

784-8
1987



ISSN— 0321— 1665

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

ბიოლოგიის
სერია
СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ

1987 N 2 - თბილისი - თბილი
- ТБИЛИСИ - ТОМ
- TBILISI - VOL.

13

BIOLOGICAL SERIES

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



ბიოლოგიის სერია СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

ტომი 13, № 2
Том

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

სარედაქციო კოლეჯი:

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

ლ. გაბუნია, ს. ღურმიშიძე, მ. ზაალიშვილი, გ. თუმანიშვილი,
გ. კანდელაკი, კ. ნადარეიშვილი, გ. ნახუტრიშვილი, გ. სანაძე, ზ. ყურაშვილი,
ნ. ძიძიშვილი, თ. ჭანიშვილი, ნ. ჯავახიშვილი
პასუხისმგებელი მდივანი ს. ლაბაძე

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

EDITORIAL BOARD:

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

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

Известия АН ГССР
© Серия биологическая, 1987

Корректор Д. Р. Арчвадзе

Сдано в набор 29.1.1987; Подписано к печати 13.04.1987; Формат бумаги
70×108¹/₁₆; Бумага № 1; Печатных л. 6,3; Уч.-издат. л. 6.0;
УЭ 06153; Тираж 1000; Заказ № 338;

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 — შიგნაარსი — CONTENTS

T. N. Dadiani. Изменения фазовой структуры сердечного сокращения при различных сроках иммобилизационного стресса	77
თ. დადიანი. გულის შეკუმშვის ფაზური სტრუქტურის ცვლილებები სხვადასხვა ხანგრძლივობის იმობილიზაციური სტრესის დროს	
T. N. Dadiani. The changes in phase structure of cardiac contraction during the different periods of immobilization stress	
P. A. Kandelaki, N. I. Totibadze. Retroградное перерождение клеток задних бугров четверохолмия после частичной декортикации ассоциативной области коры больших полушарий головного мозга кошки	82
რ. კანდელაკი, ნ. თთიბაძე. კატის ტვინის ოთხგორაკის უკანა ბოცვრების უკრედთა რეტროგრადული გადაგვარება დიდი ტვინის ქერქის ასოციაციური უბნის ნაწილობრივ დეკორტიკაციის შემდეგ	
P. A. Kandelaki, N. I. Totibadze. Retrograde degeneration in the inferior colliculus after partial decortication of the association cortex in cats	
T. A. Гиоргадзе. Поляризационно-оптический анализ межклеточного матрикса дисплазий, доброкачественных и злокачественных опухолей хрящевой структуры	88
თ. გიორგაძე. ძვლების ხრტილოვანი სტრუქტურის მქონე დისპლაზიების კეთილთვისებიანი და ავთვისებიანი სიმსივნეების უკრედშუა მატრიქსის პოლარიზაციულ-ობტკუური ანალიზი	
T. A. Giorgadze. Topo-optical characteristics of intercellular matrix in dysplasia and tumors of cartilaginous structure	
Д. И. Баазов, Г. А. Санадзе. Математическое моделирование распределения метки (изотопа углерода C^{13}) в молекуле изопрена при фотосинтезе	93
დ. ბააზოვი, გ. სანაძე. ფოტოსინთეზის დროს იზოპრენის მოლეკულაში ნიშნის (C^{13} ნაწილობრივი იზოტოპის) განაწილების მათემატიკური მოდელირება	
D. I. Baazov, G. A. Sanadze. The mathematical model of distribution of sign in the isoprene molecule (C^{13} Carbin isotope) during photosynthesis	
A. S. Кобаладзе, М. Л. Абашидзе, Г. И. Рцхиладзе, В. А. Аладашвили. Липидный спектр крови в норме и при патологии внутренних органов	97
ა. კობალაძე, მ. აბაშიძე, გ. რცხილაძე, ვ. ალადაშვილი, სისხლის ლიპიდური სპექტრი ნორმისა და შინაგანი ორგანოების პათოლოგიის დროს	
A. S. Kobaladze, M. L. Abashidze, G. I. Rtskhiladze, V. A. Aladashvili. Blood lipid spectrum in health and pathology of visceral organs	
М. Коничкова-Радохова, Г. А. Дараселия, И. Коничек. Лизис клеток некоторых видов сапрофитных микобактерий	103
მ. კონიჩკოვა-რადოხოვა, გ. დარასელია, ი. კონიჩეკი. ზოგიერთი სახეობის საპროფიტული მიკობაქტერიების უკრედთა ლიზისი	
M. Konichkova-Radokhova, G. I. Daraselia, I. Konichek. The cells lysis of some saprophyte mycobacteria species	
И. И. Георгадзе, Н. Ш. Чигогидзе, И. К. Махатадзе, Л. Х. Каличава. Оценка функциональной деятельности размороженных после низкотемпературного консервирования клеток костного мозга	108
ი. გიორგაძე, ნ. ჩიგოგიძე, ი. მახათაძე, ლ. ყალიჩავა. დაბალ ტემპურატურაზე კონსერვირებული და შემდგომ გამღვლი ძვლის ტვინის უკრედების და ლეიკოციტების ფუნქციონალური აქტიურობის შეფასება	

- I. I. Georgadze, N. Sh. Chigogidze, I. K. Makhataidze, L. Kh. Kaulichava. Estimation of functional activity of unfrozen after low temperature conservation bone marrow cells and leucocytes 113
- Л. О. Киласония. Иммунологические особенности ревматизма
ლ. კილასონია. იმუნური პასუხის თავისებურებანი რევმატიზმის დროს 113
- L. O. Kilasonia. Immunological features of rheumatic fever
- V. V. Tevdoradze, K. Sh. Nadareishvili. Действие X-лучей на электрофизиологические характеристики ранней стадии развития зародыша лягушки 119
- ვ. თევდორაძე, კ. ნადარეიშვილი. X-სხივების მოქმედება ბუყაყის ჩანასახის განვითარების ადრეული სტადიის ელექტროფიზიოლოგიურ მახასიათებლებზე 119
- V. V. Tevdoradze, K. Sh. Nadareishvili. The action of X-rays on the electrophysiological characteristics in early stages of development of frog embryo
- K. Sh. Jinioria. Исследование конформационного состояния met и CNmet-гемоглобинов методом водородного обмена ($^1\text{H}-^2\text{H}$) 125
- კ. ჯინორია. Met-და CNmet-პემოგლობინების კონფორმაციული მდგომარეობის შესწავლა წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდით ($^1\text{H}-^2\text{H}$) 125
- K. Sh. Jinioria. Investigation of met-and CNmet-hemoglobins conformational states using the method of hydrogen exchange ($^1\text{H}-^2\text{H}$)
- D. A. Oniani, V. P. Shibus. Влияние индолсодержащих биорегуляторов на циклозис растительной клетки 131
- დ. ონიანი, ვ. შიბუტ. ინდოლშემცველ ბიორეგულატორთა გავლენა მცენარეული უჯრედის ციკლოზისზე 131
- D. A. Oniani, V. P. Shibus. The influence of indolyl-containing bioregulators on the rate of protoplasmic streaming of the plant cell
- G. R. Getashvili, L. M. Visochek, M. Z. Tsilosani, M. M. Zaalishvili. Влияние низких концентраций актиномицина D на переход спираль—клубок в ДНК 135
- გ. გეტაშვილი, ლ. ვისოჩეკი, მ. წილოსანი, მ. ზაალიშვილი. აქტინომიცინ D-ს დაბალი კონცენტრაციების გავლენა „სპირალი-გორგალის“ გადასვლაზე დნ-ში 135
- G. R. Getashvili, L. M. Visochek, M. Z. Tsilosani, M. M. Zaalishvili. The influence of low concentration of actinomycin D of helix-coil transition in DNA
- D. Z. Chinchaladze, L. A. Kachabava, D. A. Prangishvili. Рестриктаза Tha I из термоацидофильной бактерии Thermoplasma acidophilum: выделение, очистка, свойства 140
- დ. ჩინჩალაძე, ლ. კაჭაბავა, დ. ფრანგიშვილი. თერმოაციდოფილური არქეობაქტერია Thermoplasma acidophilum-ის რესტრიქტაზა Tha I: გამოყოფა, გასუფთავება, თვისებები 140
- D. Z. Chinchaladze, L. A. Kachabava, D. A. Prangishvili. The restrictase Tha I from thermoacidophilic archaeobacterium thermoplasma acidophilum: isolation, purification, properties

УДК 611.1:616.45

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

ИЗМЕНЕНИЯ ФАЗОВОЙ СТРУКТУРЫ СЕРДЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

Т. Н. Дадияни

ЦНИЛ Тбилисского государственного медицинского института

Поступила в редакцию 19.06.1985

Изучали изменения показателей фазовой структуры сердечного сокращения крыс при различных сроках (1, 4 и 24 ч) иммобилизационного стресса.

Показано, что 1-часовая и 24-часовая иммобилизация животных в специальных клетках-пеналах приводит к снижению наполнения желудочков сердца кровью и к выявлению синдрома высокого диастолического давления, причем при 1-часовой иммобилизации указанные изменения были менее выражены, чем при 24-часовой. 4-часовая иммобилизация не вызывает достоверных изменений фазовой структуры сердечного сокращения.

Кроме того, выявлены наиболее информативные фазовые показатели, характеризующие состояние сердечно-сосудистой системы при вышеуказанных сроках иммобилизации в специальных клетках-пеналах.

Проблема эмоционального стресса в последние годы приобрела все большую актуальность в биологии и медицине. Эмоциональное перенапряжение современного человека обусловлено все нарастающим темпом жизни, динамией, информационными перегрузками и дефицитом времени, необходимого для анализа полученной информации. Оно стало одним из серьезных факторов нарушений функций сердечно-сосудистой системы, приводящих к ряду таких заболеваний, как гипертоническая болезнь сердца и другие.

Кратковременный фиксационный стресс у крыс рассматривается как одна из экспериментальных моделей эмоционального возбуждения.

Анализ литературных данных показал, что сердечные компоненты являются наиболее точными и чувствительными показателями эмоциональной реакции. Однако анализ функции

сердечно-сосудистой системы при стрессе основывается на частоте сердечных сокращений и показателях электрокардиограммы, в то время как при длительном действии стресс-факторов в организме происходят сложные биохимические сдвиги, которые не могут не влиять на сократительную способность сердца. Это обстоятельство обуславливает необходимость более глубокого изучения состояния миокарда на различных этапах развития стрессового состояния.

В связи с тем, что сократительная функция миокарда имеет важное значение для диагностики и лечения стрессовых и постстрессовых реакций, разработка этого вопроса является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования было изучение изменений показателей фазовой структуры сердечного сокращения крыс при различных сроках (1, 4 и 24 ч) иммобилизационного стресса.

ფაფ. მისი კ. ბაჩქალიძე
1985 წლის 6-12-2



Эксперименты проводились на 48 белых половозрелых крысах-самцах, весом 150—170 г.

Иммобилизационный стресс осуществляли путем помещения животных в индивидуальные цилиндрические клетки-пеналы, ограничивающие движение животных.

Проведены 3 серии экспериментов: I серия — 1-часовая иммобилизация; II серия — 4-часовая иммобилизация; III серия — 24-часовая иммобилизация.

Фазовый анализ структуры сердечного сокращения проводили методом поликардиографии по схеме, предложенной И. Ф. Минеевым [8]. Регистрацию поликардиограммы осуществляли на аппарате «Мингограф-34» при скорости движения бумаги 250 мм/с. Одновременно регистрировали: электрокардиограмму в II стандартном отведении, фонокардиограмму в области верхушечного толчка сердца и тетраполярную дифференциальную грудную реограмму.

Обработку поликардиограммы проводили с использованием полуавтоматического устройства для определения и ввода координат точек кривой в ЭВМ [2].

Анализировали следующие показатели фазовой структуры сердечного сокращения (мс): сердечный цикл — С; механическую систолу — См; общую систолу — Со; электрическую систолу — Сэ; период полного покоя сердца — ТР интервал на ЭКГ; период напряжения — Т; фазу асинхронного сокращения — АС; фазу изометрического сокращения — ИС; период изгнания — Е; фазу максимального изгнания — МЕ; фазу редуцированного изгнания — РЕ; общую диастолу — До, а также относительные показатели: внутрисистолический показатель — ВСП (%), индекс напряжения миокарда — ИНМ (%), механический коэффициент Блюмбергера — МКБ, отношение фазы максимального изгнания к фазе изометрического сокращения — МЕ/ИС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученного материала показал, что в результате 1-часовой иммобилизации животных в клетках-пеналах, по сравнению с исходными данными, происходило: удлинение С ($118 \pm 1,3$ и $129 \pm 3,0$ мс; $p < 0,001$); Т ($33 \pm 0,8$ и $36 \pm 1,2$ мс; $p < 0,05$) за счет ИС ($17 \pm 0,8$ и $20 \pm 0,9$ мс; $p < 0,001$); См ($53 \pm 0,9$ и $61 \pm 1,8$ мс; $p < 0,001$); Со ($70 \pm 0,7$ и $77 \pm 2,1$ мс; $p < 0,001$); Тр ($14 \pm 0,7$ и $19 \pm 1,0$ мс; $p < 0,001$); увеличение ИНМ ($46 \pm 1,3$ и $50 \pm 1,0$ %; $p < 0,05$), уменьшение МКБ ($1,2 \pm 0,1$ и $0,95 \pm 0,07$; $p < 0,001$) и МЕ/ИС ($1,2 \pm 0,1$ и $0,95 \pm 0,07$, $p < 0,001$), а также наблюдалась тенденция к удлинению До ($50 \pm 1,3$ и $52 \pm 1,9$ мс; $p > 0,2$) и уменьшению ВСП ($68 \pm 1,7$ и $66 \pm 1,5$ мс; $p > 0,2$). Е достоверно не менялось ($37 \pm 1,8$ и $39 \pm 1,5$ мс; $p > 0,2$).

4-часовая иммобилизация не вызвала достоверных изменений показателей фазовой структуры сердечного сокращения.

Анализ результатов реакции сердечно-сосудистой системы крыс на суточную иммобилизацию, по сравнению с исходными данными, показал: удли-

нение С ($117 \pm 1,5$ и $127 \pm 2,0$ мс; $p < 0,001$); ИС ($15 \pm 0,8$ и $20 \pm 1,2$ мс; $p < 0,001$), См ($55 \pm 1,9$ и $61 \pm 1,5$ мс; $p < 0,02$), Со ($69 \pm 0,9$ и $74 \pm 1,8$ мс; $p < 0,02$); До ($44 \pm 1,4$ и $50 \pm 1,1$ мс; $p < 0,01$), увеличение ТР ($17 \pm 0,3$ и $19 \pm 0,8$ мс; $p < 0,05$), ИНМ ($43 \pm 1,3$ и $47 \pm 1,2$ %, $p < 0,05$); уменьшение ВСП ($73 \pm 1,6$ и $65 \pm 1,8$ %, $p < 0,001$), МКБ ($1,28 \pm 0,06$ и $1,12 \pm 0,06$, $p < 0,05$) и МЕ/ИС ($1,18 \pm 0,02$ и $0,92 \pm 0,06$; $p < 0,001$). Е достоверно не менялось ($37 \pm 2,7$ и 36 ± 3 мс; $p > 0,5$).

Увеличение длительности сердечного цикла в результате часовой и суточной иммобилизации животных, возможно, обусловлено действием норадреналина, который, как известно, выделяется в кровь при фиксации животных и вызывает брадикардию с блуждающего нерва [11].

Известно, что более низкая частота сердечного сокращения является важнейшим приспособительным механизмом для сердечной мышцы.

Как было показано, при часовой иммобилизации наблюдается тенденция к увеличению длительности



Повышение общего периферического сопротивления часто связано с избыточным выделением катехоламинов.

По данным некоторых авторов [5, 7] часовая иммобилизация животных рассматривается как стадия тревоги общего адаптационного синдрома [9], которая характеризуется увеличением содержания адреналина в плазме крови, миокарде, печени, диафрагме, приводящей мышце бедра и т. д., что в свою очередь способствует увеличению общего периферического сопротивления и выявлению синдрома высокого диастолического давления.

Тот факт, что в результате 4-часовой иммобилизации животных не наблюдаются достоверные изменения со стороны фазовой структуры сердечного сокращения, по-видимому, объясняется тем, что организм начинает адаптироваться к продолжающемуся воздействию стресса и резистентность его повышается.

По литературным данным [7] 4-часовая иммобилизация рассматривается как стадия резистентности общего адаптационного синдрома, которая сопровождается восстановлением массы надпочечников, лимфоидных органов, содержания липидов в коре. В этот период сопротивляемость нарастает, устойчивость организма повышается, благодаря гипертрофии коры надпочечников, повышенному выделению АКТГ, кортикостероидов, инсулина [5].

Согласно данным тех же авторов в результате иммобилизации, продолжающейся 24 ч, стресс-реакция переходит в стадию истощения.

Так как в нашем случае изменения

при 24-часовой и 1-часовой иммобилизации были однонаправленными, выявлялся синдром высокого диастолического давления, мы полагаем, что 24-часовая иммобилизация животных не приводит к истощению адаптивных возможностей организма.

Таким образом, в результате 1-часовой и 24-часовой иммобилизации животных происходило снижение наполнения желудочков сердца кровью и выявлялся синдром высокого диастолического давления, причем при 1-часовой иммобилизации указанные изменения были менее выражены, чем при 24-часовой иммобилизации, в то время как 4-часовая иммобилизация не приводила к достоверным изменениям фазовой структуры сердечного сокращения.

Выявленная зависимость изменений фазовой структуры сердечного сокращения от сроков иммобилизации животных может быть связана с закономерностями общего адаптационного синдрома.

Кроме того, можно заключить, что из всех изучаемых параметров фазовой структуры сердечного сокращения наиболее информативными для характеристики состояния сердечно-сосудистой системы при иммобилизационном стрессе крыс в специальных клетках-пеналах являлись: фаза изометрического сокращения, период изгнания, механическая систола, внутрисистолический показатель, индекс напряжения миокарда, механический коэффициент Бломберга, относительные фазы максимального изгнания к фазе изометрического сокращения и период полного покоя сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ведрова Н. И. О сократительной функции миокарда при декомпенсированных митральных пороках сердца и ее изменениях под влиянием сердечных гликозидов, Автореф. канд., дисс., М., 1966.
2. Думбадзе Г. Г., Минеев И. Ф., Хачатуров Л. С., Кевлишвили О. Ш. Алашавили Г. Г. Мат. У Респ. науч. конф. физиологов вузов Грузии, Тбилиси, 1981, 145—150.
3. Карпман В. Л. Фазовый анализ сердечной деятельности, М., "Медицина", 1965.
4. Кевлишвили О. Ш. Мат. научн. конф. молодых медиков Грузии, Бакуриани, 1981, 23.
5. Ковалев О. А., Коровин К. Ф., Непочатов О. Н., Парфенова М. А., Радченко Е. Р., Шереметевская С. К. Пат. физиол. и эксп. тер., 3, 77—82, 1985.
6. Кубышкин В. Ф. Кардио-динамические фазовые синдромы, Киев, Здоров'я, 1982.
7. Маликов Л. А., Арефолов В. А. Бюлл. экслер. биол. и мед., 10, 63, 1982.



8. Минеев И. Ф. Сообщение АН ГССР, 66, 1, 165—168, 1972.
 9. Селье Г. Очерки об общем адаптационном синдроме, М., Медгиз, 1960.

10. Фельдман С. Б. Ранняя сердечной недостаточности, М., Медицина, 1976.
 11. Физиология эндокринной системы (Отв. ред. В. Г. Баранов), Л., «Наука», 1979.

გულის შეკუმშვის ფაზური სტრუქტურის ცვლილებები სხვადასხვა ხანგრძლივობის იმობილიზაციური სტრესის დროს

თ. დადიანი

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტის ცენტრალური სამეცნიერო-კვლევითი ლაბორატორია

რ ე ზ ი უ მ ე

შესწავლილ იქნა გულის შეკუმშვის ფაზური სტრუქტურის მაჩვენებლების ცვლილება სხვადასხვა ხანგრძლივობის- 1, 4 და 24 სთ იმობილიზაციური სტრესის დროს 48 თეთრ ვირთაგვავზე. მიღებული შედეგები მოწმობენ, რომ სპეციალურ გალია-პენალებში ცხოველთა 1-საათიანი და 24-საათიანი იმობილიზაციის დროს ხდებოდა გულის პარკუჭების სისხლით ავსების შემცირება და მაღალი დიასტოლური წნევის ფაზური სინდრომის გამოვლენა; ამასთან, 1-საათიანი იმო-

ბილიზაციის დროს აღნიშნული ცვლილებები უფრო ნაკლებად ვლინდებოდა, ვიდრე 24-საათიანი იმობილიზაციის დროს. 4-საათიანი იმობილიზაცია არ იწვევდა გულის შეკუმშვის ფაზური სტრუქტურის მაჩვენებლების სარწმუნო ცვლილებებს. გარდა ამისა, გამოვლენილ იქნა გულის შეკუმშვის ფაზური სტრუქტურის ის ინფორმაციული მაჩვენებლები, რომლებიც უფრო სრულად ახასიათებდნენ გულის-სხლძარღვთა სისტემის მდგომარეობას იმობილიზაციური სტრესის დროს.

THE CHANGES IN PHASE STRUCTURE OF CARDIAL CONTRACTION DURING THE DIFFERENT PERIODS OF IMMOBILIZATION STRESS

T. N. DADIANI

Tbilisi State Medical Institute, Central Scientific Research Laboratory

S u m m a r y

During the experiments with 48 white rats the changes in the indices of exponents in phase structure of cardiac contraction were studied at different periods of immobilization stress: 1-hr, 4-hr and 24-hr.

The studies showed that 1-hr and 24-hr immobilization of animals in special cage-penals led to a reduction of the filling of the cardiac ventricles with blood, and also to the manifestation of

high diastolic pressure syndrome, while at 1-hr immobilization the changes in indices were less expressed, than at 24-hr, 4-hr immobilization resulted in no significant changes in the phase structure of cardiac contractions.

Besides, the most informative indices characterizing the state of cardio-circulatory system are revealed in the above mentioned periods of immobilization in cage-penals.

УДК 611.815

ГИСТОЛОГИЯ

РЕТРОГРАДНОЕ ПЕРЕРОЖДЕНИЕ КЛЕТОК ЗАДНИХ БУГРОВ ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ДЕКОРТИКАЦИИ АССОЦИАТИВНОЙ ОБЛАСТИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КОШКИ

Р. А. Канделаки, Н. К. Тотибадзе

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

Поступила в редакцию 08.10.1985

После частичного удаления ассоциативной области коры больших полушарий кошки (передняя часть поля 7 и задняя часть поля 5) в окрашенных по Нисслю препаратах во всех ядрах задних бугров четверохолмия (ЗБЧ) определялись ретроградно перерожденные клетки. Количественные данные статистически обрабатывали по Т-критерию Стьюдента ($P < 0,001$).

Процентное соотношение дегенирированных клеток к общему количеству в центральном ядре составляло 27,5%, в периферическом — 20,2%, в наружном — 29%. «Клетки тени» от общего количества клеток составляли: в центральном ядре ЗБЧ — 1,06%, периферическом — 2,3%, в наружном — 3,0%. «Клетки тени» можно отнести к той группе клеток ядер ЗБЧ, аксоны или основные коллатерали которых были повреждены при удалении ассоциативной области коры, остальную же часть ретроградно перерожденных клеток ЗБЧ — к той группе, у которых повреждены лишь коллатерали аксонов. Соотношение количества «клеток теней» и клеток, находящихся в разной стадии ретроградной дегенерации, дает основание предположить, что в удаленную часть ассоциативной коры от клеток ядер ЗБЧ доходят в основном коллатерали аксонов.

В предыдущих работах [1, 2, 5] методом антероградной дегенерации Наута-Гигаке нами были исследованы прямые проекции отдельных ядер ЗБЧ на кору больших полушарий. Результаты подтверждали данные электрофизиологического исследования Ф. Н. Серкова с соавторами [3]. Нами было показано, что все три ядра ЗБЧ — центральное, периферическое и наружное моносинаптически проецируются, кроме слуховой, и в другие области коры, в частности на ассоциативную (передняя часть поля 7 и задняя часть поля 5). Для уточнения вида и локализации клеток ядер ЗБЧ, имеющих прямые связи с корой больших полушарий, в данной работе использовали метод ретроградной дегенерации, так как инъекция пероксидазы хрена (ПХ) в

ассоциативную область коры в наших опытах не выявила меченых нейронов в ядрах ЗБЧ. Такие же отрицательные результаты были получены Ф. Н. Серковым и Е. Д. Генисом [4] при введении ПХ в первичную слуховую кору. Авторы эти отрицательные данные объясняют тем, что коллатерали аксонов восходящих специфических афферентных волокон не транспортируют ретроградно ПХ.

Такое же мнение высказывают по поводу ретроградного транспорта ПХ коллатералами аксонов Джоунс [6] и Вайнер [15]. Хотя маркировочная техника дает возможность более детально дифференцировать релейные клетки в различных областях, вместе с тем нужно учесть, что не все клетки, проецируемые своими аксонами в область инъекции ПХ, транспорти-

руют это вещество [8, 9]. Известны также случаи, когда метод ретроградного транспорта ПХ не выявляет даже классические связи подкорки с корой [10].

Примененный нами метод ретроградной дегенерации нервных клеток, как известно, основан на повреждении как основных ветвей аксонов, так и их коллатералей. После их травмы в один и тот же послеоперационный срок в телах нейронов выявляются

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

У четырех кошек на одной стороне удаляли кору средней части супрасильвиевой извилины от уровня А5 до А11 по координатам стереотаксического атласа [12]. Операции проводили под нембуталовым наркозом, в асептических условиях. Послеоперационный период длился 60 дней, после чего животных умерщвляли под эфирным наркозом и мозг фиксировали в 10%-ном растворе формалина. На замораживающем микротоме брали каждый пятый срез (25 мк) с ипсилатерального ЗБЧ от уровня АО до РЗ. Так как во всех трех случаях удалялся почти один и тот же участок коры и возможная разница в площади повреждения практически не влияла на картину ретроградного перерождения клеток ядер ЗБЧ, то описывается общая картина изменений для всех трех случаев. После обработки в жидкости Карнуа срезы красили методом Нис-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование опытного материала показало, что во всех ядрах ЗБЧ имеются перерожденные клетки. В центральном ядре ЗБЧ отмечаются в основном мультиполярные (большие и средние), мелкие звездчатые и веретенообразные клетки [11]. По концентрации больших клеток центральное ядро разделяется на две части [13], дорсо-медиальную и вентро-латеральную. В основном во всех участках центрального ядра ЗБЧ перерождены мелкие и средние клетки и единично крупные. В этих клетках отмечается хроматолит, смещение ядра на периферию клетки, граница между ядром и цитоплазмой стерта, края клеток неровны, вокруг таких клеток расположены группы глиаль-

дегенеративные изменения разной степени вплоть до полной их деструкции — «клетки тени». По сравнению с использованным нами ранее методом антероградной дегенерации [1, 2, 5], метод ретроградной дегенерации исключает наличие возможных проекций от трека электрода, что обуславливает абсолютную достоверность полученных экспериментальных данных.

Для количественной оценки клеточного состава (нормальные, дегенерированные и «клетки тени») разных ядер ЗБЧ был использован окуляр с сеткой, общая площадь которой равнялась 1 см², содержащей 16 квадратов. При увеличении 16×40 сетка охватывает площадь препарата 0,04 мм².

Для каждого ядра ЗБЧ просматривали 4 среза на трех уровнях (оральные, средние и каудальные) и в каждом препарате одного ядра просматривали по 4 поля зрения. Были подсчитаны средние арифметические величины общего количества клеток, дегенерированных и «клеток теней» в отдельных ядрах ЗБЧ и ошибки среднего. Высчитывался процент дегенерированных клеток и «клеток теней» от общего количества клеток ядер. Достоверность результатов оценивалась с помощью Т-критерия Стьюдента.

В мелких клетках наблюдаются также вакуолизация цитоплазмы, «клетки тени» в центральном ядре ЗБЧ встречаются в малом количестве (рис. 1).

Перицентральное ядро ЗБЧ у кошки, как известно [14], состоит из тонкой 0,7 мм полосы густо упакованных клеток, которые тянутся над дорсальной и задней поверхностью ЗБЧ. В этом ядре отмечаются шпиковые (большие и маленькие) и нешпиковые клетки (большие, мультиполярные и веретенообразные). В перицентральном ядре ЗБЧ клетки полностью деструктивированы, границы цитоплазмы изъедены, ядра перемещены к периферии (рис. 2). Такая же картина наблюдается в наружном ядре ЗБЧ,

которое состоит из тонкого слоя клеток толщиной 1—1,5 мм [7]. В наружном ядре ЗБЧ перерождение охватывает большую часть всех клеток. В перерожденных клетках ядро оказывается отодвинутым к периферии, хроматофильное вещество подвергается хроматолизу, граница между ядром и цитоплазмой стерта; цитоплазма аморфная, зернистая (рис. 3), количество настоящих «клеток теней» и в этом ядре ограничено.

Для получения точной картины соотношения перерожденных клеток к общему их количеству в отдельных ядрах ЗБЧ, т. е. клеток, дающих прямые проекции в удаленную область коры, считали их общее количество, количество дегенерированных

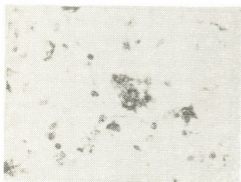


Рис. 1. Дегенерированные клетки в центральном ядре ЗБЧ. Окраска по Ниссля. $\times 640$

и «клеток теней». После статистической обработки материала с оценкой достоверности по Т-критерию Стьюдента ($P < 0,001$) оказалось, что в периферическом ядре ЗБЧ средняя арифметическая величина из общего числа клеток составляет $M_{\text{общее}} = 47 \pm 4,8$; среднее количество дегенерированных клеток $M_{\text{деген}} = 9,5 \pm 0,62$; среднее количество «клеток теней» $M_{\text{тени}} = 1,06 \pm 0,01$ (рис. 4А). Процентное соотношение дегенерированных клеток к общему их количеству составляет 20,2%, а «клеток теней» — 2,3%.

В центральном ядре ЗБЧ среднее количество из общего числа клеток

$M_{\text{общее}} = 31,13 \pm 2,45$; среднее количество дегенерированных клеток $M_{\text{деген}} = 8,6 \pm 0,6$; среднее количество «клеток теней» $M_{\text{тени}} = 0,9 \pm 0,3$ (рис. 4Б). Процентное соотношение дегенерированных клеток к общему их числу составляет 27,5%, а «клеток теней» — 1,06%.

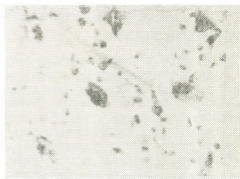


Рис. 2. Дегенерированные клетки в периферическом ядре ЗБЧ. Окраска по Ниссля. $\times 640$

В наружном ядре ЗБЧ среднее количество из общего числа клеток $M_{\text{общее}} = 40,1 \pm 3,9$; среднее количество дегенерированных клеток $M_{\text{деген}} = 11,44 \pm 0,8$ и среднее количество «клеток теней» $M_{\text{тени}} = 1,5 \pm 0,2$ (рис. 4В).

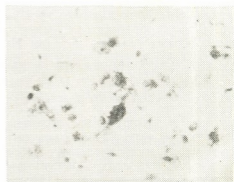


Рис. 3. Дегенерированные клетки в наружном ядре ЗБЧ. Окраска по Ниссля. $\times 640$

В этом случае процентное соотношение дегенерированных клеток к общему их числу составляет 29%, а «клеток теней» — 3,0%.

При сравнении полученных по всем трем ядрам ЗБЧ результатов стано-

вится очевидным, что более весомую проекцию на среднюю часть супрасильвиевой извилины (передняя часть

поля 7 и задняя часть поля 5) коры больших полушарий головного мозга кошки, имеет наружное ядро ЗБЧ, что соответствует нашим результатам, полученным при помощи метода антероградной дегенерации [5].

Разная степень дегенерации клеток ядер ЗБЧ при данном постоперационном периоде указывает на разную степень травмы аксонов клеток, проецирующихся на данный участок коры. В частности, клетки, у которых, видимо, были повреждены лишь коллатерали аксонов, показывают разную степень дегенерации клеток, тогда как «клетки тени» можно отнести к тем, у которых была удалена основная ветвь аксона. Так как во всех ядрах процентное соотношение дегенерированных клеток к общему количеству в несколько раз превышает такое же соотношение «клеток теней» (20,2%, 29% — дегенерированные клетки и 1,06%, 3,0% — «клетки теней»), то можно заключить, что от ядер ЗБЧ прямые связи до ассоциативной коры (поля 7,5) больших полушарий головного мозга кошки обусловлены в основном коллатералами аксонов.

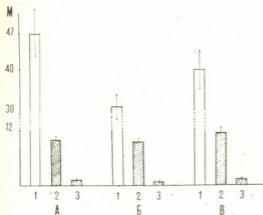


Рис. 4. Результаты статистической обработки соотношения дегенерированных клеток и «клеток теней» к их общему количеству в ядрах ЗБЧ: А — перичесентральное ядро ЗБЧ; Б — центральное ядро ЗБЧ; В — наружное ядро ЗБЧ; 1 — общее количество клеток, 2 — количество дегенерированных клеток, 3 — количество «клеток теней»

ЛИТЕРАТУРА

1. Канделаки Р. А. Изв. АН ГССР, сер. биол., 10, 2, 112—116, 1984.
2. Канделаки Р. А., Тотибадзе Н. К. Изв. АН ГССР, сер. биол., 11, 3, 177—180, 1985.
3. Серков Ф. Н., Яновский Е. Ш., Тальнов А. Н. Нейрофизиология, 11, 6, 515—523, 1979.
4. Серков Ф. Н., Генис Е. Д. В кн.: Аксонный транспорт веществ в системах мозга, 1981, 56—61.
5. Тотибадзе Н. К., Канделаки Р. А. Сообщения АН ГССР, 97, 2, 457—460, 1980.
6. Jones E. G. Brain Res., 85, 2, 249—253, 1975.
7. Knudsen E. I. J. Comp. Neurol., 218, 2, 174—186, 1983.
8. Lin. H. Brain Res., 131, 1, 167—173, 1977.
9. Maciewicz R. J. Brain Res., 84, 2, 308—312, 1975.
10. Nauta H. J. W. Brain Res., 67, 2, 219—238, 1974.
11. Ramon J., Cajal S. Histologie du systeme nerveux, De l'homme des Vertebres. Instituto Ramon Cajal., Madrid., 2, 1955, 153—173.
12. Reinoso-Suarez F. Topographischer Hirnatlas des Katze für experimental physiologische Untersuchungen, Herausgegeben von E. Mazek, A. G. Darmstadt, 1961.
13. Rockel A. J., Jones E. G. J. Comp. Neurol., 147, 1, 11—59, 1973.
14. Rockel A. J., Jones E. G. J. Comp. Neurol., 149, 3, 301—321, 1973.
15. Winer J. A. Biobehav. Rev., 1, 44—54, 1977.

პატის ტვინის ოთხგორაკის უკანა გოცვრების უჯრედთა რეტროგრადული გადაგვარება დიდი ტვინის ძირძის ასოციაციური უბნის ნაწილობრივი დეკორტიკაციის შემდეგ



რ. კანდელაკი, ნ. თოთიბაძე

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

რ ე ზ ი მ ე

თხემის ასოციაციური ქერქის (მე-7 ველის წინა და მე-5 ველის უკანა მიდამოები) მოცილების შემდეგ, ნისლის მეტოღით შეღებილ პრეპარატებში კატის ტვინის ოთხგორაკის უკანა ბორცვების ბირთვებში შესწავლილ იქნა ნეირონებს რეტროგრადული გადაგვარება. რაოდენობრივი მონაცემები დამუშავდა სტატისტიკურად სტიუდენტის T-კრიტერიუმის მიხედვით სარწმუნოობით $P < -0,001$; დეგენერირებული უჯრედების პროცენტული შეფარდება უჯრედთა საერთო რაოდენობასთან ცენტრალურ ბირთვში აღმოჩნდა 27,5%, პერიცენტრალურში — 20,2%, ხოლო გარეთა ბირთვში — 29%. „უჯრედი-ჩრდილები“ ცენტრალურ ბირთვში შეადგენენ საერთო რაოდენობის 1,06 %-ს, პერიცენტრალურში — 2,3%-ს, ხოლო გარეთა ბირთვში 3, 0 %-ს.

„უჯრედი-ჩრდილები“ უნდა მიეკუთვნოთ უკანა ოთხგორაკის ბორცვთა ბირთვების უჯრედთა იმ ჯგუფს, რომელთა აქსონები ან მათი მთავარი კოლატერალები ზიანდებიან ქერქის სათანადო უბნის მოცილების შემდეგ. რეტროგრადულად გადაგვარებული უჯრედების ნაწილი შეიძლება მიეკუთვნოს უჯრედთა იმ ჯგუფს, რომელთაც მხოლოდ აქსონთა კოლატერალები უზიანდებათ. თხემის ასოციაციური უბნის გარკვეული მიდამოების ამოკვეთით ოთხგორაკის უკანა ბორცვთა ბირთვების სხვადასხვა ხარისხით დეგენერირებული უჯრედების თანაფარდობა უფლებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ქერქის ამ ასოციაციურ მიდამომდე უმთავრესად უკანა ოთხგორაკის უჯრედების აქსონთა კოლატერალები მიემართებიან.

RETROGRADE DEGENERATION IN THE INFERIOR COLLICULUS AFTER PARTIAL DECORTICATION OF THE ASSOCIATION CORTEX IN CATS

R. A. KANDELAKI, N. I. TOTIBADZE

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

S u m m a r y

After partial ablation of the association cortex (anterior part of area 7 and posterior part of area 5) retrograde degeneration of cells in all the nuclei of inferior colliculus (IC) was studied in the Nissl stained preparations and quantitative data were statistically treated by Student's T-test. Probability of difference was found to be $P < -0.001$. Per-

centage ratio of degenerated cells to total number was 27.5% in the central nucleus, 20.2% in the pericentral nucleus and 29% in the external nucleus of IC. Ghost cells were found to be 1.06% of total number in the central nucleus of IC 2.3% in the pericentral nucleus and, 3.0% in the external nucleus. The ghost cells may be attributed to the type of

cells in the nuclei of IC axons or axonal collaterals of which had been damaged by ablation of the given area of the cortex, while the remaining part of retrograde degenerated cells belong to the type of cells in which only the axonal collaterals had been damaged. Ratio of the number

of ghost cells and the cells in various stages of retrograde degeneration allows to suggest that it is the axonal collaterals of the cells in the nuclei of IC that reach the ablated part of the association cortex.

УДК 616—007.16—006:611.71

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ

ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ОПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДИСПЛАЗИЙ, ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ КОСТЕЙ ХРЯЩЕВОЙ СТРУКТУРЫ

Т. А. Гиоргадзе

Тбилисский государственный медицинский институт

Поступила в редакцию 11.07.1985

Поляризационно-оптический анализ основных компонентов межклеточного вещества (коллагеновых волокон и гликозаминогликанов) в дисплазиях, доброкачественных и злокачественных опухолях костей хрящевой структуры показал, что в указанной группе заболеваний возрастанию степени опухолевой регрессии соответствует снижение степени ориентационной упорядоченности как коллагеновых структур, так и гликозаминогликанов.

Показатели структурной рефракции компонентов межклеточного матрикса могут быть использованы для дифференциальной диагностики этих заболеваний.

Вопросы патоморфологической диагностики дисплазий и опухолей костей хрящевой структуры остаются актуальными в связи не только с недостаточной разработкой этих вопросов, но также с тем, что на протяжении последних лет выделяют все новые и новые варианты опухолевых форм [1, 2]. Это не дает возможности не только уточнить структурную характеристику данной группы новообразований, но и более четко образовать клиническую картину, отношения к терапевтическим мероприятиям и судить о прогнозе заболевания. Сложившееся положение диктует необходимость расширить методические подходы, использовать методы, позволяющие более четко характеризовать наиболее специфические стороны новообразований хрящевой структуры. Для дисплазий и новообразований мезодермального происхождения таковыми являются поляризационно-оптические методы, получившие широкое распространение для характеристики процессов развития и роста [4, 5] и пока недостаточно используемые

при диагностике дисплазий и опухолей.

Среди поляризационно-оптических показателей опорных тканей наиболее информативными являются показатели состояния коллагеновых волокон и гликозаминогликанов, как отражающие основные компоненты межклеточного вещества и биосинтетические процессы. В то же время данных в литературе о состоянии и взаимоотношении коллагеновых волокон и гликозаминогликанов при дисплазиях и опухолях костей хрящевой структуры мы не обнаружили.

Цель работы — изучение особенностей структурной организации коллагеновых волокон и гликозаминогликанов по данным поляризационно-оптического анализа при дисплазиях и опухолях костей хрящевой структуры.

Гистологическим и поляризационно-оптическим исследованиям был подвергнут материал, полученный после операций (резекций и ампутаций) у больных с хондродисплазиями (8 случаев), доброкачественными опухолями (9 случаев) и хондросаркомами (6 случаев).

Взятые для исследования 5—6 ку­сочков из одного новообразования подвергались обработке по классиче­ским гистологическим прописям (фик­сация в формалине, обезживание в спиртах, заключение в целлоидин, ок­раска срезов гематоксилин-эозином и по ван-Гизону) и по методикам по­ляризационно-оптических исследова­ний, в общем виде представленных в работах Г. Романи [5] и Л. Модиса [4]. Для изучения состояния коллагено­вых волокон была использована ок­раска пикросириусом по В. Констан­тину, Р. Моври [3], для изучения со­стояния гликозаминогликанов — ре­акция с толуидиновым синим при pH 1,5 и 3,5 по Г. Романи [5]. Степень рефракции (Г_м) измеряли в поляри­зационном микроскопе «Ро1му-А» с помощью компенсатора λ/4 по Сенар­моуту. Окрашенные препараты были исследованы в монохроматическом свете (красный светофильтр, λ=620 нм). Полученные цифровые данные были обработаны методом математиче­ской статистики по Стьюденту-Фи­шеру с уровнем достоверности 95%.



Рис. 1. Неравномерное распределение террито­риальных и интертерриториальных полей коллагеновых волокон в хондроме. Поляризованный свет. Реакция с пикросириусом. Ро1му-А. ×100

Визуальный анализ микропрепара­тов показал, что дисплазия характе­ризовалась относительно однородной структурой с четко распределенными рефлексами в территориальном мат­рикс и узкими зонами интертеррито­риального матрикса. Территориальный матрикс характеризовался выраженной взаимоперпендикулярной ориен­тацией пучков коллагеновых волокон,

местами с формированием четких ар­кадных структур. Пучки коллагеновых волокон образуют равномерные по толщине и длине структуры с равно­мерным переходом пучков, благодаря чему они образуют массивные одно­родные поля. Реакция с толуидиновым синим обнаружила тесную связь гли­козаминогликанов с коллагеном и равномерное распределение конъюга­тов, часто ориентированных перпенди­кулярно к коллагену.

Доброкачественные опухоли, неза­висимо от форм — экхондрома, энхон­дрома, хондробластома — характеризо­вались значительным уменьшением од­нородности структур в территориаль­ном матриксе. Пучки коллагеновых волокон имели значительно меньшую упорядоченность организации. Кроме того, они характеризовались неравно­мерной толщиной и длиной. Расшири­лись зоны интертерриториального мат­рикса и во многих местах (частично в виде участков) четко не определялись места перехода интертерриториальных зон в территориальные (рис. 1). Пар­аллельно усилению неупорядоченно-

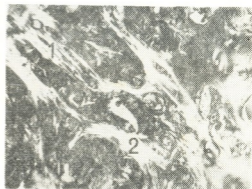


Рис. 2. Разволокненные пучки (1) и поля (2) коллагеновых волокон в хондросаркеме. Поляризованный свет. Реакция с пикросириусом. Ро1му-А. ×100

сти в ориентации коллагенового ком­понента обнаруживалось усиление не­равномерности в распределении глико­заминогликанов и их связи с коллагено­выми структурами. Местами опреде­лялись поля из беспорядочно ориенти­рованных конгломератов гликозамино­гликанов преимущественно нессульфа­тированной природы.

Злокачественные опухоли характеризовались выраженной неупорядоченностью как коллагеновых структур, так и гликозаминогликанов. Пучки коллагеновых волокон, расположенные сами по себе неупорядоченно, характеризовались неоднородностью, разволокненностью, расщеплением, неодинаковой толщиной и длиной (рис. 2). Хотя в отдельных участках обнаруживался преимущественный характер структуры коллагеновых волокон в виде мелкопетлистого или крупнопетлистого «войлока», ориентированной сети или коротких и длинных пучков, однако чередование этих участков создавало в целом выраженную мозаичность структуры (рис. 3). От-

ветствуют понятию недифференцированных цитобластом по М. Филатову.

Структурная рефракция коллагена в дисплазиях, доброкачественных и злокачественных опухолях костей хрящевой структуры составила соответственно: $12 \pm 0,11$; $7,5 \pm 0,12$; $2,2 \pm 0,12$ Гим. Показатель структурной рефракции гликозаминогликанов составил соответственно $16 \pm 0,2$; $8,3 \pm 0,5$; $3,2 \pm 0,16$ Г_{нм}.

Из представленных данных видно, что возрастанию степени опухолевой регрессии соответствует уменьше-

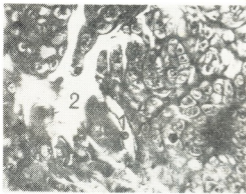


Рис. 3. Неравномерные пучки (1) и поля (2) коллагеновых волокон в хондросаркоме. Поляризованный свет. Реакция с пикросириусом. Polmu - А. х 100



Рис. 4. Неравномерные поля (1) и «озера» гликозаминогликанов в хондросаркоме. Поляризованный свет. Реакция с толuidиновым синим (pH-1,5). Polmu - А. х 100

четливо выявлялась неравномерность распределения гликозаминогликанов, из которых формировались поля и «озера», причем каждое из таких атипичных образований характеризовалось своим спектром форм гликозаминогликанов (рис. 4). Нарушение отношений между беспорядочно расположенными коллагеновыми структурами и гликозаминогликанами составляет один из существенных признаков злокачественных опухолей.

По степени выраженности нарушения типичной организации коллагеновых структур, гликозаминогликанов и их соотношений можно выделить опухоли с малой, средней и большой степенью озлокачествления, которые в последних случаях по степени клеточного полиморфизма и атипизма соот-

ние упорядоченности в организации межклеточного матрикса, что позволяет использовать эти показатели при дифференциальной диагностике.

В целом проведенное исследование дало возможность прийти к заключению, что поляризационно-оптические методы в сочетании с качественной и количественной характеристикой структур должны являться методом выбора при анализе дисплазий и опухолей костей. Дальнейшее расширение методических подходов в характеристике других компонентов межклеточного вещества откроет новые перспективы этих методов.



1. Литвинов Л. В., Петровичев Н. Н., Соловьев Ю. Н. *Арх. пат.*, 4, 27—31, 1984.
2. Петровичев Н. Н., Еремина Л. А., Хасумов Н. В. *Вопр. онкологии*, 30, 4, 14—20, 1984.
3. Constantine V. S., Mowbray J. *Jvest. Dermatol.*, 50, 419—423, 1968.
4. Modis L. *Acta biol. Acad. Sci. hung.*, 29, 197—226, 1978.
5. Romhanyi G. *Acta Histochem.*, 15, 210—233, 1963.

ძვლების ხრტილოვანი სტრუქტურის მკონე დისპლაზიების, კეთილთვისებიანი და ავთვისებიანი სიმსივნეების უჯრედშუა მატრიქსის კოლარინაციულ-ოპტიკური ანალიზი

თ. გიორგაძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

ძვლების ხრტილოვანი სტრუქტურის მკონე დისპლაზიებში, კეთილთვისებიან და ავთვისებიან სიმსივნეებში უჯრედშუა ნივთიერების პოლარიზაციულ-ოპტიკურ-მა შესწავლამ დაგვანახა, რომ სიმსივნური რეგრესიის ზრდისას ხდება უჯრედშუა მატრიქსის ორგანიზაციის მოწესრიგების დაქვეითება.

დისპლაზიურ პროცესს ახასიათებს ტერიტორიული უჯრედშუა მატრიქსის შედარებით ერთგვაროვანი სტრუქტურა, რეფლექსების მკაფიო განაწილებით.

კეთილთვისებიანი სიმსივნეებისათვის დამახასიათებელია ტერიტორიული მატრიქსის სტრუქტურის დარღვევა. კოლაგენური ბოჭკოების ორიენტაციის დარღვევის

შესაბამისად თავს იჩენს გლიკოზომინო-გლიკანების განაწილების და კოლაგენურ სტრუქტურებთან მათი კავშირის არაერთგვაროვნება.

ავთვისებიანი სიმსივნეების არსებით თავისებურებად უნდა ჩაითვალოს კოლაგენური სტრუქტურებისა და გლიკოზომინოგლიკანების გამოხატული მოუწესრიგებლობა და თანაფარდობის მოშლა, როგორც ტერიტორიულ, ისე ინტერტერიტორიულ მატრიქსში.

უჯრედშუა მატრიქსის კომპონენტების სტრუქტურული რეფრაქციის მანევრებლების გამოყენება შეიძლება ხსენებული დაავადებების დიფერენციალური დიაგნოზისათვის.

TOPO-OPTICAL CHARACTERISTICS OF INTERCELLULAR MATRIX IN DYSPLASIA AND TUMORS OF CARTILAGINOUS STRUCTURE

T. A. GIORGADZE

State Medical Institute, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Topo-optical analysis of components of intercellular matrix (collagen and glycosaminoglycans) in dysplasia, benign and malignant tumors of cartilaginous structure has shown that the increasing of degree of tumorous regression corresponds to the decreasing of regularity in organization of the territorial matrix.

Dysplastic processes are characterized by relatively homogeneous structure with clearly distributed reflexes in the territorial matrix and narrow zones in the interterritorial matrix.

Benign tumors are characterized by considerable decreasing of the homogeneous structure in the territorial mat-

rix. With an increase of nonhomogeneous orientation of collagenous component there is an increase of uneven distribution of glycosaminoglycans and their bond with collagenous structures.

Malignant tumors are characterized by considerable irregularity of both the collagenous structures and glycosaminoglycans. The disruption of correlations

between the irregularly located collagenous structures and glycosaminoglycans is one of the important signs of malignant tumors.

Indices of structural refraction of components of intercellular matrix can be used in the differential diagnostics of the mentioned diseases.

УДК 581.131.1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТКИ (ИЗОТОПА УГЛЕРОДА C¹³) В МОЛЕКУЛЕ ИЗОПРЕНА ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

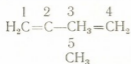
Д. И. Баазов, Г. А. Санадзе

Тбилисский государственный университет

Поступила в редакцию 11.04.1986

На основании экспериментальных данных масс-спектриванием фитогенного изопрена, выделяющегося из листьев тополя, после предварительной ассимиляции C¹³O₂ построена математическая модель распределения метки изотопа углерода C¹³ в конечном продукте при фотобиосинтезе изопрена.

Изопрен является конечным продуктом фотобиологических превращений, берущих, по всей вероятности, начало от ацетил-КоА и связанных с работой фотосинтетического аппарата [3, 7, 9, 10]. Молекула изопрена содержит пять углеродных атомов, и положение каждого из них можно определить соответствующим номером:



Полипренные соединения, куда входит изопрен, благодаря высокой физиологической активности, давно привлекают внимание ученых. В работах [6, 8] была предложена обобщенная биохимическая схема их синтеза. Она основана на открытии Блоха и Линеана, установивших, что ключевым соединением в процессе синтеза полипренов является изопентилпирофосфат («активный изопрен»). Основные этапы биосинтеза изопентилпирофосфата достаточно хорошо исследованы и схема последовательностей реакций в настоящее время стала классической.

Согласно этой схеме, стартовым соединением данного биосинтеза является ацетил-КоА, который, конденсируясь с ацето-ацетил-КоА через ок-

си-метилглутаровую (ОМГ) и мевалоновую кислоты, дает вещество с разветвленной углеродной цепью — изопентилпирофосфат, после чего путем димеризации и дальнейшей полимеризации дает начало биосинтезу широко известного класса веществ, именуемых полипренами.

За основу биосинтеза молекулярно-изопрена мы берем эту схему, предполагая, что где-то на терминальных стадиях происходит дефосфорилирование изопентилпирофосфата вследствие блокирования основного пути его дальнейшей полимеризации. Такая реакция могла бы быть спровоцирована, например, низким парциальным давлением CO₂ в атмосфере камеры, в которой экспонируется лист. Экспериментально показано [4, 10], что изопреновый эффект достигает максимального значения в условиях дефицита CO₂ — при углекислотном компенсационном пункте. В настоящее время все данные говорят о метаболической связи между экзогенным источником углерода (CO₂) и конечным продуктом биосинтеза изопрена [2, 10].

В работе [2] была изучена степень включения углерода из C¹³O₂, ассимилированной при фотосинтезе, в молекулу изопрена, выделяемого листьями тополя на свету. Выяснилось,

საქ. აკად. გ. ბააძის
დ. ბ. სანაძის

что C^{13} в изопрене обнаруживается преимущественно в одном или двух положениях из пяти возможных. На основании экспериментальных данных, полученных в нашей лаборатории при исследовании масс-спектров фитогенного изопрена [1], построена вероятностно-статистическая модель распределения углерода C^{13} в молекуле изопрена. Результаты, полученные на основе этой модели, позволили сделать заключение, что усвоенный при фотосинтезе углерод $C^{13}O_2$ распределяется в молекуле изопрена неравномерно.

Если образование молекулярного изопрена листьями тополя при фотосинтезе идет по вышеуказанному пути — через мевалоновую кислоту и изопентилпирофосфат, то этот процесс можно представить по следующей схеме: атом углерода, содержащийся в ассимилированной молекуле CO_2 , спаривается с углеродным атомом, либо от другой молекулы, поглощенной при фотосинтезе двууглекислого газа, либо с атомом углерода из эндогенного пула CO_2 , находящегося в клетке листа. Образовавшаяся С-С связь содержится в стартовом соединении биосинтеза полипренов — в ацетил-КоА.

Нужно отметить, что изучение кинетики выделения изопрена показало, что на компенсационном пункте в листьях тополя усиливаются процессы декарбоксилирования, влекущие за собой разбавление метки экзогенной двуокиси углерода [9]. Свидетельством этого факта служит снижение удельной активности изопрена во времени. При образовании ацетил-КоА две С-С связи спариваются и дают четырехуглеродное соединение. Затем в процессе биосинтеза мевалоновой кислоты образуется шестиуглеродное соединение С-С-С-С-С-С. В результате дальнейших биохимических превращений, потеряв один углерод в положении 4 или 6, последнее соединение может образовать изопрен.

Если обозначить отношение C^{12}/C^{13} в двууглекислом газе, находящемся в листовой камере и обогащенном стабильным изотопом C^{13} , через k/m , тогда долю намеченных атомов углерода C^{12} в общем балансе ассимилированного листом двууглекислого газа в процессе фотосинтеза можно вы-

разить через $k/k+m$, а долю меченых атомов углерода C^{13} — $m/k+m$. При биосинтезе изопрена вероятностное разовани не меченной двууглеродной связи $C^{12}-C^{12}$ получится равной $k^2/(k+m)^2$ (1). Точно так же в общем балансе двууглеродных связей доля однократно меченных $C^{12}-C^{13}$ и $C^{13}-C^{12}$ будет $2km/(k+m)^2$ (2), а двукратно меченных — $m^2/(k+m)^2$ (3). Очевидно, сумма этих вероятностей равна единице.

В работе [2] было показано, что после фотосинтетического поглощения $C^{13}O_2$ в молекулу изопрена включается, в основном, один или два атома углерода C^{13} , притом метка в молекуле распределяется неравномерно. Если предположить, что в процессе изопренового эффекта метится в основном карбоксильный углерод ацетата, то в молекуле изопрена метка займет 2-е или 4-е положение [5].

Таким образом, при образовании двойных углеродных связей $C^{12}-C^{13}$ и $C^{13}-C^{12}$ в первом случае метится карбоксильный, а во втором — метильный углерод ацетата. Предположим, что из всего меченого углерода, принимавшего участие в биосинтезе изопрена, σ -часть является карбоксильным, а $1-\sigma$ — метильным углеродом ацетата ($\sigma < 1$), тогда величина

$$\frac{2\sigma km}{(k+m)^2} \quad (4)$$

представляет вероятность попадания метки в двойную связь $C^{13}-C^{12}$, а величина

$$\frac{2(1-\sigma) km}{(k+m)^2} \quad (5)$$

— вероятность ее попадания в двойную связь $C^{12}-C^{13}$.

По данным Бантропа и сотр. [5] в растениях существуют пулы ацетил-КоА и ацето-ацетил-КоА, благодаря которым происходит разбавление метки, приводящее к ее перераспределению в молекуле конечного продукта. Таким образом, в процессе биосинтеза изопрена при образовании С-С связей доля меченых атомов в общем балансе может меняться в зависимости от степени участия эндогенного пула листа в фотобиосинтезе изопрена.



Обозначим через α параметр, определяющий отношение количества эндогенного пула к общему количеству углерода, содержащегося в ассимилированном листом углекислом газе. Для получения вероятности распределения метки в С-С связях в начальной стадии биосинтеза изопрена, с учетом параметра α в уравнениях (1), (3), (4) и (5), вместо k подставим $k^1 = k + \alpha(k+m)$. Последнее выражение вносит поправку на разбавление метки, приводящее к ее перераспределению в молекуле конечного продукта — изопрена.

Таким образом, с учетом разбавления метки эндогенным пулом вероятности распределения метки в С-С связях будут выражаться следующими соотношениями:

- I. $C^{12} - C^{12}$ $(k^1)^2 / (k^1 + m)^2$
 II. $C^{12} - C^{13}$ $2\sigma k^1 m / (k^1 + m)^2$
 $C^{13} - C^{12}$ $2(1 - \sigma) k^1 m / (k^1 + m)^2$
 III. $C^{13} - C^{13}$ $m^2 / (k^1 + m)^2$,
 где $k^1 = k + \alpha(k+m)$

Как уже указывалось, образование молекулярного изопрена листьями при фотосинтезе включает в себя биосинтез ацето-ацетил-КоА (четырёхуглеродное соединение С-С-С-С) из пары молекул ацетил-КоА (двухуглеродное соединение С-С).

Для расчета вероятности распределения метки C^{13} в молекуле ацетил-КоА из табл. 1. берем произведение значений вероятностей нахождения метки в различных двух парах С-С связей. Таким образом, можно получить значения вероятностей распределения метки в молекуле ацетил-КоА для 16 различных ее расположений: $C^{12} - C^{12} - C^{12} - C^{12}$, $C^{12} - C^{12} - C^{12} - C^{13}$, $C^{12} - C^{12} - C^{13} - C^{12}$ и т. д. Очевидно, что значения вероятностей будут меняться в зависимости от параметров k , m , σ и α . Для получения вероятности распределения метки в шестуглеродных соединениях надо умножить вероятности распределения метки в четырехуглеродных соединениях на такие же вероятности для двухуглеродных связей (табл. 1). Наконец, учитывая вероятность удаления атома углерода в 4- или 6-м положении, можно рассчитать распределение метки в молекуле изопрена в за-

висимости от значений параметров k , m , σ и α . Именно такое распределение было исследовано с помощью ЭВМ для значений $k=4; 3; 2; m=1; 2; 3; \sigma=0; 0,25; 0,5; 1; \alpha=0,1; 0,3;$

Таблица 1

Вероятность распределения метки в углеродных связях в процессе фотобиосинтеза изопрена

$m=1, k=4$	$C^{12} - C^{12}$	$C^{12} - C^{13}$	σ	$C^{13} - C^{12}$	$C^{13} - C^{13}$
	$\alpha=0$	0,640		0,040	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9
$\alpha=1/2$	0,750	0,019	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,023 0,069 0,1155 0,162 0,208	0,208 0,162 0,1155 0,069 0,023
$\alpha=1$	0,812	0,012	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,019 0,052 0,088 0,124 0,157	0,157 0,124 0,088 0,052 0,019
$m=2, k=3$			0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,048 0,144 0,240 0,336 0,432	0,432 0,336 0,240 0,144 0,048
$\alpha=0$	0,360	0,160	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,039 0,117 0,1955 0,274 0,352	0,352 0,274 0,1955 0,117 0,039
$\alpha=1/2$	0,538	0,071	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,032 0,096 0,160 0,224 0,288	0,288 0,224 0,160 0,096 0,032
$\alpha=1$	0,640	0,040	0,1 0,3 0,5 0,7 0,9	0,032 0,096 0,160 0,224 0,288	0,288 0,224 0,160 0,096 0,032

0,5; 0,7; 0,9. Полученные данные сопоставлялись с экспериментальными результатами, полученными в нашей лаборатории масс-спектрометрическим методом [2]. В работе исследуется именно распределение углерода из ассимилированной при фотосинтезе CO_2 в молекуле образующегося изопрена. В этих экспериментах отношение $C^{13}:C^{12}=40:60$, что соответствует значениям параметров $k=3, m=2$.

Из 320 рассмотренных в данной работе вариантов распределения метки в молекуле изопрена при различных значениях параметров k, m, σ и α наилучшим образом согласуется с

результатами эксперимента следующие две теоретические модели: 1) $k=3$, $m=2$, $\alpha=0,5$, $\sigma=0,7$ и 2) $k=3$, $m=2$, $\alpha=0,25$, $\sigma=0,7$.

Таким образом, расчеты показывают, что для неравномерного распределения метки в молекуле изопрена необходимо наличие пулов эндогенного CO_2 , ацетил-КоА и ацето-ацетил-КоА, а также возможность функцио-

нирования двух различных путей разветвления предшественников ацетил-КоА. При этом модель наилучшим образом описывает экспериментальные результаты при допущении, что в конечный продукт (в молекулу изопрена) данного биосинтеза метка попадает с большей вероятностью из карбоксильной группы ацетата, чем из метильной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Санадзе Г. А., Джанани Г. И., Базов Д. И., Хахубия Ц. Г., Эбралидзе Ш. С., Гванцеладзе Л. Г. Физиол. раст., 23, 4, 690—696, 1976.
2. Санадзе Г. А., Джанани Г. И., Тевзадзе И. М. Физиол. раст., 19, 1, 24—27, 1972.
3. Санадзе Г. А., Каландадзе А. Н. ДАН СССР, 168, 1, 227—229, 1966.
4. Санадзе Г. А., Курсанов А. Л. Физиол. раст., 13, 2, 201—205, 1966.
5. Bantorpe V. D., Kundayo O., Man J., Turnbull K. W. Phytochemistry, 14, 707, 1975.
6. Bloch K., Chaykin S., Phillips A. H., Waardde A. J. Biol. Chem., 234, 2595, 1959.
7. Jones C. A., Rasmussen R. A. Plant. Physiol., 55, 982—987, 1975.
8. Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessler J. Angew. Chem., 70, 739, 1958.
9. Rasmussen R. A., Jones C. A. Photochemistry, 12, 15—19, 1973.
10. Sanadze G. A. Progress in Photosynthesis Research., 2, 701—706, 1969.

ფოტოსინთეზის დროს იზოპრენის მოლეკულაში ნიშნის (C^{13}) ნახშირბადის იზოტოპის) განაწილების მათემატიკური მოდელირება

დ. ბააზოვი, გ. სანაძე

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რ ე ზ ი მ ე

$C^{13}O_2$ მოლეკულის ასიმილირების შემდეგ ვერხვის ფოთლებიდან გამოყოფილი იზოპრენის მას-სპექტრომეტრიკებით მიღებული ექსპერიმენტული მონა-

ცემების საფუძველზე, შექმნილია იზოპრენის ფოტობიოსინთეზის დროს საბოლოო პროდუქტში C^{13} იზოტოპის განაწილების მათემატიკური მოდელი.

THE MATHEMATICAL MODEL OF DISTRIBUTION OF SIGN IN THE ISOPRENE MOLECULE (C^{13} CARBIN ISOTOPE) DURING PHOTOSYNTHESIS

D. I. BAAZOV, G. A. SANADZE

Tbilisi State University, USSR

S u m m a r y

On the basis of summary experimental data obtained by mass-spectrometry of phylogenetic isoprene, isolated from poplar leaves after a preliminary assimilati-

on of $C^{13}O_2$ a mathematic model of sign distribution (C^{13} carbor isotope) in the ultimate product during isoprene photosynthesis was constructed.

УДК 616.153.915+922

БИОХИМИЯ

ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ

А. С. Кобаладзе, М. Л. Абашидзе, Г. И. Рцхиладзе,
Р. А. Аладашвили

Тбилисский государственный медицинский институт

Поступила в редакцию 16.01.1986

У 1674 здоровых и больных жителей города Тбилиси и пригородных районов изучалась частота первичной и вторичной дислиппротеидемии (ДЛП). Установлены пределы нормальных границ для уровней общего холестерина, триглицеридов и холестерина. Выявлена частота гиперлипидемии и гиперлипотеидемии (ГЛП) при различных заболеваниях внутренних органов. Показано, что наибольшие изменения (за исключением больных ишемической болезнью сердца — ИБС) в липидном спектре наблюдаются у больных гипертонической болезнью, хронической почечной недостаточностью и при заболеваниях желчных путей с холестатическим гепатитом.

В 1967 г. Д. Фредриксон и соавт. [14] предложили метод фенотипирования ДЛП, который включал все основные формы нарушения жирового обмена. В 1970 г. предложенная ими классификация с небольшими дополнениями [13] была рекомендована ВОЗ для использования в научных исследованиях.

К настоящему времени проведены обширные популяционные и эпидемиологические исследования как в нашей стране, так и за рубежом, которые показали четкую взаимосвязь ДЛП, в частности ГЛП, гиперхолестеринемии — ГХС и гипертриглицеридемии — ГТГ с атеросклерозом и ИБС [1, 7, 12].

Популяционные границы нормы для липидов, установленные путем эпидемиологического обследования населения, имеют строго ограниченное значение для одного региона. Кроме того, подход клинициста отличается от подхода гигиениста к понятию нормы, так как первый не может удовлетвориться широкими колебаниями «нормы» в популяционных исследованиях [7, 9].

В патогенезе атеросклероза важную роль играют как первичные (конституциональные, генетически обусловленные), так и вторичные ГЛП, развившиеся на фоне различных болезней (сахарный диабет, патология почек, поджелудочной железы, печени и др.) [19].

Изучение роли ГЛП в патогенезе атеросклероза и ИБС посвящено большое количество работ, в основном эпидемиологического характера. Однако клинические исследования в этом направлении малочисленны. Не определена роль ГЛП в развитии отдельных форм ИБС, артериальных гипертоний различного происхождения, болезней почек, органов дыхания, пищеварения и т. д. Недостаточно освещено патогенетическое и клиническое значение вторичных ГЛП. Именно в этом направлении проводились исследования на кафедре внутренних болезней № 1 лечебного факультета Тбилисского медицинского института с 1974 года [1, 2, 3, 4].



Обследовано 1674 практически здоровых и больных — жителей г. Тбилиси и пригородных районов: с ИБС (стенокардия, инфаркт миокарда, хроническая ишемическая болезнь) — 464, гипертонической болезнью — 431, хроническим гломерулонефритом — 83, хроническим пиелонефритом — 75, хронической почечной недостаточностью — 10, хроническими неспецифическими заболеваниями легких — 91, с хроническим поражением печеночной паренхимы без холестаза — 122, с хроническими заболеваниями желчных путей — 48.

Контрольная группа состояла из 157 практически здоровых лиц в возрасте 18—75 лет.

Тип наследования ГЛП изучался у 192 жителей пригородного села — Борбало.

Для исследования липидного спек-

ра кровь брали из вены на фоне гипокалорийной диеты, натощак, спустя 12—14 ч после последнего приема пищи. Лабораторные исследования и фенотипирование проводились в соответствии с методическими рекомендациями, составленными под руководством А. Н. Климова и И. Е. Ганелиной [11]. В сыворотке определяли: общее количество липидов (ОЛ), триглицеридов (ТГ), общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП). Коэффициент атерогенности (К) определяли по формуле А. Н. Климова [6]:

$$K = \frac{ОХС - ХС - ЛПВП}{ХС - ЛПВП};$$

липопротеидный спектр — методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследован липидный спектр крови в контрольной группе, которая состояла из 157 практически здоровых лиц. За норму принимали показатели, расположенные на кривой Гаусса после отсечения 10%-ных верхних и нижних значений. Показатели, характеризующие состояние липидного обмена у жителей г. Тбилиси (табл. 1), существенно не отличаются от таковых у жителей Москвы и Ленинграда, однако среднее значение уровня ОХС и ТГ несколько ниже [7, 12].

Считается, что ГЛП как фактор риска для ИБС выявляется в возрасте до 30—40 лет. В таком свете привлекают внимание результаты исследований, проведенных у 100 студентов 20—25 лет. ГЛП была обнаружена в 16 случаях; у 9 — IIa тип; у 3 — IIb тип и у 4 — IV тип. У 11 студентов имелась наследственность, отягощенная ИБС и сахарным диабетом: среди них у 9 была выявлена ГЛП. У одного 22-летнего студента с ГХС и отягощенным семейным анамнезом имелись электрокардиографические признаки ишемии миокарда.

Тип наследования ГЛП изучался у 192 жителей 32 семей пригородного села Борбало (табл. 2). Среди членов семей пробандов с нарушенным липидным обменом ГЛП была выяв-

лена у 27,7%. В семьях пробандов без ГЛП нарушения липидного обмена имелись у 10% обследованных. Анализ частоты ГЛП в зависимости от степени родства к пробанду свидетельствует о полигенном характере наследования ГЛП. Следует считать, что изолированная ГХС типа IIa наследуется по аутосомно-доминантному типу.

Результаты наших клинико-лабораторных исследований подтверждают данные других авторов о том, что ИБС вообще связана с повышением уровня липидов крови и с атерогенными типами ГЛП. Вместе с тем нами выявлены характерные особенности нарушения липидного спектра при различных формах ИБС (табл. 1). В частности, у больных атеросклеротическим кардиосклерозом (ишемическая кардиомиопатия, хроническая форма ИБС без болевых приступов) преобладает ГТГ и IV тип ГЛП. У людей, страдающих стенокардией или перенесших инфаркт миокарда, преобладает ГХС и IIa и IIb типы ГЛП, отличающиеся выраженной атерогенностью. В отличие от болевых форм ИБС, стенокардии и болевой формы инфаркта миокарда, при безболевой форме инфаркта миокарда, который

обычно распознается только электрокардиографически, выявлены ГТГ, умеренное повышение ОХС и преобладание IV типа ГЛП [4, 17]. Полученные данные, возможно, свидетельствуют о том, что существует разница в патогенезе болевых форм ИБС и атеросклеротического кардиосклероза, протекающего без боли.

В настоящее время установлено, что артериальная гипертония часто сочетается с ГЛП, что должно способствовать ускоренному развитию атеросклероза. Однако нет данных о том, какая форма артериальной гипертонии сопровождается наиболее выраженным атерогенезом. Также не исследован вопрос ГЛП и атерогенеза при хронической почечной недостаточности [5, 8, 10].

Показатели липидного спектра были исследованы у 599 больных с артериальной гипертонией, хроническим гломерулонефритом, хроническим пиелонефритом, хронической почечной недостаточностью на почве нефрита или пиелонефрита (табл. 1). Как показали исследования, у людей, страдающих гипертонической болезнью, закономерно отмечается ГЛП, ГХС, ГТГ, гипо-альфа-ХС и высокий К. Наиболее характерен II тип, в особенности IIб тип ГЛП. В данной группе клинические или (и) электрокардиографические признаки стенокардии и инфаркта миокарда были обнаружены у 40,4% больных.

У больных с гипертонической формой хронического гломерулонефрита или пиелонефрита без явлений почечной недостаточности отмечены однотипные изменения липидного спектра крови, в частности ГТГ, и соответственно преобладание IV типа ГЛП, ХС-ЛПВП был умеренно понижен, а К умеренно повышен. Примечательно, что в данной группе больных не были выявлены случаи стенокардии, инфаркта миокарда или электрокардиографические признаки постинфарктного рубца.

У больных хронической почечной недостаточностью, леченных хроническим гемодиализом, отмечены самые высокие уровни ОХС, ТГ, К и самый низкий уровень ХС-ЛПВП. Преобладал, как и при гипертонической болезни, IIб тип ГЛП; у трети из

этих больных имелись приступы стенокардии [5, 10].

Сопоставление результатов обследования больных с артериальной гипертонией различного происхождения дают основание предположить, что высокая частота ИБС при гипертонической болезни определяется глубокими нарушениями липидного обмена, в частности с IIб типом ГЛП, т. е. ГХС, ГТГ, гипо-альфа-ХС и, следовательно, высоким К.

Интерес к изучению обмена липидов при хронических неспецифических воспалительных заболеваниях легких был обусловлен не только широким распространением данной патологии, но и тем, что все еще не сформулированы закономерности взаимоотношения между хроническими болезнями легких, с гипертонией малого круга кровообращения, и легочным сердцем и атеросклерозом. Вместе с тем известно, что в отличие от атеросклероза у легочных больных редко наблюдаются нарушения ритма сердца, стенокардия и инфаркт миокарда, т. е. не отмечаются проявления ИБС [15].

Исследования проведены у больных зрелого и пожилого возраста, страдающих хроническим бронхитом, хронической пневмонией, эмфиземой легких с различной степенью легочной или легочно-сердечной недостаточности. Состояние показателей липидного спектра у этих больных характеризовалось своеобразием — как правило, преобладал «нормальный» тип липидного спектра без повышения уровня ОХС и ТГ (табл. 1). Атерогенные типы ГЛП встречались не чаще, чем в контрольной группе из практически здоровых людей. По-видимому, следует считать допустимым, что при хронической патологии легких и бронхов действуют механизмы, препятствующие нарушению липидного обмена в сторону ГЛП и, возможно, таким путем задерживающие развитие атеросклероза. Данное положение требует дальнейшего исследования [15].

Печень является важнейшим звеном в метаболизме липидов и липопротеидов. Различные нарушения деятельности печеночных клеток и желчных протоков могут привести как к повышению, так и понижению уровня липидов и липопротеидов крови [18],

Исследуемая группа	Количество	ОХС (г/л)	ХС—ЛПНП (г/л)	ТГ (г/л)	К	Нормальная липидо- грамма	ЛЛП в %			
							IIa тип	IIb тип	IV тип	за счет заболеваний связанных с патологией
Контрольная	157	2,04 ± 0,032	0,55 ± 0,01	1,01 ± 0,034	3,2 ± 0,2	84,7	6,4	0,6	8,3	
Стенокардия	112	2,637 ± 0,051	0,403 ± 0,026	1,526 ± 0,073	7,3 ± 0,55	21,0	24,2	30,0	24,8	
Инфаркт миокарда	214	2,678 ± 0,059	0,377 ± 0,018	1,498 ± 0,077	7,6 ± 0,63	13,3	30,1	30,1	21,5	
Хроническая ИБС	138	2,43 ± 0,04	0,368 ± 0,022	1,745 ± 0,084	6,0 ± 0,53	11,8	17,3	20,9	50,0	
Гипертоническая болезнь	431	2,61 ± 0,033	0,35 ± 0,034	1,55 ± 0,045	6,3 ± 0,2	16,6	26,2	36,4	20,8	
Хронический гломерулонефрит	83	2,51 ± 0,089	0,42 ± 0,035	1,61 ± 0,035	4,3 ± 0,5	20,5	9,6	7,4	62,4	
Хронический пиелонефрит	75	2,53 ± 0,065	0,41 ± 0,045	1,63 ± 0,062	5,1 ± 0,6	18,6	13,4	12,0	56,0	
Хроническая почечная недостаточность	10	2,96 ± 0,102	0,29 ± 0,048	2,40 ± 0,115	8,8 ± 0,6	—	—	70,0	30,0	
Хроническое неспецифическое заболевание легких	92	2,205 ± 0,062	0,46 ± 0,045	0,82 ± 0,075	3,7 ± 0,54	70,7	7,6	12,2	9,5	
Хронические заболевания желчных путей	48	2,52 ± 0,052	0,40 ± 0,044	1,42 ± 0,068	5,1 ± 0,55	23,21	16,6	29,2	16,6	14,39
Хронический гепатит	64	2,05 ± 0,062	0,443 ± 0,032	1,480 ± 0,058	3,4 ± 0,4	43,7	12,5	7,8	12,5	23,5
Цирроз печени	58	1,506 ± 0,056	0,436 ± 0,034	0,695 ± 0,058	3,5 ± 0,4	33,9	10,7	5,5	7,1	42,8

Таблица 2

Распределение типов ЛЛП в процентах у родственников пробандов с гиперлипотридемии в нормальной липидограммой при I, II и III степени родства с пробандом

Родственники всех степеней родства	Степень родства с пробандом											
	I			II			III					
	Т и II			Г Л П			(в %)					
	IIa	IIb	IV	IIa	IIb	IV	IIa	IIb	IV	IIa	IIb	IV
Родственники пробанда с ГЛП	13,39	7,14	7,14	20,00	10,91	10,91	5,40	5,40	2,70	5,00	5,00	5,00
Родственники пробанда с нормальной липидограммой	5,00	1,25	3,75	6,67	2,22	—	4,17	—	8,33	—	—	9,09

а также к значительным изменениям их состава и структуры (табл. 1).

Липидный обмен изучен у больных с хроническим поражением печеночной паренхимы без холестаза. При хроническом гепатите, а в большей мере при циррозе печени, часто обнаруживались гиполипидемия и гипопопротеинемия с понижением ниже нормы уровня ОХС, ХС-ЛПНП и ТГ, но без заметных изменений ХС-ЛПВП. Возможно, что гиполипидемией и определяется замедленное развитие атеросклероза у больных циррозом печени [16, 19].

Несколько иная картина была получена при заболеваниях желчных путей, когда в патогенезе участвует и

фактор холестаза, но нет тяжелого поражения паренхимы печени. У больных отмечены более высокие уровни ОХС и ТГ и часто (у 62% больных) обнаруживалась ГЛП. Еще более четкие изменения выявлены при желчно-каменной болезни, когда наиболее высокого уровня достигали ОХС и ТГ при одновременном низком содержании ХС-ЛПВП [18]. Соответственно, при данной патологии имелся высокий К.

Вышеизложенный материал дает возможность заключить, что ДЛП является отражением общепатологического процесса и характеризуется особенностями, обусловленными основным заболеванием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аладашвили В. А. В. кн.: Актуальные вопросы патогенеза, клиники и терапии инфаркта миокарда, «Сабчота Сакартвело», Тбилиси, 1976, 3—17.
2. Аладашвили В. А., Кобаладзе А. С., Варазанашвили И. М. Сб. трудов IV венгерской конференции по атеросклерозу, Будапешт, 1976, 70.
3. Аладашвили В. А., Рцхиладзе Г. И., Кобаладзе А. С., Абашидзе М. Л., Варазанашвили И. М. Тез. XVIII Всес. съезда терапевтов, Ленинград, 1, 1981, 129—131.
4. Кобаладзе А. С., Варазанашвили И. М. В кн.: Актуальные вопросы патогенеза, клиники и терапии инфаркта миокарда, «Сабчота Сакартвело», Тбилиси, 18, 1976.
5. Вирсаладзе К. С., Ткемаладзе Л. Г., Анджанаридзе К. Л., Кикнадзе Г. Б., Коплатадзе И. Г., Рухадзе Т. Ш. Хроническая почечная недостаточность, Мат. III пленума Правления Всесоюзного научного общества нефрологов, Баку, 102—103, 1976.
6. Дислипидопroteinемия и ишемическая болезнь сердца (под ред. Е. И. Чазова и А. Н. Климова), М., «Медицина», 1980.
7. Климов А. Н. Вестник АМН СССР, 3, 45—49, 1980.
8. Кромкова И. Ф. Клин. мед., 8, 98—101, 1977.
9. Липовецкий В. М., Шестов Л. Б., Никульчева В. М., Плавинская С. Н. Клин. мед., 9, 73—77, 1982.
10. Тареев Е. М., Никифорова Н. В., Ермоленко В. М., Танаинова И. К. Клин. мед., 1, 4—10, 1976.
11. Фенотипирование гиперлипидопroteinемии (метод рекомендации), Под ред. Климова А. Н., Гавелиной И. Е., М., 1975.
12. Чазов Е. И., Елисеев С. М. Тер. арх., 1, 3—11, 1981.
13. Beaumont J. L., Carlson L. A., Cooper G. K. Bull. WHO, 23, 891—915, 1970.
14. Fredrickson D. S., Levy K. I., Lees R. S. N. Engl. J. Med., 276, 34—44, 94—103, 148—156, 215—225, 273—281, 1967.
15. Hooper P. L., Woo W., Viscoriti L., Pathak D. K. N. Engl. J. Med., 305, 1455—1457, 1981.
16. Howell W. L., Manion W. C., Amer. Heart J., 60, 3, 341—345, 1960.
17. Hulley S. B., Rosenman R. H., Bawol R. D., Brand R. J. N. Engl. J. Med., 302, 25, 1383—1389, 1980.
18. Petitti D. B., Friedman G. D., Klatsky A. L. N. Engl. J. Med., 304, 23, 1396—1399, 1981.
19. Schwandt P. Münch. med. Wschr., Bd. 115, 15, 644—649, 1973.

ა. კობალაძე, მ. აბაშიძე, ბ. რცხილაძე, ვ. ალადაშვილი

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

ქ. თბილისისა და მისი შემოგარენის 1674 მცხოვრებში გამოკვლეულ იქნა პირველადი და მეორადი დისლიპოპროტეიდემიის სიხშირე. დადგენილ იქნა სისხლში საერთო ქოლესტერინის, ტრიგლიცერიდებისა და მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეიდული ქოლესტერინის დონის ნორმული ზღვრები.

შესწავლილ იქნა ჰიპერლიპიდემიისა და ჰიპერლიპოპროტეიდემიის სიხშირე

შინაგანი ორგანოების სხვადასხვა დაავადების დროს. ცხიმოვანი ცვლის მაჩვენებლების განსაკუთრებით მკვეთრი ცვლილებები, გულის იშემიური დაავადებით შეპყრობილი პირების გარდა, აღმოაჩნდათ ჰიპერტონული დაავადებით, თირკმლების ქრონიკული უკმარისობით, ნაღვლკენჭოვანი და ქოლესტაზური პეპატიტით დაავადებულ პირებს.

BLOOD LIPID SPECTRUM IN HEALTH AND PATHOLOGY OF VISCERAL ORGANS

A. S. KOBALADZE, M. L. ABASHIDZE, G. I. RTSKHILADZE, V. A. ALADASHVILI

State Medical Institute, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The prevalence of primary and secondary dislipoproteinemia was studied in 1674, Tbilisi urban and suburb population, and the normal range of blood plasma lipid levels (total cholesterol, triglycerides and HDL — cholesterol) was established.

The frequency of hyperlipemia and

hyperlipoproteinemia was also studied in some diseases of visceral organs. The most striking changes were shown to occur, apart from the cardiac ischemic patients, in the subjects with hypertension, chronic renal failure, cholelithiasis and cholestatic hepatitis.

УДК 575.23.576.852.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЛИЗИС КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ ВИДОВ САПРОФИТНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

М. Коничкова-Радохова, Г. Я. Дараселия, И. Коничек

Институт микробиологии АН ЧССР, Прага

Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси

Изучено влияние глицина, Д-треонина, пенициллина и их комбинации на лизис клеток некоторых сапрофитных микобактерий. Установлено, что чувствительность микобактерий к изучаемым факторам различна и действуют они как хорошие ингибиторы синтеза наружной оболочки клеток. Для каждого вида микобактерий был подобран соответствующий ингибитор оптимальной концентрации, при котором наблюдается лизис клеток на 90—95%.

Выделение биологически активной ДНК является одной из составных частей в изучении генетики микроорганизмов. Получение ДНК в интактном виде у микобактерий крайне затруднено, по сравнению с другими микробиологическими моделями, из-за своеобразного строения их клеточной стенки.

В ранних работах, пытаясь разрушить клеточную оболочку, ряд исследователей использовал некоторые физические методы, такие как механическое разрушение клеток с толченым стеклом, ультразвуком, дезинтегратором [3, 6, 8].

Перечисленные методы в основном вызывали разрыв ДНК клеток, в результате чего терялась ее биологическая активность.

Позднее в качестве факторов, разрушающих клеточную оболочку, стали использовать специфические энзи-

мы [4, 9] и вещества, препятствующие синтезу клеточной оболочки, такие как антибиотики [1, 2], аминокислоты и их различные комбинации. Однако эти приемы тоже не дали желаемых результатов. Метод был медленный и используемые вещества могли вызвать разрушение ДНК эндогенной нуклеазой [7]. В дальнейшем Виндер и Наугтон предложили наиболее быстрый метод лизиса клеток *M. smegmatis* [10].

В данной работе мы применили метод, в котором использована вышеупомянутая комбинация веществ, с целью разработки быстрого и надежного способа лизиса клеток для различных видов и штаммов микобактерий. Эти методы важны для получения клеток с легко разрушаемой клеточной оболочкой, необходимых для изучения передачи генетического материала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили следующие микобактерии: *Mycobacterium phlei* РА(ЧССР), *Mycobacterium lacticola* ВКМ В-833, *Mycobacterium mucosum* ВКМ В-462. Выращивание культур проводили в жидкой питательной среде (Пеп-

тон — Difco[®] 82/А) до экспоненциальной фазы роста в течение 48 ч при температуре 28°C в условиях перемешивания.

Лизис клеток проводили по методике Растиги и Давида [5] с некоторыми модификациями. Во все жид-

кие среды и буферные растворы добавляли «Твин-80» в конечной концентрации 0,05%, лизоцим (Calbiochem—Behring Corp. LaJolla) в трис-HCl в буферном растворе, содержащем EDTA, в конечной концентрации 750 мкг/мл, и глицин (Lachema, ЧССР) в концентрации 1,4—4%.

Затем изучали действие D-треонина и пенициллина на лизис клеток микобактерий. D-треонин (Serva, ФРГ) вносили в количестве 4 и 20 мМ, а пенициллин (Srofa, ЧССР) в концентрации 10 000 и 25 000 ед/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было изучено влияние глицина (концентрация 1,4 и 4%), D-треонина (концентрация 4 и 20 мМ) и пенициллина (концентрация 10 000 и 25 000 ед/мл) на степень разрушения клеточной оболочки *M. phlei*, *M. lac-*

Концентрацию клеток в суспензии измеряли на ФЭК-е (ЧССР) при 450 мМ в начале инкубации и после 24 ч в трис-HCl буфере с EDTA лизоцимом. Одновременно брали образцы и проводили лизис клеток с помощью SDS в конечной концентрации 0,5% в трис-HCl буфере (50 мМ, pH 8,0) и измеряли на ФЭК-е. По степени мутности суспензии, под влиянием SDS и без него, выявляли фракции осмотических и интактных клеток.

жалась, другие не росли или лизировались.

Как видно из таблицы, поведение клеток в буфере с лизоцимом после применения указанных факторов в течение их роста не всегда соответство-

Таблица

Изменение количества клеток микобактерий под действием глицина, D-треонина и пенициллина

Фактор	Концентрация	% клеток*		
		<i>M. phlei</i>	<i>M. lacticola</i>	<i>M. mucosum</i>
Глицин	1,4%	105	133	96
	4%	107	111	99
D-треонин	4	65	100	104
	20	90	85	97
Пенициллин	10 000 ед/мл	115	83	109
	25 000 ед/мл	108	75	97

ticola и *M. mucosum* в течение 18 ч. Затем в среде буферного раствора в присутствии EDTA на клетки действовали лизоцимом большой концентрации в течение 24 ч. Состояние культур оценивали разницей в мутности раствора до ($t=0$ ч) и после ($t=24$ ч) влияния лизоцима. Сравнением этих данных установили поведение клеток под действием изучаемых факторов в среде. Клетки, в зависимости от вида микобактерий, от использованных факторов и их концентраций, реагировали по-разному. Некоторые из них частично размно-

вали степени разрушения клеточной оболочки. Размножающаяся культура может содержать большой % клеток с легко разрушаемой клеточной оболочкой, подвергающейся лизису, (например, у *M. phlei* после влияния глицина в концентрации 1,4%).

После измерения концентрации клеток в буфере с лизоцимом (0 и 24 ч) все образцы обрабатывали с помощью SDS и снова измеряли на ФЭК-е. Наряду с лизисом клеток, вызванных в культуре, обнаружены клетки с неразрушенной оболочкой. Исходя из этого сделано заключение об активности использованных факторов, чувствительности штаммов и дана оценка пригодности методики для лизиса

* За 100% принимали количество клеток в буфере до влияния лизоцима (0 ч)

клеток. SDS не влиял на клетки, которые раньше не подвергались влиянию аминокислот, пенициллина, лизоцима. Результаты представлены на рис. 1, 2, 3. Видно, что чувствительность штаммов к отдельным факторам

влиянию глицина в концентрации 1,4%. Этот штамм, как и большинство микобактерий, малочувствителен к пенициллину. Пенициллин необходимо использовать в высокой концентрации.

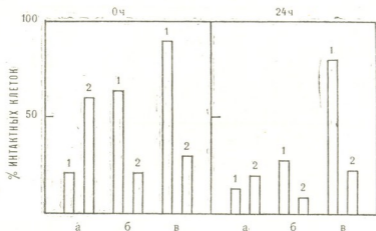


Рис. 1. Фракция интактных клеток *M. phlei* в присутствии SDS, до влияния лизоцима и под действием: а) глицина (1—1,4%; 2—4,0%); б) Д-треонина (1—4; 2—20 мМ); в) пенициллина (1—10000 и 2—25000 ед/мл)

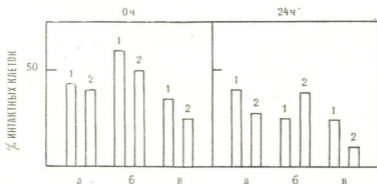


Рис. 2. Фракция интактных клеток *M. lacticola* в присутствии SDS, до влияния лизоцима и под действием: а) глицина (1—1,4%; 2—4,0%); б) Д-треонина (1—4 и 2—20 мМ); в) пенициллина (1—10000 и 2—25000 ед/мл)

резко отличается, однако нельзя утверждать, что один из факторов является наиболее подходящим для всех штаммов.

Штамм *M. phlei* оказался самым чувствительным к влиянию Д-треонина в концентрации 20 мМ, но несмотря на это, он также подвергается

Штамм *M. lacticola* наиболее чувствителен к пенициллину в концентрации 25000 ед/мл. Существенных результатов при использовании следующих двух факторов не было получено. Среди изучаемых штаммов наиболее чувствительным ко всем факторам оказался штамм *M. mucosum*, в кото-

ром под действием пенициллина как в низких, так и высоких концентрациях, глицина в концентрации 4% и Д-треонина в концентрации 4 мМ можно получить лизис 90—95% клеток. В штаммах *M. phlei* и *M. lacti-*

Под действием факторов с наиболее оптимальной концентрацией (глицин 1,4, Д-треонин 20 мМ и пенициллин 25000 ед/мл) в обоих штаммах в среднем лизировалось 85—95% клеток.

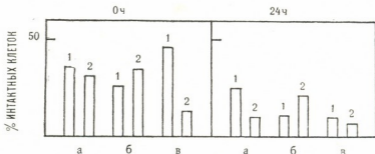


Рис. 3. Фракция интактных клеток *M. mucosum* в присутствии SDS, до влияния лизоцима и под действием: а) глицина (1—1,4%; 2—4,0%); б) Д-треонина (1—4 и 2—20 мМ); в) пенициллина (1—10000 и 2—25000 ед/мл)

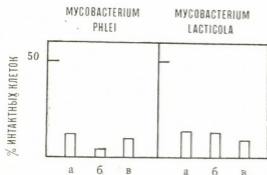


Рис. 4. Фракция интактных клеток *M. phlei* и *M. lacticola* в присутствии SDS, после влияния лизоцима и под действием: а) глицина—1,4%; б) Д-треонина—20 мМ; в) пенициллина—25000 ед/мл

cola изучено действие лизоцима в буфере на более длительный срок (до 5 суток) — рис. 4.

Лизис клеток не был достигнут в культурах микобактерий с легко разрушаемой клеточной оболочкой при высоких концентрациях и увеличении времени воздействия лизоцима. Отсюда следует, что длительное воздействие лизоцима не приводит к разрушению ДНК лизируемых клеток.

Таким образом, чувствительность штаммов *M. phlei*, *M. lacticola* и *M. mucosum* к изучаемым факторам (глицин, Д-треонин, пенициллин) различна. Все три вещества в данных экстремальных условиях действуют как хорошие ингибиторы синтеза наружной оболочки клеток микобактерий. В этих условиях для каждого штамма был подобран соответствующий ингибитор оптимальной концентрации. Пенициллин для лизиса клеток микобактерий можно использовать только в высоких концентрациях (25000 ед/мл). При использовании этого метода наблюдается лизис 90—95% клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дараселия Г. Я., Джавахишвили Ц. Д. Сообщения АН ГССР, 109, 2, 377—380, 1983.
2. Дараселия Г. Я., Коничкова-Радохова М., Коничек И., Джавахишвили Ц. Д. Тез. УИ съезда микробиологического общ-ва, Алма-Ата, 3, 1985, 20.



3. Chargaff E., Saidel H. J. *Biol. Chem.*, **177**, 417, 1949.

4. Mizuguchi Y., Tokunaga T. J. *Bacteriol.*, **104**, 1020—1021, 1970.

5. Rastogi N., David H. L. J. *Gen. Microbiol.*, **124**, 71, 1981.

6. Rytik V. The attempt to use a continuous inoculation of Mycobacteria in studying their changes and interactions with a host. CSc. Thesis, 1964.

7. Sato H., Diena B. B., Greenberg C. J. *Microbiol.*, **11**, 807—810, 1965.

8. Venner H. *Acta Biol. Med. German.*, **11**, 806, 1963.

9. Wayne L. G., Gross W. M. J. *Bacteriol.*, **95**, 1481—1482, 1968.

10. Winder F. G., Mac Naughton A. W. J. *Gen. Microbiol.*, **109**, 177—180, 1978.

ზოგიერთი სახეობის საპროფიტული მიკობაქტერიების უჯრედთა ლიზისი

მ. კონიჩკოვა-რადოხოვა, ზ. დარასელია, ი. კონიჩეკი

ჩეხოსლოვაკიის მეცნიერებათა აკადემიის მიკრობიოლოგიის ინსტიტუტი, პრაღა
საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი მ ე

შესწავლილ იქნა გლიცინის, დ-ტრეონინის, პენიცილინის, ლიზოციმის და მათი კომბინაციების გავლენა ზოგიერთი საპროფიტულ მიკობაქტერიების უჯრედების ლიზისზე. დადგინდა, რომ გამოყენებული ფაქტორების მიმართ მიკობაქტერიების მგრძობელობა სხვადასხვანაირია

და ისინი გარეთა გარსის სინთეზის კარგ ინჰიბიტორებად მოქმედებენ. შერჩეულ იქნა მიკობაქტერიების თითოეული სახეობისათვის შესაბამისი ინჰიბიტორი და მისი ოპტიმალური კონცენტრაცია, რის შედეგადაც აღინიშნება უჯრედთა ლიზისი 90—95%-ით.

THE CELLS LYSIS OF SOME SAPROFITE MYCOBACTERIA SPECIES

M. KONICHKOVA-RADOKHOVA, G. I. DARASELIA, I. KONICHEK

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of ČSSR, Prague
Institute of Plant Biochemistry, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The influence of glycine, D-threonine, penicillin and their combinations on the lysis of some saprofitic mycobacteria has been studied. It was found that sensitivity of mycobacteria to the studied factors was different and they ac-

ted as the best inhibitors of outer membrane cell synthesis. For each species of mycobacteria the correspondent inhibitor of optimal concentration was selected in the presence of which cell lysis by 90—95% was observed.

УДК 576.85

ВИРУСОЛОГИЯ

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗМОРОЖЕННЫХ ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЛЕЙКОЦИТОВ

И. И. Георгадзе, Н. Ш. Чигогидзе, И. К. Махатадзе, Л. Х. Каличава

Тбилисский НИИ вакцин и сывороток, МЗ СССР

Поступила в редакцию 08.02.1985

Интенсивность биосинтеза интерферона размороженными после криоконсервирования клетками костного мозга и лейкоцитами определяется титрами продуцируемого ими интерферона. С повышением концентрации клеток в единице объема повышаются и его титры. Интенсивность продукции интерферона у размороженных клеток костного мозга и лейкоцитов использована в качестве показателя их функциональной активности (наряду с другими тестами, существующими в практике гематологии и переливания крови).

Широкое применение лейкоцитов и клеток костного мозга в практике гематологии и гемотрансфузии привели к необходимости создания их запасов. Наиболее перспективным способом долгосрочного хранения лейкоцитарной массы и костного мозга является метод ультранизкотемпературной консервации с применением ограждающих средств. Метод этот сводится к созданию условий хранения клеток в состоянии анабиоза, что приводит к почти полному подавлению процессов обмена в лейкоцитах и миелокариocyтах и дает возможность продолжительное время сохранять их продуктивность и физиологическую активность.

Разработка методов криоконсервирования гемопоэтической ткани и лейкомассы привела к необходимости изыскания способов оценки их эффективности, основанных на определении жизнеспособности и функциональной активности размороженных клеток и сравнении полученных показателей с аналогичными характеристиками до консервирования. В настоящее время известны следующие тесты для определения жизнеспособности клеток

костного мозга и лейкоцитов: суправитальное окрашивание эозинном и трипановым синим; анализ миелограмм; исследование фагоцитарной активности; люминисцентная и электронная микроскопия; метод ауторадиографии; метод культуры ткани; изучение показателей энергетического обмена; дыхательная активность клеток; иммунологические методы; метод клонирования кроветворной ткани в селезенке; феномен экспериментальной спленоомегалии и др. [1, 2, 4—10].

Перечисленные методы применяются в зависимости от поставленных задач. В качестве экспресс-метода для оценки жизнеспособности как лейкоцитов, так и миелокариocyтов широко используется метод суправитальной окраски 1%-ным водным раствором эозина — метод Шрэка [11]. Однако по способу суправитальной окраски эозинном, несмотря на его простоту и доступность, нельзя достоверно судить о функциональной активности деконсервированных клеток.

В то же время наиболее достоверные из существующих методов оценки жизнеспособности одновременно являются, во-первых, весьма слож-

ными и, во-вторых, довольно продолжительными по времени, например метод клонирования. Но дело даже не в этих недостатках. Несмотря на наличие целого арсенала методов для тестирования деконсервированных клеток, ни один из них не позволяет с достаточной полнотой изучить и всесторонне оценить совокупность процессов, происходящих в живой клетке после ее размораживания. Вместе с тем актуальность задачи оценки функциональной активности размороженных клеток костного мозга и лейкоцитов очевидна.

Исходя из этого, было проведено сравнительное испытание по определению функциональной активности клеток костного мозга и лейкоцитов

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Испытаниям подвергались пробы лейкоцитов и клеток костного мозга перед замораживанием, а также размороженные после ультранизкотемпературного консервирования с применением в качестве ограждающих растворов криозащитных сред на основе 94%-ного глицерина (ГОСТ 6824-54) и N,N-диметилацетамида (ДМАЦ) квалификации х. ч. (ГУ-6-09-537-73) производства Шосткинского завода химреактивов.

Лейкоциты и клетки костного мозга замораживали в гофрированных алюминиевых контейнерах КВ-25808 (емкостью 50 мл) и КВ 581600 (емкостью 250 мл) в аппарате для автоматического программного замораживания ядерных клеток крови и костного мозга АЗКМ-01, созданном Институтом кибернетики АН ГССР совместно с учеными службы крови МЗ ГССР. Скорости замораживания лейкомаcсы и клеток костного мозга составляли в случае ограждающего раствора на основе глицерина — один градус в минуту до температур минус 13°C — минус 15°C; в дальнейшем скорость охлаждения составляет 10°C/мин до температуры минус 196°C; для криозащитной среды на основе ДМАЦ скорость замораживания составляла 3°C/мин от начала и до конца цикла замораживания.

На жизнеспособность исследовались клетки, хранившиеся при температуре жидкого азота — 196°C в те-

разными методами. Жизнеспособность свежих и размороженных клеток оценивалась по их способности выделять интерферон и по эозиновой пробе.

Целью исследований являлось повышение достоверности определения жизнеспособности деконсервированных клеток костного мозга и лейкоцитов предложенным способом на основании анализа изменения критериев оценки функциональной активности. В качестве критериев оценки приняты: метод суправитального окрашивания эозином — процент живых лейкоцитов и миелокардиоцитов; тест интерферонообразования при различных концентрациях клеток.

Испытания проводились в течение 6 дней, 2 месяцев, 6 месяцев и 1 года [3]. Клетки, подвергнутые низкотемпературному консервированию, размораживали на водяной бане при температуре $40 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1—2 мин и после отмывания от криофлактических веществ проверяли на жизнеспособность методом суправитальной окраски 1%-ным водным раствором эозина [11] и по тесту интерферонообразования при различных концентрациях клеток.

Клетки костного мозга и лейкоциты как свежие, так и после деконсервации ресуспендировались в среде 199 с конечными концентрациями 10^5 , 10^6 , и 10^7 клеток в 1 мл среды и обрабатывались вирусом-индуктором (вирус болезни Ньюкасла) в количестве 10—100 ЦПД₅₀ на одну клетку или 100—200 гемагглютинирующих единиц на 1 мл. Суспензии клеток ставили на инкубацию при 37°C в течение 18—20 ч. Затем клетки отделяли центрифугированием взвеси при 2 000—3 000 об/мин в течение 15 мин. Оценка интерферонсинтезирующей способности клеток костного мозга и лейкоцитов проводилась по определению титров выработанного ими интерферона в надосадочной жидкости. Титрация интерферона осуществлялась на клетках человеческих фибробластов против 100 ЦПД₅₀ вируса ве-
зикулярного стоматита.



Как видно из табл. 1 и 2, как свежее, так и размороженные после криоконсервации клетки костного мозга и лейкоциты способны продуцировать интерферон в ответ на вирусную индукцию. С повышением концентрации клеток в единице объема повышаются и титры продуцируемого клетками интерферона. Так, при концентрации лейкоцитов и клеток кост-

дуцируемого размороженными клетками, равняются 40 ед/мл, а при использовании ДМАЦ в качестве криопротектора титры интерферона составляли 160 ед/мл. Концентрация клеток в единице объема в обоих случаях одинакова — 10^7 клеток в 1 мл. При этом физико-химические свойства и биологическая активность интерферона, полученного из декон-

Таблица 1

Определение функциональной активности лейкоцитов

Проба лейкоцитов			Метод Шрэка	Тест интерферонообразования		
				% живых лейкоцитов	Активность интерферона в ед/мл	
			концентрация клеток в 1 мл			10 ⁵
Свежая			98	40	160	320
Размороженная	Криопротектор	ДМАЦ	89	20	80	160
		Глицерин	78	5	20	40

Таблица 2

Оценка функциональной активности клеток костного мозга

Проба костного мозга			Метод Шрэка	Тест интерферонообразования		
				% живых миеелокарицитов	Активность интерферона в ед/мл	
			Концентрация клеток в 1 мл			10 ⁵
Свежая			97	40	160	320
Размороженная	Криопротектор	ДМАЦ	90	20	80	160
		Глицерин	84	10	40	80

ного мозга 10^5 в 1 мл титры выработанного ими интерферона равняются 20 ед/мл, при концентрации 10^6 в 1 мл — 80 ед/мл и при концентрации 10^7 в 1 мл — 60 ед/мл. Такая же закономерность обнаруживается и при опытах со свежими лейкоцитами и клетками костного мозга.

Кроме того, большое значение имеет и криопротектор, используемый для криоконсервации клеток. Так при использовании глицерина как криопротектора титры интерферона, про-

сервированных клеток, не отличалась от свойств интерферона, продуцированного свежими лейкоцитами и клетками костного мозга.

На основании анализа диаграмм изменения критериев оценки функциональной активности клеток костного мозга и лейкоцитов (рис. 1,2) можно сделать вывод, что предложенный способ существенно повышает достоверность характеристики функциональной активности клеток. Следовательно, интенсивность продуцирования



интерферона размороженными лейкоцитами и клетками костного мозга может быть использована в качестве показателя их функциональной активности.

Предлагаемый тест интенсивности интерферообразования, несомненно, обогатит современный арсенал средств оценки функциональной активности

шей точки зрения, таким наиболее информативным критерием оценки функциональной активности является интерферонпродуцирующая активность размороженных клеток. Поскольку для образования белка — интерферона — необходим полный цикл биохимических процессов живой функционально активной клетки, то способность

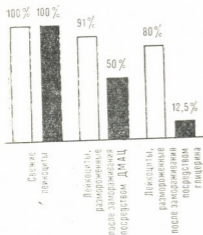


Рис. 1. Диаграмма изменения критерия оценки функциональной активности лейкоцитов: □ — по методу Шрэка; ■ — по тесту интерферообразования

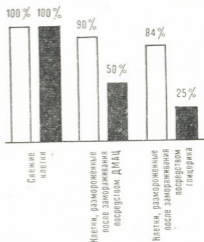


Рис. 2. Диаграмма изменения критерия оценки функциональной активности клеток костного мозга: □ — по методу Шрэка; ■ — по тесту интерферообразования

деконсервированных клеток. Данный способ, благодаря полноте и достоверности такой оценки, найдет широкое применение как в теоретической, так и практической гематологии, а также в трансфузиологии и в практике трансплантации костного мозга.

Он может быть использован в клинике лучевых поражений и заболеваний системы крови, а также будет способствовать дальнейшему прогрессу проблемы консервирования. С на-

клетки к биосинтезу интерферона, а также интенсивность самого интерферообразования могут достоверно и с достаточной полнотой свидетельствовать об уровне ее функциональной активности.

Предлагаемый тест позволяет дать заключение о жизнеспособности деконсервированных клеток костного мозга и лейкоцитов по интенсивности продуцирования ими интерферона в ответ на вирусную индукцию.

ЛИТЕРАТУРА

- Абдулкадыров К. М., Шаболин В. Н. В кн.: Трансплантация костного мозга. «Медицина», М., 1976, 23—31.
- Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. «Медицина», М., 1983.
- Георгадзе И. И., Каличава Л. Х., Махатадзе И. К., Чигогидзе Н. Ш.

- Состав для низкотемпературного консервирования лейкоцитов, А. с. № 813844, Б.И., II, 1980.
- Лобынцева Г. С., Шербак Г. М., Поляксова Л. И. В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины, «Наукова думка», Киев, 1974, 69—70.
- Михайлов В. Г. Консервация костного мозга, «Медицина», М., 1979.



6. Обозная Э. И. В. кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины, „Наукова думка“, Киев, 1974, 83—85.

7. Пушкарь Н. С., Лобинцева Г. С., Полякова А. И. Пробл. гематологии и переливания крови, 8.8—13, 1978.

8. Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойников Г. В., Останкова Л. В. Криобиология и криомедицина, 3, 57—59, 1977.

9. Шенберг М. Г., Маркова Ф. П., Обозная Э. И. В кн: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины „Наукова думка“, Киев, 1974, 131—133.

10. Ashwood-Smith M. J. In: Bone-marrow conservation. Culture and Transplantation. Proc. of a Panel, Moscow, 1969, Vienna, 1969, 2.

11. Schrek R. Amer. J. Cancer., 28, 389—391, 1936.

დაბალ ტემპერატურაზე კონსერვირებული და შემდგომ გამღვალნი ძვლის ტვინის უჯრედების და ლეიკოციტების ფუნქციონალური აქტიურობის შეფასება

ი. გიორგაძე, ნ. ჩიგოგიძე, ი. მახათაძე, ლ. ხალიჩავა

საკავშირო განმრთელობის დაცვის სამინისტროს თბილისის ვაქცინებისა და შრატების სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

დაბალ ტემპერატურაზე კონსერვირებული და შემდეგ გამღვალი ძვლის ტვინის უჯრედების და ლეიკოციტების მიერ ინტერფერონის გამომუშავების ინტენსიურობის ხარისხი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას როგორც ტესტი ამ უჯრედების ფუნქციონალური აქტიურობის განსაზღვრავად. იმუნოლოგიაში და სისხლის გადასხმის პრაქტიკაში არსებულ სხვა ტესტებთან ერთად.

აღნიშნული უჯრედების მიერ ინტერ-

ფერონის ბიოსინთეზის უნარის ხარისხი, და შესაბამისად ფუნქციონალური აქტიურობა განისაზღვრება მათ მიერ გამომუშავებული ინტერფერონის ტიტრებით. უჯრედების კონცენტრაციის გაზრდით მოცულობის ერთეულში იზრდება გამომუშავებული ინტერფერონის ტიტრი, და უკანასკნელი მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული უჯრედების გასაყინად გამოყენებული კრიოპროტექტორ (კრიოდამცველ) ნივთიერებაზე.

ESTIMATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF UNFROZEN AFTER LOW TEMPERATURE CONSERVATION BONE MARROW CELLS AND LEUCOCYTES

I. I. GEORGADZE, N. SH. CHIGOGIDZE, I. K. MAKHATADZE, L. KH. KALICHAVA

Institute of Vaccines and Sera, Ministry of Health, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The intensity of interferon production of unfrozen after low temperature conservation bone marrow cells and leucocytes can be utilized for determination of their functional activity as well as a test in of haematology and blood transfusion. The

intensity of interferon synthesis determined titer of interferon, released by these cells. With increase of cell concentration volume increases the titer of interferon, that markedly depends on utilized cryoprotector.

УДК 616—002.77 : 576.8.077.3

ИММУНОЛОГИЯ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕВМАТИЗМА

Л. О. Киласония

Тбилисский государственный медицинский институт

Поступила в редакцию 19.11.1984

Обследовано 130 больных с различными клиническими формами ревматизма. Иммунологическое обследование включало количественную оценку основных популяций Т- и В-лимфоцитов (Е-РОК, ЕАС-РОК, ОКТ3) и субпопуляций Т-лимфоцитов (Т_h, Т_у, ОКТ4, ОКТ8). Одновременно проводилась функциональная характеристика иммунорегуляторных Т-лимфоцитов. Изучали некоторые показатели естественной резистентности путем определения концентрации иммуноглобулинов и С3 фракции комплемента в сыворотке обследуемых лиц. Установлено, что для больных ревматизмом характерно состояние Т-клеточного дефицита с нарушением соотношения в иммунорегуляторных субпопуляциях при увеличении функциональной активности супрессорных лимфоцитов.

Указанные изменения находятся в связи с клиническим течением заболевания, активностью ревматического процесса. Допускается патогенетическая роль иммунорегуляторных нарушений в возникновении и прогрессировании заболевания.

Важная роль иммунных нарушений в развитии клинических проявлений и характера течения ревматизма признана многими исследователями. Необходимость полноценной оценки иммунной системы стала еще более ощутимой в последние годы в связи с нарастанием затяжных и латентных форм ревматизма, при которых клинические и лабораторные показатели воспалительного процесса часто выражены слабо или вовсе отсутствуют. И хотя сегодня ревматологическая клиника располагает методами, с помощью которых возможна объективная оценка иммунной системы организма, следует признать, что иммунный ответ, особенно клеточное его звено, при современном варианте ревматизма изучено недостаточно. Доказано, что во многих случаях ха-

рактеристика общей популяции Т- и В-лимфоцитов не всегда отражает степень иммунологических нарушений в организме. Предложены и интенсивно разрабатываются количественные и функциональные методы оценки субпопуляции лимфоцитов. В доступной нам литературе мы не встретили работ, отражающих характер взаимосвязи между отдельными иммунорегуляторными субпопуляциями в зависимости от клинического течения заболевания, активности процесса и проводимого лечения.

В представленном сообщении мы поставили целью провести комплексное исследование клеточного и гуморального звена иммунитета у больных ревматизмом в зависимости от клинического течения заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Было обследовано 130 больных ревматизмом в возрасте от 18 до 65 лет и 40 практически здоровых лиц молодого возраста. Диагноз заболева-

ния во всех случаях соответствовал критериям Джонс-Кисель-Нестерова.

Неактивная фаза ревматизма отмечена у 69 больных, I степень актив-

ности — у 25, II — у 23, III — у 13. В 10 случаях основной причиной госпитализации являлся ревматический полиартрит. У 15 больных диагностирован ревмокардит без поражения клапанного аппарата сердца. У 105 больных наблюдались ревматические пороки сердца. Недостаточность митрального клапана — у 44, сложный митральный порок — у 61. Недостаточность кровообращения I и II А стадии констатировали в 72 случаях.

Иммунную систему организма оценивали по следующим показателям. Для идентификации Т-лимфоцитов использовали традиционные методы, основанные на способности Т-лимфоцитов образовывать «тотальные» Е-РОК [10]. Изучали субпопуляции Т-лимфоцитов с поверхностными Fc рецепторами для $I_g G (T_H)$ и $I_g M (T_H)$, а также с применением моноклональных антисывороток ОКТ3, ОКТ4, ОКТ8 (USA, Orthoclone). Определяли исходную супрессорную активность лимфоцитов [16]. Функции лимфокинсинтезирующих Т-клеток исследовали в реакции торможения миграции лейкоцитов [14]. Во всех случаях учитывалось количество В-комplementарных и розеткообразующих лимфоцитов [4, 12]. Общее иммунологическое исследование включало изучение иммуноглобулинов классов G, A, M и C 3 фракции комплемента в сыворотке крови [11].

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколл-верографина по методу Боум [6]. Определяли количество общих Е-рокеткообразующих клеток (Е-РОК). Используя эритроциты барана, предварительно обработанные нейрамнидазой, проводили также Е-рокеткообразование с полученной суспензией мононуклеарных клеток. После часовой инкубации при 4°C суспензию, содержащую Е-рокетки, наслаивали на градиент плотности фиколл-верографина ($D = 1.077 \text{ г/мл}$) и центрифугировали при 400 g в течение 20 мин. Осажденные Е-РОК обрабатывали 0,85%-ным раствором NH_4Cl для лизиса эритроцитов и трижды отмывали средой № 199. После двойного разделения на градиенте полученная суспензия клеток содержала до 97% Е-РОК.

Определение Т-супрессоров и Т-хелперов проводили в тесте розеткообра-

зования [8, 13]. В качестве индикаторных частиц использовали эритроциты быка, сенсibilизированные кроличьими антителами $I_g G$ и $I_g M$ против этих эритроцитов. 0,1 мл очищенных Т-лимфоцитов доноров или больных смешивали с 0,1 мл эритроцитов быка, обработанными $I_g G (T_H)$, и инкубировали при 4°C 2 ч. Для выявления Т-хелперов очищенные Т-лимфоциты инкубировали 20 ч в среде 199, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки крови при 37°C. После инкубации клетки отмывали 2 раза средой 199 и готовили суспензию в концентрации $2 \times 10^6 \text{ кл/мл}$. К 0,1 мл суспензии лимфоцитов добавляли 0,1 мл 1%-ных эритроцитов быка, сенсibilизированных $I_g M$, и инкубировали 2 ч при 4°C. Подсчет клеток проводили в мазках, фиксированных метанолом и окрашенных азур-эозином.

Определение клеток-фенотипов ОКТ3, ОКТ4, ОКТ8 проводилось в реакции непрямой иммуофлюоресценции [5, 15]. Лимфоциты, выделенные на градиенте фиколл-верографина, трижды промывали средой RPMI 1640 (Flou lab.) и доводили до концентрации 5×10^6 в 1 мл. В пробирках объемом $12 \times 74 \text{ мм}^3$ к исходному количеству лимфоцитов добавляли моноклональные антитела (ОКТ3, ОКТ4, ОКТ8) в концентрации 5 мкг и инкубировали в холодильнике в течение 30 мин. Затем взвесь лимфоцитов с моноклональными антисыворотками три раза промывали холодным раствором фосфат-буфера (pH 7,2—7,4) и заново инкубировали в течение 30 мин на холоде с очищенными, окрашенными флюоресцентном кроличьими антителами против мышинных иммуноглобулинов в концентрации 100 мкг. Контролем служили клетки, инкубированные покрытыми флюоресцентном антителами кролика против мышинных иммуноглобулинов. Трижды отмытые клетки помещали на предметное стекло, мазок высушивали на воздухе, фиксировали 5 мин в этаноле. Количественное определение окрашенных клеток проводили с помощью люминесцентной микроскопии.

Спонтанную супрессорную активность лимфоцитов изучали в реакции бласттрансформации лимфоцитов тест-клеток доноров. Мононуклеарные клетки, без предварительного культи-

вирования с конканавалином-А, обрабатывали митомцином С в дозе 40 мкг/мл, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, дважды отмывали от митомцина средой № 199 и добавляли к тест-клеткам донора в соотношении 1:1; в качестве стимулятора использовали ФГА (Difco) в концентрации 1:100 исходного разведения. Супрессорную функцию лимфоцитов оценивали по проценту угнетения или активации индекса стимуляции реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) тест-клеток донора. Контролем служили культуры тест-клеток, стимулированные в течение 72 ч ФГА.

В реакции торможения миграции

лимфоцитов РТМЛ в качестве антигена использовали аутосыворотку обследуемых лиц (АС). За норму принимали миграционный индекс 80—120% (ИМ).

Для оценки количества В-лимфоцитов использовали стандартный метод ЕАС-розеткообразования. Одновременно изучали количество В-лимфоцитов, образующих розетки с эритроцитами мыши. Концентрацию иммуноглобулинов классов G, A, M и C3 фракции комплемента в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии с применением моноспецифических антисывороток производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. А. Ф. Гамалея.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали (табл. 1), что у больных ревматизмом выявляются существенные изменения исходного количества как основной популяции, так и субпопуляции Т-лимфоцитов. Уменьшение числа суммарных Т-лимфоцитов в группе больных ревматическим полиартритом ($39,56 \pm 1,55\%$) и при ревмокардите ($40,60 \pm 1,27\%$) по сравнению со здоровыми оказалось статистически достоверным ($p < 0,001$), однако между показателями этих двух групп статистически достоверные различия не были зарегистрированы. Наименьшее содержание Т-лимфоцитов ($31,89 \pm 0,45\%$) обнаружено в группе больных с пороками сердца ($p < 0,001$). Локализация порока не оказывала существенного влияния на состояние иммунного ответа.

Во всех исследуемых группах выявлено нарушение соотношения в Т-клеточных субпопуляциях. Уровень Т-супрессоров в группе больных ревмокардитом оказался достоверно выше, чем в контрольной группе ($18,20 \pm 0,99\%$). Более умеренное увеличение T_H лимфоцитов отмечено в группе больных полиартритом ($16,38 \pm 1,11\%$). Иначе менялось число T_M клеток. Содержание Т-хелперов прогрессивно снижалось у больных ревматическим полиартритом ($26,70 \pm 0,39\%$), в группе больных ревмокардитом ($25,40 \pm 1,12\%$), достигая наиболее низких показателей у больных с пороками сердца ($20,28 \pm 0,39\%$).

При сопоставлении результатов изу-

чения Т-субпопуляций лимфоцитов (Е-РОК, T_M , T_H) с содержанием клеток, реагирующих с ОКТЗ, ОКТ4, ОКТ8, у больных ревматизмом было установлено, что количество ОКТЗ клеток в первых двух группах достоверно снижено по сравнению с контролем ($44,0 \pm 9,45$ и $40,5 \pm 5,61$, $p < 0,001$).

Наблюдается тенденция к увеличению содержания клеток-фенотипов ОКТ8 ($27,5 \pm 1,84\%$ при полиартрите и $29,41 \pm 1,70$ при ревмокардите). Уменьшение содержания ОКТ4 клеток в группе больных ревматическим полиартритом ($31,37 \pm 2,40\%$) и при ревмокардите ($29,75 \pm 2,46\%$) по сравнению с контрольными показателями носило статистический значимый характер ($p < 0,001$). Диспропорция Т-субпопуляций лимфоцитов более выражена у больных с пороками сердца при выраженном снижении числа ОКТЗ клеток.

Изменение Т-клеточных субпопуляций находится в связи с активностью ревматического процесса (табл. 2). С нарастанием активности происходит усугубление этих показателей. Уменьшение количества Т-лимфоцитов ($22,82 \pm 3,11\%$ для Е-РОК и $32,00 \pm 2,01\%$ для ОКТЗ) наиболее выражено у больных с III степенью активности ревматического процесса. Статистически достоверных различий в показателях числа клеток-фенотипов ОКТ4 в зависимости от активности процесса мы не нашли. Активация ревматизма сопровождается увеличе-

Показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных ревматизмом

Показатели	Доноры (n=40)	Ревматический полнартрит (n=10)	Ревмокардит (n=15)	Пороки сердца (n=105)
Е - РОК (%)	53,44 ± 0,79	39,56 ± 1,55*	40,60 ± 1,27*	31,89 ± 0,45*
T _m (%)	40,60 ± 0,10	26,70 ± 0,39*	25,40 ± 1,12*	20,28 ± 0,39*
T _y (%)	11,70 ± 0,51	16,38 ± 1,11	18,20 ± 0,99*	21,14 ± 0,79*
ОКТ 3 (%)	69,82 ± 1,60	44,00 ± 9,45*	40,50 ± 5,61*	37,60 ± 3,80*
ОКТ 4 (%)	45,00 ± 1,43	31,37 ± 2,40*	29,75 ± 2,46*	32,02 ± 5,38*
ОКТ 8 (%)	25,20 ± 1,70	27,50 ± 1,84	29,41 ± 1,0	37,11 ± 2,69*
ИС (%)	14,32 ± 5,68	16,80 ± 9,44	24,00 ± 7,03	44,09 ± 8,66*
ИМ (%)	89,25 ± 3,80	63,80 ± 4,94	67,50 ± 2,50	51,00 ± 2,61*
М - РОК (%)	7,63 ± 0,42	7,84 ± 0,85	8,30 ± 0,71	5,51 ± 0,22*
ЕАС - РОК (%)	18,80 ± 0,62	14,00 ± 1,06	17,78 ± 0,99	12,79 ± 0,33*
Ig G (мг %)	1622,00 ± 87,71	1712,80 ± 325,02	1480,00 ± 119,84	1472,28 ± 163,22
Ig A (мг %)	124,29 ± 9,32	239,70 ± 58,82*	231,45 ± 72,62*	317,31 ± 31,54*
Ig M (мг %)	103,57 ± 8,93	88,90 ± 8,37	83,00 ± 21,33	102,13 ± 16,18
СЗ (мг %)	113,40 ± 11,62	93,52 ± 2,19	80,37 ± 8,48	83,11 ± 11,15

*р — достоверность различий по сравнению с контролем

нием числа Т-супрессоров, более выраженном при максимальной степени активности (22,09 ± 3,21% для T_y и 36,00 ± 2,19% для ОКТ8, p < 0,001).

При изучении функциональной активности лимфоцитов в реакции бластотрансформации тест-клеток доноров было установлено, что индекс супрессии у больных ревматическим полнартритом (16,80 ± 9,44%) и при ревмокардите (24,0 ± 7,03%) выше, чем

по сравнению с показателями 1-й и 2-й групп (p < 0,05) и с контролем (p < 0,001).

Таким образом, результаты наших исследований показали, что у больных ревматизмом при снижении содержания Т-лимфоцитов в крови резко нарушается соотношение Т-субпопуляции лимфоцитов, выражающееся увеличением численности Т-супрессо-

Таблица 2

Процентное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов у больных ревматизмом в зависимости от активности процесса (M ± m)

Активность ревматизма	Число обследованных	Е-РОК	T _m	T _y	ОКСЗ	ОКТ4	ОКТ8
1. Неактивный	69	38,41 ± ± 1,21	30,18 ± ± 1,21	18,91 ± ± 4,11	46,50 ± ± 1,22	29,25 ± ± 3,09	27,01 ± ± 1,13
2. I степень	25	33,58 ± ± 2,08	25,71 ± ± 2,11	19,33 ± ± 3,18	44,29 ± ± 1,73	28,14 ± ± 1,41	29,4 ± ± 1,70
3. II степень	23	26,18 ± ± 1,19	17,46 ± ± 2,16	20,71 ± ± 1,08	39,00 ± ± 1,64	24,00 ± ± 2,23	30,86 ± ± 4,87
4. III степень	13	22,82 ± ± 3,11	16,46 ± ± 3,21	22,09 ± ± 1,18	32,00 ± ± 2,01	27,42 ± ± 1,56	36,00 ± ± 2,19

Примечание: *р — достоверность различий при сравнении 1 с 3

**р — то же при сравнении 1 с 4

у здоровых лиц, однако разница статистически оказалась недостоверной. Индекс супрессии (ИС) в группе больных с пороками сердца составил 44,09 ± 8,66% и был достоверно повы-

шен при уменьшении числа Т-хелперов.

Снижение уровня Т-лимфоцитов, изменение в Т-клеточных субпопуляциях коррелируют с клиническим те-

чением заболевания, активностью ревматического процесса. При сравнительном анализе содержания Т-супрессоров с индексом неспецифической супрессии в исследуемых группах выявлено, что на ранних стадиях у больных полиартритом и при ревмокардите между увеличением числа T_H клеток и супрессорной активностью нет четкой корреляции. При хроническом же процессе у больных с пороками сердца нарастание Т-супрессоров сочетается с увеличением неспецифической супрессорной активности лимфоцитов. Обнаруженный факт может свидетельствовать о том, что в наших исследованиях выявляемая супрессия является зависимым от Т-клеток феноменом, а существенное увеличение численности T_H клеток у больных с пороками сердца происходит в основном за счет активных Т-супрессоров.

Учитывая современные представления о роли Т-супрессоров в развитии и поддержании иммунологической толерантности [3, 5, 7] в регуляции иммунного ответа, на основании полученных результатов можно предположить, что увеличение количества Т-супрессоров у больных ревматизмом может способствовать персистенции инфекции и обеспечивать хроническое течение заболевания.

При изучении РТМЛ мы применяли АС. В контрольной группе у всех обследованных отмечалась отчетливая миграция клеток при применении АС (ИМ = $89,25 \pm 3,80\%$). Средняя величина ИМ у больных ревмокардитом при стимуляции клеток АС составила $67,5 \pm 2,50\%$, приближаясь к нижней границе нормы. Разница средних величин ИМ у больных ревматическим полиартритом ($63,8 \pm 4,94\%$) по сравнению с контрольной группой статистически оказалась недостоверной. Наиболее выраженное торможение миграции лейкоцитов наблюдалось у больных с пороками сердца. ИМ при стимуляции клеток АС в среднем составлял $51,0 \pm 2,61\%$ и был достоверно понижен по сравнению с показателями у здоровых ($p < 0,001$). По литературным данным

при ревматизме наблюдается продукция фактора, ингибирующего миграцию лейкоцитов при стимуляции стрептококковым антигеном I, таким образом отражая степень специфической сенсibilизации лимфоцитов. Результаты наших исследований свидетельствуют, что выраженная ингибция миграции лейкоцитов при стимуляции АС у больных ревматизмом не является специфическим феноменом, а скорее всего отражает измененную реактивность клеток в результате патологического процесса.

Менее закономерные сдвиги были выявлены при количественном изучении содержания В-лимфоцитов у больных ревматизмом (табл. 1). Не выявлена статистически достоверная разница между изменением их числа и формами, активностью ревматического процесса. У больных ревматизмом наблюдается увеличение концентрации I_{gA} в сыворотке крови, что находится в тесной связи с активностью процесса и с тяжестью течения заболевания.

Комплементарная активность сыворотки больных ревматизмом, концентрация С3 фракции комплемента достоверных изменений по сравнению с контролем не претерпевала.

Таким образом, для ревматизма характерно состояние дефицита клеточного иммунного ответа, выражающегося снижением содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов; одновременно нарастает количество Т-супрессоров. Наличие взаимосвязи между клиническим течением заболевания и увеличением численности Т-супрессоров позволяет предположить патогенетическую роль последних при ревматизме. Изменение иммунологических показателей уже на ранних стадиях болезни с характерным дисбалансом в Т-субпопуляциях может быть использовано для ранней иммунодиагностики активности ревматического процесса.


Не исключено, что в основе активации ревматического процесса лежат сдвиги в сторону усиления супрессорной активности лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова А. М. Вопросы ревматизма, 1978, 4, 27—32.
2. Зимин Ю. И. Иммунология, 1, 29—33, 1982.
3. Ковальчук Л. В. Тимусзависимая иммунологическая недостаточность, Докт. дисс., М., 1982.
4. Чередеев А. Н., Грунов Р., Ко-

ვალეჩუკ ჯ. ვ. *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 89, 7, 70—73, 1980.

5. Gupta S. *Immunology*, 3, 129—133, 1982.
6. Boyum A. *Tissue Antigens*, 4, 269—274, 1974.
7. Gershon R. *Immunology*, 26, 909—923, 1974.
8. Gupta., Good R. *Clin. Exp. Immunol.*, 30, 222—227, 1977.
9. Gupta S., Good R. *Cell Immunol.*, 39, 10—28, 1977.
10. Jondal M., Holm G., Nigzele H. *J. Exp. Med.*, 136, 207, 1972.
11. Mancini G., Carbonara A. O.,

- 
- Heremans I. F. *Immunochimistry*, 2, 235—237, 1965.
12. Mendes N., Miku S. *ქართული მედიცინის საზოგადოებასი*
J. Immunol., 113, 532, 1974.
 13. Moretta L., Mingari M. C., Romanzi C. A. *Nature*, 272, 618—620, 1978.
 14. Soborg M., Bendixen G. *Acta med. scand.*, 181, 247—256, 1967.
 15. Schwartz S., Show L., Good R., Choi V., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 2099—2103, 1977.
 16. Reinherz E., Schlossman S. N. *Engl. J. Med.*, 7, 300—373, 1980.

იმუნური პასუხის თავისებურებანი რევმატიზმის დროს

ლ. კილასონია

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

რევმატიზმით დაავადებულთა იმუნოლოგიურმა გამოკვლევამ გამოავლინა T-უჯრედოვანი იმუნიტეტის მაჩვენებლების მნიშვნელოვანი ძვრები, კერძოდ T-ლიმფოციტების, T-ხელპერების რაოდენობის შემცირება, T-სუპრესორების მატება. ეს ძვრები ხდება დაავადების ადრეულ სტადიებში, რევმატიული პოლიართრიტისა და რევმატიული კარდიტის დროს. პროცესის პროგრესირებასთან ერთად, გულის რევმატიული მანკების დროს, დისპროპორცია

იმუნორეგულატორული ლიმფოციტების სუბპოპულაციებში უფრო მკაფიოა; T-სუპრესორების რაოდენობრივ მატებასთან ერთად მატულობს ფუნქციური აქტიურობაც.

უნდა ვივარაუდოთ, რომ სტრუქტოკოკით ინფიცირებისას რევმატიზმის განვითარებაში გადამწყვეტ როლს ასრულებს ლიმფოციტების სუპრესორული აქტიურობის მატება.

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF RHEUMATIC FEVER

L. O. KILASONIA

Tbilisi State Medical Institute, USSR

Summary

In 130 patients [with rheumatic fever] the correlation between immunoregulative subpopulations in the peripheral blood was studied.

It was established that deficiency of cellular immune response expressed in the reduction of the number of E-rosette and T-helpers formative cells is characteristic of rheumatic fe-

ver. The mentioned changes are correlated with the clinical course and activity of the rheumatic process and have been registered in the early stages of the disease.

It is supposed that [changes in the direction of increasing T-lymphocytes suppressive activity] underlie the activation of the rheumatic process.

УДК 616—001.28 : 591.3

РАДИОБИОЛОГИЯ

ДЕЙСТВИЕ X-ЛУЧЕЙ НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАННЕЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША ЛЯГУШКИ

В. В. Тевдорадзе, К. Ш. Надарейшвили

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

Поступила в редакцию 17.09.1986

С использованием микроэлектрофизиологической техники проведено сравнительное исследование динамики изменений мембранного потенциала (МП), входного сопротивления ($R_{вх}$) и коэффициента электрической связи ($K_{эс}$) между бластомерами в процессе первых делений дробления облученного и необлученного зародыша лягушки *Rana ridibunda*. Обнаружено, что облучение в дозе 12 Гр не изменяет цикличности изменений и абсолютных величин МП и $K_{эс}$, тогда как амплитуда циклических колебаний ($R_{вх}$) резко уменьшается. Обсуждаются возможные механизмы этого эффекта и перспективы исследования некоторых общих вопросов радиационной мембранологии.

Остановка развития и гибель зародыша после воздействия ионизирующего излучения является одним из первых фундаментальных фактов в радиобиологии, установленным еще в 1896 г. [15]. Эти факты послужили основой для развития нового направления исследований — радиационной эмбриологии. Спустя почти полвека были начаты систематические исследования механизма этого явления [1], позволившие получить доказательства о ведущей роли лучевого повреждения генетического аппарата [2, 3], а изменения радиочувствительности в процессе дробления были объяснены физико-химической гетерогенностью процесса редупликации хромосом [3, 7, 11]. Было установлено также, что изменения радиочувствительности в процессе дробления совпадают с изменениями содержания в клетке естественных радиопротекторов, в частности эндогенных тиолов [12, 14] и соединений, обладающих антиоксидантной способностью [4]. Вместе с тем были получены данные о значении цитоплазматических компонентов в реализации радиоэмбриологиче-

ского эффекта, включая обнаруженные вне хромосом мишени [17, 23].

Особенностью реакции дробящегося зародыша на воздействие ионизирующих излучений является устойчивость дробления к облучению. Показано, что дозы 10—100 кР не останавливают деления и развитие идет до стадии бластулы [9, 21]. Причиной такой устойчивости принято считать тот факт, что деление дробления не контролируется ядром и могут совершаться как в отсутствие ядра, так и при подавлении его функции [1, 2, 18, 20]. Отсюда следует, что информация, нужная для развития зародыша от момента оплодотворения до поздней бластулы, запасена в цитоплазме.

Другой характерной особенностью действия излучения на начальных стадиях развивающегося зародыша является периодическое чередование высокой и низкой радиочувствительности [6, 12, 13, 21]. Одним из возможных объяснений этого факта может быть следующее. Известно, что колебания радиочувствительности клетки хорошо коррелируют с фазами митоза. С другой стороны, раннее развитие зароды-

ша представляет собой синхронно протекающие клеточные деления. Поэтому все клетки одновременно достигают периода максимальной радиочувствительности и радиорезистентности. С началом дифференцировки, когда тотальная синхронность деления нарушается — периодичность в изменении радиочувствительности исчезает.

Электрофизиологические корреляты первых делений облученной оплодотворенной яйцеклетки пока еще не изучены. Между тем этот вопрос представляет определенный интерес как точки зрения участия мембранных процессов в реализации делений дробления, так и выявления тех изменений, которые не обнаруживаются по другим критериям оценки раннего этапа жизнедеятельности облученной яйцеклетки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служила оплодотворенная яйцеклетка лягушки *Rana ridibunda*. Для преждевременного созревания ооцитов самкам инъецировали приготовленную ex tempore суспензию гипофизов. Для искусственного осеменения у интактных самцов вырезали семенники, измель-

чающие ооциты легким нажатием на брюхо самки выдавливали из яйцеводов и помещали в заранее приготовленную суспензию спермия.

Первым признаком начавшегося развития служит поворот икринок анимальным полюсом вверх, а затем появление первых борозд дробления. Дальнейшие манипуляции и микрофизиологические исследования [10, 16] проводили по ранее описанной методике.

Функциональная схема микроэлектрофизиологического эксперимента представлена на рис. 1. Входное сопротивление зародыша измеряется методом, описанным Ходжкином и Работном и модифицированным для внутриклеточных регистраций Фетом и Катцом [19]. Суть его заключается в том, что измеряется скачок потенциала при подаче импульса постоянного тока на мембране — ΔU_1 и на эталонном сопротивлении ΔU_2 . Очевидно

$$R_{вх} = R_{эт} \frac{\Delta U_1}{\Delta U_2}. \text{ Облучение проводили}$$

на спаренной рентгеновской установке типа РУМ-17 при условиях: напряжение — 220 кВ, сила тока — 10 мА, фильтры — 0,5 мм Си и 1 мм Аi; мощность дозы 0,6 Гр/мин; суммарная доза — 12 Гр. Дозиметрический контроль осуществлен феросульфатным методом и электронным дозиметром VA-J-18 фирмы РФТ (ГДР). Яйцеклетки облучали через 2 ч после оплодотворения.

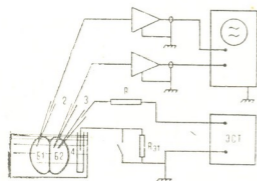


Рис. 1. Функциональная схема микроэлектрофизиологического эксперимента: 1, 2 — отводящие микроэлектроды; 3 — микроэлектрод для подачи импульса; 4 — индифферентный электрод; R — стабилизирующее сопротивление; $R_{эт}$ — эталонное сопротивление; B1, B2 — бластомеры

чали их ножницами в чашке Петри и заливали отстойной водой. Через 3—5 мин происходила физиологическая активация сперматозоидов, которая оценивалась визуально с помощью микроскопа по интенсивности их движения в суспензионной среде. Овулирую-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, на ранних стадиях развития процесс дробления характеризуется циклическим изменением МП и входного сопротивления ($R_{вх}$), продолжительность которого совпадает с

периодом митотического цикла [5, 8, 16]. На рис. 2 даны графики изменения средних величин МП, $R_{вх}$ и $K_{вх}$ в процессе дробления, полученные в контрольных опытах (А, Б, В) и пос-

ле облучения (а, б, в). При статистической обработке продолжительность клеточного цикла — время от появления борозд одного деления до появления борозд следующего, делили на четыре равные промежутки и значеня электрофизиологических параметров группировали в соответствующие моменты. Как видно из рис. 1, контрольные данные аналогичны тем, которые были получены ранее [5, 8, 10, 16], в том числе на яйцеклетках выюна [5, 8].

Для объяснения этого факта высказывались предположения [5, 22, 16], которые в общем виде можно представить следующим образом:

1. Эти колебания являются следствием изменений свойств самой мембраны blastomera, вызванных изменением ионного состава и кислотности цитоплазмы.

2. Электрические свойства мембран зародыша на ранних стадиях не претерпевают существенных изменений, происходит синтез новых мембран, периодическое включение которых изменяет общую электрическую структуру зародыша. Это и обуславливает циклические изменения МП и $R_{вх}$. Эти новые мембраны, разделяющие blastomeres, обладают более высокой калиевой проницаемостью [10] и низким удельным сопротивлением, чем внешняя мембрана. Нельзя, очевидно, исключить возможность совместного действия этих факторов.

При анализе данных надо учитывать также и то, что в мембранах, разделяющих blastomeres, имеются так называемые высокопроницаемые клеточные контакты (ВПК), структурные включения, которые обладают высокой проницаемостью для всех неорганических ионов и многих органических молекул. Благодаря ВПК происходит обмен информацией между blastomeres, согласованное их действие, физико-химический механизм которого пока еще не ясен. ВПК можно охарактеризовать его сопротивлением. Поэтому для зародыша важным параметром является так называемый коэффициент электрической связи $K_{эс}$. Его суть можно пояснить с помощью рис. 1.

В одном из blastomeres находятся два микроэлектрода: один регистрирующий, а другой — для подачи импульса тока. Во втором blastomere 4. Серия биологическая, т. 13, № 2

находится еще один регистрирующий микроэлектрод. При подаче такого импульса одновременно измеряются скачки МП микроэлектродами, находящимися в разных blastomeres. Коэффициентом электрической связи называется соотношение: $K_{эс} = \frac{V_2}{V_1}$

На основании морфологических и микроэлектрофизиологических данных была предложена эквивалентная электрическая схема зародыша [16], которая представлена на рис. 3. В эквивалентной электрической схеме учтено, что коэффициент электрической связи между blastomeres близок к единице (рис. 2В). По этой же причине схема остается в силе и на более поздних стадиях (пока $K_{эс}$ еще близок к единице).

Согласно этой схеме, для входного сопротивления и МП можно записать:

$$R_{вх} = \frac{R_1(R_2 + R_1)}{R_1 + R_2 + R_3}$$

$$МП = \frac{E_1(R_2 + R_3) + E_2 R_1}{R_1 + R_2 + R_3}$$

Из этих выражений видно, что измеренные в опыте $R_{вх}$ и МП не есть характеристика какой-нибудь одной мембраны. Кроме сопротивления мем-

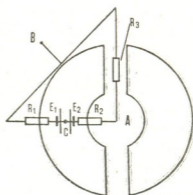


Рис. 2. Циклические изменения МП, $R_{вх}$ и $K_{эс}$ дробящегося зародыша лягушки; τ_0 — продолжительность клеточного цикла; стрелками показаны моменты появления борозд. Кривые А, Б, В — контроль, а, б, в — облучение в дозе 12 Гр. Каждая точка соответствует средним данным, полученным на 17 яйцеклетках. На кривые нанесены средние квадратические ошибки среднего

бранного потенциала отдельных мембран, $R_{вх}$ и МП зависит также от того, как эти мембраны включены между собой, т. е. от электрической структуры зародыша в целом.

Колебания $R_{вх}$ и МП можно объяснить следующим образом. После появления борозды деления или чуть позже в зародыш встраиваются новые мембраны с более низким удельным сопротивлением, чем наружная мембрана. Поэтому при сохранении высокой электрической связи, происходит постепенное уменьшение входного сопротивления зародыша и вклад E_2 в МП увеличивается. В конце цик-

Как видно из рис. 2 (а, б), после воздействия х-лучей в дозе 12 Гр не происходит нарушения циклических изменений МП и $R_{вх}$. Как же как и у необлученных зародышей, в процессе развития не меняется и близок к единице (рис. 2в). Величина МП в разных периодах клеточного цикла облученных оплодотворенных яйцеклеток не отличается от нормы. Вместе с этим после облучения наблюдается резко выраженное уменьшение входного сопротивления во всех фазах клеточного цикла. Эти факты говорят о том, что после воздействия ионизирующей радиации происходит увеличение проницаемости для всех потенциалообразующих ионов, тогда как относительная проницаемость для этих ионов не изменяется. Это, видимо, можно объяснить тем, что ионизирующая радиация не оказывает специфического воздействия на какой-либо один или группу ионных каналов, а вызывает изменения каналов всех видов.

Особо следует отметить, что различие в значении $R_{вх}$ в минимуме между облученными и контрольными зародышами менее выражено. Отсюда следует, что контактные мембраны, синтезируемые в облученных зародышах, с точки зрения электрических свойств мало отличаются от нормы. Однако указанные различия являются статистически достоверными ($P < 0,05$), что можно объяснить вкладом R_1 , величина которого после облучения, как было сказано выше, уменьшается.

Для более детального анализа рассмотренных выше данных необходимы дополнительные сведения, полученные в условиях фиксации потенциала и измерения емкостной составляющей импеданса blastomera, которая оказалась максимальной при минимальных значениях $R_{вх}$ и т. д. Ввиду того, что все эти вопросы представляют определенный интерес и в общемембранологическом аспекте, авторы сочли более целесообразным посвятить этим вопросам отдельную публикацию.

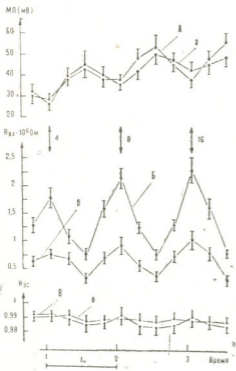


Рис. 3. Эквивалентная электрическая схема зародыша на стадии 2-х blastomeres; R_1 и R_2 — сопротивления соответственно внешней и внутренней мембраны; R_3 — сопротивление щели между blastomeres; E_1 и E_2 — ЭДС, генерируемые на этих мембранах

ла ширина щели уменьшается, ее сопротивление растет. Поэтому контактные мембраны, шунтирующие blastomeres, постепенно начинают отключаться от среды и входное сопротивление зародыша растет, а МП уменьшается, так как E_2 также отключается.



ЛИТЕРАТУРА

1. Астауров Б. Л. Биол. журн., 6, 1, 1—50, 1937.
2. Астауров Б. Л. Журн. общ. биол., 8, 6, 421—441, 1947.
3. Астауров Б. Л. Бюлл. МОИП, 63, 1, 35—50, 1958.
4. Бекепева Г. П., Пархоменко Н. М., Бурлакова Е. В. Радиобиология, 11, 1, 48—53, 1971.
5. Божкова В. П., Квავილავილი И. Ш., Ротт Н. Н., Чайлахян Л. М. Цитология, 16, 709—716, 1974.
6. Гелашвили Н. А. Сообщения АН ГССР, 34, 3, 703—710, 1964.
7. Долоне Н. Л. В кн.: Ионизирующие излучения и наследственность. М., Изд-во АН СССР, 1960, 155—174.
8. Квავილავილი И. Ш., Божкова В. П., Чайлахян Л. М. Онтогенез, 2, 425—430, 1971.
9. Нейфах А. А., Ротт Н. Н. ДАН СССР, 119, 2, 261—264, 1958.
10. Ониани Н. Т., Саганелидзе Г. Н., Тевдორадзе В. В. Изв. АН ГССР, Сер. биол., 9, 1, 59—62, 1983.
11. Прокофьева—Бельговская А. А. Цитология, 13, 437—447, 1961.
12. Смирнова И. Б., Лацис Р. В. ДАН СССР, 192, 4, 915—916, 1970.
13. Смирнова И. Б., Лацис Р. В. ДАН СССР, 203, 1, 254—256, 1972.
14. Смирнова И. Б., Лацис Р. В. Радиобиология, 13, 2, 277—280, 1973.
15. Тархан-Моурави (Тарханов) И. Р. Изв. Спб. биол. лаб., 1, вып. 3, 47—52, 1986.
16. Чиквашвили Д. Ш. Электрофизиологические характеристики мембран клеток зародышей лягушки *Rana ridibunda* в раннем развитии. Автореф. канд. дисс., Тбилиси, 1979.
17. Baxter R. C., Blair H. A. Radiat. Res., 39, 2, 345—360, 1969.
18. Fankhauser G. J. Exptl. Zool., 67, 3, 349—392, 1934.
19. Fatt P., Katz B. J. Physiol., 115, 320—370, 1951.
20. Harvey E. Biol. Bull., 79, 1, 166—187, 1940.
21. Henshaw P. S. Amer. J. Roentgenol., 43, 6, 899—907, 1940.
22. Woodward P. J. Gen. Physiol., 52, 509—531, 1968.
23. Würgler F. E., Lütolf H. U. Internat. J. Radiat. Biol., 21, 5, 455—463, 1972.

X-სხივების მოქმედება ბაყაყის ჩანასახის განვითარების
ადრეული სტადიის ელექტროფიზიოლოგიურ მახასიათებლებზე

3. თიანეთი, კ. ნაღარიშვილი

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

რეზიუმე

მიკროელექტროფიზიოლოგიური ტექნიკით შესწავლილ იქნა ბაყაყის (*Rana ridibunda*) დასხივებული და დაუსხივებელი ჩანასახის მემბრანული პოტენციალის შესავალ წინააღმდეგობასა და ბლასტომერებს შორის ელექტრული კავშირის კოეფიციენტის (K_კ) ცვლილების დინამიკა უკრედთა დანაწევრების ადრეულ სტადიაში. ნაჩვენებია, რომ 12 გრ დოზა არ ცვლის K_კ მემბრანული

პოტენციალის აბსოლუტურ სიდიდეს და ამ პოტენციალის ცვლილების ციკლურ ხასიათს, ხოლო R_{გვ}-ის ციკლური ცვლილებების ამპლიტუდა მკვეთრად იცვლება. განხილულია ამ ეფექტის შესაძლო მექანიზმი და რადიაციული მემბრანოლოგიის ზოგიერთი ზოგადი საკითხის კვლევის პერსპექტივები.

THE ACTION OF X-RAYS ON THE ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS IN EARLY STAGES OF DEVELOPMENT OF FROG EMBRYO



V. V. TEVDORADZE, K. SH. NADAREISHVILI

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

S u m m a r y

Using the microphysiological technique the comparative study of the dynamics of membrane potential changes (MP), input resistance (Ri) and the electrical coupling coefficient (Cec) between blastomeres has been studied during the first divisions of irradiated *Rana ridibunda* embryo. Irradiation in the dose of 12 Gy

was shown not to alter the recurrence of changes and absolute values of MP and Cec, while the amplitude of cyclic fluctuations of Ri significantly decreased. The possible mechanisms of this effect and the perspectives for the study of some general aspects of radiation membranology are discussed.

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ met- И CNmet-ГЕМОГЛОБИНОВ МЕТОДОМ ВОДОРОДНОГО ОБМЕНА (^1H — ^2H)

К. Ш. Джинория

*Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси
Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва*

Поступила в редакцию 25.12.1985

С помощью метода водородного обмена исследовано конформационное состояние met-(metHb) и CNmet-(CNmetHb) гемоглобинов.

Показано, что замена лиганда приводит к увеличению внутримолекулярной подвижности белка. При этом число независимых конформеров возрастает от двух для CNmetHb до четырех для metHb. Внутримолекулярная подвижность в различных формах гемоглобина увеличивается в следующей последовательности:



Для выяснения природы факторов, ответственных за скорость водородного обмена (ВО) в белке, представляет интерес сравнительное исследование ВО в metHb и CNmetHb. Высокоспинового metHb и низкоспиновые лигандные формы гемоглобина (Hb), имея практически одинаковые четвертичные и мало различающиеся третичные структуры, сильно отлича-

ются по устойчивости к денатурации и протеолитической деградации [4, 7].

В данной работе показано, что кислые конформеры metHb и CNmetHb различаются по скорости замещения во всех исследуемых методом ВО 80% пептидных Н-атомов, что имеет место не только в области низких, но и высоких температур [1].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Конформационное состояние metHb и CNmetHb исследовано с помощью метода ВО (^1H — ^2H) на ИК-спектрофотометре UR-10.

Безфосфатный metHb получали из HbO_2 , выделенного по методу Антонини и Брунори [5], добавлением феррицианида в соотношении 1М на 4М гема белка. После 30—40 мин инкубации при комнатной температуре для удаления избытка ферро- и

феррицианида пользовались методикой, предложенной Вайтом [8].

Безфосфатный CNmetHb получали из безфосфатного metHb. Для этого к metHb добавляли нейтрализованный водный раствор KCN в расчете на 1М гема 10 М KCN.

Все образцы проверяли соответствующими тестами на чистоту и нативность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования ВО CNmetHb проведены в области pH 5,1—9 и температур от 10°C до 63,5°C, а metHb — в области pH 5,1—9 и температур от 10°C до 48°C. На рис. 1 и 2 приведе-

ны кинетические кривые ВО, а на рис. 3 — те же кривые в координатах $X = f(\lg k_0 t)$, где k_0 — рассчитано по формуле Хвидт [6], а отношение $A_{\text{амид II}} / A_{\text{амид I}} = 0,500$.

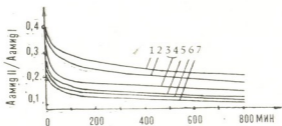


Рис. 1. ^1H - ^2H обмен пептидных Н-атомов metHb: 1—pH 5,1, 10°C , 0,05М ацетатный буфер; 2—pH 5,1, 20°C , 0,05М ацетатный буфер; 3—pH 6, 20°C , буфер 0,05М бис-трис; 4—pH 6,6, 20°C , 0,05М бис-трис; 5—pH 7,1, 20°C , 0,05М бис-трис, 0,1М NaCl; 6—pH 8, 20°C , 0,05М трис, 0,1М NaCl и 10^{-4}M ЭДТА; 7—pH 9, 20°C , 0,05М боратный буфер

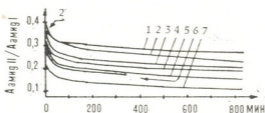


Рис. 2. ^1H - ^2H обмен пептидных Н-атомов CNmetHb: 1 и 2—pH 5,1, 0,05М ацетатный буфер 10 и 20°C соответственно; 3—pH 6, 20°C , буфер 0,05М бис-трис; 4—pH 6,6, 20°C , буфер 0,05М бис-трис; 5—pH 7,1, 20°C , буфер 0,05М бис-трис, 0,01М NaCl; 6—pH 8, 20°C , буфер 0,05М бис-трис или трисHCl, 0,1М NaCl, 10^{-4}M ЭДТА; 7—pH 9, 20°C , 0,05М боратный буфер. Во всех буферах присутствовал KCN в соотношении 10М на 1М белка

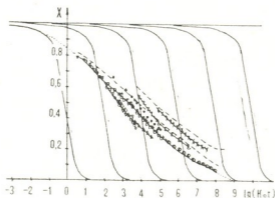


Рис. 3. Обобщенные кинетические кривые ВО пептидных Н-атомов metHb: pH 5,1, 10°C (∇), 20°C (\circ); pH 6, 20°C (Δ); pH 6,6, 20°C (\square); pH 7,1, 10°C (\odot), 20°C ($+$), 48°C (\oplus); pH 8, 20°C (z); pH 9, 20°C (x). k_0 —рассчитано по формуле Хвидт [6]. Сплошные тонкие линии—усредненные обобщенные кривые для 4 pH-зависимых конформеров metHb; точки—экстраполированные участки обобщенной кривой для второго конформера; пунктир—обобщенные кривые ВО в кислом и щелочном конформерах лигандного Hb; крайняя левая сплошная линия—обмен в PDLA в условиях полной доступности, $\rho = 1$. Последующие кривые смещены относительно друг друга с интервалом в 2 единицы $\lg(k_0 t)$, чему соответствует уменьшение ρ в 10^2 раз

Данные анализа кинетических кривых при различных значениях рН для metHb и для CNmetHb относительно metHb приведены на рис. 4. Детальный разбор анализа приведен в работе [2]. В случае с CNmetHb в отличие от HbO₂ и HbCO кривые при рН5,1, 10°C и рН9 (20°C) сильно отклонились от обобщенной кривой, поэтому данные для этих значений рН при расчетах, приведенных на рис. 4, не учитывались.

В координатах $X=f(\lg k_0 t)$ (рис. 3) кривые ВО для metHb сильно расходятся относительно друг друга. В этом случае при расчете величин смещений не учитывались сильно отклоняющийся от обобщенной кривой участок, соответствующий рН5,1 (20°C), и времена обмена более 500 мин, а также данные для рН9 и для времен ВО более 300 мин, где сильно возросли различия между кинетическими кривыми ВО при рН8 и 9. В этом случае фактор, характеризующий структурно-динамические свойства белка, ρ , мало изменяется при изменении рН от 5,1 до 6. А при увеличении рН от 6 до 6,6 ρ уменьшается в $2,7 \pm 0,7$ раз и претерпевает незначительные изменения (в пределах экспериментальной ошибки) в области рН6,6—7,1. При увеличении рН от 7,1 до 8 ρ уменьшается в $4,5 \pm 0,8$ раз и от рН8 до 9 — в $4,8 \pm 0,8$ раз (рис. 4).

Данные для кислого конформера лигандного Hb и других форм белка приведены в работе [2]. Так как экстраполяции соответствующих обобщенных кривых к $X=1$ и $X=0$ могут вносить большую неопределенность в значения величин $\langle \rho \rangle$, то $\langle \rho \rangle$ определяли сопоставлением обобщенных кривых ВО в областях, где они имеют одинаковые значения X с обобщенной кривой для кислого кон-

формера низкоспинового лигандного Hb. Расстояние между обобщенными кривыми определяли на основании данных, приведенных на рис. 3. Среднеарифметическую величину, характеризующую расстояние между обобщенными кривыми, в единицах $\lg(k_0 t)$ суммировали с $\langle \lg \rho \rangle$, определенным для кислого конформера взвешиванием. Таким образом опре-

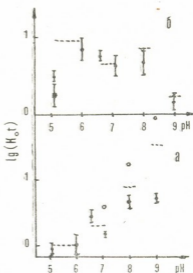


Рис. 4. Среднеарифметические величины смещений—в единицах $\lg(k_0 t)$ —относительно друг друга кинетических кривых соседних по величинам рН при 20°C в координатах $X=f(\lg k_0 t)$ —солонные кружки; вертикальные черточки—интервалы среднеквадратичных отклонений; полые кружки—условные суммарные среднеарифметические величины смещений в единицах $\lg(k_0 t)$ кинетических кривых относительно кривой для рН6; пунктирные линии—величины взаимных смещений, графически усредненных обобщенных кривых, соответствующих выделенным рН-зависимым конформерам белков: а) metHb; б) смещение кривых в CNmetHb относительно metHb; звездочкой обозначены различия между CNmetHb и metHb при 10°C.

деляли $\langle \rho \rangle$ для различных форм Hb и рН-зависимых конформеров. При анализе учтены различия, приведенные на рис. 4. Если среднеква-

дρασичный разброс для величины смещения анализируемой кривой относительно основной (для кислого конформера низкоспинового лигандного Hb) превышал средний разброс между параллельными экспериментальными кривыми, то величина наи-

кривых ВО, приведены величины $\langle \rho \rangle$, определенные путем взвешивания на основании систематически построенных обобщенных кривых ВО.

Для metHb основная обобщенная кривая построена из данных для

Таблица

Средние величины факторов замедления ВО и изменений свободной энергии при локальных трансформациях, обеспечивающих протекание реакций ВО в дезоксиHb и различных pH-зависимых конформерах низкоспинового лигандного Hb и metHb

Белок	pH	$-\langle \lg \rho \rangle$	$\langle \Delta G \rangle^1$ ккал/М	$\langle \Delta G \rangle^2$ ккал/М
ДезоксиHb	6,0—9,0	$4,90 \pm 0,12$	$6,60 \pm 0,16$	$6,6 \pm 0,2$
	5,1—7,1	$4,00 \pm 0,15$		$5,4 \pm 0,2$
	8,0—9,0	$4,80 \pm 0,07$	$6,50 \pm 0,16$	
metHb	5,1—6,0	$3,05 \pm 0,50$	$4,1 \pm 0,7$	
	6,6—7,1	$3,35 \pm 0,16$	$4,52 \pm 0,15$	$4,5 \pm 0,2$
	8,0	$3,94 \pm 0,12$	$5,32 \pm 0,16$	
	9,0	$4,57 \pm 0,08$	$6,2 \pm 0,1$	

¹ Данные получены на основании смещения обобщенных кривых относительно обобщенной кривой для кислого конформера низкоспинового лигандного Hb.

² Данные получены независимым определением площади контуров (взвешивание).

большого разброса принималась в качестве ошибки для суммарной величины $\langle \rho \rangle$ (табл. 1). В этой таблице, наряду с оценками величины $\langle \rho \rangle$, полученных из смещений обобщенных

pH5,1 (10 и 20°C), pH6,6 и pH7,1 (20 и 48°C) [1]. При этом не учитывались сильно отклоняющийся участок кривой ВО при pH5,1 и вся кривая для pH6,0. Построенная таким обра-

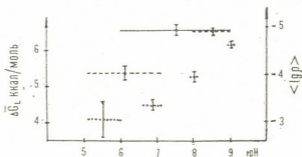


Рис. 5. Зависимость от pH средних величин логарифмов факторов замедления ВО $-\langle \lg \rho \rangle$ и изменений свободной энергии $\langle \Delta G_L \rangle$ при локальных трансформациях, обеспечивающих протекание реакции ВО в различных формах Hb, рассчитанная на основании графически усредненных обобщенных кривых; вертикальные черточки — интервалы среднеквадратичных отклонений; (—) — лигандный низкоспиновый Hb, (—) — дезоксиHb и (· · ·) — metHb



зом обобщенная кривая охватывает величины X от 0,05 до 0,8. В этом случае изменение свободной энергии при локальных трансконформациях $\langle \Delta G \rangle = 4,5 \pm 0,2$ ккал/М и является фактически усредненной характеристикой двух первых конформеров metHb. Зависимость от pH средних величин логарифмов факторов замедления ВО ($\langle \lg p \rangle$) и изменений свободных энергий ($\langle \Delta G \rangle$) при локальных трансконформациях, обеспечивающих протекание реакции ВО с участием внутренних пептидных NH групп в различных формах Hb, приведена на рис. 5.

Следует отметить, что замедление обмена при присоединении CN⁻ не может быть вызвано маскировкой пептидных Н-атомов, статически доступных для молекул растворителя, так как, судя по кристаллографическим данным, при присоединении CN⁻ не происходят конформационные перестройки, приводящие к маскировке заметного числа пептидных Н-атомов от растворителя, во-вторых, различия в скорости ВО затрагивают все, и в том числе наиболее медленно обменивающиеся Н-атомы. Наши экспериментальные данные, приведенные в работе [3], подтверждают вышесказанное.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джинория К. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., 10, 131 — 135, 1984.
2. Джинория К. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., 12, 4, 264 — 269, 1985.
3. Джинория К. Ш. Сообщения АН ГССР, 115, 393 — 395, 1984.
4. Abaturov L. V., Ushakova M. M., Jakobashvili N. N., Zhdanova K. I., Jinoria K. Sh. VII International Symp. uber Struktur und Funktion der Erythrozyten Hrsg. von Rapoport S., Jung F. Berlin, Akad — Verl., 1975, 129 — 133.
5. Antonini E., Brinori M. In: Haemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, London, 1971, 21—37.
6. Hvidt A. Dynamic aspects of conformational changes in biological macromolecules. Ed. Sardon C., Reidel D. Publ. Comp., 1973, 103 — 115.
7. Perutz M. F., Muirhead H., Cox J. M., Goaman L. C. G., Mathews F. S., McGamby E. L., Welb L. E. Nature (London), 219, 29 — 32, 1968.
8. White S. L. J. Biol. Chem., 250, 1263 — 1258, 1975.

met-და CNmet-ჰემოგლობინების კონფორმაციული გდგომარეობის შესწავლა წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდით (¹H—²H)

ა. ჯინორია

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მეცნიერთა ბიჭვიანის ინსტიტუტი, თბილისი
 სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიის ინსტიტუტი, მოსკოვი

რ ე ზ ი უ მ ე

წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდით (¹H—²H) შესწავლილ იქნა met-(metHb) და CNmet-(CNmetHb) ჰემოგლობინების კონფორმაციული მდგომარეობა. ნაჩვენებია, რომ ლიგანდის შეცვლა იწვევს ცილის შიდამოლეკულური მოძრაობის ზრდას და დამოუკიდებელი კონფორ-

მირების რაოდენობის გაზრდას ორიდან (CNmetHb) ოთხამდე (metHb). შიდამოლეკულური მოძრაობა ჰემოგლობინის სხვადასხვა ფორმებში ასეთი მიმდევრობით იზრდება: metHb < CNmetHb ≈ HbO₂ = = HbCO < deoxyHb

INVESTIGATION OF MET- AND CNMET-HEMOGLOBINS
CONFORMATIONAL STATES USING THE METHOD OF
HYDROGEN EXCHANGE (^1H — ^2H)



K. Sh. JINORIA

Institute of Plant Biochemistry, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR
Institute of Molecular Biology, USSR Academy of Sciences, Moscow

S u m m a r y

By means of hydrogen exchange method met- (metHb) and CNmet- (CNmetHb) hemoglobins conformational states were studied.

It is concluded that the replacement of one ligand by another markedly increases the intramolecular motility of the

protein and the number of independent conformers rises from two for CNmetHb to four for metHb. The intramolecular motility of different forms of hemoglobin decreases as follows: metHb < CNmetHb \approx Hbo₂ = HbCO < deoxyHb.

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

ВЛИЯНИЕ ИНДОЛСОДЕРЖАЩИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ЦИКЛОЗИС РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Д. А. Ониани, В. П. Шибут

*Тбилисский государственный университет
ВНИИ микробиологических производств, Минск*

Поступила в редакцию 10.07.1985

С использованием микроэлектродной техники и метода Штруггера исследовалось влияние серотонина, индолилуксусной кислоты (ИУК) и индола на потенциал покоя Ψ и скорость циклозиса клетки V водоросли *Nitella*. Установлено, что реакция клетки на все три соединения носит колебательный характер. Анализ зависимостей $\Psi(t)$ и $V(t)$ в терминах ранее развитой модели, предполагающей сопряжение сдвигов этих показателей, позволяет судить, что влияние индола на циклозис в случае не очень высоких концентраций проявляется опосредованно, через вызываемые им изменения потенциала покоя. В отличие от этого, серотонин и ИУК, по-видимому, непосредственно влияют на процесс циклозиса. Сходство формы кривых $\Psi(t)$, $V(t)$, а также выявленная расчетным путем близость конформационных возможностей молекул двух последних соединений позволяет предполагать, что они взаимодействуют с одним и тем же типом рецепторных структур.

Индолилуксусная кислота и серотонин являются важнейшими гормонами соответственно растительных и животных организмов.

Индольное ядро обеих молекул является важным фактором проявления их биологической активности; замена его другими ароматическими группами — имидазольной, окси- или галогензамещенными бензольными — приводит к снижению активности или полной ее утрате.

В то же время, высказывалось предположение, что в случае серотонина индольное кольцо не участвует в генерировании вторичного сигнала, а лишь обеспечивает правильную ориентацию молекулы при взаимодействии с рецептором [7].

Было показано, что оба соединения уже в весьма низких концентрациях оказывают влияние на процессы жизнедеятельности клеток харовых водорослей [3, 5]; нами была предпринята попытка выявления некоторых деталей механизмов развития вызы-

ваемых ими эффектов. Изучалось влияние индолилуксусной кислоты, серотонина, а также индола на потенциал покоя и скорость движения протоплазмы клеток *Nitella syncarpa*. Клетки собирались в канале Траку Воке (Литовская ССР) и хранились в лабораторных условиях в искусственной питательной среде [3].

Для регистрации изменений потенциала покоя использовалась ранее описанная микроэлектродная техника [3]; скорость движения протоплазмы определялась по методу Штруггера [6]. Расчет стабильных конформаций молекул обоих гормонов был осуществлен в попарно-аддитивном приближении; использовались алгоритмы, описанные в [2] и потенциальные функции, приведенные в [8].

Было установлено, что реакция клетки на все три соединения носит колебательный характер, причем кривая, описывающая изменения скоро-

сти движения протоплазмы, несколько отстает по фазе от соответствующей кривой для потенциала покоя. В случае индолилуксусной кислоты и серотонина положения первых экстремумов почти совпадают; под действием индола аналогичные изменения развиваются примерно в два раза медленнее, а отставание во времени сдвигов скорости движения протоплазмы по отношению к сдвигам потенциала покоя заметно больше.

Ранее нами было показано [4], что изменения потенциала покоя обуславливают изменения скорости циклозиса, причем соответствующая зависимость определяется уравнением

$$\frac{dv}{dt} = k_1 \Delta \Psi - k_2 \Delta v,$$

где $\Delta \Psi$, Δv — сдвиги величин потенциала покоя и скорости движения протоплазмы относительно нормы; k_1 ,

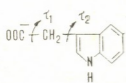
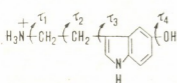
Для суждения о том, по какому из двух путей развивается изменение скорости циклозиса, можно воспользоваться следующим приемом. В случае, если изменения скорости движения протоплазмы наступают только под действием сдвигов потенциала покоя, в точках экстремумов кривой $V(t)$ справедливо

$$\Delta V = \frac{k_1}{k_2} \Delta \Psi.$$

Таким образом, на плоскости (ΔV , $\Delta \Psi$) точки, соответствующие значениям обоих параметров в экстремумах функции $V(t)$, должны укладываться на прямую, проходящую через начало координат.

Именно такой характер имеет зависимость, связывающая обе величины, в случае применения умеренных концентраций индола (рис. 1а). При сравнительно высокой концентрации

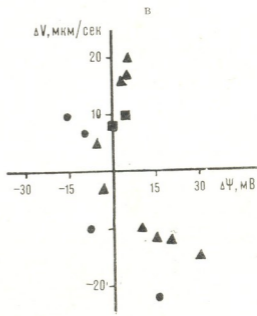
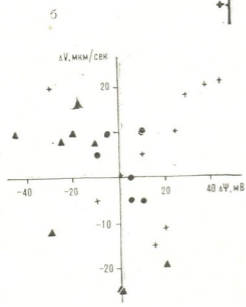
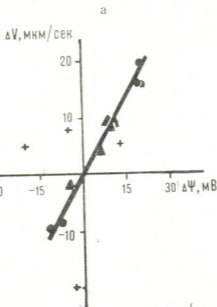
Таблица
Стабильные конформации молекул индолилуксусной кислоты и серотонина

Соединение	Диэлектрическая проницаемость, ϵ	Углы внутреннего вращения, град				Энергия, U, ккал/моль
		τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	
Индолилуксусная кислота 	3,5	90	90	—	—	0,0
	∞	90	90	—	—	0,0
Серотонин 	3,5	54	60	87	101	0,9
		57	179	93	96	1,8
		65	-61	98	94	1,5
		54	60	87	-96	0,0
		57	179	93	-95	1,7
		65	-59	99	-93	1,1
	∞	54	60	87	90	0,0
		57	180	93	90	1,9
		65	-62	98	90	0,6
		54	60	87	-90	0,0
	57	180	93	-90	1,0	
	65	-62	98	-90	0,6	

k_2 — константы. Таким образом, изменения скорости движения протоплазмы, наступающие под действием того или иного соединения, могут быть либо опосредованы через развивающиеся сдвиги потенциала покоя, либо связаны с непосредственным вмешательством испытуемых агентов в какие-то процессы, обуславливающие циклозис.

10^{-5} г/мл — она уже не выполняется, так же как и при всех испытанных концентрациях индолилуксусной кислоты и серотонина (рис. 1б, в).

Результаты расчета стабильных конформаций молекул обоих гормонов приведены в таблице. В случае серотонина они хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными и результатами других рас-



Связь между экстремальными сдвигами скорости циклолиза ΔV и соответствующими им сдвигами потенциала покоя $\Delta \Psi$, наступающими под действием индола (а), серотонина (б) и индолилуксусной кислоты (в) в концентрациях 10^{-8} г/мл — Δ , 10^{-7} г/мл — \square , 10^{-6} г/мл — \bullet , 10^{-5} г/мл — $+$

четов [1]; для индолилуксусной кислоты подобные сведения в доступной нам литературе отсутствуют. В наиболее стабильных конформациях обеих молекул ионогенные группы оказались сходным образом расположены относительно индольного радикала; в частности, практически совпадают расстояния между ионогенной группой и атомом азота индольного кольца (4,8 А и 5,0 А).

Таким образом, можно предположить, что действие обоих соединений происходит по одному механизму.

В отличие от индола, оно непосредственно через сдвиги потенциала покоя. Возможно, что они взаимодействуют с одним и тем же типом рецепторных структур, причем знак заряда не имеет значения для генерации и вторичного сигнала.



1. Ахрем А. А., Галактионов С. Г., Голубович В. П. Конформации биогенных аминов, „Наука и техника“, Минск, 1979.
2. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Перельман Т. Л. Диффузия в сложных молекулярных структурах, „Наука и техника“, Минск, 1974.
3. Ониани Д. А. Исследование влияния физиологически активных веществ на регуляцию скорости движения протоплазмы и мембранного потенциала. Автореф. канд. дисс., Тбилиси, 1975.
4. Ониани Д. А., Плакс А. В., Колева Е. С. Биофизика, 31, 361—362, 1986.
5. Юрин В. М., Иванченко В. М., Галактионов С. Г. Регуляция функций мембран растительных клеток, „Наука и техника“, Минск, 1979.
6. Штруггер З. Практикум по физиологии растительных клеток и тканей, ИЛ, М., 1953.
7. Barridge M. J. J. Exp. Biol., 56, 311—321, 1972.
8. Nikiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I. Intern. J. Peptide Protein Research, 13, 363—373, 1979.

ინდოლუმიდოვანი ბიორეგულატორთა გავლენა
მცენარეული უჯრედის ციკლოზისზე

ჯ. ონიანი, ვ. შიბუტი

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
მიკრობიოლოგიურ წარმოებათა საკავშირო სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, მინსკი

რ ე ზ ი უ მ ე

მიკროელექტროდული ტექნიკისა და უტრუგერის მეთოდის გამოყენებით გამოკვლეულ იქნა წყალმცენარე ნიტელას უჯრედების მოსვენების პოტენციალზე (Ψ) და ციკლოზისის სიჩქარეზე (V) ინდოლის, სეროტონინისა და ინდოლილმარმეავას გავლენა.

თეორიული კონფორმაციულობის ანალიზის მეთოდების გამოყენებით წყვილ-

წყვილად, ადრეტიურ მიახლოებაში, განსაზღვრულ იქნა სეროტონინისა და ინდოლილმარმეავას მოლეკულათა კონფორმაციული შესაძლებლობები.

შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ სეროტონინისა და ინდოლილმარმეავას მოქმედება ერთი და იმავე მექანიზმით წარმოებს და არაა განპირობებული მოსვენების პოტენციალის ძვრებით.

THE INFLUENCE OF INDOLYL-CONTAINING BIOREGULATORS ON THE RATE OF PROTOPLASMIC STREAMING OF THE PLANT CELL

D. A. ONIANI, V. P. SHIBUTI

Tbilisi State University, USSR

Institute of Microbiological Productions, Minsk, USSR

S u m m a r y

The effect of indole, serotonin and indolyl acetic acid on the resting potential (Ψ) and of protoplasmic streaming (V) in Nitelle cells has been studied using microelectrode technique and Strugger's method. The conformational possibilities of indolyl acetic acid and serotonin molecules were investigated by the

methods of semiempirical theoretical conformational analysis. The effect, induced by serotonin and indolyl acetic acid may be assumed to follow the same mechanism; the action of these agents cannot be accounted for by the resting potential shifts.

УДК 547.963.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АКТИНОМИЦИНА D НА ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ-КЛУБОК В ДНК

Г. Р. Геташвили, Л. М. Высочек, М. З. Циლოსани,
М. М. Заалишвили

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

Поступила в редакцию 09.10.1985

Методом сканирующей микрокалориметрии исследовано влияние низких концентраций актиномицина D на тепловую денатурацию ДНК в растворах с различной ионной силой. Показано, что актиномицин сильно видоизменяет термодинамические параметры перехода спираль-клубок, причем эффекты антибиотика проявляются более четко в растворах с низкой ионной силой. Обсуждаются возможные причины наблюдаемых изменений параметров перехода.

Важность многих интеркалирующих соединений, особенно антибиотиков и антиканцерогенных препаратов, с точки зрения биохимии и медицины является мощным стимулом для исследования способа их действия и структурной активности [2, 8, 14, 21]. Одним из наиболее интересных интеркаляторов является актиномицин D — представитель широкого класса хромопептидных антибиотиков, ингибирующих работу ДНК-зависимой РНК-полимеразы в прокариотических и эукариотических клетках [12, 13, 17]. Имеется надежное подтверждение того, что актиномицин D подавляет активность РНК-полимеразы в результате связывания с матрицей ДНК и образования длительно живущих блоков на пути движения фермента [6]. Поскольку роль РНК-полимеразы в известной степени заключается в ло-

кальном расплетании двойной спирали, исследования влияния актиномицина на процессы денатурации ДНК представляют особый интерес для выяснения механизмов и энергетики взаимодействия этого антибиотика с ДНК. Кроме того, измерения энтальпии денатурации ДНК в комплексе с актиномицином могут дать ценную информацию относительно природы сил, стабилизирующих двойную спираль, и могут быть использованы для построения более точной теории взаимодействия ДНК с низкомолекулярными лигандами. В данной работе методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии проведено исследование влияния низких концентраций актиномицина D на тепловую денатурацию ДНК в растворах с различным содержанием хлористого натрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовалась ДНК из селезенки крупного рогатого скота (Олайнский завод химреактивов), подвергавшаяся дополнительной очистке. В очищенных препаратах ДНК примеси белка не превышали

1,5%, а РНК — 3%. Молекулярный коэффициент экстинкции составлял $E_p = 6500$, максимальный гиперхромизм 37—38%. Концентрация препарата в калориметрических измерениях составляла $1,4 \cdot 10^{-3}$ М. В эксперимен-

тах использовался кристаллический актиномицин D фирмы «Serva», неподвергавшийся дополнительной очистке. Концентрация актиномицина определялась по поглощению на волне 442 нм. Комплексование актиномицина определялась по поглощению на волне 442 нм. Комплексование актиномицина с ДНК осуществлялось прямым смешиванием исходных растворов этих реагентов и последующим инкубированием в течение 6 ч. Во избежание комплексования актиномицина компонентами буфера исполь-

зовались небуферированные растворы с хлористым натрием в качестве опорного электролита. pH контролировался до и после экспериментов на pH-метре «pH-673», снабженном ячейкой для микроизмерений, и составлял 6,5—7,0. Эксперименты по денатурации комплексов ДНК — актиномицин D проводились на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1 (СКБ биологического приборостроения АН СССР, Пушкино) при скорости прогрева препаратов 1 град/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Актиномицин D существенно видоизменяет параметры перехода спираль-клубок в ДНК. На рис. 1 изображены кривые плавления комплексов ДНК-актиномицин в растворах

ДНК) наиболее глубокие изменения претерпевает форма кривых плавления в растворах с низкой ионной силой. Кривая плавления чистой ДНК имеет достаточно сложную многоступенча-

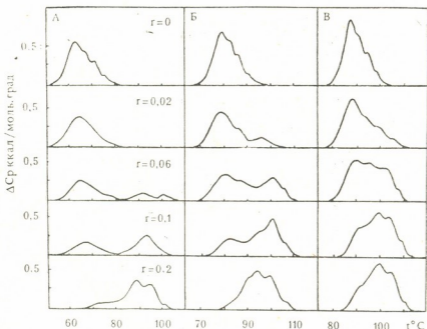


Рис. 1. Кривые плавления комплексов ДНК—актиномицин D в растворах с различной ионной силой: А — 0,005 М NaCl, Б — 0,05 М NaCl, В — 0,2 М NaCl. r представляет отношение молярной концентрации актиномицина D к молярной концентрации пар оснований ДНК. Концентрация пар оснований ДНК — $1,4 \cdot 10^{-3}$ М

$5 \cdot 10^{-3}$ М NaCl (А), $5 \cdot 10^{-2}$ М NaCl (Б) и $2 \cdot 10^{-1}$ М NaCl (В). С ростом r (r представляет отношение молярной концентрации антибиотика к молярной концентрации пар оснований

тую форму, отражающую блочность структуры ДНК эукариотов, и захватывает температурный интервал 53—84°C. При введении в раствор очень низких концентраций актиномицина

($g=0,02$) наблюдается сглаживание ряда дополнительных максимумов и значительное уменьшение основного максимума при 64°C . Дальнейшее увеличение g приводит к очень сильному расширению интервала плавления и выявлению, четко разделяемых, фаз плавления в районах $52-84^{\circ}\text{C}$, $84-97^{\circ}\text{C}$ и $97-104^{\circ}\text{C}$. Надо отметить, что двухфазность кривых плавления проявляется при комплексовании ДНК с ионами некоторых металлов [5], со многими протяженными лигандами [9, 18], красителями [3, 15] и др. соединениями, не являясь специфической чертой интеркаляции. Однако в нашем случае выявляется гораздо более сложный характер плавления ДНК в присутствии актиномина D. В большинстве работ двухфазность переходов спираль-клубок интерпретируется, либо как результат раздельного плавления областей ДНК содержащих и не содержащих стабилизирующий лиганд [15], либо объясняется перераспределением лиганда в ходе плавления [3, 20]. Наблюдаемая нами многофазность отражает, вероятнее всего, перераспределение молекул актиномина в ходе плавления, приводящее к кластерированию красителя на нерасплавленных участках ДНК. Это согласуется с данными о том, что интеркаляция происходит в спиральных участках ДНК [8, 16]; при локальном расплетении определенных участков актиномина высвобождается и связывается с еще нерасплетенными сегментами молекулы, дополнительно повышая их стабильность, причем процесс повторяется неоднократно. Это и приводит к столь значительному расширению интервала плавления в наших экспериментах. Предпочтительное связывание актиномина D ГЦ-богатыми областями ДНК также должно играть заметную роль, еще больше усложняя характер плавления. Более высокие концентрации актиномина потенциально сводят на нет такое перераспределение, так как все возможные центры уже заняты, и наблюдающаяся двухфазность указывает лишь на преимущественное взаимодействие актиномина D с участками ДНК, богатыми гуанином. С ростом концентрации актиномина кривая плавления смещается в сторону более высоких температур (при $g=0,2$ температура плавления возрастает на \sim

30°C), что согласуется с данными о стабилизирующем эффекте большого количества интеркаляторов [3, 4, 20]. При увеличении ионной силы эффект стабилизации заметно нивелируется, хотя даже в $0,2 \text{ M NaCl}$ область плавления сдвигается на $10-12^{\circ}\text{C}$. Изменение ионной силы может влиять на процесс плавления комплексов ДНК-актиномина D различными путями. Во-первых, при интеркаляции среднее расстояние между отрицательно заряженными фосфатными группами увеличивается, что приводит к уменьшению электростатического отталкивания. Однако этот эффект не должен играть заметной роли при более высокой ионной силе, когда заряды фосфатных групп достаточно экранированы. Определенную роль должен играть и температурный фактор, поскольку с увеличением ионной силы расхождение цепей начинается при более высокой температуре. Наконец, ионная сила влияет и на степень интеркаляции — с ростом концентрации ионов натрия наблюдается уменьшение константы связывания [10].

Считается, что увеличение термической стабильности при интеркаляции обусловлено межплоскостными взаимодействиями между хромофором интеркалятора и соседними парами оснований [4, 7]. К сожалению, по сей день однозначно не установлена природа сил, поддерживающих вторичную и третичную структуру нуклеиновых кислот, в частности не достигнуто количественное соотношение имеющихся энергетических параметров. Поэтому большой интерес представляют данные о влиянии актиномина D на энтальпию тепловой денатурации ДНК. Как видно из табл. 1, изменение энтальпии денатурации ДНК с ростом концентрации актиномина D носит сложный и достаточно неожиданный характер. В растворах с низкой ионной силой, при малых значениях g , наблюдается резкое уменьшение энтальпии денатурации с 7,1 до 3,9 ккал/м.п.о. Столь сильный эффект уменьшения ΔH на первый взгляд совершенно непонятен, если принять во внимание распространенную точку зрения о доминирующей роли стеккинга в энергетике стабилизации двойной спирали [11, 22], с одной стороны, и принятое представление об усилении стеккинга при интеркаляции, с другой

стороны [4, 7]. Однако внимательный анализ фактов приводит к выводу, что на долю стекнинг-взаимодействий приходится не более половины энтальпии

Таблица 1

Влияние актиномицина D на энтальпию тепловой денатурации ДНК

r	ΔH ккал/моль пар оснований		
	0,005M NaCl	0,05M NaCl	0,2M NaCl
0	7,1±0,4	7,7±0,4	8,3±0,5
0,01	6,0±0,3	6,2±0,3	8,7±0,5
0,02	—	—	8,8±0,5
0,025	5,1±0,3	6,4±0,3	—
0,04	4,3±0,2	7,0±0,4	9,7±0,6
0,05	—	—	9,9±0,6
0,06	4,7±0,2	7,5±0,4	—
0,07	—	—	10,4±0,7
0,085	3,9±0,2	—	—
0,1	4,3±0,2	8,1±0,5	9,6±0,6
0,2	5,4±0,3	8,7±0,5	9,2±0,6

стабилизации, и значительная ее часть обеспечивается водородными связями [1]. Важную роль при этом играют гидрофобные взаимодействия так как районы, где действуют водородные связи, оказываются надежно защищенными от вторжения молекул воды [22]. Однако ДНК обладает значительной гибкостью, которая проявляется в стереохимических перераспределениях в ее структуре, вызванных тепловыми флуктуациями и имитирующими «мигрирующий шарнир» [19]. Такого рода «шарнир» позволяет парам оснований разделяться — при этом молекулы воды проникают внутрь двойной спирали, где они могут конкурировать за водородные связи, ослабляя или нарушая спаривание оснований. Эти районы могут служить центрами нуклеации в процессе денатурации ДНК, так как при этом

снижается активационная энергия, необходимая для разделения цепей [19]. Актиномицин D, задерживая переходящую структуру такого шарнира, может облегчать этот процесс. По мнению Собела [19] многие агенты, интеркалируя свои хромофоры между основаниями, при денатурации растворителем уменьшают активационную энергию, необходимую для уничтожения стекнинга, что может снижать энтальпию перехода. В наших экспериментах уменьшение энтальпии наблюдается при концентрациях актиномицина, не вызывающих заметных температурных сдвигов, т. е. уменьшение энтальпии компенсируется обычным энтропийным эффектом. С ростом концентрации актиномицина D происходит вытеснение «шарниров», молекула ДНК становится жестче [13, 19] и ее внутренние области становятся менее доступны для атак молекул воды — в результате энтальпия начинает возрастать. Тем не менее, даже при значении $r=0,2$, энтальпия денатурации остается несколько ниже, чем в случае чистой ДНК, что указывает на энтропийный характер температурной стабилизации ДНК актиномицином D в растворах с низкой силой. В растворе 0,2 M NaCl ΔH возрастает, начиная с самых низких концентраций актиномицина, достигая максимального значения при $r=0,06$. Поскольку в растворах с повышенной ионной силой плавление происходит в высокотемпературной области, в данном случае трудно отличить специфический эффект актиномицина от влияния собственно температуры на ΔH , тем более, что эффект противоионов зачастую влияет и на характер зависимости ΔH от температуры [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Хинц Г. И. Биохимическая термодинамика „Мир“, М., 1984.
2. Berman N. M., Young P. R. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10, 87—92, 1981.
3. Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M. Biochemistry, 21, 3933—3945, 1982.
4. Chambrou J., Daune M., Sadron C. Biochem. Biophys. Acta, 123, 306—312, 1966.
5. Dove W. F., Davidson N. J. Mol. Biol., 5, 467—471, 1962.
6. Human R. W., Davidson N. J. Mol. Biol., 50, 421—430, 1970.
7. Le Pecq J. B., Paoletti C. J. Mol. Biol., 27, 87—95, 1967.
8. Lerman L. S. J. Mol. Biol., 3, 18—30, 1961.
9. Li H. J., Biopolymers, 11, 835—851, 1972.
10. Li H. J., Crothers D. M. J. Mol. Biol., 39, 461—463, 1969.



11. Marky L. A., Breslauer K. J. *Biopolymers*, **21**, 2185—2197, 1982.

12. Mauger A. B. *Top. Antibiot. Chem.*, **5**, 229—239, 1980.

13. Müller W., Crothers D. M. J. *Mol. Biol.*, **35**, 251—273, 1968.

14. Neidle S. *Prog. Med. Chem.*, **16**, 151—158, 1978.

15. Pattel D. J., Canuel L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5207—5221, 1977.

16. Peacocke A. R., Skerret J. N. H. *Trans. Faraday Soc.*, **52**, 261—267, 1956.

17. Reich E., Goldberg I. H. *Progress in Nucleic Acids Res. and Mol. Biol.*, **3**, 183—197, 1964.

18. Shin T. Y., Boinner J. *Mol. Biol.*, **48**, 468—482, 1970.

19. Sobell H. M., Chun-che Tsai, Jain S. C., Gilbert S. G. *J. Mol. Biol.*, **114**, 333—359, 1977.

20. Stewart Ch. R. *Biopolymers*, **6**, 12, 1737—1743, 1968.

21. Waring M. J. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 159—170, 1981.

22. Zimm B. H., Kallenbach N. R. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **13**, 171—191, 1962.

აქტინომიცინ D-ს დაბალი კონცენტრაციების გავლენა „სპირალი — გორბალის“ გადასვლაზე დნმ-ში

გ. გეტაშვილი, ლ. ვისოჩეკი, მ. ჟილოსანი, მ. ჯაალიშვილი

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

რ ე ზ ი უ მ ე

რასტრული კალორიმეტრიის მეთოდით გამოკვლეულ იქნა აქტინომიცინ D-ს დაბალ კონცენტრაციითა გავლენა დნმ-ის სითბურ დენატურაციაზე, სხვადასხვა იონური ძალის ხსნარებში. ნაჩვენებია, რომ აქტინომიცინი მნიშვნელოვნად სცვლის „სპირალი — გორგალის“ გადასვლის თერ-

მოდინამიკურ პარამეტრებს. ამასთან, ანტიბიოტიკის გავლენა უფრო მკვეთრად ვლინდება დაბალი იონური ძალის ხსნარებში. განხილულია გადასვლის პარამეტრების აღწერილი ცვლილებების შესაძლო მიზეზები.

THE INFLUENCE OF LOW CONCENTRATION OF ACTINOMYCIN D ON HELIX—COIL TRANSITION IN DNA

G. R. GETASHVILI, L. M. VISOCHEK, M. Z. TSILOSANI, M. M. ZAALISHVILI

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

S u m m a r y

The effect of low concentrations of actinomycin D on the thermal denaturation of DNA in solutions with various ionic strength has been studied by the scanning calorimetric method. It has been shown that actinomycin D greatly

modifies thermodynamic characteristics of helix-coil transition in DNA. The effects of actinomycin are more pronounced in the solutions with low ionic strengths. The possible reasons for these phenomena are discussed.

УДК 577.155.2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

РЕСТРИКТАЗА *Tha* I ИЗ ТЕРМОАЦИДОФИЛЬНОЙ АРХЕБАКТЕРИИ *Thermoplasma acidophilum*: ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА, СВОЙСТВА

Д.З. Чинчаладзе, Л. А. Качабава, Д. А. Прангишвили

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

Поступила в редакцию 19.04.1985

Из термоацидофильной архебактерии *Thermoplasma acidophilum* выделена и очищена до гомогенного состояния специфическая эндонуклеаза рестрикции *Tha* I. Фермент обладает молекулярным весом 60 000 дальтон и состоит из двух субъединиц с молекулярным весом 30 000 дальтон. Максимальную активность рестриктаза проявляет при 60°C и pH 8,5. Для проявления максимальной активности фермента необходимо наличие ионов Mg^{2+} . KCl в концентрациях больше 50 мМ значительно ингибирует ферментативную активность.

Эндонуклеазы рестрикции II типа, расщепляющие ДНК на строго определенном участке последовательности, выделены из различных бактерий и сине-зеленых водорослей, однако очень малое количество из этих ферментов очищено до состояния, когда одну полосу в полиакриламидном геле или один пик с хроматографической колонки можно ассоциировать с ферментативной активностью [5].

Рестриктазы обнаружены и в микроорганизмах нового класса — архе-

бактериях [3]. Сообщалось о частичной очистке из термоацидофильной архебактерии *Thermoplasma acidophilum* рестриктазы *Tha* I, узнающей тетра-нуклеотидную последовательность CGCG и образующей симметричный разрыв этой последовательности [6].

Данная работа посвящена разработке методов выделения и очистки до гомогенного состояния рестриктазы *Tha* I из *T. acidophilum* и характеристике фермента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Бактерии. Клетки лишенной клеточной стенки ацидофильной экстремально термофильной архебактерии *Thermoplasma acidophilum*, выращенные при 58°C и pH 1,1, как описано в работе [7], были любезно предоставлены проф. Циллигом (Институт биохимии им. М. Планка, Мюнхен, ФРГ).

ДНК фага T7 и плазмиду pBR 322 выделяли как описано ранее [2].

Хроматографические материалы. ДЭАЭ-целлюлозу (DE-52) („Whatman“, Великобритания), фосфоцеллюлозу P-11 („Whatman“), BioRex-70 („BioRad“, США),

Blue Sepharose CL-6B („Pharmacia“, Швеция) и сефадекс G-100 („Pharmacia“) использовали в соответствии с рекомендациями фирм.

Буферы. В работе были использованы следующие буферные растворы: буфер А — 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ KCl, 1,6 мМ 2-меркаптоэтанол и 30% глицерина. Буфер В — буфер А, содержащий 5 мМ $MgCl_2$. Буфер С — буфер В, содержащий 1 мМ АТФ. Буфер D — буфер А, содержащий 0,5 М KCl. Буфер E — 100 мМ трис-HCl, pH 8,8, 50 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 1,6 мМ

2-меркаптоэтанола, 7,5% глицерина и 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторида.

Эндонуклеазную активность в препаратах фермента определяли по деградации плазмиды рВR 322 или ДНК фага Т7 в инкубационной системе (20 мкл), содержащей 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 0,1 мкг/мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1 мкг плазмиды рВR 322 или ДНК фага Т7 и 5—10 единиц активности фермента. Реакцию проводили при 60°C в течение 15 мин и степень деградации ДНК

наблюдали, подвергая реакционную смесь электрофорезу в 0,8%-ном геле розного геле. Электрофорез проводили в трис-ацетатном буфере рН 7,7.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия в 3%-ном концентрирующем и градиентном (5—25%) разделяющем гелях в трис-глицериновом буфере, рН 8,3, по методу, описанному в работе [4].

Элюцию белка из геля проводили электрофоретически.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Выделение, очистка

Клетки *T. acidophilum* лизировали суспендированием в буфере Е. Из гомогената, предварительно обработанного ДНК-азой I до заметного уменьшения вязкости, клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 14 000×g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость собирали, наносили на 100 мл колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную буфером А, и тщательно промывали тем же буфером. Рестриктаза вместе с примерно

фосфоцеллюлозой Р-11, уравновешенную буфером А. Практически вся рестриктазная активность адсорбировалась на колонке. Ее элюировали линейным градиентом концентрации КСl 0—0,3 М в буфере А. Рестриктазная активность обнаруживалась в пике оптической плотности, элюирующемся при 0,18 М КСl. Фракции, содержащие рестриктазу, объединяли и после диализа против буфера В наносили на 12 мл колонку с BioRex-70, уравновешенную тем же буфером. Белок элюировали линейным градиентом 0—0,3 М КСl в буфере В. Рестриктаза элюировалась в виде дискретного пика при 0,1 М КСl. Активные фракции после диализа против буфера С наносили на 5 мл колонку с Blue Sepharose CL-6В, уравновешенную буфером С. На всех перечисленных стадиях очистки специфическая эндонуклеаза рестрикции соочислалась вместе с ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Разделение этих двух ферментов удалось при афинной хроматографии на Blue Sepharose CL-6В, где рестриктазная и ДНК-полимеразная активности элюируются с колонки при разных, но довольно близких значениях ионной силы (0,22 М и 0,12 М соответственно). Повторная хроматография фракции на Blue Sepharose CL-6В позволяла достичь дальнейшего частичного разделения этих двух активностей. После хроматографии на Blue Sepharose CL-6В фракции, содержащие рестриктазу, объединяли, концентрировали диализом против Ficoll-400 до объема 0,3 мл и после

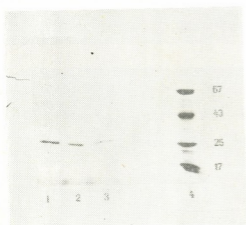


Рис. 1. Электрофореграмма рестриктазы *Tha* I в градиентном (5—25%) ПААГ в денатурирующих условиях (1, 2, 3). В качестве маркеров на геле присутствуют: БСА, овальбумин, рибонуклеаза и химотрипсиноген А (4). Справа указаны молекулярные веса маркеров (килодальтон)

50% белка грубого экстракта оказывалась в промывочной жидкости, которую наносили на 50 мл колонку с

диализа против буфера D наносили на колонку (0,4 см²×28 см) с сефадексом G-100. Колонку уравнивали и хроматографию проводили в буфере D. Рестриктаза элюировалась после примерно половины колоночного объема в виде дискретного симметричного пика.

Выход ферментативной активности составил на 1 г биомассы примерно 100 000 единиц активности (за единицу активности фермента принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага T7 или плазмиды pBR 322 за 60 мин при 60°C в стандартных условиях). Удельная активность конечного препарата фермента была равна 800 000 ед. акт. на 1 мг белка.

При электрофорезе конечного препарата фермента в градиентном (5—25%) ПААГ в денатурирующих условиях наблюдалась лишь одна белковая полоса; видимые примеси отсутствуют (рис. 1). Эта белковая полоса соответствует наблюдаемой ферментной активности, так как: 1. на всех стадиях хроматографического фракционирования наблюдалась прямая корреляция между содержанием данного белка и рестриктазной активностью во фракции; 2. после элюции из геля данная полоса проявляла ферментативную активность.

Конечный препарат фермента хранили при -5°C без заметной потери активности в течение по крайней мере года.

II. Молекулярный вес

Молекулярный вес нативного препарата фермента определяли на калиброванной колонке с сефадексом G-100. Для калибровки колонки использовали белки с известными молекулярными весами: БСА—67, овальбумин—43, рибонуклеаза—25 и химотрипсиноген А—17 килодальтон. Молекулярный вес рестриктазы оказался в области 60 000 дальтон.

Молекулярный вес полипептидной цепи, видимой при электрофорезе в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, вычисленный из сопоставления ее подвижности с подвижностями белков с известными молекулярными весами, оказался равным 30 000 дальтон (рис. 1).

Сравнивая полученные результаты, можно предположить, что исследуе-

мый фермент представляет собой димер и состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярным весом 30 000 дальтон.

III. Каталитические свойства

Выделенная специфическая эндонуклеаза рестрикции по характеру гидролиза стандартных субстратов была

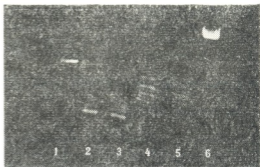


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК фага T7 и плазмиды pBR 322 препаратом фермента: 2,4—гидролиз плазмиды pBR322 и ДНК фага T7 исследуемой рестриктазой; 3,5—гидролиз плазмиды pBR 322 и ДНК фага T7 рестриктазой Tha I; 1,6—плазмида pBR 322 и ДНК фага T7 — негидролизированные

идентифицирована как рестриктаза Tha I: как видно из рис. 2, эти две ферментативные активности образуют полностью идентичные фрагменты при

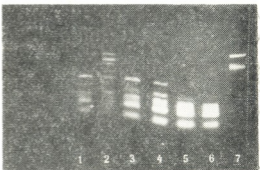


Рис. 3. Гидролиз плазмиды pBR 322 рестриктазой Tha I при разных значениях pH среды: 1—6,5; 2—7,0; 3—7,5; 4—8,0; 5—8,5; 6—9,0; 7—плазмида pBR 322 — негидролизированная

гидролизе ДНК фага T7 и плазмиды pBR 322.

Исследуемая эндонуклеаза рестрикции Tha I каталитическую активность



проявляет в интервале температур от 40°C до 70°C; наивысшая активность проявляется при 60°C — температуре,

близкой к оптимальной температуре роста организма [1]. Фермент обладает высокой термостабильностью: 2-часовая преинкубация препарата фермента при 60°C не вызывает уменьшения каталитической активности, преинкубация при 70°C в течение 15 мин уменьшает активность примерно на 50%.

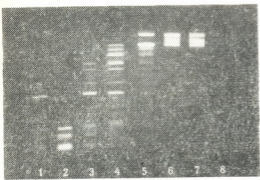


Рис. 4. Гидролиз плазмиды pBR 322 рестриктазой Tha I при разных концентрациях KCl (мМ) в инкубационной системе: 1 — без KCl; 2 — 10; 3 — 20; 4 — 50; 5 — 100; 6 — 200; 7 — 500; 8 — плазмиды pBR 322 — негидролизованная

Фермент проявляет каталитическую активность в широком интервале значений pH (pH 6,0—9,0) (рис. 3). Оптимальное значение pH равно 8,5.

Рестриктаза Tha I в высшей степени чувствительна к значениям ионной силы в инкубационной системе (рис. 4). Как видно из рисунка, высокие концентрации KCl (выше 50 мМ) значительно ингибируют активность фермента, однако определенные значения ионной силы (10—20 мМ KCl) необходимы для обеспечения максимальной активности.

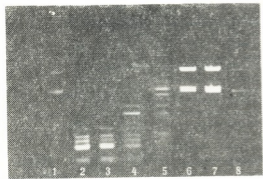


Рис. 5. Гидролиз плазмиды pBR 322 рестриктазой Tha I при разных концентрациях MgCl₂ (мМ) в инкубационной среде: 1 — без MgCl₂; 2 — 2; 3 — 5; 4 — 10; 5 — 20; 6 — 50; 7 — 100; 8 — плазмиды pBR 322 — негидролизованная

В отсутствии в инкубационной системе ионов Mg²⁺ каталитическая активность фермента не проявляется. Оптимальная концентрация этих ионов равна 2 мМ (рис. 5).

Добавление в инкубационную среду тритона X-100 до концентрации 0,1% не влияет на каталитическую активность фермента.

Как видно из рис. 3,4, варьирование условий реакции (температура, ионная сила, pH) не вызывает изменения специфичности рестриктазы Tha I, в отличие от ряда известных рестриктаз, специфичность которых зависит от условий реакции [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленгуорси Т. Жизнь микробов в экстремальных условиях, „Мир“, М., 1981.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование, „Мир“, М., 1984.
3. Прангшвили Д. А. Мол. биол., 17, 234—247, 1983.
4. Laemmli U. K. Nature (Lond.), 227, 680—685, 1970.
5. Malcolm A. D. B. In: Genetic Engineering (ed. R. Williamson), Academic Press N.—Y., II, 1981, 130—168.
6. McConnel D. Y. Nucl. Acids Res., 6, 1729—1739, 1978.
7. Sturm S. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., CI, 12—25, 1980.

დ. ჩინჩალაძე, ლ. კახაბავა, დ. ფრანგიშვილი

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

რ ე ზ ი ე

თერმოაციდოფილური არქეობაქტერიიდან *Thermoplasma acidophilum* გამოიყო და ჰომოგენურ მდგომარეობამდე გასუფთავდა რესტრიქციის ენდონუკლეაზა *Tha I*. ფერმენტის მოლეკულური წონაა 60 000 დალტონი. ფერმენტი ორი სუბერთეულისაგან შედგება, თითოეული — 30 000 დალტონი. რესტრიქტაზა მაქსი-

მალურ აქტივობას ამჟღავნებს 60°C-ზე და pH 8,5-ზე. რესტრიქტაზის მაქსიმალური აქტივობის გამოსაყენებლად აუცილებელია Mg^{2+} იონების თანაარსებობა. KCl 50mM-ზე მეტ კონცენტრაციებში ფერმენტულ აქტივობას მნიშვნელოვნად თრგუნავს.

THE RESTRICTASE *Tha I* FROM THERMOACIDOPHILIC ARCHAEBACTERIUM *THERMOPLASMA ACIDOPHILUM*: ISOLATION, PURIFICATION, PROPERTIES

D. Z. CHINCHALADZE, L. A. KACHABAVA, D. A. PRANGISHVILI

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

S u m m a r y

Restriction endonuclease *Tha I* has been purified to the homogeneity from thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. The enzyme has a molecular weight of 60000 daltons and consists of two subunits each having mo-

lecular weight of 30000 daltons. The enzyme has maximal activity at 60°C and pH 8.5. The restrictase requires the presence of Mg^{2+} ions. KCl in the concentrations more than 50 mM significantly inhibits the enzyme activity.

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 более 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 анотация (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 глянцево́й 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.

6129/89



Цена 85 коп.

Индекс 76204