერმენტი პოლი (ადე-რიბოზა)  
პოლიმერაზა ნად-ს გარდაკმნის (ადე-  
რიბოზა) n-ში, ადე-რიბოზილირდება კო-

ვალენტურად მრავალი, სხვადასხვა ბუ-  
ნების ცილა, რაც მიგვანიშნებს ადე-რი-  
ბოზილირების პროცესის მულტიფუნქ-  
ციონალურ დანიშნულებაზე უჯრედში.

## ADP-RIBOSYLATION OF NUCLEAR PROTEINS IN EUKARYOTIC CELLS

T. M. ZAALISHVILI

I. S. Beritashvili Institute [of Physiology, Georgian Academy of Sciences,  
Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Enzyme poly (ADP - ribose) polymere-  
rase catalyzes the formation of (ADP -  
ribose)<sub>n</sub> from NAD. ADP - ribosylates co-  
valently a number of proteins of various

nature. This suggests that ADP-ribo-  
sylation has a multifunctional role in the  
eucaryotic cell.

УДК 612.1:616.1

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## СОСТОЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ СЕРДЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КРЫС ПРИ КРОВОПОТЕРЕ ПОСЛЕ ГИПОКИНЕЗИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Н. З. Мегрелишвили

ЦНИЛ Тбилисского государственного медицинского института

Поступила в редакцию 12.03.1984

Изучали состояние регуляторных механизмов сердечной деятельности белых крыс по показателям вариационной пульсометрии в исходном состоянии и на различных этапах гипокинезии и кровопотери.

Установлено, что гипокинезия вызывает усиление тонуса симпатической нервной системы и влияние центрального контура управления сердечных сокращений. Однако более устойчивыми к последующей кровопотере оказались животные с преобладанием в исходном состоянии тонуса парасимпатической нервной системы и влияний автономного контура управления; после гипокинезии степень централизации была невысокой, а кровопотеря усиливала тонус симпатической нервной системы и деятельность центрального контура управления.

У менее устойчивых животных в исходном состоянии преобладали тонус симпатической нервной системы и центрального контура управления; после гипокинезии напряжение регуляторных механизмов было значительным, а кровопотеря выявляла высокий тонус парасимпатической нервной системы на фоне угнетения тонуса симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Ограничение двигательной активности одна из главных характерных особенностей условий жизни современного человека. Бурное развитие техники, механизация и автоматизация производства приводит к быстрому и значительному уменьшению тяжелого физического труда. Получили широкое развитие все виды транспорта и коммунального хозяйства, произошло внедрение элементов механизации в быт каждой семьи. Все эти благи научно-технического прогресса имеют и отрицательную сторону — способствуют значительному уменьшению роли мышечной активности в повседневной жизни каждого человека. Сегодня горожанин затрачивает в десятки раз меньше мышечных усилий, чем его предки. По данным акад. А. И. Берга во всей вырабатываемой человечеством энергии доля мышечных усилий за последние 100 лет сократилась с 94 до 1%. Для обозначения тенден-

ции к малоподвижному образу жизни предложен термин *Homo sedentarius* (человек сидячий) [9].

Вместе с тем постельный режим различной длительности является одним из основных условий успешного лечения больного. Часто после продолжительного пребывания больных в постели приходится прибегнуть к оперативному вмешательству, что сопровождается кровопотерей. В доступной литературе мы не встретили данных, посвященных изучению устойчивости организма, перенесшего гипокинезию, к кровопотере и роли сердечно-сосудистой системы в ее формировании, что и явилось целью данной работы.

В задачу исследования входило изучение состояния регуляторных механизмов сердечно-сосудистой системы и степени их участия в формировании устойчивости организма к кровопоте-

ре при гипокинезии. Такой подход к изучению вопроса обусловлен тем, что любому заданному уровню функцио-

нирования организма соответствует эквивалентный уровень функционирования аппарата кровообращения [2].

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на половозрелых беспородных белых крысах-самцах весом 190—260 г. Двигательную активность животных ограничивали путем помещения их в индивидуальные клетки-пеналы в течение 14 (I группа, 16 экспериментов) и 45 суток (II группа, 18 экспериментов). Кровапотерю производили на предварительно гепаринизированных гипокинетических крысах путем одномоментного массивного кровопускания (2% от веса тела) из бедренной артерии, что приводило к снижению АД до 60 мм рт. ст. Состояние контуров ре-

гуляции сердечной деятельности изучали с помощью метода вариационной пульсометрии. Работу проводили на биотехническом комплексе [4]. Анализировали следующие показатели: частота сердечных сокращений (ЧСС), вариационный размах ( $\Delta x$ ), амплитуда моды (АМо), индекс напряжения регуляторных механизмов (ИН), индекс вегетативного равновесия (ИВР). Регистрацию показателей проводили в исходном состоянии, после гипокинезии (до кровопотери), сразу после кровопотери и в последующем с 10-минутными интервалами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исходном состоянии у животных I и II групп достоверного различия показателей вариационной пульсометрии не отмечалось: ЧСС— $600 \pm 4,8$  и  $615 \pm 7$ ,  $P < 0,1$ ; Мо— $100 \pm 1,3$  и  $98 \pm 3,5$ ,  $P < 0,5$ ; АМо— $32,2 \pm 5,7$  и  $40,7 \pm 4$ ,  $P < 0,2$ ;  $\Delta x$ — $11 \pm 1,4$  и  $9 \pm 1,4$ ,  $P < 0,2$ ; ИН— $14,6 \pm 6,4$  и  $18,7 \pm 2,2$ ,  $P < 0,1$ ; ИВР— $2,9 \pm 1,2$  и  $4,7 \pm 1,9$ ,  $P < 0,2$ .

Продолжительность жизни после кровопотери животных I-й группы колебалась от 7 до 23 мин (в среднем  $11 \pm 1,9$  мин). Во всех случаях сразу после кровопотери выявлялся период декомпенсации функций.

Животные II группы по продолжительности жизни после кровопотери были разделены на две условные подгруппы: а) более устойчивые (6 животных) и б) менее устойчивые (12 животных). Продолжительность жизни животных II-а группы колебалась от 60 до 183 мин—в среднем  $95 \pm 19$  мин. Продолжительность жизни животных II-б группы колебалась от 10 до 30 мин—в среднем  $21 \pm 2,8$  минут ( $P < 0,001$ ). У относительно более устойчивых животных в течение патологического процесса выделялись стадии дезинтеграции, временной адаптации и декомпенсации. У менее устойчивых животных сразу после кровопотери выявлялся период декомпенсации функций.

У животных обеих групп отмечалось уменьшение массы тела после гипокинезии: в I группе—с  $257 \pm 15$  до  $214 \pm 12$  г,  $P < 0,02$ ; во II-а—с  $220 \pm 10$  до  $210 \pm 4$  г,  $P < 0,2$ ; во II-б—с  $220 \pm 10$  до  $190 \pm 12$  г,  $P < 0,05$ .

Анализ фактического материала показал, что у животных I группы после гипокинезии отмечалось (таблица) увеличение ЧСС, АМо, ИН и ИВР, уменьшение Мо и  $\Delta x$ , что свидетельствовало об усилении тонуса симпатической нервной системы, повышении степени централизации управляющих механизмов и особенно гуморального канала регуляции. Таким образом после 14-суточной гипокинезии происходила резкая активация симпатoadrenalовой системы и включение адренергических адаптивных механизмов, что и проявлялось в усилении тонуса симпатической нервной системы и влияний центрального контура управления.

Уменьшение ЧСС, АМо, ИН и ИВР, увеличение Мо и  $\Delta x$  сразу после кровопотери (таблица) свидетельствовало об усилении тонуса парасимпатической нервной системы и влияний автономного контура управления. Нарастание брадикардии, Мо и  $\Delta x$ , уменьшение АМо, ИН и ИВР через 11 мин после кровопотери указывало на резкое увеличение тонуса парасимпати-

ческой нервной системы, угнетение тонуса симпатической нервной системы и срыв компенсации.

Во II группе (45-суточная гипокинезия) в исходном состоянии у менее устойчивых животных, по сравнению с более устойчивыми, отмечались: более высокая ЧСС ( $623 \pm 4,2$  и  $605 \pm 5,8$ ,  $P < 0,02$ ), АМо ( $45,7 \pm 3,1$  и  $35,6 \pm 2,8$ ,  $P < 0,02$ ), ИН ( $29,4 \pm 2,5$  и  $18 \pm 1,9$ ,  $P < 0,01$ ) и ИВР ( $5,7 \pm 1,3$  и  $3,6 \pm 0,4$ ,  $P < 0,1$ ), более низкие значения Мо ( $97 \pm 2,2$  и  $99 \pm 2,7$   $P < 0,5$ ) и  $\Delta x$  ( $8 \pm 0,8$  и  $10 \pm 0,5$ ,  $P < 0,05$ ).

Таким образом, у менее устойчивых животных до гипокинезии выявлялся более высокий тонус симпатической нервной системы и более активное участие центрального контура управления в регуляции сердечной деятельности, тогда как у более устойчивых наблюдалось превалирование автономных механизмов в регуляции сердечной деятельности и сдвиг вегетативного баланса в сторону парасимпатического отдела вегетативной нервной системы.

После 45-суточной гипокинезии анализ изменений показателей вариационной пульсометрии как у более, так и у менее устойчивых животных указывал на включение адренергических адаптивных механизмов в регуляции. Однако у менее устойчивых животных отмечалась значительно резко выраженная симпатикотоническая реакция. У последних, по сравнению с более устойчивыми животными, наблюдались более высокие значения ЧСС ( $633 \pm 3,7$  и  $595 \pm 6$ ,  $P < 0,001$ ), АМо ( $65,8 \pm 4,3$  и  $48,4 \pm 1,7$ ,  $P < 0,01$ ), ИН ( $57,7 \pm 3,5$  и  $29,5 \pm 2,3$   $P < 0,001$ ) и ИВР ( $11 \pm 1,2$  и  $5,9 \pm 1,1$ ,  $P < 0,01$ ), более низкие значения Мо ( $95 \pm 1,1$  и  $101 \pm 2,2$ ,  $P < 0,01$ ) и  $\Delta x$  ( $6 \pm 0,3$  и  $8,2 \pm 0,6$ ,  $P < 0,001$ ).

Таким образом, к концу 45-суточной гипокинезии у более устойчивых животных наблюдалась относительно высокая активность процессов авторегуляции, по сравнению с менее устойчивыми животными, у которых отмечалась централизация управления сердечного ритма и выраженное напряжение регуляторных механизмов.

После кровопотери у более устойчивых животных отмечалось (таблица) увеличение Мо, АМо, ИН и ИВР,

уменьшение  $\Delta x$ , свидетельствующие о некоторой активации симпатического отдела вегетативной нервной системы и тенденции усиления деятельности центрального контура управления.

В стадии дезинтеграции увеличивались Мо, АМо, ИН и ИВР, уменьшался  $\Delta x$ . Эти изменения указывали на значительное повышение тонуса симпатической нервной системы и центрального контура управления.

В период декомпенсации уменьшение ЧСС, АМо, ИН и ИВР, увеличение Мо и  $\Delta x$  говорило о усилении тонуса парасимпатической нервной системы, угнетении тонуса симпатической нервной системы и уменьшении влияния центрального контура управления.

В терминальной стадии процесса изменения, имеющие место в предыдущий период, еще более усугублялись, что указывало на резкое угнетение тонуса симпатической нервной системы и срыв компенсации.

У менее устойчивых животных после кровопотери отмечалось (табл.) уменьшение ЧСС, АМо, ИН и ИВР, увеличение Мо и  $\Delta x$ , т. е. имело место понижение тонуса симпатической нервной системы. На этом фоне выявлялось повышение тонуса парасимпатической нервной системы и влияния автономного контура управления.

Через 10 мин после кровопотери продолжала уменьшаться ЧСС, увеличивалась Мо, оставались уменьшены АМо, ИН и ИВР, увеличен  $\Delta x$ , что свидетельствовало о сохранении высокой степени участия контура автономного управления в регуляции.

Через 21 мин происходило угнетение тонуса симпатической нервной системы и срыв компенсаторных механизмов.

Литературные данные свидетельствуют, что после 14-суточной гипокинезии животные находятся в стадии тревоги общего адаптационного синдрома [6, 7, 11, 12]. В этой стадии происходит резкая активация деятельности гипоталамус-гипофиз-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем, вызванная необычностью обстановки эксперимента, волевым усилием ограничения обычного образа жизни и подавлением естественного желания активных движений. Происходит усиление выброса в кровь кортикостерона, адреналина, норадреналина, АКГГ. По мнению В. К. Кула-

Динамика изменений показателей вариационной пульсометрии при кровопотере после гипокнезии различной длительности у крыс

М±m

Группа	Этапы	Изменения показателей вариационной пульсометрии						ИН, усл. ед.	ИВР, усл. ед.
		ЧСС, уд/мин	Мо, мкс	АМо, %	Δ X, мкс	ИН, усл. ед.	ИВР, усл. ед.		
I n=16	до гипокнезии после гипокнезии сразу после КП через 12 мин	600±4,8	100±1,3	32,2±5,7	11±1,4	14,6±6,4	2,9±1,2	7,9±1,3 P<0,01	
		620±5 P<0,01	96±2 P<0,05	54±3,3 P<0,001	6,8±0,6 P<0,01	40,5±6,7 P<0,01	5,1±1,2 P<0,1	5,1±1,2 P<0,1	
		597±5 P<0,001	101±0,8 P<0,02	43±2,5 P<0,01	8,4±1 P<0,1	25,6±4 P<0,05	3,1±1,5 P<0,02	3,1±1,5 P<0,02	
	451±13,7 P<0,001	143±3,4 P<0,001	34±5 P<0,001	11,3±2 P<0,02	10,5±4,8 P<0,001				
II-а n=12	до гипокнезии после гипокнезии сразу после КП через 10 мин через 21 мин	623±4,2	97±2,2	45,7±3,1	8±0,8	29,4±2,5	5,7±1,2	11±1,2 P<0,02	
		633±3,7 P<0,1	95±1,1 P<0,2	65,8±4,3 P<0,001	6±0,3 P<0,02	57,7±3,5 P<0,001	3,9±2,5 P<0,02	3,9±2,5 P<0,02	
		611±4 P<0,001	98±0,8 P<0,02	42,9±6 P<0,001	11±2,8 P<0,02	19,8±6,7 P<0,001	5,9±1,8 P<0,02	5,9±1,8 P<0,02	
		543±8,8 P<0,001	115±7 P<0,02	47,1±3,4 P<0,01	8±2 P<0,2	25,6±8,5 P<0,01	3,3±0,9 P<0,001	3,3±0,9 P<0,001	
		451±12,5 P<0,001	142±10,5 P<0,01	40±6,1 P<0,001	12±1,7 P<0,001	11,7±4 P<0,001			
II-б n=6	до гипокнезии после гипокнезии сразу после КП десинтеграция временная адаптация декомпенсация терминальная стадия	605±5,8	99±2,7	35,6±2,8	10±0,5	18±1,9	3,6±0,4	5,9±1,1 P<0,02	
		595±6 P<0,05	101±2,2 P<0,2	48,4±1,7 P<0,001	8,2±0,6 P<0,02	29,5±2,3 P<0,02	7,5±1,3 P<0,2	7,5±1,3 P<0,2	
		563±11 P<0,02	111±2,7 P<0,02	52,6±2,5 P<0,2	7±0,6 P<0,2	33,3±1,8 P<0,1	8,5±0,7 P<0,05	8,5±0,7 P<0,05	
		501±9,7 P<0,001	122±3,8 P<0,001	66,3±2,4 P<0,02	6,5±0,4 P<0,02	35,2 P<0,05	10,1±1 P<0,02	10,1±1 P<0,02	
		483±8,3 P<0,001	129±5 P<0,001	60,6±3,1 P<0,001	6±0,2 P<0,1	39,4±3,4 P<0,02	4,2±1,1 P<0,2	4,2±1,1 P<0,2	
		442±10,7 P<0,001	140±5,6 P<0,001	40,4±3,4 P<0,05	9,6±0,3 P<0,05	15±6,9 P<0,01	1,9±0,8 P<0,02	1,9±0,8 P<0,02	
	350±12 P<0,001	200±8 P<0,001	31±3 P<0,001	16±12 P<0,001	49±4 P<0,001				

Примечание: P — достоверность различий относительно этапа до гипокнезии

P<sub>1</sub> — достоверность различий относительно этапа после гипокнезии



гина, экстремальное воздействие на организм в стадии тревоги, т. е. в период, когда адаптационные механизмы еще не мобилизованы, ведет к значительному понижению устойчивости животного и суммации патогенного действия двух факторов [8]. Одновременно при умеренной активации симпато-адреналовой системы наблюдается относительно легкое течение геморагического шока, а при избыточной или недостаточной ее реакции шоковый процесс протекает значительно тяжелее и наступает ранняя смерть животного [5].

Таким образом, после 14-суточной гипокинезии повторное экстремальное воздействие в виде острой массивной кровопотери приходится на организм в стадии тревоги ОАС, с напряженным функционированием симпато-адреналовой системы и регуляторных механизмов. Поэтому в ответ на кровопотерю симпато-адреналовая система не может развить необходимую симпатикотоническую реакцию, а перенапряжение регуляторных механизмов приводит к их «полому» [1], чем и вызваны срыв компенсации и ранняя гибель животных.

После 45-дневной гипокинезии животные находятся в стадии резистентности ОАС [6, 7, 11, 12], когда гипоталамус-гипофиз-надпочечниковая и симпато-адреналовая системы переходят на новый уровень функционирования, обеспечивающий более экономный режим работы нервной и эндокринной систем на фоне длительного снижения общих стимулирующих и тонизирующих влияний, что выражается, в частности, и в понижении продукции упомянутых гормонов. Если организм подвергается экстремальному воздействию в стадии резистентности, т. е. в период мобилизации адаптивных механизмов, то он оказывается более устойчивым к этому воздействию [3, 8, 12].

Однако динамика показателей вариационной пульсометрии выявляет различие между животными II-а и II-б групп уже в исходном состоянии: у менее устойчивых животных отмечается более высокая активность симпатической нервной системы и высокая степень централизации управления, чем у более устойчивых. После воспроизведения гипокинезии как у более, так и у менее устойчивых живот-

ных включаются адренергические адаптивные механизмы, однако у менее устойчивых отмечается более резкое повышение активности симпатического отдела вегетативной нервной системы и напряжения регуляторных механизмов. Таким образом, после 45-суточной гипокинезии менее устойчивые животные подвергаются кровопотере в условиях гиперактивности симпато-адреналовой системы и регуляторных механизмов. После кровопотери перенапряженная симпато-адреналовая система не может развить достаточную симпатикотоническую реакцию, необходимую для включения компенсаторных механизмов в ответ на экстремальное воздействие, а перенапряжение регуляторных механизмов приводит к их истощению.

У более устойчивых животных после гипокинезии развивается умеренная активация симпатического отдела вегетативной нервной системы и менее выраженное напряжение регуляторных механизмов. После кровопотери происходит мобилизация резервных возможностей симпатоадреналовой системы и усиление централизации управления, что является выражением адапционно-приспособительной деятельности организма в экстремальных условиях и выявляется в развитии стадии временной адаптации функций и в большей продолжительности жизни при шоке. Однако в стадии декомпенсации это же усиление функционирования симпато-адреналовой системы приводит к ее истощению, а в терминальной стадии и к «полому» перенапряженных регуляторных механизмов, а в результате к срыву компенсации и гибели животных.

Анализ фактического материала позволяет заключить, что различная устойчивость животных к кровопотере при различной длительности гипокинезии определяется исходным состоянием регуляторных механизмов сердечной деятельности. У более устойчивых животных в состоянии покоя, до воспроизведения гипокинезии, преобладают активность парасимпатической нервной системы и автономного контура регуляции сердечной деятельности, а у менее устойчивых — симпатической нервной системы и центрального контура управления [10]. В ответ на экстремальное воздействие на фоне гипокинезии более благоприят-



ნამსა და ცენტრალური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ. ამასთანავე, უნდა აღინიშნოს, რომ ცენტრალური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ.

ჩეხოსლოვაკური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ. ამასთანავე, უნდა აღინიშნოს, რომ ცენტრალური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Баевский Р. М. В кн.: Функциональные особенности сердца при физических нагрузках в возрастном аспекте, I, Ставрополь, 1975, 27—50.
2. Баевский Р. М. Прогнозирование состояния на грани нормы и патологии, «Медицина», М., 1979.
3. Васильев П. В., Глод Г. Д., Мельников Е. П., Никольский И. Н., Петрухин С. В., Сытник С. И., Углова Н. Н. Косм. биол. и авиакосм. мед., 13, 5, 35—41, 1979.
4. Думбадзе Г. Г., Минеев И. Ф., Гершкович Э. И., Хачатуров Л. С., Разамат Л. Ю., Мартиросян А. В., Краснянский С. М., Телия З. А., Долидзе Г. Создание исследовательского комплекса для многофакторных динамических исследований при психофизиологических нагрузках (Отчет ЦНИЛ ТГМИ № ГР 80065440, инв. № 02827051038), Тбилиси, 1981.
5. Забродин О. Н., Крецер И. В. Пат. физ. и эксп. тер., 1, 93—94, 1985.
6. Коваленко Е. А., Гуровский Н. И. Гипокинезия, «Медицина», М., 1980.
7. Қорқач В. И. Врач. дело, 2, 11—16, 1981.
8. Кулагин В. К. Патологическая физиология травмы и шока, Л., «Медицина», 1978.
9. Мельник Б. Е., Кахана М. С. Медико-биологические формы стресса, «Штиинца», Кишинев, 1981.
10. Миндадзе К. А., Мегрелишвили Н. З. В кн.: Патогенез и экспериментальная терапия экстремальных состояний с учетом возрастных особенностей (Сб. науч. тр.), Тбилиси, 1984, 20—29.
11. Чернов И. П. Пробл. эндокринологии, 25, 2, 65—70, 1979.
12. Чернов И. П. Косм. биол. и авиакосм. мед., 1980, 4, 3, 57—60.

**ვირთობის გულის მუშაობის რეგულატორული მექანიზმების მდგომარეობა სისხლკარვის დროს, სხვადასხვა ხანგრძლივობის ჰიპოქინეზის შემდეგ**

**6. მებრუნევილი**

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტის ცენტრალური სამეცნიერო-კვლევითი ლაბორატორია

რ ე ზ ი უ მ ე

გალა-პენალეში მოთავსებით ვირთობის გულის მუშაობის რეგულატორული მექანიზმების მდგომარეობის შესახებ უნდა აღინიშნოს, რომ ცენტრალური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ. ამასთანავე, უნდა აღინიშნოს, რომ ცენტრალური ნერვული სისტემის ტონუსის გაზრდას უნდა მივიჩნიოთ.

მდგრადეში ჰარბობს სიმპათიკური ნერვული სისტემის ტონუსი და ცენტრალური მარეგულირებელი კონტურის აქტივობა. სისხლკარვის პასუხად, ექსტრემალურ მდგომარეობაში ორგანიზმის საიმედო კომპენსაციურ რეაქციად უნდა ჩაითვალოს სიმპათიკური ნერვული სისტემისა და ცენტრალური მარეგულირებელი კონტურის ტონუსის მატება; პარასიმპათიკური ნერვული სისტემისა და ავტონომიური მარეგულირებელი კონტურის ტონუსის მატება იწვევს, პირიქით, კომპენსაციის ადრეულ დარღვევას და ცხოველთა დღეულებს.



STATE OF HEART-CONTROL MECHANISMS IN RAT DURING THE  
HEMORRHAGE AFTER HYPOKINESIA OF VARIOUS DURATION



N. Z. MEGRELISHVILI

Tbilisi State Medical Institute, Central Scientific Research Laboratory

S u m m a r y

The motor activity of rats was restricted for different periods (14 days and 45 days) by placing them in cages. The rats were subject to hemorrhage after hypokinesia. It turned out that the resistance of animals to hemorrhage depends upon the initial state of heart-control mechanisms. In the animals more resistant to hemorrhage there prevails the tone of autonomous controlling curve for the heart activity and parasympathetic nervous system, while in the animals

with less resistance to hemorrhage there prevail the tone of sympathetic nervous system and central controlling curve. The increasing in tone of sympathetic nervous system and central controlling curve should be considered more desirable compensatory reaction to hemorrhage, while the increasing in tone of parasympathetic nervous system and autonomous controlling curve leads to an early suppression of compensation and death.

УДК 612.825.3+616.853

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ НА СУДОРОЖНУЮ АКТИВНОСТЬ

В. М. Окуджава, С. А. Чипашвили, Г. Р. Хачатуров

*Институт клинической и экспериментальной неврологии им. П. М. Сараджшвили  
МЗ ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 7.06.1985

Проводился микрофизиологический анализ нейронной организации пенициллинового очага при аппликации концентрированных растворов таурина и глицина.

В работе показано, что аппликация указанных веществ может вызвать урежение пенициллиновых электроэнцефалографических (ЭЭГ) спайков, уменьшение амплитуды и полное их купирование; при этом уменьшалась продолжительность ритмических пенициллиновых разрядов.

Микрофизиологическое исследование активности отдельных нейронов пенициллинового очага выявило полное купирование высокочастотных разрядов эпилептического нейрона, реорганизацию его клеточной активности по типу пассивных нейронов.

Анализ как энцефалографических, так и микрофизиологических данных выявил более сильное купирующее действие таурина по сравнению с действием глицина.

В настоящее время хорошо установлена природа короткой цепи аминокислот, таких как глицин,  $\beta$ -аланин, гамма-аминомасляная кислота и таурин. Все они обладают сильным тормозным воздействием на различных уровнях центральной нервной системы млекопитающих [3, 4, 6, 16]. Эти вещества принимают активное участие в обменных процессах и содержатся в центральной нервной системе, следовательно, являются естественными для мозга. Поэтому вполне понятно стремление исследователей использовать тормозные свойства этих веществ для лечения эпилепсии.

На разных моделях экспериментальной эпилепсии исследовалась возможность купирования эпилептической активности при введении животным различных аминокислот. В частности, антиконвульсивный эффект таурина наблюдали у животных с хронической моделью экспериментальной эпилепсии, вызываемой аппликацией кобальта, алюминиевой пасты, а также на фоне введения животным тетразола [7, 8, 15].

Имеется ряд работ, в которых исследованию влияния некоторых аминокислот, в том числе глицина и таурина, проводились на острой модели экспериментальной эпилепсии, и в качестве конвульсантов применялись такие эпилептогенные вещества как стрихнин, пенициллин, пентилентетразол. При этом исследовалось в основном влияние глицина и таурина на отдельные спорадические пенициллиновые и стрихнинные ЭЭГ спайки. В экспериментах применялось системное введение аминокислот в центральную нервную систему животных [15, 14]. Проникновение аминокислот через гематоэнцефалический барьер затруднено [10, 12, 13]. Относительно мало работ [5], в которых исследуется возможность торможения эпилептической активности аппликацией фармакологического препарата непосредственно в область эпилептического очага, что дает возможность, минуя гематоэнцефалический барьер, проявить купирующее действие исследуемого препарата.

Было показано, что системное введение глицина кошкам не купирует эпилептическую активность [14]. С другой стороны, при системном введении и прямой аппликации глицина на область эпилептического очага у крыс проявлялось купирующее действие глицина [5]. Интересно было проверить у кошек эффект глицина при прямой его аппликации на область эпилептического очага.

Настоящая работа является продолжением, начатых нами ранее исследований [2] о возможности торможения эпилептической активности введением

тормозных аминокислот непосредственно в область эпилептического очага. Разрабатываемые в последнее время микроинъекторы дают возможность использовать ингибиторы судорожной активности в клинической практике. С этих позиций было интересным выявить тормозное действие глицина у кошек и с помощью микрофизиологического метода наиболее тонко дифференцировать эффект купирующего действия изучаемых агентов, что имеет определенный интерес для клинической практики.

## МЕТОДИКА

Эксперименты проводились на взрослых кошках. Операция проводилась под эфирным наркозом, затем животное переводилось на искусственное дыхание и обездвигивалось внутривенным введением тубокурарина. Во время операции обнажались кости черепа и проводилась трепанация в сенсомоторной области коры. Вскрывалась твердая мозговая оболочка. С целью уменьшения пульсовых и дыхательных движений мозга животному, находящемуся на искусственном дыхании, с одной стороны в межреберных промежутках вскрывали плевральную полость—создавали открытый пневмоторакс. К опыту приступали не ранее чем через два часа после снятия эфирного наркоза.

Для создания эпилептического очага на кору накладывался кусочек смоченной в растворе пенициллина фильтровальной бумаги размером  $1 \text{ мм}^2$ . После создания устойчивого очага эпилептической активности фильтровальная бумага снималась. Мы старались создать очаги различной силы, т. е. исследования проводились как во время отдельных спорадических пенициллиновых ЭЭГ спайков, так и во время ритмических эпилептических разрядов, которые могли во-

звлекать в эпилептическую активность и другие области коры.

На область пенициллинового очага в экспериментах апплицировался насыщенный раствор глицина или таурина.

При микроэлектродных исследованиях использовались стеклянные микропипетки, заполненные 3 М раствором хлористого калия. Диаметр кончика микроэлектрода был менее  $1 \text{ мк}$ , а сопротивление его равнялось 20—50  $\text{мОм}$ . Для передвижения микроэлектрода применяли механический микроманипулятор, который крепили к стереотаксическому аппарату. Все клеточные потенциалы регистрировались при помощи катодного повторителя фирмы «Nihon—Kohden», записывались на магнитный регистратор фирмы «ТЕАС», а затем обрабатывались многоканальным анализатором NTA-512В. Фотографирование полученных результатов проводилось с катодного осциллографа «Disa Electronic» на киноплёнку установкой ФОР-2.

Биопотенциалы, отводимые макроэлектродами, регистрировались при помощи многоканального чернилопишущего электроэнцефалографа фирмы «Alvar».

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При аппликации на кору малых доз пенициллина (500000 ед. в 5 мл физиологического раствора) в области очага регистрировались отдельные спо-

радические спайки, которые возникали с латентным периодом 3—5 с.

Частота разряда колебалась от 21 до 35 в минуту. При аппликации концентрированного раствора на область

пенициллинового очага, созданного на задней сигмовидной извилине, наблюдалось угнетение эпилептической активности. При этом происходило урежение пенициллиновых ЭЭГ спайков, уменьшение их амплитуды и полное их купирование (рис. 1). Латентный период действия глицина составлял

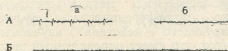


Рис. 1. Влияние аппликации концентрированного раствора глицина на область пенициллинового очага: Аа—до, Аб и Б—после аппликации глицина. Моноплярно отводятся: 1—левая сенсомоторная область (очаг); 2—симметричная очагу область противоположного полушария; 3—теменная область левого полушария. Калибровки: 100 мкВ, 1 с

50—100 с. Более сильное тормозное действие на эпилептическую активность было получено при аппликации таурина (рис. 2). Эта аминокислота при концентрированном растворе блокировала эпилептическую активность за 60—20 с. Полное торможение эпи-

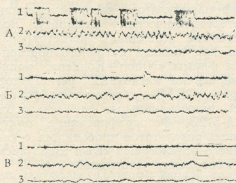


Рис. 2. Длительное торможение эпилептической активности при аппликации концентрированного раствора таурина на область пенициллинового очага: А—до, Б и В—после аппликации таурина. Моноплярно отводятся: 1—левая сенсомоторная область (очаг); 2—правая сенсомоторная область; 3—левая теменная область. Калибровки: 100 мкВ, 1 с

лептических разрядов продолжалось в течение 30—40 мин. На рис. 2 пред-

ставлены фрагменты эксперимента, в котором аппликация малой дозы пенициллина вызвала возникновение коротких ритмических разрядов без распространения в симметричную область противоположного полушария. Через 10 с после аппликации таурина на область эпилептического очага вместо ритмического разряда регистрируются одиночные спайки (рис. 2Б), которые вскоре (через 80 с) полностью блокируются (рис. 2В). Полный блок эпилептической активности в этом опыте продолжался 45 мин, затем активность одиночных спайков восстанавливалась. Возможность такого продолжительного тормозного эффекта таурина описана в литературе [11].

При использовании в качестве конвульсанта более высоких доз пенициллина (500000 единиц в 3 мл физиологического раствора) в коре регистрировался ритмический разряд, способный вовлекать в судорожную активность и другие области коры. Пароксизмальная активность при этом имела многообразные проявления и, видимо, зависела от неподдававшихся учету условий эксперимента. При такой модели эпилептической активности аппликация глицина и таурина в область эпилептического очага имела результатом укорочение продолжительности судорожной активности. Если аппликация названных веществ происходила на ранних стадиях развития ритмического разряда, она могла оборвать дальнейшую генерализацию эпилептической активности.

Микрофизиологический анализ нейронной активности пенициллинового очага при аппликации (на область очага) как глицина, так и таурина выявил уменьшение частоты разрядов регистрируемых нейронов. На рис. 3 приводятся гистограммы активности нейронов пенициллинового очага до аппликации исследуемых веществ и после. Видно резкое уменьшение частоты нейронных спайков после аппликации изучаемых агентов (рис. 3Б).

Микрофизиологические исследования, кроме того, позволили выявить реорганизацию клеточной активности, которая являлась в основе купирующего действия изучаемых аминокислот,

наблюдаемого при электроэнцефалографических исследованиях.

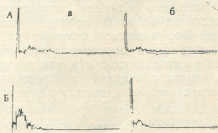


Рис. 3. Гистограммы активности нейрона сенсомоторной области коры в пенициллиновом очаге: Аа — до, Аб — после аппликации глицина; Ба — до, Бб — после аппликации таурина

На рис. 4 приводится внеклеточная запись активности нейрона до (А) и после (Б, В, Г) аппликации глицина на область очага. При этом на ЭЭГ (верхние кривые) видно, что после



Рис. 4. Активность нейрона сенсомоторной области коры, зарегистрированная внеклеточным микроэлектродом в области пенициллинового очага: А — до, Б, В, Г — после аппликации на область очага концентрированного раствора глицина. Между Б, В и Г — перерывы в несколько секунд. Калибровки: горизонтальная линия — 100 мс, вертикальная — 400 мкВ для макроэлектрода

аппликации концентрированного раствора глицина на область очага урежение частоты пенициллиновых разрядов, уменьшение их амплитуды коррелируют с изменением картины активности регистрируемого нейрона. Относительная высокочастотность, характерная для разряда нейрона во время отдельных спорадических ЭЭГ спайков (фрагмент А), заменяется регулярными разрядами нейрона (рис. 4 Б, В). Abortивные ЭЭГ спайки, регистрируемые впоследствии (рис. 4 Г), коррелируют уже с одиночными разрядами нейрона.

На рис. 5А показана активность нейрона эпилептического очага в период ритмического пенициллинового разряда. Видна постепенная эпилептизация нейрона. Фрагмент А,З этого рисунка представляет характерную картину разряда эпилептического нейрона: высокочастотные разряды нейрона коррелируют с пенициллиновыми пароксизмальными ЭЭГ разрядами, ре-

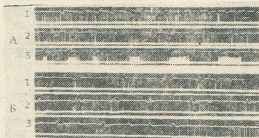


Рис. 5. Активность нейрона сенсомоторной области коры, зарегистрированная внеклеточным электродом в области пенициллинового очага до и после аппликации концентрированного раствора таурина. Между 1, 2 и 3 — перерывы в несколько секунд. Калибровки: горизонтальная линия — 100 мс, вертикальная — 300 мкВ для макроэлектрода

ритмический очаг, однако регистрируемые в коре. На фрагменте Б представлена активность того же нейрона после аппликации на область очага концентрированного раствора таурина. Таурин в данном случае полностью не купирует пенициллиновый емый нейрон уже не участвует в генезе эпилептической активности. Высокочастотные разряды нейрона исчезают и заменяются картиной разряда, характерной для введения пассивных нейронов (рис. 5Б).

Длительные периоды выключения высокочастотных спайков эпилептического нейрона регистрировались и во время аппликации глицина на область пенициллинового очага при генерализованной эпилептической активности. Это характерная картина, развивающаяся в это время в нейронной популяции очага. Видимо, такое частичное или полное выключение высокочастотных разрядов в популяции в итоге ослабляло очаг и в одних случаях вызывало его полный блок, а в других вело к укорочению судорог.

Результаты наших экспериментов показывают, что глицин и таурин купируют пенициллиновые ЭЭГ спайки, укорачивают продолжительность ритмического разряда. Эти данные согласуются с наблюдениями относительно тормозных эффектов глицина и таурина, ионофоретически апплицируемых на нейроны коры [9, 1].

Анализ как энцефалографических, так и микрофизиологических данных выявил более сильное действие таурина по сравнению с действием глицина. Латентный период действия таурина был короче, эффект купирующего дей-

ствия намного длинее по сравнению с глицином.

В опытах мы ни разу не получали облегчающего влияния исследуемых веществ на нейроны эпилептического очага. Это выгодно отличает их от действия гамма-аминомасляной кислоты как антиконвульсанта, так как при аппликации последней на область эпилептического очага, наряду с купирующим действием, было продемонстрировано [2] диаметрально противоположное, активирующее и синхронизирующее действие.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А. А. Синаптическая организация мозга (Сб. статей), 22, 1980, 89—103.
2. Окуджава В. М., Гофф В. Г., Чипашвили С. А., Хачатуров Г. Р. Очаговые формы эпилепсии (Сб. научн.-тр. Ин-та клин. и экспер. неврологии МЗ ГССР), Тбилиси, 1982, 68—72.
3. Bernardi G., Cherubini E. G., Marciani M. G., Stanzione P. *Neurosci. Lett.*, 12, 335—338, 1979.
4. Bernardi G., Marciani M. G., Morocutti C. *Brain Res.* 92, 511—515, 1975.
5. Cherubini E. G., Bernardi P., Stanzione M. G., Marciani M. G., Mercuri N. *Neurosci. Lett.*, 21, 93—97, 1981.
6. Curtis G. R., Hosli L., Johnston G. A. R., Johnston I. H. *Exp. Brain Res.*, 5, 235—258, 1968.
7. Durelli L., Mutani R., Delsedima M., Quattrococo C., Buffa C., Mazzarino M., Funuro S. *Exp. Neurol.*, 52, 30—39, 1976.
8. Izumi K., Igisu H., Fukuda T. *Brain Res.*, 88, 576—579, 1975.
9. Marciani M. G., Stanzione E., Cherubini E., Bernardi G. *Neurosci. Lett.*, 18, 169—172, 1980.
10. Marrassi A. S., Hart R. E., Rodriguez J. M. *Science*, 127, 284—285, 1958.
11. Mutani R. L., Bergamini R., Fariello R., Delsedime M. *Brain Res.*, 70, 170—173, 1976.
12. Oldendorf W. H. *Amer. J. Physiol.*, 221, 1629—1639, 1971.
13. Purpura D. F., Girado T. G., Smith Jr., Gimez J. A. *Amer. J. Physiol.*, 221, 1629—1639, 1971. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 10, 677—685, 1958.
14. Ruggero G. *Fariello Exp. Neurol.*, 66, 55—63, 1979.
15. Van Gelder N. M. *Brain Res.*, 47, 167—175, 1972.
16. Werman R., Davidoff R. A., Aprison M. H. *J. Neurophysiol.*, 31, 81—95, 1968.

კრუნჩხვითი აქტივობაზე ზოგიერთი ამინომჟავის მოკვამდობის მიკროფიზიოლოგიური გამოკვლევა

ვ. ოპუჯავა, ს. ბივაზილი, ზ. ბაჩატუროვი

საქართველოს სსრ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს პ. სარაჯიშვილის სახელობის კლინიკური და ექსპერიმენტული ნევროლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

ნაშრომში მოცემულია დიდი ტვინის ქერქში პენიცილინის ზემოქმედებით აღმო-

ცენებული კრუნჩხვითი კერის ნეირონული ორგანიზაციის მიკროფიზიოლოგიური

ანალიზი ამ კერაზე ტაურინისა და გლიცინის კონცენტრირებული ხსნარების აპლიკაციისას.

დიდი ტვინის ქერქში პენიცილინის კერაზე გლიცინის ან ტაურინის კონცენტრირებული ხსნარების აპლიკაციას შეუძლია გამოიწვიოს პენიცილინის სპაიკების გაიშვიათება, მათი ამპლიტუდის შემცირება და სრული დათრგუნვა. ამასთან პენიცილინით გამოწვეული რიტმული განმუხტებების ხანგრძლივობა მცირდება.

პენიცილინის კერის ცალკეული ნეი-

რონების მიკროფიზიოლოგიურმა ანალიზმა გამოავლინა ეპილეფსიური ნეირონების მაღალსიხშირეანი განმუხტებების დათრგუნვა და ნეირონული აქტივობის რეორგანიზაცია, როგორც ეს პასიური ნეირონის მოქმედებისათვის არის დამახასიათებელი.

ელექტროენცეფალოგრაფიულმა და მიკროფიზიოლოგიურმა ანალიზმა გამოავლინა, რომ ტაურინი უფრო ძლიერად მოქმედობს, ვიდრე გლიცინი.

## A MICROPHYSIOLOGICAL STUDY OF THE INFLUENCE OF SOME AMINO ACIDS ON THE SEIZURE ACTIVITY

V. M. OKUJAVA, S. A. CHIPASHVILI, G. R. KHACHATUROV

P. M. Sarajishvili Institute of Clinical and Experimental Neurology, Georgian Public Health Ministry, Tbilisi, USSR

### S u m m a r y

A microphysiological analysis was made of the neuronal organization of penicillin foci during the application of the concentrated solutions of taurine and glycine on the epileptic foci.

In the present study the application of these substances was shown to produce a decrease in the frequency and amplitude of the penicillin discharges up to their full arrest.

Microphysiological study of the unitary neuronal activity in penicillin foci revealed an entire suppression of high-frequency discharges of epileptic neurons and their reorganization according to the behaviour of passive neurons.

Analysis of the EEG and microphysiological data revealed a stronger inhibitory action of taurine in comparison with that of glycine.

УДК 612.826.1

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## О ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВЯЗЯХ ЛАТЕРАЛЬНЫХ ИЗВИЛИН С СУПРАСИЛЬВИЕВОЙ ИЗВИЛИНОЙ

З. В. Самадашвили, Н. С. Гедеванишвили, Л. К. Гомартели

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 25.06.1984

Исследовались транскаллозальные и ассоциативные ответы, регистрируемые при электрической стимуляции симметричных участков латеральных извилин (поле 18) в супрасильвиевой извилине.

Опыты ставились на небутализированных кошках. Установлено, что в ответ на электрическую стимуляцию симметричных точек латеральных извилин как ассоциативные, так и транскаллозальные ответы возникают в одних и тех же участках супрасильвиевой извилины. При парном раздражении одних и тех же точек одноименных областей тестируемые ответы (транскаллозальные и ассоциативные) подавлялись при межстимульных интервалах от 50 до 500 мс. Однако, следует отметить, что относительно глубокое и длительное подавление тест-ответов отмечалось при стимуляции ипсилатеральной коры.

Если регистрируемые при стимуляции симметричной коры транскаллозальные ответы в супрасильвиевой извилине предварялись вызванными раздражением какой-нибудь из латеральных извилин потенциалами, тест-ответы в обоих случаях сильно подавлялись (от 40 до 370 мс).

Полученные данные позволяют заключить, что нейронная активность супрасильвиевой извилины постоянно контролируется обеими латеральными извилинами, что проявляется главным образом в угнетающем воздействии.

Супрасильвиевая извилина коры больших полушарий головного мозга получает каллозальные аксоны как от одноименного участка контралатеральной гемисферы [3, 9, 11, 12, 16], так и от латеральной извилины противоположного полушария [1, 2, 7]. Вместе с тем существуют ассоциативные связи между латеральной и супрасильвиевой извилинами одного полушария. Таким образом, нейронные

популяции обеих латеральных извилин могут оказывать определенное влияние на процессы, происходящие в супрасильвиевой извилине [4—6, 15].

В данной работе исследовались вызванные ответы супрасильвиевой извилины при электрическом раздражении симметричных точек латеральных извилин обоих полушарий.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты ставились на 14 наркотизированных небуталом (37—40 мг/кг) половозрелых кошках. Электрическое раздражение коры больших полушарий производилось прямоугольными импульсами электрического тока длительностью не более 0,1—0,3 мс, подаваемых из стимулятора

ЭСУ-2. Биопотенциалы от поверхности коры отводились серебряными пуговчатыми электродами. В качестве предварительного усилителя был использован УБП 1-02.

Суммарные ответы коры (16 или 32) усреднялись специализированной машиной типа АНОПС-1.



В первой серии исследовались изменения тестируемых ответов в латеральной и супрасильвиевой извилинах, регистрируемых при парной электрической стимуляции латеральных извилин.

При стимуляции средней части латеральной извилины (поле 18) транскаллозальные ответы (ТКО) в противоположной коре возникают в виде двухфазного позитивно-негативного колебания, за которым может следовать добавочное позитивное (положительное) отклонение. Ответы регистрируются как в симметричных, так и в несимметричных областях контралатеральной коры; однако в симметричных участках ТКО имеют более

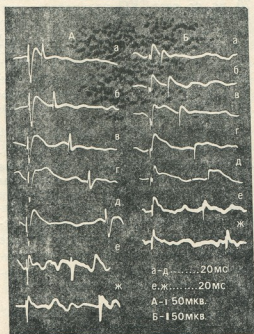


Рис. 1 Угнетение тестируемых ТКО латеральной (А) и супрасильвиевой (Б) извилин при парной электрической стимуляции контралатеральной латеральной извилины

высокую амплитуду. Парная стимуляция раздражаемой области (межстимульный интервал более 400 мс) вызывает возникновение двух, следующих один за другим, ТКО. В симметричных участках противоположной коры при интервале между стимулами не более 50 мс происходило полное угнетение второго ТКО (рис. 1—А, а, б). При увеличении интервала до 80 мс

второй ТКО возникал в виде <sup>низкого</sup> амплитудного положительного колебания (в), которое нарастало по мере увеличения интервала (г, д, е) и достигало начальной амплитуды при интервале 370—400 мс (ж). При стимуляции той же точки и регистрации ТКО из супрасильвиевой извилины наблюдалась несколько похожая картина — полное угнетение второго ТКО наступало в интервалах до 130 мс (рис. 1-Б, а-д). Увеличение интервала до 240 мс (е) вызывало восстановление ответа до 50% начальной величины ТКО, а при интервале 380—400 мс второй ТКО возвращался к фоновой величине амплитуды (ж). Таким образом, при стимуляции средней части латеральной извилины полное угнетение ТКО гораздо продолжительнее в супрасильвиевой извилине, по сравнению с угнетением ТКО в латеральной извилине коры полушарий.

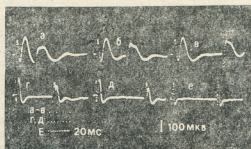


Рис. 2 Угнетение тестируемых ответов супрасильвиевой извилины (а—д) при парной электрической стимуляции ипсилатеральной латеральной извилины

Как отмечалось выше, исследовались также вызванные ответы (ВО) супрасильвиевой извилины при парной стимуляции тех же участков латеральной извилины ипсилатеральной стороны. На рис. 2—а, б, в видно, что при межстимульных интервалах от 70 до 140 мс наступало полное угнетение тестируемого ответа; низкоамплитудное положительное отклонение появлялось при интервале 240 мс (г). Эти положительные потенциалы увеличивались при увеличении интервалов между стимулами (д) и достигали фоновой величины при интервале 500 мс и более (е).

Таким образом, парная стимуляция латеральной извилины вызывает угне-

тение тестируемых ТКО в противоположном полушарии, как в латеральной, так и в супрасильвиевой извилинах. Такой же эффект на вторые ответы в супрасильвиевой извилине вызывает и стимуляция ипсилатеральной латеральной извилины.

Во второй серии исследовались тест-ТКО супрасильвиевой извилины, регистрируемые при стимуляции контралатеральной симметричной точки, когда кондиционирующие стимулы наносились на латеральные извилины, т. е. исследовалось их влияние на ответы супрасильвиевой извилины.

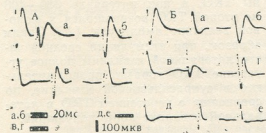


Рис. 3. Угнетение тестируемых ТКО супрасильвиевой извилины, регистрируемых при стимуляции контралатеральной симметричной точки: А-а, в — кондиционирующие ответы при стимуляции контралатеральной латеральной извилины; А-б, г — фоновые ТКО супрасильвиевой извилины на тестируемый раздражитель; Б-а, в, д — кондиционирующие ответы при стимуляции ипсилатеральной латеральной извилины; Б-б, г, е — фоновые ТКО супрасильвиевой извилины на тест-раздражитель

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существует немало данных относительно изменения суммарных ответов коры больших полушарий при раздражении разных областей противоположного полушария парными стимулами. Латимер и Кеннеди [14], Аймон-Марсан и Морилло [8] исследовали изменения вторых ТКО при парной стимуляции латеральной и супрасильвиевой извилин, а Клар и соавт. [10] наблюдали за изменением ответов коры при парной стимуляции МТ.

Результаты нашей работы, полученные при регистрации ТКО из латеральной извилины, возникающих в от-

На рис. 3 видно, что ТКО из супрасильвиевой извилины (А-б, г), регистрируемые при стимуляции симметричной точки противоположной коры, угнетаются на 40% (А-а), если им предшествуют кондиционирующие ответы, регистрируемые при стимуляции контралатеральной латеральной извилины.

Тестируемые ответы постепенно увеличиваются в амплитуде, если увеличивается время между стимулами (А-в) и достигают фоновой амплитуды при межстимульных интервалах 180—220 мс. Если же кондиционирующий стимул наносится на ипсилатеральную латеральную извилину, то тест-ТКО угнетаются более сильно. На рис. 3 Б-а видно, что, когда интервал между стимулами составляет до 70 мс, то тест-ТКО подавляется полностью (Б-а); низкоамплитудные ответы регистрируются при интервалах 105—125 мс (Б-в), а фоновые ТКО (в, е, и) супрасильвиевой извилины, регистрируемые при стимуляции симметричных точек, наблюдаются только в случае межстимульного интервала порядка 350—370 мс.

Таким образом, кондиционирующая стимуляция как ипси-, так и контралатеральных латеральных извилин на тест-ТКО супрасильвиевой извилины (регистрируется при раздражении симметричных точек) действует одинаково, угнетая в обоих случаях тестируемые ответы, однако угнетение тест-ТКО выражено сильнее при кондиционирующей стимуляции ипсилатеральной латеральной извилины.

вет на стимуляцию парными стимулами симметричной точки, совпадают с данными указанных авторов. Однако наши опыты так же показали, что вторые ТКО, регистрируемые из супрасильвиевой извилины, при раздражении латеральной извилины угнетаются, как и ТКО из противоположной латеральной извилины. Следовательно, угнетение амплитуды второго ТКО в обоих случаях должно быть вызвано включением тормозных механизмов в соответствующих воспринимающих областях. Очевидно, первые из каллозальных импульсов вызывают торможение большого количества кор-

ковых нейронов, принимающих участие в генезе ТКО, поэтому повторное раздражение контралатеральной коры может оказаться малоэффективным или вовсе неэффективным, если интервал между двумя стимулами равен 200—400 мс. Видимо, в этом промежутке времени клетки еще находятся в заторможенном состоянии. В пользу этого говорят данные Аймон-Марсана и Морилло [8], Финей и Орема [13] о торможении большинства корковых клеток латеральной извилины при активации каллозальных нейронов. Подобные процессы происходят также и в супрасильвиевой извилине в ответ на возбуждение каллозальных клеток противоположной латеральной извилины. Как отмечалось, при парной стимуляции латеральной извилины регистрировались ответы в супрасильвиевой извилине ипсилатеральной стороны. При этом вторые ответы угнетались более длительно (до 500 мс). Данные эффекты также можно связать с торможением корковых клеток воспринимающей области. В пользу этого говорят данные

[4—6, 15] о том, что ассоциативная кора находится под постоянным контролем первичных воспринимающих областей, что выражается, в основном, в угнетении активности нейронов ассоциативной коры. Описанные данные второй серии опытов можно объяснить следующим образом: при стимуляции латеральной извилины нейронные популяции в обеих супрасильвиевых извилинах тормозятся. Если на эти же клетки конвергируют пре-синаптические образования тех каллозальных клеток, которые активируются стимуляцией симметричных точек противоположной супрасильвиевой извилины, то активация этих нейронов должна быть неэффективной или малоэффективной в интервале торможения. Отсюда вытекает, что симметричные области латеральных извилин оказывают функционально идентичное влияние на одни и те же популяции нейронов супрасильвиевых извилин коры, важной функцией которых является участие в интегративной деятельности больших полушарий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров Ф. Н. *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, 55, 7, 48—54, 1968.
2. Макаров Ф. Н. *Комиссуральные связи зрительной коры кошки*, Автореф. канд. дисс., Л., 1968.
3. Мосидзе В. М., Ржиначвили Р. С., Тотиадзе Н. К., Кеванишвили З. Ш., Акбардия В. К. *Расщепленный мозг*, «Мецниереба», Тбилиси, 1972.
4. Нарикашвили С. П. *ЖВНД*, 19, 110—123, 1969.
5. Нарикашвили С. П., Арутюнов В. С., Гума Е. *ЖВНД*, 18, 865—879, 1968.
6. Нарикашвили С. П., Арутюнов В. С., Моцивава Э. С. *ЖВНД*, 17, 669—676, 1967.
7. Школьник—Ярос Е. Г. *ЖВНД*, 8, 1, 123—136, 1958.
8. Ajmone-Marsan G., Morillo A. *Arch. Ital. Biol.*, 101, 1—19, 1963.
9. Chang H. L. *J. Neurophysiol.*, 16, 133—144, 1953.
10. Clure M. N., Landay W. M., Bishop G. H. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 13, 21—33, 1961.
11. Curtis H. J., Bard P. *Amer. J. Physiol.*, 126, 473—475, 1939.
12. Curtis H. J., *J. Neurophysiol.*, 3, 407—413, 1940.
13. Feeney D. M., Orem I. M. *Exp. Neurol.*, 33, 310—321, 1971.
14. Latimer C. N., Kennedy T. T. *J. Neurophysiol.*, 24, 66—79, 1961.
15. Rutledge M. K., Shellenberger, *Arch. Ital. Biol.*, 106, 353—368, 1968.
16. Shofer R. J., Purpura D. P. *Exp. Neurol.*, 2, 37, 431—445, 1972.



ზ. სამადაშვილი, ნ. გედევანიშვილი, ლ. გომარტელი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ნემბუტალიზებულ ცხოველებზე (14 კატა) სუპრასილვიის ხვეულში ელექტროფიზიოლოგიურად შესწავლილ იქნა ლატერალური ხვეულების გაღიზიანებით გამოწვეული ტრანსკალოზალური და ასოციაციური პასუხები. გამოიჩვენა, რომ ლატერალური ხვეულების გაღიზიანებით გამოწვეული როგორც ასოციაციური, ისე ტრანსკალოზალური პასუხები სუპრასილვიის ხვეულის ერთსა და იმავე უბნებში აღმოცენდება. როგორც კონტრალატერალური, ისე იფსილატერალური ლატერალური ხვეულების ერთი და იმავე წერტილების წვეტილული გაღიზიანებისას მეორე გაღიზიანებით აღმოცენებული პასუხები ითრგუნება, თუ სტიმულთა შორის ინტერვალი 50 მს-დან 500 მს-მდეა. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ მეორე პასუხის შედარებით ღრმა და ხანგრძლივი დათრგუნვა მაშინ ხდება, როცა ღიზიანდება იფსილატერალური ქერქი.

თუ სუპრასილვიის ხვეულის სიმეტრიული წერტილის გაღიზიანებისას რეგისტრირებულ ტრანსკალოზალურ პასუხებს წინ უსწრებს იფსი-ან კონტრალატერალური ლატერალური ხვეულის გაღიზიანებით აღმოცენებული პოტენციალები, ტესტ-პასუხები ორივე შემთხვევაში ძლიერ ითრგუნება (თუ გაღიზიანებათა შორის ინტერვალი 40 — 370 მს-ის ფარგლებშია).

გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ორივე შემთხვევაში სუპრასილვიის ხვეულების ერთსა და იმავე უბნებზე ლატერალური ხვეულების სიმეტრიული წერტილების გავლენა ფუნქციურად იდენტურია.

უნდა ვივარაუდოთ, რომ ლატერალური ხვეულების სიმეტრიულ უბნებში მიღებული ინფორმაცია, გადაამუშავების შემდეგ, გადაეცემა სუპრასილვიის ხვეულის ერთსა და იმავე უბნებს და ამდენად ამ უკანასკნელთ ურთიერთშემავსებელი მოქმედება ახასიათებთ.

FUNCTIONAL CONNECTIONS BETWEEN THE LATERAL AND SUPRASYLVIAN GYRI

Z. V. SAMADASHVILI, N. S. GEDEVANISHVILI, L. K. GOMARTELI

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Transcallosal and assotiative responses, evoked by the stimulation of the lateral gyrus, were registered and tested in the suprasylvian gyrus of nembutalized cats. The transcallosal and assotiative responses, evoked by the stimulation of the symmetrical points of the lateral gyrus, were identified in the same point of suprasylvian area. Inhibition of test-responses during the double stimulation of the same points of the contralateral or ipsilateral gyri took place in the interval between the stimuli 50—500 msc.

Stimulation of the ipsilateral cortex provokes the longer and stronger inhibition. Marked inhibition of test responses (40—370 msec) took place when transcallosal responses, recorded during the stimulation of symmetrical point of suprasylvian gyrus were preceded by the potentials evoked during the stimulation of ipsi-or contralateral lateral gyri. The influence of symmetrical points of the lateral gyrus on the same points of suprasylvian area is supposed to be identical.

УДК 612.821.7

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ТАЛАМИЧЕСКОГО РЕУНИАЛЬНОГО ЯДРА НА ОБЩЕЕ ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНОГО И НА СТРУКТУРУ ЦИКЛА БОДРСТВОВАНИЕ-СОН

Э. О. Чиджавадзе, М. М. Мгалоблишвили

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 22.06.1984

На кошках было показано, что электролитическое повреждение неспецифического таламического реуниального ядра вызывает изменение общего поведения животного и цикла бодрствование-сон. В частности, повреждение данного ядра повышает уровень пищевой мотивации и задерживает процесс обучения, не затрудняя при этом дискриминацию направляющих сигналов. Наблюдается редукция парадоксального и медленноволнового сна с параллельным увеличением бодрствования. Обсуждается участие реуниального ядра в регуляции цикла бодрствование-сон, в организации мотивационно-эмоционального поведения и памяти.

В настоящее время методом повреждения отдельных структур лимбической системы (гиппокамп, септум, миндалевидный комплекс, гипоталамус, поясная извилина и др.) выявлено их участие как в организации мотивационно-эмоциональных поведений, так и в регуляции цикла бодрствование-сон [3]. Кроме вышеназванных структур, вероятно, и другие образования головного мозга также имеют немаловажное значение в этих процессах. Объектом наших исследований было неспецифическое таламическое реуниальное ядро — ранее не изученное в этом аспекте. Интерес этот возник в связи со структурным сходством данного ядра с такой важной структурой лимбической системы как септум, являющейся одним из основных входов гиппокампа.

С помощью метода ретроградного транспорта пероксидазы хрена на

крысах и кроликах показано наличие прямых таламо-гиппокампальных связей [2, 4, 5, 6, 9] и, в частности, реуниально-гиппокампальных связей [2, 4, 5, 10, 21]. Следовательно, реуниально-гиппокампальная связь может обеспечивать осуществление влияний различных структур мозга на гиппокамп. Учитывая сходство между клетками реуниального ядра и медиального септума [7, 8, 11, 12, 16, 19], Бэйзден и Хувер [4] предположили общность этих образований в модуляции гиппокампального тета-ритма.

Цель данной работы — изучить влияние электролитического повреждения неспецифического таламического реуниального ядра на общее поведение животного, память, а также на соотношение и взаимообусловленность различных фаз цикла бодрствование-сон.

### МЕТОДИКА

Опыты ставились на кошках с хронически вживленными в различные структуры головного мозга электродами в условиях их свободного поведения. Операция по вживлению элект-

родов производилась под нембуталовым наркозом (30—35 мг/кг). Электроды готовились из константановой проволоки с фабричной изоляцией и имели диаметр неизолированного

кончика 150—200 мк. Координаты для стереотаксической локализации кончиков электродов брались по атласу Джаспера и Аймон-Марсана [13]. Электроды вживлялись в новую кору (зрительная кора), в дорсальный гиппокамп, в неспецифическое таламическое реуниальное ядро и в глазодвигательные мышцы. Производилась также регистрация электрокардиограммы и электроокулограммы. Идентификация различных фаз цикла бодрствование-сон производилась на основе динамики электронеокортикограммы, электрогиппокампограммы и движения глазных яблок.

При обработке записей циклограммы строились по общепринятому принципу, выделялись четыре состояния: бодрствование, поверхностный медленноволновой сон, глубокий медленный сон и парадоксальный сон.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Влияние повреждения таламического реуниального ядра на пищевое поведение и на выработку инструментальных пищевых рефлексов

Повреждение реуниального ядра (рис. 1) кошки переносили хорошо и, как только выходили из наркоза, на-

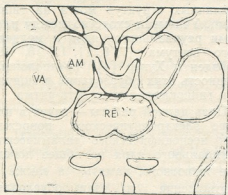


Рис. 1. Схематическое изображение мозга на уровне неспецифического таламического реуниального ядра. Повреждение отмечено пунктиром

чинали самостоятельно есть. На рис. 2А показано количество каждодневного приема пищи до и после повреждения реуниального ядра. Налицо увеличение уровня пищевой мотивации —

Регистрация цикла бодрствование-сон производилась после утреннего кормления животного от 11 до 18 ч. Периодически производилась 24-часовая регистрация цикла. Опыты проводились в специальной экспериментальной камере, приспособленной для визуального наблюдения и полиграфической регистрации цикла бодрствование-сон. Полиграфическая запись производилась на 16-канальном электроэнцефалографе ЭЭГУ-16-02. Повреждение реуниального ядра достигалось анодным электролизом.

По окончании опытов мозг фиксировался в растворе формалина и подвергался обычной гистологической обработке. При необходимости данные обрабатывались статистически. Рассчитывались средние величины, их стандартные отклонения. Достоверность указанных величин определялась t-критерием Стьюдента.

развитие гиперфагии. Несмотря на увеличение пищевой мотивации, животное теряет в весе, что, по-видимому, связано с нарушением цикла сна.

Одним из удачных тестов нормального состояния животного после функционального выключения той или иной структуры головного мозга является выработка инструментальных пищевых рефлексов, для которой необходим соответствующий уровень пищевой мотивации, что и имело место после повреждения реуниального ядра.

Условные пищеводвигательные реакции вырабатывались классическим методом на тон и щелчки. Во время интервалов между сигналами животное находилось в стартовом отделении экспериментальной кабины. При включении раздражителей животное подходило к соответствующей кормушке и получало порцию мяса. Условные направляющие сигналы подкреплялись в каждом сеансе обучения подачей пищи 10 раз. Контролем слу-

жили статистически обработанные данные на интактных животных.

Как показала статистическая обработка данных, в первых трех сеансах обучения (рис. 2Б, 1, 2, 3), судя по процентам правильных ответов, выработка инструментальных пищевых рефлексов (темные столбики) по

лов в обеих группах животных, достигалась одновременно.

Таким образом, несмотря на то, что повреждение реуниального ядра повышает уровень пищевой мотивации, выработка инструментальных пищевых рефлексов задерживается, не затрудняя при этом дискриминацию направляющих сигналов.

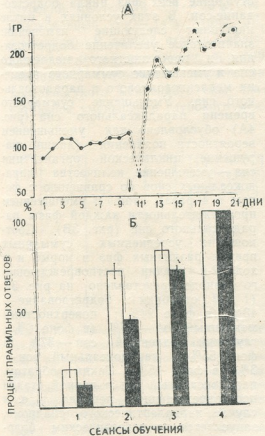


Рис. 2. Влияние электролитического повреждения реуниального ядра на пищевую мотивацию (А) и выработку инструментальных пищевых рефлексов со звуковой дискриминацией (Б); А — по оси абсцисс — экспериментальные дни; по оси ординат — количество принимаемой пищи; прямая линия с кружочками — до повреждения; прерывистая с кружочками — после повреждения; стрелкой отмечен день повреждения. Б — на оси абсцисс — 1, 2, 3, 4-й сеансы обучения; на оси ординат — процент правильных ответов; светлые столбики — у интактных животных; темные — у экспериментальных.

сравнению с контрольной группой животных (светлые столбики) задерживалась. В четвертом сеансе обучения (рис. 2Б, 4) 100%-ная дискриминация направляющих сигнала

**Влияние повреждения таламического реуниального ядра на общее поведение животного и на протекание цикла бодрствование-сон**

После установления стабильного фона цикла бодрствование-сон производилось электролитическое повреждение реуниального ядра, которое вызывало заметные изменения как в поведении животного, так и в цикле сна. Поведенческие наблюдения над таким животным, дополненные электроэнцефалографическими исследованиями, позволили нам классифицировать эффекты, полученные после подобного повреждения, на несколько временных стадий: стадия гиперактивности, или гиперэмоциональности; стадия экспериментальной сонливости; вновь стадия гиперактивности и стадия стабилизации цикла бодрствование-сон. Как только животное после повреждения реуниального ядра выходило из наркоза наступал период двигательной гиперактивности. В течение всего опытного дня наблюдалось манежное движение, которое принимало как бы целенаправленный характер. Временами манежное движение сменялось небольшим отдыхом. Соответственно в эти дни в цикле бодрствование-сон наблюдались драматические сдвиги. В паузах между манежным движением иногда развивались фрагменты дремотного состояния.

Через определенное время (7—8 дней) манежное движение ослабевало и наступала следующая стадия, длящаяся около 6 дней, весь период которой животное проводило на ногах. Круглосуточное наблюдение показало, что характерные для сна позы животное не принимало. Несмотря на это, наблюдалось наступление парадоксальных снов небольшой про-

должительности. Идентификация парадоксальных снов по поведенческим данным в этот постповреждающий период показана на рис. 3В. Все парадоксальные сны начинались прямо от поведенческого бодрствования в стоячем или сидячем положении с высоко поднятой головой. Затем голова начинала падать и от резкого удара животное просыпалось, т. е. налицо картина нарколептического

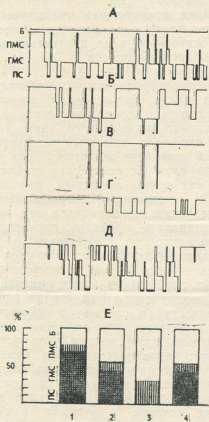


Рис. 3. Структура 6-часовых циклов бодрствование-сон до и после повреждения ретикулярного ядра: А — фоновая структура. Б — 2-я стадия постповреждающего периода, построенная по электроэнцефалографическим критериям, В — та же стадия, построенная по поведенческим критериям; Г, Д — 3 и 4-я стадии; Е — процентное соотношение фаз цикла бодрствование-сон до (1) и в соответствующие стадии (2, 3, 4) постповреждающего периода

синдрома, когда парадоксальные сны начинаются без предварительной фазы медленноволнового сна. Однако парадоксальные сны не могут быть обусловлены поведенческим бодрствованием, так как общеизвестна при-

чинная взаимосвязь [14, 18, 20], существующая между парадоксальным и медленноволновым сном. Если сравнить циклограмму данной стадии, построенной по электроэнцефалографическим критериям (рис. 3Б), с циклограммой, построенной по поведенческим данным (рис. 3В), картина значительно изменяется — налицо наступление всех фаз цикла бодрствование-сон. В этих условиях в цикле наступают следующие изменения: значительное увеличение бодрствования и поверхностного медленного сна и уменьшение суммарного времени медленноволнового и парадоксального сна. Уменьшение суммарного времени парадоксального сна (рис. 4А) обусловлено как уменьшением вероятности появления (налицо нарушение циклической организации сна — уменьшение количества парадоксальных снов по сравнению с фоном в 4 раза), так и уменьшением продолжительности каждой фазы парадоксального сна (рис. 3Б). Соотношение усредненных суммарных времен различных фаз в норме и в ходе 2-й стадии постповреждающего периода представлено на рис. 3Е (1 и 2 столбики): бодрствование — 43% (в фоне 24%); поверхностный медленный сон — 17% (в фоне 6%); глубокий медленный сон — 37% (в фоне 55%) парадоксальный сон — 3% (в фоне 15%). Таким образом, парадоксальный сон в данной стадии постповреждающего периода, т. е. в случае нарколептического синдрома, запускается не поведенческим бодрствованием, а медленноволновым сном, который развивается на фоне поведенческого бодрствования.

Более выраженными являлись изменения в структуре цикла бодрствование-сон в 3-й стадии постповреждающего периода, которая наступала приблизительно к 14-му дню после повреждения ретикулярного ядра. Рис. 3Г иллюстрирует соотношение различных фаз цикла бодрствование-сон той же кошки в ходе данной стадии. В этих условиях в цикле наблюдалось два выраженных изменения: полное исчезновение медленноволнового и парадоксального сна и значительное увеличение бодрствования (70%) и поверхностного медленного сна (30%) (рис. 3Е. 3 столбик) по



сравнению с фоном (рис. 3А, Е, 1 столбик).

Восстановление картины цикла бодрствование-сон и наступление стабилизации представлено на рис. 3Д. К моменту стабилизации усредненное суммарное время различных фаз следующее: бодрствование — 47%; поверхностный медленный сон — 13%; глубокий медленный сон — 26%; парадоксальный сон — 14% (рис. 3Е, 4 столбик). В данной стадии наблюдается заметное увеличение времени засыпания, увеличение количества поверхностного медленного сна, значительное уменьшение глубокого мед-

Несмотря на стабилизацию цикла бодрствование-сон, содержание различных фаз не достигает контрольного уровня (рис. 3А).

Заметные изменения претерпевала и электроэнцефалографическая картина парадоксальной фазы сна. Рис. 4Б иллюстрирует сравнение тета-ритма гиппокампа эмоциональной (1 столбик) и неэмоциональной (2 столбик) стадий парадоксального сна фона с тета-ритмом гиппокампа постповреждающего периода (3 столбик). Как видно, после повреждения реуниального ядра в гиппокампе, по сравнению с эмоциональной стадией парадоксального сна фона, наблюдается статистически достоверное уменьшение выраженности тета-ритма. Тета-ритм гиппокампа после повреждения приближается к тета-ритму неэмоциональной стадии парадоксального сна фона. В данном случае можно провести аналогию между степенью выраженности гиппокампального тета-ритма постповреждающего периода и неэмоциональным парадоксальным сном фона.

На фоне повреждения реуниального ядра наблюдалось также уменьшение и характерных для парадоксальной фазы сна компонентов эмоционального напряжения. Рис. 5А иллюстрирует частоту движений глазных яблок в ходе парадоксального сна фона (1 столбик) и постповреждающего периода; когда парадоксальный сон проходит в позе сфинкса (2 столбик) и когда животное принимает нормальные позы сна (3 столбик). Показано статистически достоверное уменьшение частоты движений глазных яблок. Наибольшая тенденция к уменьшению наблюдается при сравнении фона (1 столбик) с парадоксальным сном, когда животное спит в позе сфинкса (2 столбик).

Наблюдалось также изменение сердечного ритма (рис. 5Б). В ходе бодрствования (Б) электрокардиограмма имеет тенденцию к урежению, тогда как в ходе парадоксального сна (ПС) частота сердечных

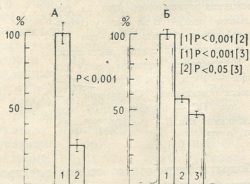


Рис. 4. Влияние повреждения реуниального ядра на частоту появления парадоксальных фаз сна (А) и на выраженность гиппокампального тета-ритма (Б); А: 1 — частота появления парадоксальных фаз сна в нормальном цикле бодрствование-сон; 2 — в ходе постповреждающего периода (2 стадия). Достоверность разницы между 1 и 2 столбиками —  $P < 0,01$ . Б — гиппокампальный тета-ритм в ходе эмоциональной стадии парадоксальной фазы сна фоновой структуры цикла бодрствование-сон; 2 — в ходе неэмоциональной стадии парадоксального сна; 3 — после повреждения реуниального ядра. Достоверность разницы между 1 и 3 столбиками —  $P < 0,0001$

ленноволнового сна и незначительное уменьшение парадоксального сна (рис. 3 Д, Е, 4 столбик). Частота появления парадоксальных снов по сравнению со второй стадией (рис. 3Б) увеличивается, т. е. циклическая организация сна приходит в норму, в результате чего увеличивается суммарное время парадоксальных снов.

сокращений увеличивается. Что касается медленноволнового сна, то повреждение реуниального ядра не вы-

Из вышесказанного видно, что повреждение реуниального ядра вызывает значительные изменения цикла

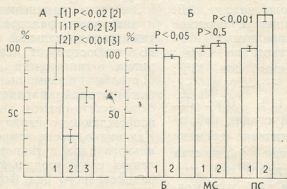


Рис. 5. Влияние электролитического повреждения реуниального ядра на движение глазных яблок в ходе парадоксального сна (А) и на частоту сердечных сокращений в ходе различных стадий цикла бодрствование-сон (Б). А: 1 — движение глазных яблок в фоне; 2 — в ходе 2-й стадии постповреждающего периода; 3 — в ходе 4-й стадии. Достоверность разницы между 1 и 2 столбиками —  $P < 0,02$ ; 1 и 3 столбиками —  $P < 0,2$ ; 2 и 3 столбиками —  $P < 0,01$ ; Б: 1 — фоновая запись; 2 — после повреждения. Обозначения: Б — бодрствование; МС — медленноволновой сон; ПС — парадоксальный сон. Достоверность разницы между 1 и 2 столбиками: для Б —  $P < 0,05$ ; МС —  $P > 0,5$ ; ПС —  $P < 0,001$

зывает изменений частоты сердечных сокращений по сравнению с фоном (1 столбик).

бодрствование-сон со своими электроэнцефалографическими и вегетативными компонентами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, повреждение реуниального ядра вызывает значительные изменения в мотивационно-эмоциональном поведении и в цикле бодрствование-сон. Показано, что обширное повреждение реуниального ядра вызывало заметную гиперфагию. Возможно, данное ядро является одним из звеном системы, регулирующей пищевое поведение. Однако интересно отметить, что увеличение приема пищи, которое должно вести к увеличению массы тела, в данном случае, наоборот, вызывало похудание животного, что, в свою очередь, можно объяснить гиперэмоциональностью животного и нарушением цикла бодрствование-сон, т. е. здесь налицо корреляция между количеством пищи, двигательной активностью и весом животного. Согласно нашим данным, несмотря на то, что повреждение реуниального ядра вызывает

увеличение пищевой мотивации, процесс обучения не нарушается, а лишь задерживается, не затрудняя при этом дискриминацию направляющих сигналов. Можно полагать, что роль реуниального ядра в организации памяти заключается, главным образом, в регуляции мотивационных процессов.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о значении лимбической системы в регуляции цикла бодрствование-сон. Функциональное отключение той или иной структуры имеет, как правило, следствием расстройство данного цикла. Исследование хронических эффектов электролитического повреждения реуниального ядра показало значительные изменения в организации цикла бодрствование-сон. В норме циклическая организация сна, т. е. временные со-



отношения между фазами протекания, являются более или менее упорядоченными. Повреждение же реуниального ядра вызывает отчетливые изменения в цикле бодрствование-сон. В частности, нарушается временная организация. Сильно редуцировалось общее количество медленноволнового и парадоксального сна с параллельным увеличением бодрствования. Изменения претерпевала и электроэнцефалографическая картина парадоксального сна со своими вегетативными компонентами. Как было отмечено, во второй стадии постповреждающего периода, в отличие от контрольных записей, медленноволновой сон можно было идентифицировать лишь по электроэнцефалографическим критериям. В этой же стадии наблюдалось появление нарколептического синдрома. По данным ряда авторов [15, 17], распределение различных фаз цикла бодрствование-сон при данном синдроме отличается от нормы, что согласуется и с нашими данными. Однако, как было нами показано, парадоксальный сон, возникающий при нарколептическом синдроме, обусловлен не бодрствованием, как это считалось [2], а медленноволновым сном. Вероятно, повреждение реуниального ядра вызвало расщепление механизмов поведенческого и электроэнцефалогра-

фического бодрствования. Все это указывает на то, что в любом случае (как в норме, так и в случае отклонения, вызванном функциональным исключением той или иной структуры головного мозга) между медленноволновым и парадоксальным сном существует причинная взаимосвязь [14, 18, 20], выражающаяся в том, что первая фаза сна подготавливает нейрогуморальный фактор активации мозговой системы, регулирующий вторую фазу.

Таким образом, вышеописанные результаты показали, что при повреждении реуниального ядра характер протекания различных фаз сна, соотношение электроэнцефалографических и поведенческих компонентов различных фаз цикла бодрствование-сон претерпевают заметные изменения. Однако со временем происходит восстановление и нормализация цикла бодрствование-сон. Вероятно, реуниальное ядро участвует в регуляции цикла бодрствование-сон модулирующим влиянием на базические механизмы дiencephальных структур. Кроме того, полученные данные говорят о возможном участии данного ядра в организации мотивационно-эмоционального поведения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вейн А. М. Нарушения сна и бодрствования, «Медицина», М., 1974.
2. Пахомова А. С. Нейрофизиология, 13, 4, 359—365, 1981.
3. Ониани Т. Н. Интегративная функция лимбической системы, «Мецниереба», Тбилиси, 1980.
4. Baisden R. H., Hoover D. B. Cell Tissue Res., DEU, 203, 3, 387—391, 1979.
5. Baisden R. H., Hoover D. B., Covie R. I. Anat. Res., 193, 738, 1979.
6. Baisden R. H., Hoover D. B., Cowie R. I. Neurosci. Lett., 13, 105—109, 1979.
7. Brownstein M., Kobayashi R., Palkovits M., Saavedra J. M. J. Neurochem., 24, 35—38, 1975.
8. Chronister R. B., De France I. F., Sikes R. W., Srebro B., White L. E., Exp. Neurol., 50, 684—698, 1976.
9. Herkenham M. A. Neurosci. Abstr., 2, 1, 387, 1976.
10. Herkenham M. A. J. Comp. Neurol., 177, 4, 589—609, 1978.
11. Hoover D. B., Muth E. A., Jacobowitz D. M. Brain Res., 153, 295—306, 1978.
12. Jacobowitz D. M., Palkovits M. J. Comp. Neurol., 157, 13—28, 1974.
13. Jasper H. H., Ajmone-Marsan. A Stereotaxic Atlas of the Diencephalon of the Cat. Ottawa Nat. Res. Council, Canada, 1954.
14. Jouvet M. Science, 163, 32—41, 1969.
15. Mitler M. M., Dement W. C. Elec-



troenceph. clin. Neurophysiol., 43, 691—699, 1977

16. Paikovits M., Saavedra I. M., Kobayashi R. M., Brownstein M. Brain Res., 79, 443—450, 1974.

17. Rechtschaffen A., Dement W. C. In: A. Kales (Ed.). Sleep Physiology and Pathology. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1969.

18. Svorad D., Karmanov G. Nature, 12, 713—714, 1966.

19. Tömböl T., Petsche H. Brain Res., 12, 414—426, 1969.

20. Ursin R. Brain Res., II, 2, 347—356, 1968.

21. Wyss J. H., Swanson L. W. Neuroscience, 4, 463—476, 1979.

თალამური რეუნიალური ბირთვის დაზიანების გავლენა კატის ზოგად მცვეპაზე და ძილ-ღვიძილის ციკლის სტრუქტურაზე

ე. ჩიჯავაძე, მ. მგალობლიშვილი

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

კატების თალამუსის რეუნიალური ბირთვის ელექტროლიზური დაზიანება აძლიერებს კვებით მოტივაციის დონეს და შემამჩნევად აკავებს დასწავლის პროცესს, მაგრამ, ამავე დროს, ქცევის მიმართველი სიგნალების დისკრიმინაცია უცვლელი რჩება. რეუნიალური ბირთვის დაზიანების შემდეგ საგრძნობლად იცვლება სხვადასხვა ფაზის მიმდინარეობის ხასიათი და ელექტროენცეფალოგრაფიული და ქცევითი კომპონენტები ძილ-ღვიძილის ციკლის სხვადასხვა ფაზაში. კერძოდ, შეიმჩნევა ნელტალლოვანი და პარადოქსული ძილის მნიშვნელოვანი რედუქცია და ამასთან ერთად მნიშვნელოვნად ხანგრძლივდება ღვი-

ძილის ფაზა. გარკვეული დროის გავლის შემდეგ ხდება ძილ-ღვიძილის ციკლის აღდგენა და ნორმალიზაცია. პარადოქსული ძილი, რომელიც ჩნდება ნარკოლეფსიური სინდრომის განვითარებასთან ერთად (დაზიანების შემდეგი პერიოდის მე-2 სტადია), გაპირობებულია არა ღვიძილით, არამედ ნელტალლოვანი ძილით, რომელიც აღმოცენდება სიფხიზლის ფონზე. მიღებული შედეგების მიხედვით უნდა დავასკვნათ, რომ რეუნიალური ბირთვი ალბათ მონაწილეობს როგორც ქცევისა და მეხსიერების მოტივაციურ-ემოციურ ორგანიზაციაში, ისე ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში.

EFFECT OF THE LESION OF THALAMIC REUNION NUCLEUS ON THE GENERAL BEHAVIOR AND THE STRUCTURE OF SLEEP-WAKEFULNESS CYCLE

E. O. CHIJAVADZE, M. M. MGALOBlishvili

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

Summary

Electrolytic lesion of the reunion nucleus was shown to increase the level of food motivation and noticeably delayed learning process, not hindering

the discrimination of directing signals in cats. Lesion of the reunion nucleus resulted in significant changes in the course of different sleep phases, rati-

16.03.53-41  
518-11101930

of EEG and behavioral components of various phases of the sleep-wakefulness cycle. Particularly, a significant reduction of SWS and PS is observed in parallel with the increase of wakefulness. However, the restoration and the normalization of the sleep-wakefulness cycle take place in due course. PS occurring in the course of narcoleptic syndrome (the second stage of post-

lesion period) is due not to behavioral wakefulness, but to SWS, appearing against the background of behavioral wakefulness. Possible participation of the reunion nucleus in the organization of motivated emotional behavior and memory, as well as in the regulation of the sleep-wakefulness cycle is supposed.

УДК 616.24—053.9:616.15—076

МОРФОЛОГИЯ

## СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КРАСНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В СТАРЧЕСКИЙ ПЕРИОД ЖИЗНИ В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

(Электронномикроскопическое исследование)

З. М. Топурия

*Тбилисский государственный медицинский институт*

Поступила в редакцию 06.02.1984

Методами электронной микроскопии исследована кровь практически здоровых мужчин и при хронических неспецифических заболеваниях легких в старческом периоде жизни (от 60 до 80 лет). Контролем служили исследования крови в норме и патологии у мужчин зрелого периода жизни (от 30 до 50 лет). Выявлено снижение количества нормоцитов до 76,0—75,5% у лиц старческих возрастов. Отмечено компенсаторное увеличение клеток крови больших размеров до 17,84—20,63% — макроцитарный анизоцитоз, а также типичное старение эритроцитов путем сферуляции. Деструкция эритроцитов с аномализацией рельефа поверхности выражает процесс интенсификации жизнедеятельности части нормоцитов. Указанные изменения связаны с особенностями гемодинамики и специфики адаптационных механизмов при патологии и в старости. Количественный учет изменений эритроцитов по данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) может быть использован в общем гематологическом обследовании для дифференциальной диагностики патологии старческих периодов жизни.

Исследования клеток красной крови методами электронной микроскопии получили распространение при изучении архитектоники эритроцитов [7, 8, 15] и функционального состояния клеток в норме и при патологии [1, 2, 3, 10, 13, 14]. В настоящее время в области морфологии клеток красной крови выявлена принципиальная возможность дифференциального анализа при оценке функционального состояния эритроцитов, характеризующего отдельные патологические процессы [4, 5, 6, 9]. Однако названный метод не нашел еще

применения в геронтологических исследованиях, о чем свидетельствует отсутствие литературных данных.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей строения поверхности и формы эритроцитов лиц старческого возраста и больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких. Выявленные с помощью электронной микроскопии морфологические изменения клеток красной крови сопоставлялись с данными, полученными в световом микроскопе (СМ).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследована кровь 40 мужчин. Из них 20 были практически здоровы и составляли две возрастные группы: зрелого (контроль — 10 человек

в возрасте 30—50 лет) и старческого (10 человек в возрасте 60—80 лет) периода жизни, а 20 больных хроническими неспецифическими заболе-

ваниями легких (ХНЗЛ) — 10 в возрасте 30—50 лет и 10 в возрасте 60—80 лет. В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, с помощью СМ производили подсчет эритроцитов, учитывая все виды клеток, а также определяли размеры этих клеток. Кровь для СЭМ и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) фиксировали глутаральдегидом и осмием. Полученные образцы изучали в микроскопах Swiscap—100 и JEM—100С. Важнейшей особенно-

стью приготовления образцов крови для СЭМ явилась хорошая сохранность форм клеток и их мембран, что было гарантировано незамедлительной фиксацией гепаринизированной крови в момент ее получения из вены человека. Способ приготовления образцов крови, примененный в наших исследованиях, позволил также изучать эритроциты без деления образца, с применением методов СЭМ и ТЭМ. Уровень значимости доверительного интервала  $p=0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование клеток красной крови в трехмерном изображении не по-

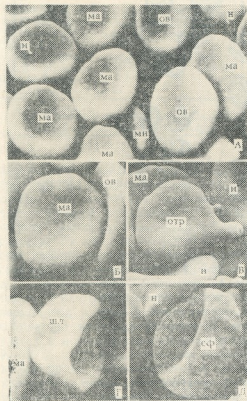


Рис. 1. Эритроциты в норме и при патологии: А — трехмерная структура клеток красной крови старческого периода жизни. В составе клеток преобладают макроциты (х 12000); Б — макроцит (х 15000); В — эритроцит с отростками (х 18000); Г — шлемоцит (х 24000); Д — сфероцит (х 30000).

Обозначения: н — нормоцит; ма — макроцит; ов — овалоцит; ми — микроцит; шл — шлемоцит; отр — эритроцит с отростками; сф — сфероцит

зволило выделить какие-либо различия в структуре поверхности и форме эритроцитов у здоровых и больных людей. Очевидно, клетки красной крови, вне зависимости от возраста и состояния людей, необходимо описывать, соблюдая определенные стандарты в размерах, форме, количестве и функциональном напряжении ультраструктурных клеток (табл. 1).

**Нормоцит** (рис. 1а). Как показали исследования, указанная клетка является основной формой эритроцитов человека. Клетка имеет округлую форму с характерными менисковидными углублениями на фронтальной и теневой сторонах. При этом уклон мениска от края клетки к ее центру составляет 14—16%, диаметр клетки 7,25—7,45 мкм, а толщина свободного края 1,8—2,0 мкм. Оболочка эритроцитов до настоящего времени рассматривалась как гладкая структура. Применение СЭМ позволило обнаружить в цитолемме нормоцита значительную шероховатость с чередованием мелких углублений и бугорков диаметром 50—100 нм. Нормоциты старческого периода жизни не имеют принципиального отличия от нормоцитов иных возрастов в норме или при патологии и составляют  $77,6 \pm 0,56\%$  (в контроле  $87,4 \pm 0,93\%$ ). Выявленное несоответствие количества нормоцитов в старости компенсируется другими клетками, характеризующими анизоцитоз крови.

**Анизоциты** (рис. 1а) — большая группа эритроцитов, получивших название макроцитов, овалоцитов и микроцитов. Клетки значительно отличаются от нормоцитов размерами (от 6,4—6,6 мкм для микроцитов до

7,8—9,2 × 12—14 мкм для овалоцитов). Макроцит (рис. 16) — наиболее типичная клетка величиной от 8,65 до 9,5 мкм, характеризуется отсутствием выраженных менисковидных углублений. Уклон мениска, как пра-

вило, мало заметен даже при электронной микроскопии и не превышает 3—4%, а у микроцитов составляет только 1—2%. Указанное слабое менискообразование при светооптической микроскопии создает эффект

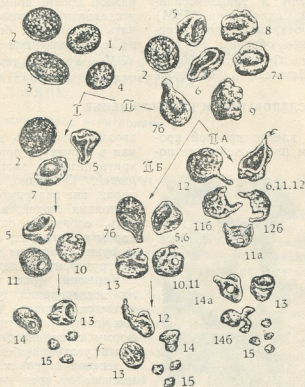


Рис. 2. Состояние клеток красной крови в норме и при патологии. Эритроциты, характеризующие процесс анизоцитоза: 1 — нормоцит; 2 — макроцит; 3 — овалоцит; 4 — микроцит; I — эритроциты аномального вида, характеризующие деструктивный процесс в норме (зрелый и старческий периоды жизни): 5 — шлемоциты; 7 — однобугорчатые эритроциты, 10 — криптоциты, 11 — эритроциты с отверстием, 13 — сфероциты, 14 — шизоциты, 15 — секвестры гемоглобина; II — эритроциты аномального вида, характеризующие деструктивный процесс при ХНЗЛ: 5 — шлемоциты, 6 — ладьевидные эритроциты, 7 — однобугорчатые (мишеневидные — 7а, ракетковидные — 7б) эритроциты, 8 — гребневидные эритроциты, 9 — мультибугорчатые эритроциты; IIA — зрелый период жизни: 6 — ладьевидные эритроциты (с отверстием — 11, с отростками — 12), 11 — эритроциты с отверстиями (одноотростчатый — 11а, многоотростчатый — 11б), 12 — эритроцит с отростками (одноотростчатый — 12а, многоотростчатый — 12б), 13 — сфероциты, 14 — шизоциты (отростчатые с отверстиями — 14а, с криптовидными углублениями — 14б), 15 — секвестры гемоглобина; IIB — старческий период жизни: 5 — шлемоциты, 6 — ладьевидные эритроциты, 7б — однобугорчатые (ракетковидные) эритроциты, 10 — криптоциты, 11 — эритроциты с отверстием, 12 — эритроциты с отростками, 13 — сфероциты, 14 — шизоциты, 15 — секвестры гемоглобина



Характеристика клеток красной крови у лиц зрелого и старческого периодов жизни в норме и при патологии ( $M \pm m$ )

№	Эритроциты и размеры клеток в <i>мкм</i>	Практически здоровые люди		Больные ХНЗЛ	
		30—50 лет	60—80 лет	30—50 лет	60—80 лет
1	Нормоциты — 7,25 — 7,45	87,4 ± 0,93	77,57 ± 0,56	84,06 ± 0,28	76,03 ± 0,09
2	Макроциты — 8,65 — 9,50	7,93 ± 0,28	16,5 ± 0,28	8,97 ± 0,19	19,37 ± 0,19
3	Овалоциты — 7,6 — 9,2 × 12,0 — 14,0	1,03 ± 0,19	0,77 ± 0,19	1,2 ± 0,19	0,73 ± 0,09
4	Микроциты — 6,4 — 6,6	0,73 ± 0,19	0,57 ± 0,09	0,7 ± 0,09	0,53 ± 0,09
Эритроциты, отличающиеся размерами от нормоцитов и характеризующие анизоцитоз		9,69%	17,84%	10,87%	20,63%
5	Шлемоциты — 6,8 — 7,0	0,3 ± 0,09	0,33 ± 0,09	0,33 ± 0,09	0,3 ± 0,09
6	Ладьевидные эритроциты — 5,6 — 6,3 × 8,1 — 9,2	—	—	0,57 ± 0,09	0,5 ± 0,09
7	Однобугорчатые эритроциты — 7,2 — 7,4	1,07 ± 0,09	1,83 ± 0,09	0,77 ± 0,09	0,37 ± 0,09
8	Гребневидные эритроциты — 7,0 — 7,2	—	—	0,5 ± 0,09	0,33 ± 0,09
9	Многобугорчатые эритроциты — 7,0 — 7,2	—	—	0,5 ± 0,09	0,23 ± 0,09
10	Криптоциты — 7,0 — 7,2	0,6 ± 0,09	0,7 ± 0,09	0,87 ± 0,09	0,5 ± 0,09
11	Эритроциты с отверстием — 7,0 — 7,2	0,3 ± 0,09	0,6 ± 0,09	0,5 ± 0,09	0,4 ± 0,09
12	Эритроциты с отростками — 6,8 — 7,0	—	—	0,3 ± 0,09	0,3 ± 0,09
13	Сфероциты — 4,5 — 6,0	0,6 ± 0,09	0,97 ± 0,09	0,73 ± 0,09	0,4 ± 0,09
14	Шизоциты — 2,5 — 3,5	—	—	—	—
Эритроциты аномального вида, характеризующие деструктивный процесс		2,87%	4,43%	5,06%	3,33%

плоскопараллельности поверхностей фронтальных и теневых сторон анизоцитов. Аналитическое исследование клеток группы анизоцитов лиц старческого возраста обнаруживает возрастание их количества до 17,83% за счет увеличения числа макроцитов, составляющих  $16,5 \pm 0,28\%$  (в контроле: анизоцитов — 9,69%, макроцитов —  $7,93 \pm 0,28\%$ ). Суммирование нормоцитов и анизоцитов нивелирует количество эритроцитов во всех возрастах в норме и при патологии до 95—97%. Изучение клеток красной крови, ранее обозначенных как «пойкилоциты», объемным методом электронной микроскопии позволило отметить этот феномен как аномалию видов части эритроцитов не только при патологии, но и в норме. Эта группа клеток, достигающая 5—3%, в связи с большим количеством видов требует четкого описания с целью выявления и детализации последних в мазках крови, приготовленной для СМ.

**Шлемоциты** (рис. 1г) — распространенный вид аномальных, полусферических клеток с выпукло-вогнутой по-

верхностью (синонимы: шлемовидные куполообразные, ладьевидные и др.). Диаметр вогнутой части полусферы составляет 6,8—7,0 *мкм*. Клетки изменяются в зависимости от глубины прогиба центрального участка, а также в зависимости от вида предшественника. Шлемоциты имеют закругленные края и гладкую поверхность.

**Бугристые эритроциты** (рис. 2, 7, 8, 9) — группа клеток с бугорками цитолеммы, выходящими над их поверхностью на 1,0—2 *мкм*. Однобугорчатые эритроциты — клетки, в которых бугорок расположен в центре, имеют мишеневидное строение (синоним — мишеневидные эритроциты); клетки с бугорком на периферии имеют строение ракетки для игры (синоним — ракетковидные эритроциты). Многобугорчатые эритроциты определяются по пространственному расположению цитолеммных выступов. Бугорки, находящиеся в одной плоскости, образуют гребневидные клетки. В случае бессистемного расположения бугорков клетки имеют вид плода или ягоды (синонимы: зубчатые, тутовые, акантоциты и др.). Размеры бугорчатых

эритроцитов не превышают 7,0 мкм.

**Криптоциты** (рис. 2, 10). Систематическое изучение бугорчатых эритроцитов выявляет клетки с постепенным отрывом частей цитолеммы и появлением криптовидных углублений в краях или образованием сквозных отверстий диаметром до 0,8—1,2 мкм. Размеры криптоцитов и клеток с отверстиями могут быть от 6,5 до 7,2 мкм.

**Эритроциты с отростками** (рис. 1в). Клетки имеют один или несколько отростков цитолеммы, нередко достигающих 5 мкм. Указанные эритроциты легко распознаются на светооптическом уровне.

**Шизоциты** (рис. 2, 14). В связи с секвестрацией клетки, часть аномальных эритроцитов постепенно уменьшается в размерах и превращается в конечную стадию функционирующих клеток карликовых размеров до 2,5—3,5 мкм (синоним — фрагменты эритроцита). Также удалось выявить мелкие шаровидные структуры диаметром от 0,9 до 1,5 мкм, вероятно, относящиеся к секвестрированному из клетки гемоглобину.

**Сфероциты** (рис. 1д). У лиц старческого возраста выявлены своеобразные эритроциты сферической формы диаметром 4,5—6,0 мкм. Клетки имеют плотную цитолемму с мелкозернистым или крупнобугристым рельефом поверхности. Встречаются сфероциты в  $0,97 \pm 0,09\%$  случаев. Предшественниками их могут быть как нормоциты, так и анизоциты всех рангов.

Таким образом, проведенные методом СЭМ исследования, позволили наблюдать типичное состояние клеток крови людей старческого периода жизни и отметить выраженную тенденцию к образованию деструктивных форм эритроцитов при ХНЗЛ. Проведенные исследования в ходе старения организма человека выявили замену части менисковидных нормоцитов клетками с плоскопараллельным характером фронтальных и теневых сторон. Макроциты составляют  $16,5 \pm 0,28\%$  планоцитов и являются главными клетками среди анизоцитов. Возможно, макроцит — оптимальная клеточная структура, которая благодаря значительной величине своей поверхности и объему, является главной и необходимой клеткой организ-

ма в старости. Из описания макроцита следует, что плоскопараллельное строение клетки создает не только повышенный контакт со средой, но и одновременно способствует увеличению обменной поверхности этих и других эритроцитов периферической крови. Увеличение количества макроцитов составляет главный механизм адаптации организма в условиях гипоксии старости. Другим характерным признаком клеток крови лиц старческого возраста является наличие эритроцитов сферической формы. Трансформация эритроцитов в сферические структуры позволяет высказать предположение о старении части нормоцитов и планоцитов путем их сферуляции. Процесс, как показала ТЭМ, объясняется физиологическим старением клеточной мембраны, в связи с глобулярной осмиофилией липидов, а также гемоглобина, в связи с его пикнозом, и может оцениваться как липофанероз ультраструктур эритроцитов.

Вместе с абсолютным увеличением параметров эритроцитов у лиц старческого возраста наблюдается возрастание эритроцитов с аномальным характером поверхности. Одновременное и комбинированное применение методов СЭМ и ТЭМ позволило выявить сущность клеточной аномализации, заключающейся в процессе поступательной секвестрации частей эритроцита. Происходит изменение формы клетки и уменьшение ее объема. Параметры нормоцита изменяются до превращения последнего в шизоцит уродливого вида, карликовых размеров. Отмеченная деструкция нормоцитов значительно интенсифицируется в связи с усилением тканевой гипоксии в патологии. Необходимо отметить, что при ХНЗЛ, в зрелом периоде жизни, возрастает количество деструктивных форм эритроцитов при неизменном количестве плазмочитов, в том числе и макроцитов. А в старческом периоде жизни, наоборот, количество деструктивных форм снижается, а нивелирование общего количества нормоцитов происходит с увеличением планоцитов до  $20,63\%$  и ростом макроцитов до  $19,37 \pm 0,19\%$ .

Учитывая вышесказанное, считаем, что та или иная форма эритроцитов возникает в процессе функциони-

рования клеток крови и отражает этап жизнедеятельности организма в условиях относительного здоровья, старости или патологии. Количественный учет эритроцитов аномального вида, произведенный в световом микроскопе показал, что так называемый пойкилоцитоз встречается у людей всех возрастов, здоровых и больных, приблизительно от 2,87 до 5,06% случаев. Изменчивость же эритроцитов есть ничто иное как ряд последовательных этапов в жизни одной клетки и зависит от состояния ультраструктур мембраны, способной сохранить вновь возникающую форму клетки. При этом временные или промежуточные виды клеток никак не изменяются в связи с передвижением последних в кровеносных сосудах. Фиксация эритроцитов в объектах для светового и электронно-микроскопического исследований также не изменяет его архитектуры.

Отмеченные ранее состояния клеток красной крови в экспериментах у животных старческих, позднестарческих периодов жизни и при патологии возникают, как было доказано, при нарушении диффузионной функции барьера воздух—кровь. Развивающиеся при этом тканевая гипоксия и гипоксемия являются причиной изменения трехмерного строения эритроцитов [11]. У человека, в старческом возрасте и при патологии изменения эритроцитов, по-видимому, также связаны с критическим состоянием барьера воздух—кровь. Выявлено,

что утолщение барьера воздух—кровь в старости до 0,83 мкм (в контроле 0,35 мкм) связано с трехкратным утолщением базального слоя в норме и шестикратным утолщением его при патологии. Указанное состояние аэрогематического барьера, также как в эксперименте, сопровождается замедлением диффузии газов, развитием тканевой гипоксии и гипоксемии [12].

Обнаруженное у людей старческого возраста трехмерное строение эритроцитов представляет состояние макроцитарного анизоцитоза и сфероцитоза эритроцитов, как правило, связанное с изменением гемодинамики и специфики адаптационных механизмов старения. Увеличение количества эритроцитов с аномальным рельефом поверхности не только в старости, но и при патологии характеризует деструктивный процесс, непосредственно связанный с интенсифицированием жизнедеятельности некоторой части нормоцитов применительно к условиям тканевой гипоксии и гипоксемии.

Количественный учет изменений эритроцитов, произведенный с помощью световой микроскопии, опираясь на данные СЭМ, имеет практическое значение и может быть использован при общем гематологическом обследовании для дифференциальной диагностики патологических состояний старческих периодов жизни, в частности применен для диагностики группы хронических неспецифических заболеваний легких.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров О. В., Матюшкин В. А., Киценко Л. С. Тер. арх., 55, 3, 85—87, 1983.
2. Бадура Ю. Л., Кругликов Г. Г., Арутюнян В. Д., Грибова И. А. Арх. патол., 40, 5, 41—48, 1979.
3. Березина Т. Л. В кн.: Анестезиология и реаниматология. Иркутск, 1983, 116—117.
4. Втюрия Б. В., Каем Р. И., Черновская В. В. Булл. экспер. биол. и мед., 9, 117—119, 1982.
5. Дудина Е. Н. Автореф. канд. дисс. М., 1983.
6. Кашулина А. В., Терещенко И. П., Александрова. Патол. физиол. и эксп. терап., 3, 53—55, 1980.
4. Серия биологическая, т. 12, № 2
7. Козинец Г. И., Талеленова Н. Н., Шишканова З. Г. Проблемы гематологии и переливания крови, 7, 44—47 1979.
8. Крымский Л. Д., Несвайко Г. В., Рыбалов А. Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови, «Медицина», М., 168, 1976.
9. Кузин М. И., Шимкевич Л. Л., Дудина Е. Н. Вестник АМН СССР, 8, 74—79, 1983.
10. Марачев А. Г., Корнев А. В. Арх. патол., 9, 11—18, 1983.
11. Топурия З. М. Изв. АН ГССР, сер. биол., 7, 4, 310—320, 1981.
12. Топурия З. М. Изв. АН ГССР, сер. биол., 9, 4, 128—137, 1983.

13. Besis M. Blood Smears Reinterpreted, Berlin, 1977.  
 14. Grimes A. J. Human Red Cell Metabolism, London, 1980.

15. Hayhoe F. G. I., Flemans R. I., A Colour Atlas et Haematological Cytology, Welf Medical Publications Ltd, 1962.

ადამიანის წითელი სისხლის უჯრედების მდგომარეობა  
 მოხუცებულობის პერიოდში და ფილტვების ქრონიკულ  
 არასპეციფიკურ დაავადებათა დროს

ზ. თოფურია

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

შესწავლილ იქნა მოხუცებული ადამიანის (მამაკაცები) სისხლის წითელი ბურთულები ტრანსმისიული და რასტრული ელექტრონული მიკროსკოპით, პრაქტიკულად ჯანმრთელ პირებსა და ფილტვების ქრონიკულ არასპეციფიკურ დაავადებათა დროს.

გამოვლინდა, რომ ორგანიზმის მოხუცებულობის პერიოდში — 60 — 80 წლიან მამაკაცებში — როგორც ნორმის, ასევე

პათოლოგიის დროს, სისხლში აღინიშნება მაკროციტებისა და ოვალოციტების რაოდენობის ზრდა — მაკროციტული ანიზოციტოზი, აგრეთვე ანომალური რელიევის მქონე ერითროციტების გაჩენა. უნდა ვივარაუდოთ, რომ ეს ცვლილებები გამოწვეულია ქსოვილთა ჰიპოქსიითა და ჰიპოქსემიით, რაკი ხნიერების შედეგად „უხეშდება“ ჰისტო-ჰემატური ბარიერი.

## THE STATE OF HUMAN RED BLOOD CELLS IN SENILE PERIOD OF LIFE AND DURING CHRONIC NONSPECIFIC LUNG DISEASES

Z. M. TOPURIA

The State Medical Institute, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The blood of practically healthy men was studied by means of electron microscope as well as during chronic nonspecific lung diseases in senile period of life from 60 to 80 yeas. Blood investigations in norm and pathology of mature men in the age of 30—50 served as controls. The decrease of the number of normocytes up to 76.0—75.5% was revealed in senile persons. Compensatory increase of blood cells of large sizes (17, 84—20, 63%)—macrocytic anisocytosis, as well as typical aging of erythrocytes by means of spherulation was observed. The

destruction of erythrocytes with the anomalization of the surface relief results in the process of intensification of vital activity of part of the normocytes. The mentioned changes are connected with the peculiarities of hemodynamics and specificity of adaptive mechanisms in senility and pathology. The quantitative calculation of erythrocyte changes according to scanning electron microscopic data may be used in general hematologic investigations for the differential diagnosis of pathology in senile period of life.

УДК 577.153.35

БИОХИМИЯ

## АНАЛИЗ СУБСТРАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ Na,K-АТФазы

З. П. Кометиани, Г. А. Зурабишвили

*Институт физиологии АН ГССР им. И. С. Бериташвили, Тбилиси*

Поступила в редакцию 02.02.1984

Проведен анализ формы кинетических кривых субстратной зависимости Na,K-АТФазы при различных фиксированных концентрациях свободных ионов АТФ и Mg. Предложена «минимальная» модель Na,K-АТФазы, в которой свободные ионы АТФ и Mg выступают ингибиторами Na,K-АТФазы, влияющими только на средство фермента к комплексу MgАТФ. Предполагают, что для всех этих лигандов (АТФ, Mg, MgАТФ) имеются отдельные участки связывания.

Ранее нами была определена «минимальная» катионная модель Na,K-АТФазы [3]. Настоящая работа представляет попытку определить «минимальную» модель Na,K-АТФазы по отношению к субстрату, применяя метод анализа формы кинетических кривых [4, 7].

### МЕТОДИКА

Na,K-АТФазную активность обработанной NaI-мембранной фракции головного мозга крысы измеряли по ранее разработанной методике как оубаинчувствительную часть суммарной АТФазной активности, при pH 7,8 и 37°C и в присутствии 130 мМ NaCl и 20 мМ KCl [5]. Данные представлены в виде средних арифметических не менее шести параллельных измерений с соответствующей средней ошиб-

кой среднего арифметического, которая в большинстве случаев перекрывалась символами, использованными на графиках. Относительную ошибку считали постоянной, поэтому при вычислении параметров регрессионных прямых их не принимали в расчет. Активность выражали количеством микромолей высвобожденного неорганического фосфата на мг белка в час.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные кривые зависимости скорости Na,K-АТФазной реакции от концентрации MgАТФ не обладают признаками, которыми можно отличить их от кривых, характерных для кинетики Михаелиса—Ментен. Однако в обратных координатах (рис. 1 и 2) проявляются свойства, характерные для нелинейной кинетики, которые можно использовать для анализа. Кроме того, при представлении зависимости скорости от концентрации субстрата следует учитывать диссоциацию комплекса MgАТФ:

$[Mg^{2+}] \cdot [АТФ] = K_d \cdot [MgАТФ]$ . Поскольку и  $Mg^{2+}$  и свободные ионы АТФ могут быть модификаторами Na,K-АТФазы и участвовать в реакции [1,10], скорость надо представлять как функцию трех переменных  $v = f([Mg^{2+}], [АТФ], [MgАТФ])$ . Но из-за диссоциации MgАТФ удастся фиксировать только одну из этих переменных. Однако знание зависимости между переменными позволяет путем подстановки (напр. вида  $[АТФ] = [MgАТФ] \cdot K_d/[Mg^{2+}]$ , где  $[Mg^{2+}] = const.$ ),



все же выразить скорость как зависимость от одного переменного. Кривые на рис. 1 и 2 проведены именно таким способом. Они представляют зависимость скорости реакции от концентрации MgATФ в двойных обратных величинах при фиксированных концентрациях Mg<sup>2+</sup> (рис. 1) и свободных ионов АТФ (рис. 2).

Как видно, форма у всех кривых одинакова. Все они выпуклы у оси ординат, а по мере возрастания аргумента (уменьшения концентрации субстрата) имеют асимптоты. Можно допустить, что кривые сходятся в одной точке на оси ординат. Функции монотонно возрастают.

Уравнение стационарной скорости может быть записано в виде рациональной дроби:

$$u(t) = t^n \sum_0^s \beta_i t^{-i} / l_0 \sum_0^p \alpha_i t^{-i}$$

$$t \equiv \frac{1}{[S]}, \quad \frac{1}{V} \equiv u, \quad s = n + m + p,$$

где  $l_0$  — количество внесенного фермента.

Выпуклая форма кривых, которые имеют асимптоту при  $t \rightarrow \infty$ , исключает все случаи  $p > 1$ , поскольку при больших значениях  $t$  кривая должна иметь асимптоту. Кроме того,  $p \neq 0$ , поскольку при отсутствии субстрата активность равна нулю. Таким образом,  $p = 1$ . С другой стороны,

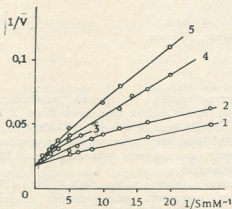


Рис. 1. Субстратная зависимость Na, К-АТФазы в двойных обратных величинах при фиксированных концентрациях ионов магния 1—0,1, 2—0,5; 3—1,0; 4—2,5; 5—5,0 мМ

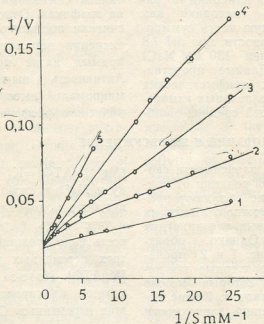


Рис. 2. Субстратная зависимость Na, К-АТФазы в двойных обратных величинах при фиксированных концентрациях свободных ионов АТФ: 1—0,1; 2—0,2; 3—0,5; 4—0,8; 5—1,0 мМ

$$\lim_{t \rightarrow 0} u(t) = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{\beta_s}{l_0 \alpha_p} \cdot t^{-m} = \infty$$

$$u = \frac{\alpha_0 \beta_1 - \alpha_1 \beta_0}{\alpha_1^2 l_0} + \frac{\beta_0}{\alpha_0 l_0}$$

Однако, как видно из рис. 1 и 2, кривые пересекаются с ординатой в одной точке. Это возможно только при  $m=0$ . С учетом этих условий, уравнение скорости можно переписать так:

$$u(t) = t \sum_0^{p+1} \beta_i t^{-i} / l_0 \sum_0^p \alpha_i t^{-i},$$

т. е. связывание одного каталитического участка с субстратом достаточно для протекания реакции, а участки, связывание которых привело бы к полному торможению реакции, отсутствуют. Форма кривых определяется коэффициентами  $\alpha_i$  и  $\beta_i$ , а также показателями степени  $n$ ,  $m$  и  $p$ . В данном случае  $n$  и  $m$  известны, остается установить  $p$ . Для этого нужно исследовать функции, соответствующие полученному уравнению скорости при  $p=0, p=1, \dots$  и т. д., пока не получим минимальную степень, необходимую для описания кривых данной формы. Для  $p=0$  зависимость скорости от субстрата в двойных обратных величинах должна быть линейной, что исключено в рассматриваемом случае.

Пересечение с ординатой и наклонность асимптот должны быть положительными, что имеет место при условии  $\alpha_0 \beta_1 - \alpha_1 \beta_0 > 0$ .

Как видно, случай  $p=1$  полностью удовлетворяет требованиям формы кинетических кривых при определенном соотношении коэффициентов  $\alpha_i$  и  $\beta_i$ .

Очевидно, все случаи  $p > 1$  также удовлетворяют эти требования. Однако вряд ли нужно постулировать существование дополнительных участков связывания: их минимальное количество, удовлетворяющее требованиям формы кинетической кривой, является наиболее вероятным [7].

Физический смысл коэффициентов  $\alpha_i$  и  $\beta_i$  можно исследовать, построив минимальную модель механизма Na, K-АТФазы, учитывая полученный вывод и ограничения, накладываемые на коэффициенты формой кинетических кривых. Эти условия вводятся в основном к двум:

$$\frac{\beta_0}{\beta_1} < \frac{\alpha_1}{\alpha_0} < \frac{\beta_1}{\beta_0} \quad \text{и} \quad \frac{\alpha_0}{\alpha_2} > \frac{\alpha_1 \beta_0}{\alpha_1 \beta_1 - \alpha_0 \beta_0}$$

Кроме того, если исследовать зависимость скорости Na, K-АТФазной реакции от концентрации субстрата при возможно низких концентрациях, где кривые зависимости приближаются к асимпте, то, в пределах экспериментальной ошибки, такую зависимость можно считать линейной, а линию регрессии рассматривать как максимально приближенную к асимптоте. Рабочий диапазон концентрации субстрата был подобран так, чтобы в двойных обратных величинах зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в пределах экспериментальной ошибки считать линейной. Результаты таких экспериментов представлены на рис. 3 и 4. Как видно, регрессионные прямые при различных фиксированных концентрациях  $Mg^{2+}$  (рис. 3) и АТФ (рис. 4) пересекаются в первом квадранте. При увеличении концентрации  $Mg^{2+}$  (от 0,5 до 2,0 мМ) и АТФ (от 0,2 до 0,8 мМ) растет наклонность прямых, а пересечение на оси ординат уменьшается. Таким образом, получается, что:

Для  $p=1$  уравнение примет вид:

$$u(t) = \frac{\beta_0 t^2 + \beta_1 t + \beta_2}{l_0 (\alpha_0 t + \alpha_1)} \quad (1)$$

Такое уравнение опишет кривую, и при условии  $\alpha_1 \beta_1 - \alpha_0 \beta_0 > 0$  (условие положительности первой производной во всем интервале аргумента) будет монотонно возрастать. При условии  $\alpha_1^2 \beta_0 / \alpha_2 < \alpha_1 \beta_1 - \alpha_0 \beta_2$  (условие отрицательности второй производной во всем интервале изменения аргумента) кривая будет выпуклой. Вторая производная имеет вид

$$u''_{tt} = 2 \frac{(\alpha_1^2 \beta_0 - \alpha_0 \alpha_1 \beta_1 + \alpha_0^2 \beta_2)}{l_0 (\alpha_0 t + \alpha_1)^3},$$

т. е. абсолютная величина будет возрастать при  $t \rightarrow 0$  и стремиться к нулю при  $t \rightarrow \infty$ . Это значит, что кривизна выпуклых будет больше у ординаты; при увеличении аргумента кривые будут иметь асимптоту. Уравнение асимптоты для рассматриваемой функции примет вид:

$$\partial \left( \frac{\beta_0}{\alpha_0 l_0} \right) / \partial [Mg^{2+}] > 0;$$

$$\partial \left( \frac{\beta_0}{\alpha_0 l_0} \right) / \partial [AT\Phi] > 0;$$

$$\partial \left( \frac{\alpha_0 \beta_1 - \alpha_1 \beta_0}{\alpha_0^2 l_0} \right) / \partial [Mg^{2+}] < 0;$$

$$\partial \left( \frac{\alpha_0 \beta_1 - \alpha_1 \beta_0}{\alpha_0^2 l_0} \right) / \partial [AT\Phi] < 0;$$

Учитывая все вышеперечисленные особенности кинетических кривых и поведение асимптот, можно приступить

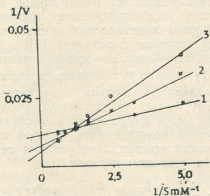


Рис. 3. Пересечение регрессионных линий при фиксированных концентрациях ионов магния: 1—0,5 мМ, 2—1,0 мМ, 3—2,0 мМ

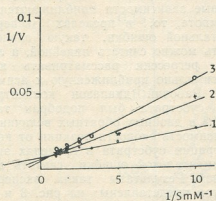


Рис. 4. Пересечение регрессионных линий при фиксированных концентрациях свободных ионов АТФ: 1—0,2; 2—0,5; 3—0,8 мМ

к подбору «минимальной» модели. Комплекс  $MgAT\Phi$ , будем считать субстратом, а свободные ионы АТФ и  $Mg^{2+}$  — модификаторами (ингибиторами). Можно допустить, что кривые

при любых фиксированных значениях  $[Mg^{2+}]$  и  $[AT\Phi]$  стремятся пересекать ординату в одной точке (рис. 3 и 4). Это значит, что все формы фермент-лигандных комплексов, содержащие субстрат ( $MgAT\Phi$ ), каталитически активны, и что связывание свободных ионов АТФ и  $Mg^{2+}$  не влияет на скорость каталитического превращения, т. е. ингибирующий эффект этих лигандов нужно отнести за счет изменения сродства к субстрату. Кроме того, модель должна быть симметричной, поскольку вид ингибиции свободными ионами АТФ и  $Mg^{2+}$  качественно совпадает (рис. 3 и 4). Таким требованиям отвечает схема, состоящая из шести форм фермента (рис. 5). На схеме пунктиром обозначены несущественные переходы. Их наличие и отсутствие не меняет вид уравнения, соответствующего данной схеме и удовлетворяющего форме кинетических

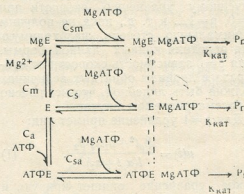


Рис. 5. Схема «минимальной» модели субстратной зависимости Na, K-АТФазы

кривых. Следуя принципу минимизации модели, при выводе уравнения методом быстрого равновесия, ограничимся «необходимыми» или обязательными переходами:

$$u = \frac{1 + C_s S + C_a A + C_m M + C_{sm} C_m MS}{K_{кат} l_0 (C_s S + C_{sm} C_m MS)} + \frac{C_{sa} C_a AS}{C_{sa} C_a AS}$$

где  $K_{кат}$  — каталитическая константа;  $C$  — константы ассоциации;  $M = [Mg^{2+}]$ ,  $A = [AT\Phi]$ ,  $S = [MgAT\Phi]$ .

После подстановки  $A = SK_D/M$ , при  $M = const.$ , получим уравнение (1), где



$$\alpha_0 = (C_s + C_{sm}C_m M); \alpha_1 = \beta_2 = C_{sa}C_a K' / M;$$

$$\beta_0 = (1 + C_m M); \beta_1 = (C_s + C_{sm}C_m M + C_a K' / M).$$

Соответственно при подстановке  $M = SK_D / A$ ,  $A = \text{const.}$  получим:

$$\alpha_0 = (C_s + C_{sa}C_a A), \alpha_1 = \beta_2 = C_{sm}C_m K' / A;$$

$$\beta_0 = (1 + C_a A); \beta_1 = (C_s + C_{sa}C_a A + C_m K' / A)$$

При  $t=0$  для обоих случаев  $u=1/10K_{кат}$ , т. е. точка пересечения кривых с ординатой постоянна и не зависит от концентрации  $Mg^{2+}$  или АТФ. Условия, определяемые формой кинетических кривых, выполняются при следующих неравенствах и равенстве:

$$C_{sa} < C_s; C_{sm} < C_s; C_{sm} = C_{sa}.$$

Первые два неравенства, естественно, вытекают и из рассматриваемой схемы: связывание  $Mg^{2+}$  или АТФ уменьшает сродство к субстрату. Третье равенство вытекает из симметричности модели, обоснованной экспериментальными результатами (одинаковая форма кривых и вид пересечений асимптот при  $[Mg^{2+}] = \text{const.}$  и при  $[АТФ] = \text{const.}$ ). Выходит, что связывание  $Mg^{2+}$  или АТФ одинаково влияет на сродство к  $MgATP$ , т. е. фермент-лигандные комплексы  $Mg \cdot E$  и  $ATP \cdot E$  имеют одинаковое сродство к  $MgATP$ . Однако АТФ является более сильным ингибитором (рис. 1—4), из чего следует, что  $C_a > C_m$ , т. е. АТФ имеет большее сродство к ферменту, чем  $Mg^{2+}$ .

Существенным преимуществом «минимальной» модели является то, что такая модель обязательна для данного набора экспериментальных кривых. Анализ их формы дает возможность построить «минимальную» модель без дополнительной информации, основываясь лишь на кинетических исследованиях. Однако, используя другие данные о механизме и структуре фермента, можно проверить правомочность «минимальной» модели. При отсутствии данных, противоречащих данной схеме, ее следует включать как обязательную составную часть более детальной модели, которая будет учитывать взаимоотношение других лигандов с ферментом.

Субстрат, свободные ионы АТФ и  $Mg^{2+}$ , видимо, связываются на от-

дельных участках. Такой вывод вытекает из следующих обстоятельств: а) ионная форма магния необходима для протекания  $Na, K$ -АТФазной реакции, поскольку при недостатке  $Mg^{2+}$  не происходит переход  $E_1P \rightarrow E_2P$  [8, 9]; б) экспериментально доказано наличие двух видов АТФ-связывающих участков [6, 11]. Вероятно связывание АТФ или  $Mg^{2+}$  приводит к одинаковым конформационным перестройкам, поэтому комплексы АТФ·Е и  $Mg \cdot E$  имеют одинаковое сродство к  $MgATP$ .

Известно, что  $Na, K$ -АТФаза функционирует как димер. Показано, что на каждом мономере в отсутствие ионов магния связывается одна молекула АТФ (или его аналог). Добавление магния в среду увеличивает связывающую способность фермента в два раза, т. е. на каждом мономере связываются уже две молекулы нуклеотида, при этом сродство к ним падает [11]. Разумеется, эффект частично объясняется связыванием магния с ферментом, а частично образованием комплекса  $MgATP$ . Однако решающим фактором может быть наличие двух отдельных участков для АТФ и  $MgATP$ , которые с достаточной селективностью связывают свои лиганды. Тогда увеличение связывающей способности можно объяснить образованием второго лиганда — комплекса  $MgATP$  при добавлении в среду магния. Кроме этого, показано, что свободные ионы АТФ регулируют электрогенность  $Na, K$ -АТФазы, причем для этого достаточно относительно небольшое изменение концентрации свободных ионов АТФ, которая остается всегда ниже концентрации  $MgATP$  [2]. Из вышесказанного также вытекает предположение о существовании отдельного регуляторного участка, связывающего только АТФ, а не  $MgATP$ . Такой вывод подкрепляется предложенной нами «минимальной» моделью зависимости скорости  $Na, K$ -АТФазной реакции от концентрации  $Mg^{2+}$ , АТФ и  $MgATP$ , а также снимает необходимость усложнить модель дополнительными, «смешанными» формами фермент-лигандных комплексов, в которых АТФ,  $Mg^{2+}$  и  $MgATP$  могут связываться на одних и тех же участках.



1. Болдырев А. А. Итоги науки и техники. Биол. химия, 17, 95—106, 1982.
2. Киквидзе З. Я., Векуа М. Г., Кометиани З. П. Биохимия, 48, 1074—1079, 1983.
3. Кометиани З. П., Векуа М. Г. Биохимия, 48, 1025—1030, 1983.
4. Кометиани З. П. Сообщения АН ГССР, 105, 411—414, 1982.
5. Кометиани З. П., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Биохимия, 40, 1039—1046, 1975.
6. Boldyrev A. A., Svinukhova L. A. Biochim. biophys. Acta, 707, 167—170, 1982.
7. Burdsley W. G. Biochem. J., 153, 101—117, 1976.
8. Fahn S., Koval G. J., Albers R. W. J. Biol. Chem., 241, 1882—1889, 1966.
9. Fahn S., Hurley M. R., Koval G. J., Albers R. W. J. Biol. Chem., 241, 1890—1895, 1966.
10. Schuurmans Stekhoven F. M. A. H., Swarts H. G. P., de Pont J. J. H. H. M., Bonting S. L. Biochim. biophys. Acta, 649, 533—540, 1981.
11. Pleisner L., Plessner L. W. Biochim. biophys. Acta, 643, 449—462, 1981.
12. Skou J. C., Esmann M., Biochim. biophys. Acta, 601, 386—402, 1980.

Na,K-ატფაზის სუბსტრატული დამოკიდებულების ანალიზი

ზ. კომეთიანი, ბ. ზურაბიშვილი

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

ჩატარდა Na,K-ატფაზური რეაქციის სუბსტრატის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულების კინეტიკურ მრუდთა ფორმის ანალიზი ატფ-ის თავისუფალ იონთა და  $Mg^{2+}$  სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის გამოყენებისას. შემუშავებულია „მინიმალური“ მოდელი, რომელშიც ატფ-ის თავისუფალი იონები და  $Mg^{2+}$  Na,K-ატფაზის მოდიფიკატორებად გვევლინებიან და გავლენას ახდენენ მხოლოდ ფერმენტის მიერ  $Mg^{2+}$ -ატფ-ის კომპლექსის დაკავშირებაზე. ყველა ამ ლიგანდისათვის ( $Mg$ ,  $Mg$ -ატფ და ატფ) ცალ-ცალკე დაკავშირების უბნებია ნაგარაუდები.

ვსუფალი იონები და  $Mg^{2+}$  Na,K-ატფაზის მოდიფიკატორებად გვევლინებიან და გავლენას ახდენენ მხოლოდ ფერმენტის მიერ  $Mg^{2+}$ -ატფ-ის კომპლექსის დაკავშირებაზე. ყველა ამ ლიგანდისათვის ( $Mg$ ,  $Mg$ -ატფ და ატფ) ცალ-ცალკე დაკავშირების უბნებია ნაგარაუდები.

ANALYSIS OF THE NA,K-ATPASE DEPENDENCE ON SUBSTRATE

Z. P. KOMETIANI G. A. ZURABISHVILI

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Analysis of kinetic curves shape of the Na, K-ATPase dependence on substrate at different fixed concentrations of ATP free ions and  $Mg^{2+}$  has been carried out. "Minimal" model is proposed, where ATP free ions and  $Mg^{2+}$  are inhi-

bitors of Na, K-ATPase acting only on the enzyme affinity for Mg-ATP complex. Separate binding sites for each ligand ( $Mg^{2+}$ , ATP, MgATP) are suggested.

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ ЛИСТА ТОПОЛЯ И ОБРАЗОВАНИЕ В НЕЙ ХЛОРОФИЛЛА

А. И. Литвинов, Г. К. Томарадзе, С. Г. Сургуладзе, Г. А. Санадзе

Тбилисский государственный университет

Поступила в редакцию 01.06.1984

Описаны условия получения и культивирования хлорофиллоносного каллуса листа тополя. Благодаря селекции наиболее зеленых участков каллуса при пересадках, содержание хлорофилла в нем в течение трех лет повысилось от 15—30 до 30—50  $\text{мкг/г}$  сыр. веса. Обнаружено ингибирование синтеза хлорофилла в культуре ткани тополя в жидкой среде под влиянием 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты\* и его стимулирование под влиянием 6-бензиламинопурина. Обсуждаются перспективы использования культуры ткани тополя в качестве продуцента изопрена.

Листья многих растений в определенных экстремальных условиях синтезируют и выделяют в атмосферу свободный изопрен. Это явление, получившее название изопренового эффекта, тесно связано с функционированием фотосинтетического аппарата и изучается на уровне растений [19], отделенных листьев [3, 4, 14], изолированных протопластов и хлоропластов [1, 2]. Наряду с несомненным теоретическим интересом изопреновый эффект привлекает пристальное внимание с практической точки зрения — выделяющие изопрен растения рассматриваются как перспективные источники получения изопрена. В этой связи проблема получения и культивирования хлорофиллоносных культур изолированных тканей изопренвыделяющих растений является весьма актуальной, так как наиболее реальный способ практического использования

изопренового эффекта должен состоять в создании соответствующих биотехнических систем.

Однако получение и культивирование изолированных тканей с высоким содержанием хлорофилла является трудной методической задачей и только в последние годы в этой области достигнуты ощутимые успехи [6, 9, 15, 18]. Среди различных методических приемов, используемых для повышения концентрации хлорофилла в изолированных культурах тканей и клеток растений, важное место занимает оптимизация фитогормонального контроля [7, 10, 13].

Задача настоящей работы — исследовать влияние некоторых фитогормонов (2,4-Д, НУК, БАП) на рост и образование хлорофилла изолированной культурой ткани тополя, выращиваемой в жидкой среде.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культура ткани тополя была получена из молодых листьев растений *Populus deltoides* Marsh., выращиваемых в оранжерее при естественном

освещении. Листья стерилизовали 30%-ным этанолом 3 мин, 2%-ным хлораминном 15 мин, промывали стерильной дистиллированной водой, затем наре-

\* Принятые сокращения: 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, НУК — 1-нафтилуксусная кислота, БАП — 6-бензиламинопурин, ДМСО — диметилсульфоксид.

зали на сегменты и помещали на поверхность питательной среды, содержащей соли по Мурасиге и Скугу [11], агар—7 г/л, сахарозу—20 г/л, гидролизат казеина—1 г/л, инозит—100 мг/л, тиамин—0,5 мг/л, аденин—1 мг/л, 2,4-Д—1 мг/л; рН среды—5,5—5,6. Стерилизовали среду автоклавированием в течение 15 мин при давлении 1 атм. В 100 мл колбы с 40 мл среды помещали сегменты одного или двух молодых листьев и культивировали при температуре 26—28°C и непрерывном освещении 6000—8000 люкс (люминесцентные лампы).

Условия выращивания полученной каллусной ткани такие же как при инцировании первичного экспланта. Пассирование проводили через три недели, выбирая наиболее зеленые участки весом 1—1,5 г. До начала опытов с фитогормонами было осуществлено 38 пассажей, причем в последнем пассаже, а также в жидкой питательной среде концентрация сахарозы была снижена вдвое. Кроме того, в жидкой среде отсутствовал гидролизат казеина. 100-миллиметровые колбы, содержащие 30 мл жидкой питательной среды и около 1 г ткани, помещали на качалку АБУ-6с, 60 кач/мин, амплитуда 2 см. Использовали фитогормоны фирмы Сигма. Растворы фитогормонов добавляли к среде, содержащей все компоненты, а затем доводили ее рН до 5,2. Выращи-

вали ткани в жидкой среде при температуре 26—28°C и непрерывном освещении 8000—10000 люкс (люминесцентные лампы).

Анализы проводили следующим образом. Сначала взвешивали сырую массу ткани, затем ее перемешивали и делали заборы проб для определения сухого веса и концентрации хлорофилла. Для анализов использовали 4—6 колб. Полученные величины усредняли и находили стандартное отклонение. Пробы высушивали до постоянного веса при температуре 65°C. Хлорофилл извлекали из ткани с помощью ДМСО.

Оптическую плотность экстрактов определяли при 645 и 666 мкм и расчеты проводили по уравнению Арнона [5].

ДМСО был предложен для определения хлорофилла в листьях высших растений [8]. Авторы обнаружили, что ДМСО-метод, не уступая по полноте извлечения хлорофилла ацетоновому, не требует мацерации ткани и полученные экстракты отличаются большей стабильностью — качеством, особенно важное при массовых анализах. В специальных опытах нами было установлено, что ДМСО-метод может с успехом использоваться для определения хлорофилла в культуре ткани тополя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Каллусообразование на молодых сегментах тополя было замечено уже на третьи сутки и продолжалось 3—4 недели. По мере роста каллуса все более очевидной становится его визуальная гетерогенность — каллус включал зеленые участки с различным содержанием хлорофилла, светло-желтые и белые участки. Гетерогенность каллуса сохранялась и при последующем культивировании, причем соотношение зеленых и нехлорофиллоносных участков не было постоянным. Однако по мере культивирования и, вероятно, главным образом из-за селекции наиболее зеленых участков, доля последних в каллусе, а также концентрация хлорофилла в нем постепенно увеличилась. Если в первых 6 пассажах содержание хлорофилла в конце цикла выращивания составляло

15—30 мкг/г сыр. веса, то в последующих пассажах эта величина составила 30—50 мкг/г сыр. веса. При снижении концентрации сахарозы в 38 пассаже вдвое рост культуры замедлился, однако содержание хлорофилла увеличилось до 60—80 мкг/г сыр. веса.

Гетерогенность особенно наглядна при переводе каллуса в жидкую питательную среду. Гетеротрофная ткань распадается на клетки, группы клеток и небольшие кусочки. Часть этой ткани наслаивается на стенки колб. Зеленая ткань, характеризующаяся значительной агрегативностью, целиком остается в среде в виде кусочков каллуса.

Характер роста культуры, переведенной с агаризованной в жидкую питательную среду, оказался зависимым

от фитогормонов. 2,4-Д способствует быстрому росту гетеротрофной рыхлой ткани (рис. 1а); одновременно с этим наблюдается постепенное разрушение хлорофилла в зеленой ткани,

внесенной в колбы при пересадке (рис. 1б). К 20-му дню культивирования происходит полная потеря хлорофилла. Скорость роста культуры и конечное накопление сухого вещества

Рис. 1. Влияние  $10^{-7}$  М 2,4-Д (а, б) и  $10^{-6}$  МНУК+ $10^{-6}$ М БАП (в, г) на рост (а, в) гетерогенного каллуса тополя и накопление в нем хлорофилла (б, г). Эксплантат — 24-дневный гетерогенный каллус. Каждая точка — усредненное значение 4—6 измерений. Стандартное отклонение составляет 15—20%

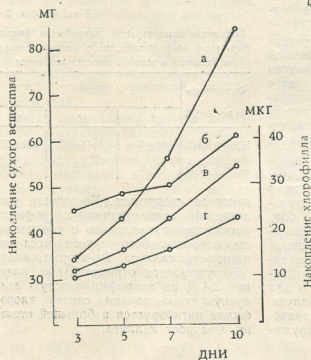
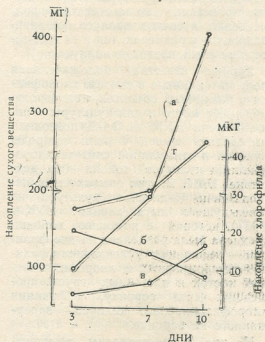


Рис. 2. Влияние  $10^{-6}$  М НУК+ $10^{-6}$  М БАП (а, в) и  $10^{-6}$  М 2,4-Д+ $10^{-6}$  М БАП (б, г) смешанной суспензионной фракции культуры тополя и накопление в ней хлорофилла (в, г). Инокулят — 11-дневная суспензионная фракция (гетеротрофные и хлорофиллоносные клетки и клеточные группы). Каждая точка — усредненное значение 4—6 измерений. Стандартное отклонение составляет 15—20%

значительно ниже при совместном действии НУК и БАП (рис. 1в), однако синтез хлорофилла происходит в течение всего анализируемого срока (рис. 1г). Визуальные наблюдения показывают, что рост культуры в этом случае происходит как за счет хлорофиллоносных кусочков каллуса, увеличивающихся в размерах, так и за счет гетеротрофных клеток и каллуса.

Хорошо известна положительная роль цитокининов в синтезе хлорофилла в различных объектах, что, вероятно, имеет место и для культуры тополя. Замена НУК на 2,4-Д позволила бы сделать вывод о роли природы ауксина в стимуляции синтеза хлорофилла в культуре тополя под действием БАП. В этих опытах была использована 11-дневная культура из предыдущего опыта (вариант НУК+БАП), которая с помощью воронки Бюхнера была разделена на две фракции — смешанная суспензионная фракция гетеротрофных и хлорофиллоносных клеток и клеточных групп, прошедших через воронку, и фракция хлорофиллоносного каллуса, задержанного на воронке.

На рис. 2 представлены результаты опыта со смешанной суспензионной фракцией. В обоих вариантах накопление сухого вещества коррелирует с накоплением хлорофилла. Следовательно, БАП способствует синтезу хлорофилла и при совместном влиянии с 2,4-Д, которая одна ингибирует синтез хлорофилла (рис. 1б). В варианте опыта НУК+БАП значения обеих измеряемых величин выше, чем в варианте 2,4-Д+БАП. Следовательно, сочетание НУК+БАП более благоприятно влияет на рост и накопление хлорофилла в суспензионной фракции. Аналогичные закономерности в характере накопления сухого вещества и хлорофилла выявлены и для фракции хлорофиллоносного каллуса. Что же касается относительных значений этих величин, то здесь обнаруже-

ны различия. В случае смешанной суспензионной фракции обе эти величины достоверно не изменяются в течение всего анализируемого срока и в расчете на грамм сырой массы составляют 57 мг сухого вещества и 26 мкг хлорофилла. В случае фракции хлорофиллоносного каллуса на 10—12 день культивирования происходит как увеличение его плотности (табл. 1), так и повышение концентрации в нем хлорофилла (табл. 2). При сопоставлении указанных в табл. 1 и 2 величин вы-

Таблица 1

Изменение сухого веса (мг/г сыр. веса) хлорофиллоносного каллуса, выращиваемого в жидкой питательной среде

Фитогормоны по 10 <sup>-6</sup> М	День		
	7	10	12
НУК+БАП	65±9	121±19	129±16
2,4-Д+БАП	68±8	84±13	88±15

Таблица 2

Изменение концентрации хлорофилла (мкг/г сыр. веса) хлорофиллоносного каллуса, выращиваемого в жидкой питательной среде

Фитогормоны по 10 <sup>-6</sup> М	День		
	7	10	12
НУК+БАП	44±7	144±15	159±17
2,4-Д+БАП	45±9	65±11	76±12

ясняется следующее. Во-первых, увеличение концентрации хлорофилла происходит параллельно с увеличением относительного сухого веса или плотности каллуса. Во-вторых, вновь обнаруживается отрицательное влияние 2,4-Д на хлорофиллоносную каллусную ткань, причем синтез хлорофилла ингибируется в большей степени, чем рост каллуса.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каллусная культура тополя является гетерогенной. Это обусловлено, вероятно, главным образом тем обстоятельством, что в качестве исходного материала был использован такой сложный объект, каким является лист.

Несмотря на непрерывное освещение, основная масса каллуса в первых пассажах была гетеротрофной, однако благодаря селекции масса зеленого каллуса постепенно увеличивалась. Селекция является одним из основных



методов повышения содержания хлорофилла в изолированных культурах [6, 22]. Другой важный метод — лимитирование углеводного питания [6]. Снижение концентрации сахарозы в питательной среде в наших опытах также способствовало накоплению хлорофилла в культуре.

В зависимости от состава инокулята и природы фитогормонов культура тополя в жидкой среде может расти преимущественно или в виде гетеротрофной суспензии, или в виде хлорофиллоносного каллуса. 2,4-Д способствует росту культуры в виде гетеротрофной суспензии и замедляет скорость роста зеленой ткани и синтез хлорофилла в ней. БАП способствует росту зеленого каллуса и накоплению хлорофилла.

Известно, что цитокинины вызывают органогенез в изолированных культурах тополя, тогда как 2,4-Д стимулирует их неорганизованный рост [10, 20, 21]. В наших опытах, по-видимому, также наблюдаются разные уровни зависимой от фитогормонов дифференцировки, причем имеют место следующие корреляции: ослабление связей между клетками — снижение синтеза хлорофилла; увеличение агрегативности тканей — усиление синтеза хлорофилла.

Всегда ли усиление синтеза хлорофилла в культуре связано с повышением уровня дифференцировки (каллусная ткань) или же специализация клеток, связанная с возникновением фотосинтетического аппарата, может быть реализована на уровне суспензионных культур? Ряд работ дает положительный ответ на этот вопрос — известны продуктивные хлорофиллоносные суспензионные культуры, синтез пигмента в клетках которых происхо-

дит одновременно с их делением [17]. В культуре тополя наблюдается корреляция между накоплением сухого вещества и хлорофиллом, поэтому можно предположить, что и в нашей культуре синтез хлорофилла может протекать одновременно с делением клеток.

Концентрация хлорофилла в культуре тополя, выращиваемой на агаризованной питательной среде, в настоящее время составляет в среднем 60—80 мг/г сыр. веса, а в наиболее зеленых участках каллуса—90—110 мг/г сыр. веса; в наиболее зеленых кусках каллуса, выращиваемого в жидкой среде, — даже 140—160 мг/г сыр. веса. Эти величины концентрации хлорофилла сравнимы с таковыми для некоторых миксотрофных культур, обладающих высоким фотосинтетическим потенциалом [6, 15, 18].

Оценивая перспективность использования изолированных тканей и клеток растений в качестве продуцентов экономически важных веществ, следует учитывать интенсивность синтеза этих веществ и уровень дифференцировки культуры.

В наших исследованиях выявлены условия, в которых каллусная культура тополя синтезирует довольно высокую концентрацию хлорофилла. Кроме того, в наших предварительных опытах установлено, что эта культура способна к фотосинтетической фиксации углекислого газа и к выделению изопрена, однако интенсивность обоих процессов на порядок ниже, чем в интактных листьях. Наши настоящие исследования направлены на интенсификацию фотосинтеза и выделение изопрена в культуре ткани тополя, а также на получение суспензионных хлорофиллоносных культур изопрен-выделяющих растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мгалоблишвили М. П., Литвинов А. И., Санадзе Г. А. ДАН СССР, 259, 766—768, 1981.
2. Мгалоблишвили М. П., Литвинов А. И., Каландадзе А. Н., Санадзе Г. А. Физиол. раст., 29, 372—377, 1982.
3. Санадзе Г. А. Физиол. раст., 13, 753—761, 1966.
4. Санадзе Г. А., Курсанов А. Л. Физиол. раст., 13, 201—207, 1966.
5. Arnon D. I. Plant Physiol., 24, 1—15, 1949.
6. Dalton C. C., Peel E. In: Progr. in Ind. Microbiol., 17, 1983, 109—166.
7. Davey M. R., Fowler M. W., Street H. E. Phytochemistry, 10, 2559—2575, 1971.
8. Hiscox J. D., Israelstam G. F. Can. J. Bot., 57, 1332—1334, 1979.
9. Kennedy R. A., Barnes J. E. Plant Physiol., 59, 600—603, 1977.

10. Kohlenbach H. W. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, 1977, 355—365.
11. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 15, 473—497 1962.
12. Nato A., Bazetoux S., Mathieu Y. *Physiol. Plant.*, 41, 116—123, 1977.
13. Neumann K.—H., Raafat A. *Plant. Physiol.*, 51, 685—690, 1973.
14. Rasmussen R. A., Jones C. A. *Phytochemistry*, 12, 15—19, 1973.
15. Sato F., Asada K., Yamada Y. *Plant and Cell Physiol.*, 20, 193—200, 1979.
16. Sato F., Nakagawa N., Tanio T.,

Yamada Y. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2463—2467, 1981.

17. Seeni S., Gnanam A., *Physiol. Plant*, 49, 465—472, 1980.
18. Seeni S., Gnanam A. *Plant and Cell Physiol.*, 24, 1033—1041, 1983.
19. Tingey D. T., Manning M., Grotzhaus L. C., Burns W. F. *Physiol. Plant*, 47, 112—118, 1979.
20. Venverloo C. J. *Acta Bot. Neerl.*, 22, 390—398, 1973.
21. Winton L. L. *Amer. J. Bot.*, 55, 159—167, 1968.
22. Yamada Y., Sato F. *Plant and Cell Physiol.*, 19, 691—699, 1978.

ზოგიერთი ფიტოჰორმონის გავლენა ვერხვის ფოთლის ქსოვილთა კულტურის ზრდასა და ქლოროფილის წარმოქმნაზე

ა. ლიტვინოვი, გ. თომარაძე, ს. სურგულაძე, გ. სანაძე  
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რეზიუმე

ნაშრომში აღწერილია ვერხვის ფოთლის ქლოროფილშემცველი კალუსის მიღებისა და კულტივირების პირობები. აგარიზებულ საყვებ არეზე გაზრდილი კალუსის შედარებით მწვანე მონაკვეთების შერჩევით ქლოროფილის შემცველობა ვერხვის ქსოვილის კულტურაში სამ წელიწადში 15—30 მკგ ქლ/გ-დან 30—50 მკგ/ქლ/გ-მდე გაიზარდა მშრალ წონაზე

გადაანგარიშებით. ნაჩვენებია, რომ 2,4-დიქლოროფენოქსიმარმუაჟა იწვევს ქლოროფილის სინთეზის ინჰიბირებას ქსოვილთა კულტურაში, ხოლო 6-ბენზილამინოპურინის შეყავს გავლენით სინთეზი ჩქარდება. განხილულია ვერხვის ფოთლის ქსოვილის კულტურის გამოყენების პერსპექტივები, როგორც იზოპრენის პროდუცენტისა.

THE INFLUENCE OF SOME PHYTOHORMONES ON THE GROWTH AND CHLOROPHYLL CONTENT IN POPLAR LEAVES TISSUE CULTURE

A. I. LITVINOV, G. K. TOMARADZE, S. G. SURGULADZE, G. A. SANADZE

Tbilisi State University, USSR

S u m m a r y

The initiation and growth conditions for poplar leaves tissue culture are described. The increasing in the chlorophyll content in tissue culture from 15—30 to 30—50 $\mu$ g chl/g. fr. wt. during three years is due to a selection of the greener parts of the callus at transplanting. The inhibition of the chlorophyll synthesis in tissue

culture in liquid medium under the influence of 2,4 — dichlorophenoxyacetic acid and its stimulation under the influence of 6—benzylaminopurine are found. The perspectives for the using of a poplar culture as a source of isoprene are discussed.



УДК 612.112.94:612.118.221.2:6.05(47922)

ИММУНОЛОГИЯ

## ЧАСТОТА HLA ГЕНОВ И ГАПЛОТИПОВ СРЕДИ ГРУЗИН

Н. И. Махатадзе, В. В. Меунаргия, В. В. Яздовский, Ц. Н. Чагишвили

*НИИ гематологии и переливания крови им. акад. Г. М. Мухадзе МЗ ГССР,  
Тбилиси*

Поступила в редакцию 25.06.1984

В работе представлены результаты изучения распределения HLA антигенов в грузинской популяции и этнографических группах Грузии. Всего исследовано более тысячи человек. HLA типирование проводили в стандартном 2-ступенчатом микролимфоцитотоксическом тесте набором типизирующих анти HLA сывороток, направленных к 21 антигену локусов А и В. Выявлены характерные особенности как для грузинской популяции в целом, так и для отдельных этнографических групп Грузии. Наиболее частыми антигенами во всех изученных нами группах оказались: HLA A2, B5, B35.

В 1958 г. французский исследователь Дж. Доссе доказал существование специфического лейкоцитарного антигена, названного им «МАС» (последствий антиген HLA-A2). За относительно небольшой промежуток времени стремительно развивается область знаний по изучению главного комплекса гистосовместимости человека HLA. Этому во многом способствовало выявление роли HLA в развитии иммунологических реакций как в норме, так и при патологических состояниях. Сегодня известно, что система HLA является центральным генетическим аппаратом функционирования иммунной системы [4].

Исключительный полиморфизм, возможность четкой идентификации антигенов HLA широко используется при генетических исследованиях. Одним из актуальных вопросов в изучении комплекса HLA является выявление популяционных особенностей в распределении HLA антигенов. Установлены существенные отличия в частоте отдельных HLA генов между расами европеоидов, монголоидов, ориентов [9], а также внутри рас. Обнаружены особенности между группами европеоидов, проживающих в СССР

[3, 5, 6, 7]. Проведение подобных исследований в Грузии представляет особый интерес в связи с промежуточным расположением республики у границ Европы и передней Азии, а также сосредоточением на относительно небольшой территории (69,7 тыс. квадратных километров) различных климатических и ландшафтно-географических зон [1]. Распределение HLA антигенов в Грузии ранее не изучалось.

Популяционные исследования имеют основополагающее значение для разработки проблемы «HLA и болезнь». Исследованиями последних лет не только показано наличие индивидуальности в распределении HLA аллелей и особенно частоте отдельных гаплотипов, но также выявлена неоднородность ассоциаций HLA антигенов с заболеваниями в различных этнических популяциях [10].

Типирование населения по HLA антигенам может быть использовано для выявления лиц с повышенным риском возникновения того или иного заболевания, разработки и своевременного принятия мер профилактики болезни, а также для решения вопросов трансплантологии и трансфузиологии, подбора пар донор—реципиент.

HLA антигены исследованы нами среди представителей следующих этнографических групп Грузии: карталинцев (Горийский район г. Гори, 117 человек), кахетинцев (Телавский район, г. Телави, 80 человек), имеретинцев (Зестафонский район, 162 человека), мегрелов (Зугдидский район, г. Зугдиди, 100 человек), аджарцев (Батумский район, г. Батуми, 92 человека), рачинцев (Онский район, г. Они, 94 человека). Изучена также смешанная группа 492 человека, в которую вошли представители всех этнографических групп\* и районов Грузии. Все обследованные были донорами крови или плазмодереза Республиканской и районных станций переливания крови МЗ СССР. Возраст исследованных составил от 18 до 60 лет, примерно равное количество женщин и мужчин, не состоящих в кровном родстве. Принадлежность к грузинской национальности и к определенной этнографической группе устанавливалась путем опроса, по паспортным данным, с учетом предшествующих поколений и места жительства. Типирование HLA антигенов производилось по стандартной методи-

ке в 2-ступенчатом микролимфоцитотоксическом тесте [11] с использованием сывороток Ленинградского центра иммунологического типирования тканей, коммерческих сывороток фирм „Biotest serum“, „Behring“ ФРГ, а также международной панели „Интертрансплант-4“. Лейкоциты периферической крови выделяли в градиенте плотности фикол-верографина ( $d \pm 1,077$ ). Частоту гена (P) определяли по формуле:  $p = 1 - \sqrt{1 - j}$ , где  $j$  частота соответствующего антигена в популяции. Значения частоты гаплотипов высчитывали по формуле Матюс  $hji = \Delta ji + p_j pi$ , где  $p_j$  и  $pi$  — генные частоты;  $\Delta$  (дельта) — гаметная ассоциация или степень неуравновешенного сцепления между генами локусов рассчитывалась по формуле

$$\Delta = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+d)(c+d)}{n^2}}, \quad n -$$

число обследованных,  $b, c, d$  — значения, полученные при составлении решетки „2×2“.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что наиболее частыми антигенами в смешанной группе являются HLA A2, A9, B5, B35 (табл. 1, 2). При сравнении с популяцией

русских г. Москвы и с северо-европейским распределением (последнее приводится по материалам «Histocompatibility Testing 1980» [8]), обнаружено снижение частоты антигена A1

Таблица 1

HLA-A локус: частоты антигенов (%) среди грузин, русских г. Москвы и европейцев\*

HLA	Имеретинцы n=162	Мегрелы n=100	Аджарцы n=92	Рачинцы n=94	Карталинцы n=117	Кахетинцы n=80	Смешанная группа n=492	Русские n=267	Европейцы* n>u>000
A 1	16,67	7,0	15,22	5,32	13,67	11,25	9,76	23,2	27,0
A 2	61,11	67,0	57,61	62,77	52,99	50,0	57,32	49,1	45,7
A 3	19,75	12,0	18,48	2,66	24,79	28,75	22,36	24,3	23,0
A 9	22,84	16,0	32,61	17,02	23,08	21,25	25,81	22,1	21,3
A 10	14,81	18,0	10,87	13,83	21,37	16,25	16,46	18,3	11,0
A 11	9,26	8,0	7,61	5,32	7,69	6,25	8,33	11,2	11,8
A 19	2,47	5,0	6,52	3,19	5,98	11,25	6,30	19,8	29,6
Blank для частоты гена	0,1748	0,2325	0,1679	0,2360	0,1760	0,2063	0,1852	0,0843	0,0776

\* Здесь и в табл. 2 средние данные по материалам VIII Международного совещания [8]



Гаметная ассоциация ( $\Delta$ ) локусов HLA-A,-B среди грузин (смешанная группа)

HLA	A 1	A 2	A 3	A 9	A 10	A 11	Aw 19
B 5	-55	277*	- 30	74	-115*	41	- 6
B 7	-11	- 29	113*	9	- 20	-22	-17
B 8	46*	- 48	1	8	5	18	-17
B 12	- 7	29	13	0	41	-43*	15
B 13	6	107	-16	39	- 54	-20	-21
B 14	9	-10	-24	20	- 7	- 9	7
B 15	12	-15	-11	- 4	63*	18	- 6
B 16	4	8	0	-48*	41	-14	3
B 17	21	-48	-55*	31	6	46*	-14
B 18	18	-48	- 1	5	-15	-13	1
B 21	2	-30	9	-11	-24	- 6	30*
B 27	2	49	- 3	-33	- 1	- 6	- 2
B 35	-49	-122	127*	40	-22	37	45
B 40	19	24	-34*	- 4	- 2	- 1	23

\*P < 0,05

Выявленные особенности в распределении HLA антигенов в Грузии являются фундаментом для разработки проблемы «HLA и болезнь» в регионе,

а также могут способствовать расширению наших представлений о системе HLA.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Джаошвили В. Ш. Население Грузии, «Медицинеба», Тбилиси, 1968.
2. Джирш Д. У. Иммунологическая инженерия, «Медицина», М., 1982.
3. Нерсисян В. М., Мартиросян И. Г. Пробл. гематол., 10, 31—33, 1979.
4. Петров Р. В. Иммунология, «Медицина», М., 1982.
5. Сочнев А. М. Иммунология, «Медицина», М., 1982, I, 43—46.
6. Тананов А. Т., Кутьина Р. М., Потеева И. А. Пробл. гематол., 10, 26—30, 1979.
7. Тимошенко Л. И., Бурка Н. И., Бай Е. Н., Митченко Ж. Н. Пробл. гематол., I, 37—40, 1982.
8. Baur M. P., Danilovs J. A. Joint Report: Population Analysis of HLA—A, B, C, DR and others genetic markers—In: Histocompatibility testing 993—995, 1980.
9. Bodmer J. G., Bodmer W. F. Amer. J. Hum. Genet., 22, 396—421, 1970.
10. Grumet F. C., Clin. Immunol. Rev., 2, 123—155, 1983.
11. Terasaki P. I., Bernoko D., Park M. S., Ozturk G., Ivani I. Amer. J. Clin. Path., 69, 2, 103—120 1978.

#### HLA გენეტიკისა და ჰაპლოტიპების სიხშირე ქართველებში

ბ. მახათაძე, ვ. მუხარბია, ვ. იაზღოვსკი, ც. ჩაბიაშვილი

საქართველოს სსრ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს გ. მუხაძის სახელობის ჰემატოლოგიისა და სისხლის გადასხმის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, თბილისი

#### რეზიუმე

ნაშრომში წარმოდგენილია კვლევის შედეგები ქართველთა პოპულაციისა და ეთნოგრაფიულ ჯგუფებში HLA ანტიგენების განწილების შესახებ. საამისოდ

შესწავლილ იქნა ათასზე მეტი ჯანსაღი პირი—სისხლის დონორი. HLA ტიპირება ხდებოდა სტანდარტული ორსაფეხურიანი მიკროლიმფოციტოტოქსიკური ტესტით.



გამოყენებულ იქნა ტიპირების დამდგენი ანტი HLA შრატები, მიმართული A და B ლოკუსების 21 ანტიგენისადმი. გამოვლინდა აღნიშნული პოპულაციისა და ეთნოგრაფიული ჯგუფებისათვის დამახასიათებელი HLA ანტიგენების განაწილების

თავისებურება. ყველაზე გავრცელებული აღმოჩნდნენ: A2, B5, B35 ანტიგენები, ხოლო ჰაპლოტიპებიდან — ქართველთა პოპულაციაში: A2—B5; A3—B7; A3—B35; A9—B5.

**FREQUENCY OF HLA GENES AND HAPLOTYPES AMONG THE GEORGIANS**

N. I. MAKHATADZE, V. V. MEUNARGIA, V. V. IAZDOVSKI, TS. N. CHAGIASHVILI

G. Mukhadze Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Georgian Ministry of Health, Tbilisi, USSR

**S u m m a r y**

Frequency of genes and haplotypes in the HLA system was determined by means of tissue typing in over 1000, healthy Georgians, with a plate of sera

against 21 alleles of A and B locus. Haplotypes A2, B5; A9, B5: A3, B7; A3, B35 occurred most frequently among the Georgians.

УДК 612.823

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

## ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ СТРАХА КОШКИ НА РАЗДРАЖЕНИЕ ДОРСОМЕДИАЛЬНОГО ТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА ДО И ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГИПОТАЛАМУСА

Н. Н. Дзидзишвили, М. С. Хомерики

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 07.09.1984

Еще в начале нашего столетия Фогтом и Фридманом было показано, что дорсомедиальное ядро (ДМЯ) таламуса имеет сложную структуру, оно состоит из мелкоклеточной и крупноклеточной частей. По исследованиям многих авторов [2, 9, 11] каждая из этих частей связана с разными структурами головного мозга, что говорит как о морфологической, так и о функциональной дифференциации данного ядра. В предыдущей работе нами было установлено, что на базе раздражения именно мелкоклеточной части ДМЯ, в условиях хронического эксперимента, легко вырабатываются условные эмоциональные ответы страха с убегающим [3]. Эти ответы имеют сходство с теми, которые возникают в ответ на раздражение гипоталамуса, хотя порог вызова эмоциональной реакции

### МЕТОДИКА

Опыты ставились на половозрелых кошках в условиях хронического эксперимента. Раздражающие электроды в ДМЯ таламуса и электрокоагулирующие электроды, по две пары с каждой стороны, в гипоталамус были вживлены по координатам атласа Джаспера и Аймон-Марсана [8]. Индифферентный электрод располагался в кости затылочной области.

Вначале изучался характер ответов на прямое раздражение мелкоклеточной части ДМЯ таламуса. После этого, на базе раздражения данного ядра, вырабатывался условный эмоциональный ответ на тон 500 Гц. Когда условная реакция страха была

страха при прямом гипоталамическом раздражении более низок [4].

Гипоталамус, по современным данным, признан «центральной» фигурой в лимбической системе, дающей эмоциональные ответы на прямое раздражение [1, 5, 10, 15].

Исходя из этого и описанных в литературе анатомических связей таламического ДМЯ с гипоталамусом [9, 10, 11, 14] естественно было предположить, что между этими двумя структурами должна существовать тесная функциональная связь и что ответы, вызываемые раздражением мелкоклеточной части ДМЯ таламуса, возможно, являются результатом активирования гипоталамуса.

С целью проверки этого предположения были поставлены опыты на кошках с раздражением ДМЯ после билатерального повреждения латерального гипоталамуса.

Упрочена и возникала в 100% случаев, производилось билатеральное повреждение латерального гипоталамуса путем электрокоагуляции. По прошествии постоперационного периода — через 10—12 дней — пробовали ответные реакции животных как на условный тон, так и на прямое раздражение мелкоклеточной части таламического ДМЯ.

По окончании опытов животные забивались повышенной дозой эфирного наркоза и мозги фиксировались в 10%-ном растворе формалина. На срезах верифицировались локализация раздражающих электродов и повреждения гипоталамуса (рис. 1 и 2).

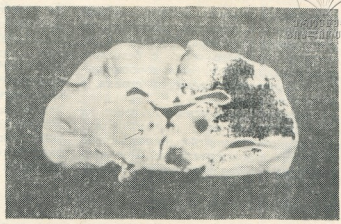


Рис. 1. Точка в таламическом дорсомедиальном ядре (указана стрелкой), при стимуляции которой возникала поведенческая реакция страха

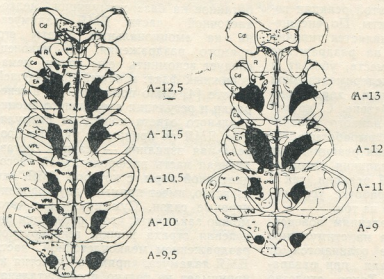


Рис. 2. Образцы билатерального повреждения латерального гипоталамуса. Схематическое изображение фронтального среза мозга кошки по атласу Джаспера и Аймон-Марсана

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Прежде всего следует отметить, что при раздражении мелкоклеточной части таламического ДМЯ возникали хорошо выраженные ответы страха с убеганием. Данная реакция сопровождалась вегетативными компонентами, характерными для эмоционального ответа страха: уринойей, мидриазом, иногда дефекацией. Еще одним признаком эмоциональной окраски ответной реакции было дли-

тельное последствие; после тщетных попыток выйти из экспериментальной клетки кошки забивались в угол и продолжали сидеть там с расширенными зрачками. На первых же пробах стимуляции у животных вырабатывался отрицательный условный рефлекс: при виде экспериментальной обстановки проявлялась резко отрицательная реакция животных, их с трудом удавалось усаживать в

экспериментальную кабину, кошки царапались и норовили выскочить из рук экспериментатора. После 7—8 сочетаний условного тона с безусловным раздражением была хорошо выражена условная реакция страха с убеганием.

После того как условный ответ на тон возникал во всех случаях, у животных, одновременно, билатерально повреждался гипоталамус. По прохождении постоперационного перио-

да заново ставились опыты при тех же условиях, что и до операции. Оказалось, что ответы как на прямое раздражение мелкоклеточной части ДМЯ таламуса, так и на условный тон у животных с поврежденным гипоталамусом сохранялись без изменения: реакция убегания наступала мгновенно при подаче условного тона; отрицательная реакция на вид экспериментальной обстановки бывала такой же, как и до повреждения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На возможность возникновения эмоциональных ответов страха с убеганием при раздражении ДМЯ таламуса еще в 1962 году указал Робертс [13]. В наших опытах такие ответы возникали при раздражении лишь мелкоклеточной части данного ядра. Об эмоциональности этой реакции говорят следующие факты. По внешнему проявлению она является типично защитной: в ответ на раздражение кошка срывается с места, убегает и забивается в угол экспериментальной кабины. Для реакции характерно длительное последствие. С другой стороны, на основе данного раздражения очень быстро вырабатывается условная поведенческая реакция. Она проявляется как в наличии отрицательной ситуационной реакции, так и в очень быстрой выработке условного аверсивного ответа на тон.

По внешним проявлениям поведенческие ответы страха на стимуляцию ДМЯ таламуса не отличаются от тех, которые возникали при раздражении гипоталамуса. Такое сходство эмоциональных ответов той и другой структуры и факт наличия анатомических связей таламического ДМЯ с гипоталамусом, о чем говорилось выше, по данным настоящего исследования, не дает еще право предполагать, что

ответы, вызываемые раздражением ДМЯ, возникают при неизменном участии гипоталамуса.

Как показали наши опыты, билатеральное повреждение латерального гипоталамуса не оказывает влияния ни на условное поведение, выработанное на базе стимуляции мелкоклеточной части ДМЯ таламуса, ни на эмоциональные ответы его прямого раздражения. И, наконец, следует вспомнить еще один немаловажный факт: в нашей предыдущей работе [4] было показано, что в генерации и регуляции аверсивного эмоционального ответа кошки на стимуляцию ДМЯ не принимает участия префронтальная извилина — главная составляющая часть префронтальной ассоциативной коры, с которой ДМЯ, как известно, имеет прямые двусторонние нервные связи. Суммируя все это, можно заключить, что в регуляции поведения страха кошки, генерируемой раздражением мелкоклеточной части ДМЯ таламуса, прямого участия не принимает не только префронтальная ассоциативная кора, у которой имеются тесные связи с гипоталамусом [6, 12], но и сам гипоталамус, считающийся, как было сказано выше, «основной структурой» эмоциогенной лимбической системы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ониани Т. Н. В кн.: Нейрофизиология эмоций и цикла бодрствование-сон, 2, «Медицинераба», Тбилиси, 95—117, 1976.
2. Робинер И. С. ЖВНД, 18, 5, 886—894, 1968.
3. Хомерики М. С. Мат. XIV съезда Всесоюзного физиологического общества им. И. П. Павлова, Баку, 2, 103—104, 1983.
4. Хомерики М. С., Давитулиани Д. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., 8, 6, 372—377, 1982.
5. Brown G. W., Cohen B. D., Amer. J. Physiol., 197, 1, 153—157, 1959.



6. Clark Le Gross W., Meyer M. Brit. Med. Bull., 6, 341—345, 1950.

7. Friedmann M. J. Psychol. u. Neurol., 18, 309—312, 1911.

8. Jasper H. H., Ajmone-Marsan C. A. Stereotaxic Atlas of the Diencephalon of the Cat., Nat. Res. Council, Canada, Ottawa, 1954.

9. Khalifeh R. R., Kaelber W. W., Ingram W. R. Amer. J. of Anatomy, 116, 2, 341—345, 1965.

10. Nakao H. Amer. J. Physiol., 194, 2, 411-418, 1958.

11. Nauta W. J. H. Brain, 85, III, 505—521, 1962.

12. Nauta W. J. H. Acta Neurobiol., 32, 2, 125—140, 1972.

13. Roberts W. W. J. Comp. Physiol. Psychol., 55, 2, 191—197, 1962.

14. Siegel A., Edinger H., Troiano R. Exper. Neurol., 38, 2, 202—217, 1973.

15. Valenstein E. S. Brain Behaviour and Evol., 2, 4, 295—316, 1969.

16. Vogt C. J. Psychol. u. Neurol., 12, 285—291, 1909.

თალამუსის დორსომედიალური ბირთვის გაღიზიანებით  
 გამოწვეული შიშის ქცევა კატებში ჰიპოთალამუსის  
 დაზიანებამდე და დაზიანების შემდეგ

6. ძიგნისტი, მ. ხომერიკი

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

დადგენილია, რომ თალამუსის დორსომედიალური ბირთვის წერილუჯრედოვანი უბნის გაღიზიანების საპასუხოდ აღმოცენდება კარგად გამოხატული შიშის ემოციური რეაქცია. ამგვარი გაღიზიანების ბაზაზე ადვილად ხდება გაქცევის პირობითრეფლექსური პასუხის გამომუშავებაც. მიუხედავად იმისა, რომ აღნიშნულ ბირთვის მკიდრო ნერვული კავშირები აქვს თავის ტვინის ისეთ ემოციოგენურ სტრუქტურასთან, როგორც ჰიპოთალამუსია და ამ ორი სტრუქტურის გაღიზიანების საპასუხოდ აღმოცენებული შიშის ემოციური

პასუხებიც ერთმანეთს ძალიან ჰგავს, ლატერალური ჰიპოთალამუსის ორმხრივი დაზიანება არ ახდენს გავლენას თალამუსის დორსომედიალური ბირთვის წერილუჯრედოვანი უბნის აქტივაციით გამოწვეულ შიშის ქცევაზე.

უნდა დავასკვნათ, რომ თალამუსის დორსომედიალური ბირთვის წერილუჯრედოვანი უბნის სტიმულაციით გამოწვეულ შიშის ემოციური რეაქციის გენეზსა და მიმდინარეობაზე ჰიპოთალამუსი უშუალო გავლენას არ ახდენს.

FEAR BEHAVIOR ELICITED BY THE STIMULATION OF THE THALAMIC DORSOMEDIAL NUCLEUS BEFORE AND AFTER HYPOTHALAMIC LESION IN CATS

N. N. DZIDZISHVILI, M. S. KHOMERIKI

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

In chronic experiments on cats the electrical stimulation of small-cellular areas of the thalamic dorsomedial nucleus (DMN) was shown to elicit

a well pronounced fear response — escape behavior. The conditioned fear behaviour can be easily acquired on the basis of the stimulation of this structu-

re. The bilateral lesion of the lateral hypothalamus does not affect both the conditioned and unconditioned emotional reactions elicited by the DMN stimulation.

The conclusion should be made that,

though the hypothalamus has interconnections with the small-cellular areas of DMN, apparently it does not influence the arousal and continuation of emotional responses elicited by the stimulation of DMN

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

1. В журнале печатаются не опубликованные в других изданиях, завершённые, оригинальные работы экспериментального и теоретического характера по утвержденным редколлегией разделам биологии, обзорные статьи, написанные по заказу редколлегии, а также краткие сообщения и рецензии. Периодически в журнале будет помещаться краткая хроника о проведенных в республике научно-организационных мероприятиях.

2. Объем рукописи экспериментальных и итоговых работ, включая таблицы, рисунки, подписи к рисункам, список литературы и резюме на грузинском и английском языках (не более одной страницы машинописи на каждом языке), не должен превышать 12 страниц машинописного текста, напечатанного через 2 интервала и полем 3 см с левой стороны. К рукописи может быть приложено не более 5 рисунков. Объем обзорной статьи — 24 страницы, краткого сообщения со списком литературы и кратким резюме на английском языке (не более 6 строк) — до 4 страниц машинописи. Краткие сообщения можно иллюстрировать 1—2 рисунками.

Резюме на английском и грузинском языках, список литературы, таблицы и подписи к рисункам должны быть представлены на отдельных листах.

3. Рукопись (в двух экземплярах) должна быть тщательно проверена, иметь направление учреждения и заключение экспертной комиссии в двух экземплярах. На первой странице слева приводятся индексы статьи (УДК) по таблицам Универсальной десятичной классификации, справа — раздел биологии, затем название статьи, инициалы и фамилии авторов, название учреждения, где выполнена работа, и краткая аннотация (не более 0,5 стр.).

Статья должна быть подписана авторами. В конце статьи необходимо указать полностью имя, отчество и фамилии авторов, домашний и служебный адреса, телефоны.

4. Введение должно содержать краткое изложение сути рассматриваемой проблемы и задачи исследования. Описание методики должно быть кратким, но позволяющим читателю самостоятельно оценить соответствие техники и методических приемов, использованных при выполнении работы. Описание результатов и их обсуждение должны ограничиваться рассмотрением и оценкой важнейших фактов, полученных в экспериментах. В конце статьи выводов печатать не следует.

5. К статье и краткому сообщению следует приложить реферат на русском языке для реферативного журнала СССР (не более 1000 знаков), оформленный следующим образом: УДК, раздел биологии, инициалы и фамилии авторов, заглавие, название журнала. В конце реферата следует указать количество таблиц, рисунков, библиографические сведения. После реферата слева в квадратных скобках нужно указать научное учреждение, в котором выполнена работа. Реферат должен быть подписан автором.

6. Иллюстрации — четкие фотографии на глянцевой бумаге и рисованные графики на кальке или белой чертежной бумаге — следует представлять в двух экземплярах (в надписанном конверте). Надписи на иллюстрациях должны быть выполнены тушью. На обороте иллюстрации следует обозначить карандашом ее номер, фамилию автора и сокращенное название статьи, а в случае необходимости отметить верхний и нижний край.

7. Фамилии цитируемых авторов следует давать в транскрипции, соответствующей тексту статьи, и в оригинальной — в списке литературы. Список литературы составляется по алфавиту. В начале списка необходимо приводить литературу грузинским или русским шрифтом, а затем латинским. После порядкового номера (в тексте статьи он ставится в квадратные скобки) следует давать фамилию и инициалы авторов, название издания, затем: для периодических изданий — том, страницы (от и до), год; для непериодических — название издательства, место, год издания и страницы.

8. Рукописи, оформленные без соблюдения указанных правил, а также не соответствующие профилю журнала, возвращаются автору. Все рукописи проходят рецензирование.

9. Публикация статей производится в порядке очередности их поступления, за исключением работ, заказанных редакцией.

10. Корректуры статей даются авторам для проверки, правки и визирования. Изменения и дополнения в тексте корректур не допускаются, за исключением исправления ошибок и опечаток. Выправленные корректуры возвращаются в редакцию в трехдневный срок. При задержке корректур редакция публикует статьи по первоначальным текстам.

11. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять тексты статей.

12. Авторы получают бесплатно 12 отдельных оттисков.

6<sup>139/73</sup>



Цена 85 коп.

Индекс 76204