

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 5 • თბილისი • ტომი
• TBILISI • TOM
• 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, № 5
Том

18582

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

სარედაქციო კოლეგია:

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

ლ. გაბუნია, ს. ღურმიშიძე, მ. ზალიშვილი, გ. თუმანიშვილი,
გ. კანდელაკი, კ. ნადარეიშვილი, გ. ნახუცრიშვილი, გ. სანაძე, ბ. ყურაშვილი,
თ. ქანიშვილი, 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. Габунья, Н. А. Джавахишвили, С. В. Дурмишидзе,
К. Ш. Надарейшвили, Г. Ш. Нахуцришвили, Г. А. Санაძე, Г. Д. Тумანიшვილი,
М. М. Заалишვილი, Г. В. Кანდელაკი, Б. Е. Курашвили,
Т. Г. Чанишვილი
Ответственный секретарь С. Р. Лабაძე

EDITORIAL BOARD:

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

S. G. Chanishvili, N. A. Djavakhishvili, S. V. Durmishidze,
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 17.07.1987; Подписано к печати 23.10.1987; Формат бумаги
70×108¹/₁₆; Бумага № 1; Печатных л. 6,3; Уч.-издат. л. 6.0;
№ Э 14297; Тираж 1000; Заказ № 2512

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— შიგნაგსი — CONTENTS

Л. К. Габуния. Развитие биологических исследований в Академии наук Грузинской ССР	293
ლ. კ. ბუნია. ბიოლოგიური გამოკვლევების განვითარება საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიაში	
L. K. Gabunia. The development of biological investigations in Academy of sciences of Georgian SSR	
Л. Б. Гветадзе, Т. Н. Ониани, Ш. Д. Манджавидзе, М. В. Гогичадзе. Динамика нейронной активности хвостатого ядра в цикле бодрствование-сон	301
ლ. გვეტაძე, თ. ონიანი, შ. მანჯავიძე, მ. გოგიჩაძე. კუდიანი ბირთვის ნეირონული აქტივობის დინამიკა ძილ-ღვიძილის ციკლში	
L. B. Gvetadze, T. N. Oniani, Sh. D. Manjavidze, M. V. Gogichadze. Dynamics of neuronal activity of the caudate nucleus in the sleep — wakefulness cycle	
Д. С. Данелиа. Влияние канниевой кислоты на деполяризационный эффект ацетилхолина и глутамата	309
დ. დანელია. კანინის მჟავის გავლენა აცეტილქოლინის და გლუტამატის მადეპოლარიზებელ ეფექტზე	
D. S. Danelia. The action of kainic acid on depolarizing effect of acetylcholine and glutamate	
Л. Г. Цакадзе, К. Д. Куталия, З. П. Кометиани. ЭГТА-зависимое действие нейротрансмиттеров на Na, K-АТФазу	315
ლ. წაქაძე, კ. კუტალია, ზ. ქომეთიანი. ნეიროტრანსმიტერების ეგტადამოკრებული მოქმედება Na, K-ატფაზზე	
L. G. Tsakadze, K. D. Kutalia, Z. P. Kometiani. EGTA-Dependent effect of neurotransmitters on Na, K-ATPase	
М. Л. Долидзе, А. И. Литвинов, Г. А. Санадзе. Некоторые свойства фотомиксотрофного каллуса тополя	320
მ. დოლიძე, ა. ლიტვინოვი, გ. სანაძე. ვერხვის ფოტომიქსოტროფული კალუსის ზოგიერთი თვისება	
M. L. Dolidze, A. I. Litvinov, G. A. Sanadze. Some properties of photomixotrophic poplar callus	
Д. К. Мешвелиани, Р. Ш. Адамия, Р. В. Вашакидзе, Н. А. Мамулашвили, Т. Г. Чанишвили. Бактериальные гемолизины	328
დ. მშველიანი, რ. ადამია, რ. ვაშაკიძე, ნ. მამულაშვილი, თ. ჭანიშვილი. ბაქტერიული ჰემოლიზინები	
D. K. Meshveliani, R. Sh. Adamia, R. V. Washakidze, N. A. Mamulashvili, T. G. Chanishvili. Bacterial hemolysins	
И. И. Тимошук. Использование иммунологических показателей в целях оценки коррекции патологии при хронических нагноительных заболеваниях легких	339
ი. ი. ტიმოშუკი. იმუნოლოგიური მაჩვენებლების გამოყენება ფილტვის ქრონიკული ჩირქოვანი დაავადების კორექციის შეფასების მიზნით	
I. I. Timoshchuk. The use of immunologic indices for pathology correction on evaluation in chronic suppurative lung diseases	
К. Ш. Надарейшвили, А. Р. Егiazарова, Т. В. Сана я. Изменения термодинамических параметров облученного бычьего сывороточного альбумина и радиозащитный эффект мексамина	346



კ. ნადარეიშვილი, ა. ეგიაზაროვა, თ. სანაია. ზარის შრატის აღზრდილობის მინის დასხივებული თერმოდინამიკური პარამეტრების ცვლილებანი და მექანიზმის რადიოდაცვითი ეფექტი

K. Sh. Nadareishvili, A. R. Egiazarova, T. V. Sanaia. The changes of thermodynamic parameters of X-irradiated bovine serum albumin and protective effect of mexamin

Д. А. Ониани, В. П. Шибут. О механизмах действия адреномиметиков и адренолитиков на клетку *Nitella syncarpa* 352

ჭ. თნიანი, ვ. შიბუტი. *Nitella syncarpa*-ს უჯრედებზე ადრენომიმეტიკებისა და ადრენოლიტიკების მოქმედების შესახებ

D. A. Oniani, V. P. Shibut. On action mechanisms of adrenomimetics and adrenolytics on *Nitella syncarpa* cell

Н. В. Карсанов, Д. Э. Джагаров, З. Г. Гвишиани. Исследование конформации хроматина in vivo с помощью меченого актиномицина 357

ნ. ქარსანოვი, დ. ჯაგაროვი, ზ. გვიშიანი. ქრომატინის კონფორმაციის გამოკვლევა ნიშანდებული აქტინომიცინ D-ს დახმარებით

N. V. Karsanov, D. E. Jagarov, Z. G. Gvishiani. Study of chromatin conformation in vivo by labelled actinomycin D.

РАЗВИТИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИНСКОЙ ССР

Л. К. Габуня

Великая Октябрьская революция, открывшая народам Советского Союза широкий путь к свободному созидательному труду и научному творчеству, дала мощный толчок развитию в Грузии биологических наук.

Немало ценных сведений о растительном и животном мире Грузии содержат древнегрузинские рукописи. Итоги раннего периода изучения нашей флоры и фауны были подведены в конце XVIII в. в известном «Описании царства Грузинского» Вахушти Багратиони. Большое значение для развития естествознания в Грузии имели научные экспедиции Петербургской академии наук на Кавказе (первая половина XIX в.) и в особенности создание в Тбилиси в середине прошлого столетия Ботанического сада и Кавказского музея. Систематические исследования в области ботаники и зоологии, ряда других биологических дисциплин (физиология животных и человека, микробиология, генетика, эмбриология, гистология, биохимия, антропология) начались после открытия Тбилисского университета в 1918 г.

С установлением Советской власти в Грузии связано создание широкой сети научных учреждений биологического профиля, где начали проводиться исследования, отвечающие требованиям народного хозяйства молодой Советской республики. Организация в 30-х годах Закавказского филиала АН СССР, а в начале 1941 г. — Академии наук Грузии в значительной мере способствовала концентрации научных сил и развитию наиболее актуальных направлений современной биологии.

В 1933 г. на базе научных отделов и лабораторий Тбилисского ботанического сада был образован Институт ботаники, который ныне носит имя одного из его основателей Н. Н.

Кецховели. Основная задача флористов и систематиков в те годы состояла в детальной инвентаризации флоры республики, что должно было создать предпосылку для выявления и освоения ее богатых растительных ресурсов. Были организованы крупные экспедиции, широко развернулись региональные флористические исследования. Собранный обширный материал лег в основу восьмитомной «Флоры Грузии». Сейчас сотрудники института ведут углубленные исследования в области систематики и ареалогии, продолжая подготовку второго, переработанного и дополненного издания «Флоры Грузии» (вышло в свет уже семь томов). Успешно изучается флора споровых растений республики. Опубликовано два тома определителя этих растений и подготовлен к изданию третий том. В ближайшие годы появятся «Конспект флоры споровых растений Грузии» и «Определитель шляпочных грибов Закавказья», составленный совместно с армянскими и азербайджанскими специалистами.

В институте основательно исследованы вопросы формационного состава растительности, детально разработаны принципы геоботанического районирования и вертикальной поясности растительного покрова, выяснен его типологический состав. По новому освещены вопросы голоценовой истории лесной флоры. Впервые дана полная классификация растительности республики и изучены важнейшие вопросы геоботанического картирования. Созданы геоботаническая и агрогеоботаническая карты, карта естественных кормовых угодий.

Эти исследования послужили основой для разработки мероприятий по промышленному освоению и исполь-

зованию растительных ресурсов Грузии.

В области физиологии и анатомии растений разрабатывались такие вопросы, как физиология вегетативного размножения, анатомия водопроводящих систем, содержание витаминов в растениях Грузии, причины хлороза виноградной лозы и др. В настоящее время в институте успешно ведутся исследования по улучшению снабжения лозы питательными веществами путем внекорневого питания и возможности его воздействия на интенсивность фотосинтеза и передвижение ассимилятов к гроздьям.

Интересные результаты получены в области физиологии двудомных растений. На богатом фактическом материале установлены особенности внешнего проявления полового диморфизма этих растений и подробно рассмотрены вопросы происхождения пола и его эволюционного развития. Необходимо отметить также открытие неизвестного ранее фотобиологического явления, названного эффектом изопрена (биосинтез свободного изопрена в процессе фотосинтеза), представляющего значительный интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. В последние годы большое внимание уделялось изучению физиологических основ морозоустойчивости виноградной лозы и некоторым другим вопросам физиологии растений, представляющим немалый интерес для практики сельского хозяйства.

Собран уникальный материал, имеющий большое значение для исследования нашей культурной флоры, в частности для решения вопросов происхождения и эволюции пшениц, их филогенетической систематики. Благодаря этим работам, получившим широкое признание, грузинские пшеницы стали объектом интенсивных исследований как в нашей стране, так и за рубежом.

В последнее время в Институте ботаники быстро развиваются экологические и биоэкологические исследования, результаты которых необходимы для разработки единой системы мероприятий по охране окружающей среды. Все больше внимания уделяют наши ботаники региональным комплексным исследованиям, внося ощутимый вклад в дело охраны и освоения

естественных кормовых угодий. Результаты недавних флористических и геоботанических исследований в бассейнах реки Арагви легли в основу мероприятий по рациональному использованию, охране и восстановлению природных ресурсов этого горного региона. Успешно ведется ботаническое изучение таких районов, как Сванети и Рача-Лечхуми. Особо следует выделить экофизиологические исследования, проводимые на высокогорной станции Казбеги, являющейся крупнейшим в СССР центром в области изучения экологии высокогорной растительности.

Еще в 20-х годах в Тбилиси были организованы отдельные лаборатории, где развернулись зоологические исследования в ответ на конкретные требования народного хозяйства и здравоохранения республики. Однако стала очевидной необходимость ведения планомерных фундаментальных исследований по зоологии. Это важное дело возглавил основанный в 1932 г. Сектор зоологии Закавказского филиала АН СССР, впоследствии преобразованный в Институт зоологии АН СССР.

Фаунистические исследования этого института охватили в первую очередь энтомофауну — наиболее интересную и богатую формами группу. Были получены исчерпывающие сведения о видовом составе и эколого-географическом распределении многих групп насекомых, распространенных на территории Грузии. Затем был изучен состав и географическое распределение групп пресмыкающихся, птиц, грызунов и других животных. Особое внимание уделялось аутоэкологическим исследованиям (изучение взаимодействия вида со средой его обитания) — в основном видов, важных для народного хозяйства.

В послевоенный период институт широко развернул работы в области паразитологии. Изучалась гельминтофауна животных, проводились эколого-фаунистические исследования паразитических нематод сельскохозяйственных растений. При этом разрабатывался ряд таких вопросов, как взаимоотношение между паразитом и хозяином, специфичность паразитов и некоторые другие.

В последние годы большое внимание уделяется комплексному эколого-



фаунистическому изучению отдельных районов Грузии. В результате выяснен качественный и количественный состав паразитокомплексов некоторых групп насекомых, рыб, амфибий, пресмыкающихся, птиц и млекопитающих, раскрыта зависимость структуры этих комплексов от факторов внешней среды, обнаружены основные очаги гельминтозов.

В Институте зоологии ведутся также комплексные гидробиологические и ихтиологические исследования важнейших озер и водохранилищ, изучается рыбное население рек Грузии. Выявлен видовой и подвидовой состав ихтиофауны, уточнены диагнозы многих видов, установлены закономерности их эколого-географического распределения. Для новейшего этапа гидробиологических исследований характерно изучение биологической продуктивности водоемов в динамическом аспекте. С этой точки зрения исследуется динамика развития фитопланктона и гетеротрофных звеньев отдельных водоемов, особенности жизнедеятельности массовых форм зоопланктона и зообентоса, величина первичной продукции водоемов, структура рыбного населения, биология различных видов рыб и т. д.

Заслуживают упоминания выполненные в институте исследования в области экспериментальной эмбриологии. Изучены, в частности, процесс дифференцировки ультраструктуры клеток глаза зародыша птиц, взаимосвязи ультраструктуры и химической дифференцировки клеток глаза, явление соматической полиплоидии в эмбриогенезе. Следует отметить также результаты исследования динамики полового цикла и плодовитости у распространяемых на территории Грузии мышевидных, что несомненно важно для определения закономерностей изменения численности этих грызунов и установления рациональных сроков борьбы с ними. Наконец, в настоящее время Институт зоологии развивает исследования по таким направлениям, как популяционная экология, этология и др.

В 30-х годах, по мере расширения палеонтологических исследований в Грузии, совершенствовались приложения этой дисциплины в геологии, а также разрабатывались более общие проблемы. Стратиграфическая палеон-

тология начала перерастать в эволюционную палеонтологию, или палеобиологию. В 1950 г. в системе ГССР был организован соответствующий сектор, преобразованный впоследствии в Институт палеобиологии. Исследования института, носящего ныне имя Л. Ш. Давиташвили, охватили почти все важнейшие группы ископаемых организмов, встречающиеся на территории республики: кайнозойские растения, простейшие, мезо-кайнозойские плеченогие и моллюски, позвоночные.

Значительных успехов добились грузинские палеонтологи в изучении эволюции животного мира Черноморско-Каспийской области на протяжении позднего кайнозоя. Как известно, вследствие горообразовательных движений, происходивших в третичное время, величина, конфигурация и даже число морских бассейнов этой области с геологической точки зрения очень быстро изменялись, что сразу же отражалось и на их населении: одни формы вымирали, а другие, наоборот, бурно развивались и размножались. Нашим палеонтологам, изучавшим эту фауну, удалось установить несомненную причинную связь между изменениями условий существования и изменениями органических форм, выяснить характер воздействия фактора среды на организм, выявить изменчивость, вызываемую и направляемую этими факторами.

Весьма существенные результаты получены Институтом палеобиологии в области обоснования дробного подразделения мезозойских и кайнозойских образований Грузии и смежных с нею областей Юга СССР. Этот успех достигнут преимущественно на основе палеобиологического изучения различных групп ископаемых организмов, которое во многих случаях проводилось совместно с сотрудниками Палеонтологического института АН СССР и Геологических институтов АН СССР и АН ГССР. Кроме этого, в Институте палеобиологии выполнен ряд крупных исследований по таким центральным проблемам эволюционного учения, как прогресс в истории органического мира, причины вымирания организмов, соотношения между жизнью особи и историей соответствующего вида, связи между изменениями формы и функцией организма и др.

Здесь уместно, быть может, напомнить о мировоззренческом значении палеобиологии как науки, поставляющей материал для разработки вопросов дарвинизма и изучающей эти вопросы. Было бы, конечно, наивно думать, что идеализм и фидеизм изгнаны из биологии на вечные времена (не так давно в Ницце на I Международном конгрессе по палеонтологии человека некоторые из его участников совершенно серьезно развивали мысль о совместимости эволюционизма и креационизма). Поэтому сотрудники института и впредь намереваются уделять должное внимание проблемам эволюционного учения. В ближайшие годы должны усилиться палеобиоценологические и экосистемные исследования. Большое внимание будет уделяться также расширению применения палеонтологических методов в геологии.

В 1971 г. в системе Академии наук Грузии был организован Институт биохимии растений, основанию которого предшествовала длительная работа по созданию современной экспериментальной базы исследований в данной области и подготовке высококвалифицированных специалистов. Основными научными направлениями института являются: исследование ДНК клеточных органелл и белков культурных растений для разработки молекулярных основ селекции; выяснение путей управления ферментными системами азотного и окислительного обмена, что позволило бы повысить урожайность сельскохозяйственных культур и качество продукции, получаемой из растительного сырья; изучение метаболизма и механизма действия эндогенных и экзогенных регуляторов роста и развития растительной ткани; исследование биосинтеза флавоноидов, стероидов, эфирных масел, углеводородов и других соединений вторичного происхождения с целью направленного синтеза соединений, важных для народного хозяйства и медицины.

За относительно короткое время в институте выполнены крупные исследования в области изучения функции и организации генома. Здесь были впервые найдены так называемые сателлитные компоненты ДНК растений. У родственных видов высших растений обнаружены случаи различия как количественного содержания, так и набора сателлитных ДНК. Выделе-

ны в чистом виде и охарактеризованы сателлитные ДНК многих высших растений. При помощи рестрикции проведен анализ таких ДНК, составлены их физические карты. Методом высокоразрешающей термической денатурации исследованы ДНК хлоропластов высших растений, принадлежащих к разным классам и порядкам. В результате обнаружена значительная внутримолекулярная гетерогенность. В отличие от соответствующих ядерных геномов исследованные ДНК хлоропластов высших растений характеризуются значительной общностью своей внутримолекулярной организации.

Изучение молекулярных механизмов транскрипции на уровне изолированных клеточных органелл, а также основных компонентов хроматина клеточных ядер показало органоу и клеточную специфичность распределения ядрышковой и карิโอплазматической форм РНК-полимеразы. Получены данные, свидетельствующие об участии циклической аденозинмонофосфатной кислоты в гормональной регуляции транскрипции у растений. Выявлены некоторые особенности РНК-синтезирующей системы ядер, хлоропластов и митохондрий.

Большое внимание уделяется в институте биохимии растений изучению ферментов микроорганизмов. Необходимо отметить работы по выделению, очистке, изучению физико-химических свойств и иммобилизации ряда ферментов, имеющих важное народнохозяйственное значение. Отобраны активные штаммы-продуценты кислото-стабильной α -амилазы и глюкоамилазы. Получены мутантные представители микромицетов, обладающие повышенной способностью к биосинтезу амилаз и целлюлаз. Разработаны препаративные способы очистки α -амилазы, глюкоамилазы и др. В настоящее время решаются такие важные для реализации Продовольственной программы задачи, как биоконверсия целлюлозных отходов в пищевую глюкозу или использование фермента гиалуронидазы для повышения рождаемости при искусственном оплодотворении крупного рогатого скота.

Уже много лет в институте ведется исследование по биохимии превращения чужеродных соединений, или ксенобиохимии. Установлено, что ряд



растений поглощает и обезвреживает токсические вещества. Выявлены молекулярные механизмы детоксикации, намечаются пути управления этими ферментными процессами. Подобраны растения, активно очищающие биосферу от чужеродных соединений (к их числу относятся яблоня обыкновенная, груша кавказская дикая, грецкий орех и др.). Касаясь работ, имеющих важное практическое значение, нельзя не упомянуть создание технологии производства витаминсодержащих красящих концентратов из отходов чайного сырья, а также получение штамма бактерий-продуцентов каротиноидов (провитамина А), в 14 раз более активного, чем исходный штамм.

В ближайшие годы намечается расширение исследований по некоторым важным направлениям биотехнологии.

Значительный интерес представляют исследования, проводимые в Институте молекулярной биологии и биофизики, образованном в 1986 г. на базе Сектора биофизики Института физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР. Здесь удалось обнаружить, выделить и охарактеризовать два неизвестных до сих пор мышечных белка: протин М, значительно увеличивающий сократимость реконструированной актомиозиновой системы, и P_{55} , оказывающий влияние на аденозинтрифосфатазу как миозина, так и актомиозина и, что особенно важно, практически полностью ингибирующий АТФазу актомиозинового комплекса при сохранении его сократительных свойств. Значительные успехи достигнуты и в исследовании субмолекулярного строения мышечных белков — миозина, актина и др., а также топографии их функционально важных центров. Большое внимание уделяется в институте изучению структуры и функции нуклеопротеидных комплексов и ферментов, контролирующих синтез нуклеиновых кислот.

Институт молекулярной биологии и биофизики стал одним из первых в стране научных коллективов, где началось изучение молекулярной биологии микроорганизмов нового класса — архебактерий. Налажено выращивание термоацидофильных и галофильных архебактерий, из которых выделены, очищены до гомогенного состояния и охарактеризованы ДНК-зависи-

мые РНК- и ДНК-полимеразы. Сравнение их свойств со свойствами полимераз эукариот и обычных бактерий будет способствовать выяснению механизмов эволюции репликационного и транскрипционного аппаратов.

С целью установления механизмов взаимодействия нуклеиновых кислот с белками в институте осуществлен синтез отдельных фрагментов гистоноподобных белков и пептидоподобных макромолекулярных систем. Большое внимание уделяется здесь синтезу биоподобных высокомолекулярных соединений, имеющих практическое значение. Разработаны новые поликонденсационные методы получения полимеров, с помощью которых синтезировано большое число не описанных ранее биоподобных макромолекулярных систем на основе природных аминокислот. Кроме того, получено большое число биодegradуемых, водонерастворимых полимеров, представляющих интерес для хирургии в качестве саморассасывающихся материалов.

Развитие физиологической науки в Грузии связано с именем И. С. Бериташвили, возглавившего в 1919 г. в Тбилисском университете кафедру физиологии, на базе которой был организован впоследствии институт (ныне Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР). Созданный И. С. Бериташвили центр физиологических исследований развил свою деятельность в основном в области нейрофизиологии. Ранние этапы этих исследований были связаны главным образом с изучением нервно-мышечного аппарата. Разница в возбудимости различных участков мышцы исследовалась с биохимической точки зрения, что позволило установить связь повышенной возбудимости иннервированных участков мышцы с их биохимическими особенностями. Наряду с проблемой передачи возбудимости от нерва мышце подробно изучалось рефлекторное действие спинного мозга. Была экспериментально обоснована ведущая роль желатинозной субстанции Роладо в процессе торможения. Была также выдвинута оригинальная гипотеза механизма общего торможения, согласно которой возникновение этого явления связано с так называемым нейропилем как в спинном мозгу (желатинозная суб-

станция), так и головном (ретикулярная формация).

В 30-е годы, наряду с дальнейшим исследованием упомянутых уже проблем, было начато изучение общего поведения животных и, в особенности, их ориентации в пространстве. Особое внимание уделялось, в частности, роли вестибулярного аппарата уха в процессе ориентации. В годы Великой Отечественной войны в Институте велись исследования по изучению влияния на организм животных взрывной волны и обратности нервных сдвигов, вызванных контузией.

И в послевоенное время продолжалось микрофизиологическое исследование спинного мозга, изучение с помощью электрофизиологических методов взаимодействия коры головного мозга и подкорковых образований, исследование общего поведения животных и др.

Следует заметить, что здесь впервые в СССР было начато детальное изучение ретикулярной формации головного мозга. Было установлено немало важных фактов, свидетельствующих о воздействии этой формации на кору головного мозга, и показано, что она оказывает как активирующее, так и тормозящее воздействия.

В конце 50-х годов исследование общего поведения животных позволило И. С. Бериташвили окончательно установить так называемую психонервную деятельность животных, характеризующуюся более высокой организацией, чем условно-рефлекторная. Концепция психо-нервной деятельности легла в основу изучения памяти животных. Исследованиями были охвачены почти все группы позвоночных — от рыб и амфибий до высших обезьян.

Начиная с 60-х годов в Институте физиологии интенсивно изучается роль эмоций в процессе запоминания. В связи с этим важным объектом исследований стали так называемые лимбические структуры. Наряду с научным исследованием поведенческих актов, все большее внимание уделялось микрофизиологии и нейрохимии, развитие которых также тесно связано с изучением проблемы памяти.

Наиболее крупные научные достижения института за последние годы сводятся к следующему.

Создана классификация памяти человека и животных, получившая всемирное признание. Обнаружена активная роль нейроглии коры в интегративной деятельности больших полушарий, что позволило создать концепцию нейро-глиальной системы обеспечения некоторых высших функций головного мозга.

Установлена сложная функциональная структура парадоксальной фазы сна; обнаружено, что различные стадии этой фазы отражают разные мотивационные процессы и уровни эмоционального напряжения. Это позволило создать новую концепцию биологической роли парадоксальной фазы сна в гомеостазе мозга.

Изучены условия возникновения экспериментальной информационной патологии высшей нервной деятельности, обнаружены механизмы саморегуляции мозга при этой форме патологии. Созданы принципиально новые модели экспериментальной патологии высшей нервной деятельности, позволившие обнаружить причины новых форм патологии мозга, их патогенетические и защитные механизмы и создать теорию информационной патологии поведения.

Обнаружены специфические нейроны восприятия болевой чувствительности на уровне промежуточного мозга, а также система структур, участвующая в механизмах обезболивания. Установлены электрофизиологические и вегетативные корреляты саморегуляции высшей нервной деятельности человека, что легло в основу представления о механизмах некоторых психофизиологических функций человека.

Обнаружены механизмы регуляции магистральных и пиальных сосудов головного мозга, а также механизмы развития отека головного мозга; установлена корреляция между уровнем интенсивности местного кровотока в коре больших полушарий и уровнем развития эмоциональных состояний.

Установлены молекулярные, клеточные (мозговые) и поведенческие проявления влияния разных доз радиации на организм и разработаны некоторые научные принципы противорадиационных мероприятий.

На пути поиска эндогенных регуляторов нервной клетки впервые выделе-



ны пептиды, подвергающиеся пост-трансляционной модификации.

На моделях тканевых культур коры мозга показано, что под действием ионов калия усиливается движение отростков и появляются новые отростки. Эти данные позволяют выдвинуть гипотезу о роли миелинизации в образовании новых временных связей.

Расшифрована принципиальная кинетическая схема Na^+ , K^+ -АТФазы и идентифицированы ее регуляторные механизмы, связанные с функцией и состоянием клетки. Особый интерес вызывает обнаружение и изучение действия нейротрансмиттеров на АТФазы синапсом, отражающего работу высокочувствительной регуляторной системы, возможно, играющей важную роль в проявлении некоторых высших функций мозга.

В Институте экспериментальной морфологии им. А. Н. Натишвили со дня его основания изучается сердечно-сосудистая система, в особенности ее тончайшая часть — капилляры. Данные, полученные в результате многолетних исследований, выполненных в этом направлении, составили научную основу для ряда оперативных вмешательств. Здесь установлены важные особенности строения микроциркуляторного кровеносного русла, в частности показана особая чувствительность капилляров к изменениям условий существования; выявлены механизмы, обуславливающие местное кровообращение и др. Весьма существенны исследования, позволившие выявить в сердечной мышце синусоиды, которые в случае необходимости обеспечивают питание миокарда посредством обратного кровотока.

Выполненные в институте исследования основных свойств искусственных заменителей кровеносных сосудов имели также важное теоретическое значение, так как позволили установить факт возникновения в протезе кровеносной сети. Институту принадлежит приоритет в деле обоснования возможности замещения веной собственной артерии.

Безусловно заслуживают внимания разработанные в институте тончайшие методы морфологических исследований, позволяющие распознать тенденцию малигнизации в очагах предраковых заболеваний.

Ряд интересных работ посвящен изучению механизма восстановления при повреждении отдельных органов животных.

За последнее десятилетие в институте успешно исследуется вопрос развития кровоснабжения сердца в филогенезе позвоночных. Показан путь становления и дифференциации вечечных сосудов сердца и терминального сосудистого русла миокарда. Установлены пределы устойчивости организма к гипо- и аноксии, выявлен комплекс неспецифических реакций адаптивного характера к кислородной недостаточности.

Заслуживают внимания исследования, выполненные в области изучения патофизиологии шока. Доказано, что тяжелая агрессия в организме животного не сопровождается дефицитом содержания эндогенных катаболических гормонов в крови — наоборот, имеет место увеличение их концентрации.

Изучены изменения ультраструктуры изолированного сердца при различных условиях его консервации и показано, в частности, что наряду с нарушениями, возникающими в результате кислородного голодания, имеют место и особые изменения в стенке сердечных артерий — «опустошение» гладкомышечных клеток среднего слоя.

Важные результаты получены также в области исследования морфогенеза опухолевого роста. Показано, что раковые клетки обладают способностью не только сохранять ряд нормальных свойств, но и продуцировать вещества, которые опорная ткань не может производить.

Значительный интерес представляют проводимые в институте исследования по изучению проблемы старения (в биологическом и социально-медицинском аспектах). Установлено, что в процессе старения возрастные изменения большинства физиологических, биохимических, психологических параметров проявляются неравномерно. В отдельные периоды особенно повышен риск срыва гомеостаза, однако у долгожителей и членов их семей эти критические периоды проходят без особых нарушений.

Особо следует отметить, что в институте разработана технология получения разных лекарственных форм плацентарного интерферона — «пла-



ферона», который, помимо интерферона содержит и другие биологически активные вещества, обладающие антиоксидантным эффектом.

Заслуживают упоминания выполняемые в институте исследования по изучению влияния «цеолитовой диеты» на микрофлору внутренних органов животных, рост и дифференцировку их тонкой структуры, а также на постимплантационную выживаемость эмбрионов.

Следует, наконец, отметить, что в Институте экспериментальной морфологии разработаны медико-технические требования, по которым ВНИИ медицинского приборостроения сконструированы первые советские установки для радиоиммунологических исследований.

Цитофотометрические и биохимические исследования, выполненные в лаборатории биологии развития (отделившейся в 1983 г. от Института экспериментальной морфологии АН ГССР) Тбилисского государственного университета, показали, что в печени и почках ряда животных под влиянием гомологического ядерного экстракта (вытяжки изолированных ядер) происходит частичное разрушение ДНК, причем разрушенная ДНК является гетерохроматиновой. Сам ядерный экстракт не содержит ДНК и не обладает ДНКазной активностью. В нем обнаружена фракция РНК, играющая существенную роль в его действии, которое, как установлено, является тканеспецифичным. Развита мысль о том, что активная часть ядерного экстракта способна демаскировать ДНК хроматина, и, возможно, участвует в регуляции геной активности.

В лаборатории биофизики Института физики исследуются термодинамические аспекты жизненных процессов. Определяется теплоемкость и детально изучаются процессы гидратации фибриллярных и глобулярных белков, нуклеиновых кислот в нативном и денатурированном состояниях. Установлена важная роль упорядоченных цепочек из молекул воды в структуре волокон белков и нуклеиновых кислот. Найдена эмпирическая зависимость гидратации двойной спирали ДНК от ее химического состава. Впервые измерена низкотемпературная теплоемкость ДНК при различных значениях ее влажности. Применение метода микрокалориметрии, в создании которого наряду с сотрудниками Института физики принимали участие специалисты Научного центра биологических исследований АН СССР в Пущине, позволило обнаружить кооперативные конформационные переходы в составе цельных клеток, тканей и органов. Удалось показать, что эти тепловые переходы различны для нормальных и опухолевых клеток и тканей. На основе экспериментальных данных о микрорезлементном составе нормальных и опухолевых тканей (на молекулярном и клеточном уровнях) разработана концепция металлоканцерогенеза.

В заключение отметим, что в этом кратком обзоре мы, естественно, не могли охватить все вопросы общей и физико-химической биологии, разрабатываемые в Академии наук Грузии. Не были затронуты также интересные исследования, выполняемые во внеакадемических учреждениях.

УДК 612.826.5:612.821.7

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

ДИНАМИКА НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ ХВОСТАТОГО ЯДРА В ЦИКЛЕ БОДРСТВОВАНИЕ-СОН

Л. Б. Гветадзе, Т. Н. Ониани, Ш. Д. Манджавидзе,
М. В. Гогичадзе

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

Поступила в редакцию 20.05.1987

На крысах, в условиях свободного поведения, изучалась динамика нейронной активности хвостатого ядра в цикле бодрствование-сон. Показано, что большинство нейронов (66%) этого ядра разряжаются более высокочастотно во время эмоционального бодрствования и парадоксального сна по сравнению с медленноволновым сном. Отдельной группой выделяются нейроны (27%), ведущие себя противоположно, — их активность была наивысшей на фоне медленноволнового сна. Обнаружены также нейроны (7%), не меняющие свою активность при смене фаз и стадий цикла бодрствование-сон. Обсуждается участие нейронов хвостатого ядра в регуляции цикла бодрствование-сон.

Хвостатое ядро (ХЯ) является одним из наиболее крупных подкорковых образований головного мозга. Общеизвестно его участие в регуляции моторной активности и условно-рефлекторной деятельности [8]. Кроме того, на основе изучения эффектов самораздражения [22], а также оборонительных рефлексов [1], показано значение этого ядра в организации мотивационно-эмоциональных реакций.

Особый интерес представляет участие ХЯ в регуляции цикла бодрствование-сон (Б-С). Данный вопрос изучался довольно интенсивно; еще в 50-х годах было обнаружено важное значение ХЯ в формировании начальной фазы медленного сна (МС) [9, 16]. В дальнейшем в многочисленных опытах было показано, что низкочастотным электрическим раздражением ХЯ можно вызвать синхронизацию электрокортикограммы [2, 7, 11].

Разнообразность функций ХЯ подкреплена его многочисленными дву-

сторонними связями с различными структурами головного мозга. Кроме важнейших связей с разными образованиями лимбической системы (миндалины, гипоталамус и др.) [13], ХЯ имеет тесные связи с различными ядрами таламуса, МРФ, мозжечком [2, 8], а также различными областями новой коры [1, 8]. Особо нужно отметить тот факт, что ХЯ тесно связано с дофаминергической системой мозга, которая, наряду с регуляцией моторной активности, играет значительную роль в организации цикла Б-С [19]. Многочисленными экспериментами показаны прямые двусторонние связи между черной субстанцией (основной частью дофаминергической системы) и ХЯ [14, 18].

Большинство работ по нейронной активности ХЯ проведено в условиях острого эксперимента и касалось только лишь спонтанной фоновой активности [3, 6, 20]. В настоящее время микроэлектродные исследования главным образом сочетаются с изучением нейронных перестроек этого ядра при условнорефлекторной дея-

тельности [8]. Существуют лишь единичные работы о динамике нейронной активности ХЯ во время бодрствования и сна, однако они носят случайный характер [5]. Учитывая то обстоятельство, что в аспекте выявления функциональной роли той

МЕТОДИКА

Опыты ставились на 10 белых крысах. Под гексаналовым наркозом (100 мл/кг) в черепе просверливали трепанационное отверстие и монтировали в нем механический миниатюрный манипулятор. Центр для отверстий на черепе определяли по атласу Буреша и др. [12]. В отверстие вставляли и укрепляли норакрилом цилиндрические «колодцы» из плексигласа, имеющие резьбу на внутренней поверхности. Для ограничения пульсации на дне «колодца» натягивалась пленка парафильма. Идентификация различных фаз и стадий цикла бодрствование-сон производилась путем регистрации электроэнцефалограммы, электрогиппокампограммы и электроокулограммы.

Микроэлектроды из вольфрамовой проволоки диаметром 200—250 мкм электрически затачивались в 6%-ном растворе NaOH (ток 0,1—0,2 А). Затем электроды по всей поверхности, за исключением кончика, изолировались специальным лаком (АК-113). Сопrotивление электродов равнялось примерно 5—10 МОм. Микроэлектроды погружались в мозг с помощью манипулятора, завинченного в «колодец». Один шаг микроманипулятора перемещал электрод на 50 мкм.

Отведенные внеклеточно потенциалы действия нейронов через миниатюрный катодный повторитель пода-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статистический анализ динамики нейронной активности ХЯ в цикле Б-С позволил выделить три основных типа нейронов. Первый тип нейронов включал те единицы, которые наивысшую, по сравнению с МС, частоту разрядов показывали во время эмоционального бодрствования (ЭБ) и парадоксального сна (ПС) — рис. 1Б. Такие нейроны составляли 66% от общего числа зарегистрированных клеток. Как видно из частотной ги-

стогаммы, нейрон данного типа во время МС разряжается низкой частотой, а с пробуждением животного, происходит резкое увеличение активности (рис. 1А). При этом следует указать, что частота разрядов в различных эпизодах бодрствования может отличаться друг от друга, хотя она всегда выше, чем в МС. В частности, при развитии ЭБ активность выше, чем при простом спокойном бодрствовании. В ПС же ритм разрядов

или иной структуры мозга можно получить ценную информацию, изучением именно нейронной активности, мы задались целью детально исследовать динамику такой активности ХЯ в цикле Б-С.

вались на усилители двухлучевого осциллографа. Регистрация разрядов нейронов производилась на фотопленке с экрана осциллографа, на магнитной пленке и (после амплитудного дискриминирования) на бумаге параллельно с электроэнцефалограммой. Запись на магнитной пленке обрабатывалась с помощью микроЭВМ «Анонс-101». Многоканальный дискриминатор давал возможность выделить один или несколько нейронов в случае мультинейронной регистрации. На бумаге записывалась активность только одного нейрона, имевшего наиболее высокоамплитудные пики, а при составлении гистограмм обработке подвергалась активность всех нейронов, выделяемых дискриминатором. Во избежание ошибок, вносимых шумом, активность нейрона с наиболее низкой амплитудой пиков не анализировалась. По окончании опытов через микроэлектрод пропускали постоянный ток (2 мА, 60 с), животных забивали, а мозг фиксировали в 10%-ном растворе формалина. Ход микроэлектрода и конечная позиция его кончика определялась на серийных фронтальных срезах толщиной 20 мкм. Данные обрабатывались статистически. Рассчитывались средние величины, их стандартные отклонения и достоверность наблюдаемых изменений по t-критерию Стьюдента.

стогаммы, нейрон данного типа во время МС разряжается низкой частотой, а с пробуждением животного, происходит резкое увеличение активности (рис. 1А). При этом следует указать, что частота разрядов в различных эпизодах бодрствования может отличаться друг от друга, хотя она всегда выше, чем в МС. В частности, при развитии ЭБ активность выше, чем при простом спокойном бодрствовании. В ПС же ритм разрядов

достигает, а иногда и превышает уровень ЭБ. Вместе с тем, характерно, что с развитием ПС происходит постепенное нарастание активности (рис. 1А). При этом активность дан-

тивности нейрона второго типа в цикле Б-С. Хорошо видно, что с наступлением десинхронизации электрической активности происходит резкое уменьшение, а иногда даже пол-

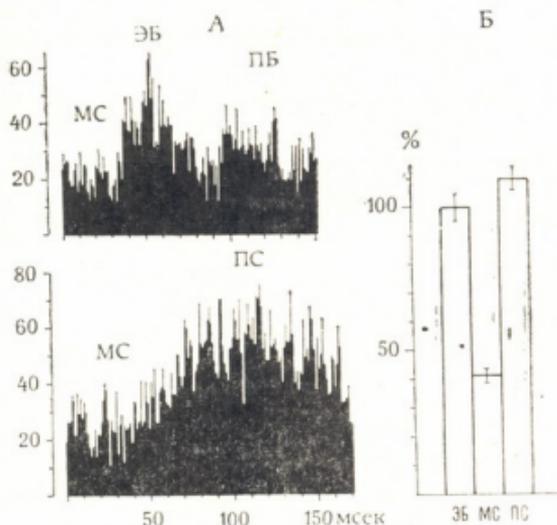


Рис. 1. Динамика активности нейрона первого типа хвостатого ядра в цикле бодрствование - сон: А — частотограммы фоновой импульсной активности; по оси абсцисс — время в с, по оси ординат — количество импульсов за одну с; Б — результаты статистической обработки (за 100% взята средняя частота разрядов нейрона во время эмоционального бодрствования); ПБ — пассивное, ЭБ — эмоциональное бодрствование, МС — медленноволновый, ПС — парадоксальный сон. Разница между ЭБ, ПС и МС статистически достоверна ($p < 0,001$)

ного нейрона сохраняется на высоком уровне в течение всей фазы.

Большинство нейронов первого типа во всех фазах разряжалось одинаковым паттерном. Однако были зарегистрированы и такие единицы, которые во время МС разряжались по типу пачка-пауза, а в бодрствовании и ПС нейронные спайки были распределены относительно равномерно (рис. 2).

Нейроны второго типа характеризовались наивысшей частотой разрядов во время МС по сравнению с другими состояниями цикла Б-С (рис. 3Б). Эти нейроны были сравнительно малочисленными (27%). На рис. 3А показана динамика ак-

тивное торможение активности нейрона. С восстановлением ЭЭГ картины МС частота разрядов вновь возрастает, а в ПС опять происходит угнетение нейронной активности.

В экспериментах редко (7%), но все же регистрировались и такие нейроны, которые не показывали статистически достоверной разницы в частоте разрядов при смене фаз цикла Б-С (третий тип нейронов).

При мультинейронной записи обратил на себя внимание тот факт, что одновременно в пределах одной и той же нейронной популяции можно было регистрировать единицы первого и второго типов. Кроме того что эти клетки отличались друг от

друга динамикой частоты разрядов в различных физиологических состояниях, они имели разную амплитуду спайкового разряда. В большинстве

па, амплитудой разряда. Во время синхронизации ЭЭГ на осциллографической записи преобладают разряды «высокой» амплитуды (рис. 4А), тог-

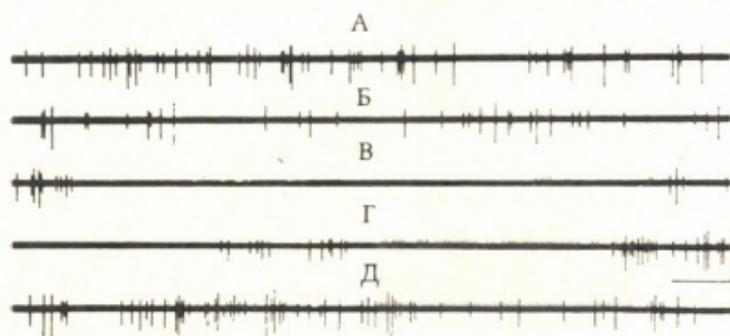


Рис. 2. Осциллографическая запись мультинейронной активности хвостатого ядра в различных фазах цикла бодрствование - сон: А — эмоциональное, Б — пассивное бодрствование, В, Г — медленноволновый, Д — парадоксальный сны. Калибровка, — 100 мкв, 100 мс

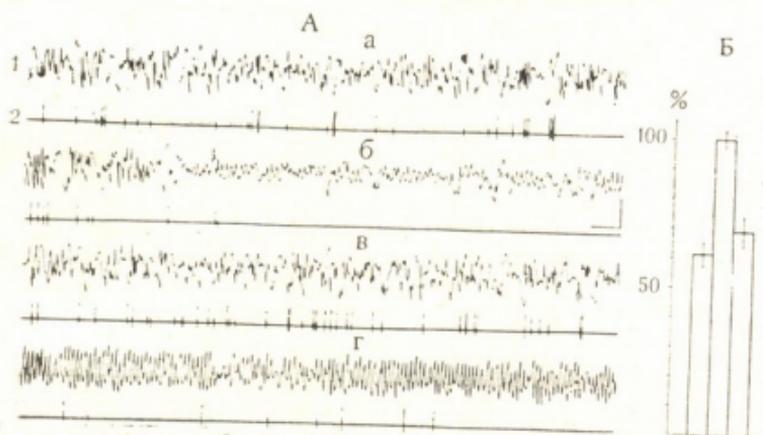


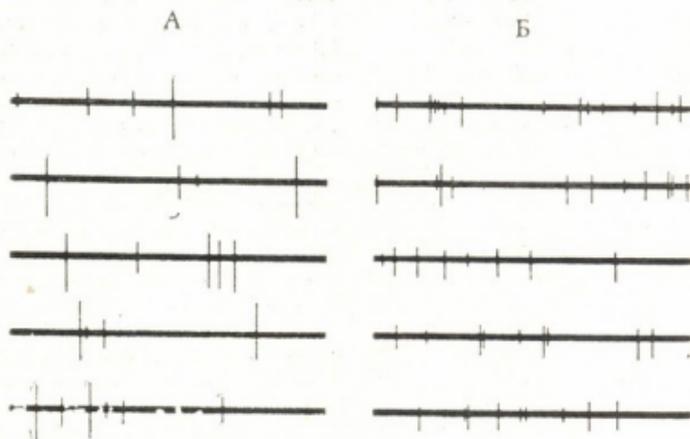
Рис. 3. Динамика активности нейрона второго типа хвостатого ядра в цикле бодрствование — сон: А — сопоставление изменений электроэнцефалограммы (1) и нейронной активности (2): а, в — медленноволновый сон, б — пробуждение из медленноволнового сна, г — парадоксальный сон. Калибровка — 100 мкв, 1 с; Б — результаты статистической обработки (за 100% взята средняя частота разряда нейрона во время медленноволнового сна); разница между МС и ЭБ, ПС достоверна ($p < 0,001$); обозначения те же, что и на рис. 1

случаев нейроны второго типа, то есть те, которые наивысшую активность показывали во время МС, характеризовались более высокой, по сравнению с единицами первого ти-

да как при десинхронизации данный нейрон полностью замолкает и резко активируются нейроны с «низкой» амплитудой разряда (рис. 4Б), которые разряжались и во время МС,

хотя и сравнительно низкой частотой. Еще один пример такого случая показан на рис. 5. В ЭБ и ПС разряжаются только нейроны со сравнительно малой амплитудой разрядов. Они уменьшают свою активность в

дремотном состоянии и на фоне МС. Что касается нейронов с «большой» амплитудой спайков, их разряды не являются с развитием ЭЭГ признаков МС и частота нарастает по мере углубления этой фазы.



4. Динамика мультинейронной активности хвостатого ядра во время двух физиологических состояний мозга: А — на фоне синхронизации, Б — десинхронизации ЭЭГ. Калибровка—100 мкВ, 100 мс

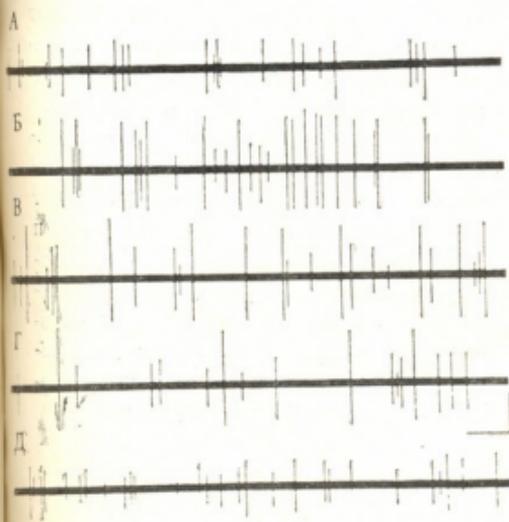


Рис. 5. Мультинейронная активность хвостатого ядра в различных фазах цикла бодрствования: А — эмоциональное, Б — пассивное бодрствование, В, Г — ме ленноволновый, Д — парадоксальный сны. Калибровка — 100 мкВ, 100 мс

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существующие литературные данные указывают на многофункциональный характер ХЯ. Эта структура с одной стороны участвует в ре-
2 Серия биологическая, т. 13, № 5

гуляции мотивированного поведения, моторной активности и условнорефлекторной деятельности [1, 8, 22], а с другой — в формировании МС [2, 7,

9, 11, 16]. Большинство изученных нами нейронов ХЯ характеризовались наивысшей активацией в ЭБ и ПС по сравнению с МС. Видимо, это те единицы, которые участвуют в формировании тех нейрональных сетей, которые регулируют различные виды поведения, характерные для бодрствующего животного. Тот факт, что в ПС данные нейроны также показывают высокую степень активации, указывает на то, что элементы системы бодрствования функционируют и при данном физиологическом состоянии, хотя поведенческое проявление при этом отсутствует из-за наличия мощной нисходящей тормозящей импульсации [21]. В этом аспекте особое внимание привлекает тот факт, что ХЯ является одним из главных составных частей нигростриарной дофаминергической системы. Как известно, эта система высокоактивируется во время поведенческого бодрствования [17, 19]. Показано, что разрушения дофаминсодержащих нейронов черной субстанции вызывает, наряду с уменьшением дофамина в стриатуме, подавление бодрствования. У кошки падение уровня дофамина на 90% вызывало коматозное состояние. Возможно, некоторые из зарегистрированных нами нейронов первого типа, увеличивающих активность в ЭБ и ПС, являются именно частью этой системы, получающей импульсацию от дофаминергических нейронов черной субстанции. Исходя из этого, можно предположить, что данные нейроны участвуют не только в регуляции бодрствования, но и ПС, так как они увеличивают активность на фоне обоих состояний. Однако такое утверждение требует дополнительных специальных нейрофизиологических и гистохимических исследований.

При регистрации мультинейронной активности ХЯ создается впечатление, что нейроны, отличающиеся сравнительно большой амплитудой спайкового разряда, начинали возбуждаться исключительно с наступлением МС. При переходе МС в ПС или при пробуждении эти единицы замолкали. Естественно полагать, что они функционально связаны с синхронизирующей системой мозга и являются наиболее крупными клетками ХЯ. По морфологическим данным [8] клетки этого ядра разделяются по своему диаметру на большие (22—30 мкм), средние (10—20 мкм) и мелкие (5—9 мкм). Даже при всех трудностях, которые возникают во время оценки объема клетки по амплитуде экстрацеллюлярно отведенного потенциала действия, создается впечатление, что на фоне МС начинают возбуждаться именно большие клетки ХЯ. На такую возможность указывают и некоторые нейрофизиологические работы [4, 10, 15], показывающие зависимость амплитуды спайкового разряда от размера клетки. Видимо, эти большие нейроны имеют сравнительно длинный аксон и своей активностью, наряду со структурами мезодиеэнцефалона, могут участвовать в формировании нейронных сетей, ответственных за синхронизацию электрической активности.

Таким образом, изучение динамики нейронной активности ХЯ в цикле Б-С показало, что она участвует как в организации бодрствования и ПС, так и МС. При этом за формирование синхронной электрической активности, видимо, ответственны сравнительно крупные клетки с длинными выходными аксонами, а бодрствования и ПС — дофаминергические.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э. Б., Отелли В. А. Хвостатое ядро, «Наука», Л., 1976.
2. Бутхузи С. М. Электрофизиологическое исследование функции хвостатого ядра, «Мециереба», Тбилиси, 1971.
3. Виноградова О. С. Ж. высш. нерв. деят., 18, 671—680, 1968.
4. Гасанов У. Г. Успехи физиол. наук, 13, 62—85, 1981.
5. Демир Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, «Наука», Л., 1978.
6. Драгин Ю. М., Михайлов А. В. В кн.: Стриопаллидарная система, «Наука», Л., 1973, 47—53.



7. Oniani T. N., Keshelava-Gogichadze M. V. *Fiziol. zhurn. CCCP*, 72, 29—37, 1976.

8. Суворов Н. Ф. Стриарная система и поведение, «Наука», Л., 1980.

9. Akert R., Andersson B. *Acta Physiol. Scand.*, 22, 2—3, 1951.

10. Buchwald J. S., Grover F. S. *J. Neurophysiol.*, 33, 148—159, 1973.

11. Buchwald N. A., Wyers E. J., Okuma D. T., Heuser G. *Electroenceph. Clin Neurophysiol.*, 13, 511—518, 1961.

12. Bures J., Petran M., Zachar J. *Electrophysiological methods in biological research* Prague, Academic publishing house of Czechoslovak Academy of Sciences, 1967.

13. Cowan W. M., Powell T. P. S. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 29, 426—439, 1966.

14. Dahlstrom A., Fuxe K. *Acta Physiol. Scand.*, 62, suppl., 232, 1—55, 1964.

15. Henneman E., Somjen G., Carpenter D. O. *J. Neurophysiol.*, 28, 360—380, 1965.

16. Hess R., Koella W., Akert K. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 5, 75—90, 1953.

17. Jones B. E., Bobilier P., Jouvet M. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 163, 176—180, 1969.

18. Kanazawa I., Marsall G. R., Kelly J. S. *Brain Res.*, 115, 485—491, 1976.

19. Koella W. In: *Psychopharmacology of sleep*, New York, Raven Press, 1981, 19—52.

20. Marco L. A., Copack P., Edelson A. M., Gilman S. *Brain Res.*, 53, 251—305, 1973.

21. Pompeiano O. In: *Sleep and altered states of consciousness*. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins, 1967, 351—423.

22. Routenberg A. J. *Comp. and Physiol.*, 72, 161—171, 1970.

კუდიანი ბირთვის ნეირონული აქტივობის დინამიკა ძილ-ღვიძილის ციკლში

ლ. ზმბაძე, თ. ონიანი, შ. მანჯავიძე, მ. გოგიჩაძე

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

რეზიუმე

ვირთაგვებზე, თავისუფალი ქცევის პირობებში, შეისწავლებოდა კუდიანი ბირთვის მულტინეირონული აქტივობის დინამიკა ძილ-ღვიძილის ციკლში. ნეირონთა ერთი ჯგუფი (66%) ემოციური ღვიძილისა და პარადოქსული ძილის დროს ნელ ძილთან შედარებით განიმუხტება უფრო მაღალი სისწიერით. ნეირონთა მეორე ჯგუფის

(27%) აქტივობა ყველაზე მაღალია ნელი ძილის ფონზე. მცირე რაოდენობის ნეირონების (7%) აქტივობა არ იცვლება ძილ-ღვიძილის ციკლის ფაზებისა და სტადიების მონაცვლეობის დროს. განიხილება კუდიანი ბირთვის ნეირონთა მონაწილეობა ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში.

DYNAMICS OF NEURONAL ACTIVITY OF THE CAUDATE NUCLEUS IN THE SLEEP-WAKEFULNESS CYCLE

L. B. GVETADZE, T. N. ONIANI, Sh. D. MANJAVIDZE, M. V. GOGICHADZE

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

Summary

Dynamics of neuronal activity of the caudate nucleus in the sleep-wakefulness cycle was studied in free moving rats using mobile metallic microelectro-

des. Computer analysis and statistical treatment of the data have shown that the majority of neurons (66%) in the above-mentioned nucleus generate with

სსრ, სას. მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი. 307

high frequencies during emotional wakefulness and paradoxical sleep, while in the slow wave sleep they exhibit the least activity.

A comparatively small number of neurons (27%) shows inverse dynamics of activity. They fire more intensively in slow wave sleep as compared to emotional wakefulness and paradoxical sleep.

In caudate nucleus some neurons (7%) which show no statistically significant difference in the discharge frequency in the different phases of the sleep-wakefulness cycle are found.

The involvement of caudate nucleus in the neurophysiological mechanisms of sleep-wakefulness cycle is discussed.

УДК 612.014.3

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

ВЛИЯНИЕ КАИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ДЕПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ЭФФЕКТ АЦЕТИЛХОЛИНА И ГЛУТАМАТА

Д. С. Дanelia

Институт кибернетики АН ГССР, Тбилиси

Поступила в редакцию 25.09.1986

Исследовалось влияние каиновой кислоты (КК) на деполяризационные ответы нейронов улитки, вызванные ионофоретическим нанесением глутаминовой кислоты (ГК) и ацетилхолина (АХ). КК вызвала потенциацию деполяризационного эффекта ГК. В нейронах, отвечающих на АХ двухкомпонентным деполяризационно-гиперполяризационным потенциалом, низкие концентрации КК вначале потенцировали деполяризационный компонент ответа, а через 1.5–2 ч и с увеличением концентрации КК деполяризация подавлялась. При этом наблюдалась потенциация гиперполяризационного компонента ответа. Изменение эффектов ГК и АХ наблюдалось на одних и тех же нейронах. Предполагается, что нейротоксичность КК не является следствием активации рецепторов ГК. Обсуждается возможность участия циклических нуклеотидов в опосредовании эффектов КК.

В последнее десятилетие появилось большое количество работ, связанных с исследованием влияния КК, структурного аналога ГК, на нейроны ЦНС [4, 6]. КК, как сильный нейротоксический и деполяризующий агент, используется для селективного разрушения нервной ткани [4] и вызова эпилептической активности в лимбических структурах. [23]. Однако, несмотря на широкое применение КК в нейробиологических экспериментах, механизм нейротоксичности этого вещества остается неясным. Согласно одним авторам [18], КК, действуя как агонист рецепторов ГК, вызывает тоническую деполяризацию рецепторов ГК, при этом резко активируется Na^+ , K^+ -АТФаза, и нейроны погибают вследствие истощения энергетических запасов клетки. С другой точки зрения,

КК не действует непосредственно на рецепторы ГК [15], а вызывает высвобождение ГК из пресинаптических окончаний и тормозит ее обратный захват [9, 20], в результате чего в синаптической щели создается крайне высокий уровень ГК. Согласно третьему предположению, деструкция нейронов лимбической системы обусловлена развитием судорожной активности, а не прямым действием ГК [23].

Если эффект КК обусловлен исключительно активацией рецепторов ГК, то это вещество не должно влиять на эффекты, вызываемые другими медиаторами. Целью настоящей работы было исследование влияния КК на деполяризационные ответы нейронов улитки, вызванные ионофоретическим нанесением АХ и ГК.

Опыты были проведены на нейронах весенних бодрствующих улиток *Helix lucorum*. Исследованию подвергались нейроны, отвечающие на ионофоретическое нанесение АХ деполяризацией или двухкомпонентным деполяризационно - гиперполяризационным потенциалом [2]. Применялась стандартная методика внутриклеточной регистрации нейронной активности. Отводящие микроэлектроды были заполнены 3М раствором КСl или 0,6 М K_2SO_4 . Ионофоретиче-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ни на один из исследованных нейронов перфузия КК не оказывала заметного деполяризующего действия. Однако вызванная АХ деполяризация существенно облегчалась. На рис. 1А показана реакция нейрона

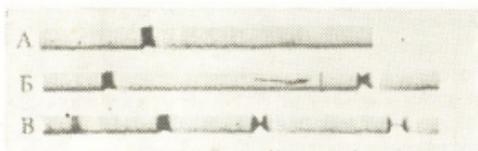


Рис. 1. Влияние перфузии 5,1 мМ (Б) и 51 мМ (В) КК на деполяризацию нейрона, вызванную ионофоретической аппликацией АХ. На этом и последующих рисунках сила тока изменяется слева направо, черточки под кривыми — отметка нанесения АХ; А — контроль, 160 нА; Б — 100, 150 нА; В — 40, 80, 100, 140 нА. Калибровка: 4 с, 20 мВ

на контрольную ионофоретическую аппликацию АХ при силе тока 160 нА. После перфузии 5,1 мМ раствора КК нанесение АХ при силе тока 100 нА вызывало приблизительно такую же, а при силе тока 150 нА большую деполяризацию, чем в контроле (рис. 1Б). После перфузии 51 мМ раствора КК облегчающий эффект усиливался — АХ стимул в 80 нА вызывал приблизительно такой же эффект, как в контроле, а при силе тока 140 нА имела место деполяризационная инактивация спайк-генерирующей мембраны (рис. 1В).

Более детально было исследовано влияние КК на вызванный АХ двухфазный ответ (рис. 2). В контроль-

скую аппликацию АХ и ЕК производили с помощью двухствольных микроэлектродов, заполненных 0,1 М водными растворами. Препарат омывался раствором Рингера, состав которого был описан ранее [2]. Запись нейронной активности производили через 10—15 мин после перфузии приготовленных на этом растворе разных концентраций КК. Опыты были проведены при температуре 20—25°C.

ной записи АХ наносился при исходном уровне мембранного потенциала (рис. 2А) и при деполяризации мембраны на 10 мВ (рис. 2Б). Продолжительность двухфазного ответа регистрируемого нейрона была постоянной при всех интенсивностях стимула, тогда как амплитуда деполяризационного компонента с увеличением интенсивности стимула возрастала, достигая порога генерации разряда при силе тока 180 нА. Перфузия 5,1 мМ раствора КК вызывала увеличение как амплитуды, так и продолжительности деполяризационного компонента двухфазного ответа (рис. 2В). Примечательна при этом быстрая «утомляемость» ответов как при малых, так и больших интенсивностях стимулов. После перфузии 51 мМ раствора КК (рис. 2Г) ответ на АХ при силе тока 50 нА был приблизительно таким же, как в контроле при силе тока 140 нА. Однако с увеличением силы тока амплитуда деполяризационного компонента увеличивалась незначительно, достигая уровня генерации разряда при силе тока 250 нА. В то же время увеличение интенсивности стимула вызывало увеличение продолжительности двухфазного ответа.

Через 10 мин после перфузии 510 мМ раствора КК наблюдалось исчезновение деполяризационного компонента ответа (рис. 2Д-З). С увеличением интенсивности АХ-стимула крутизна переднего фронта гиперполяризационного компонента уменьшалась (рис. 2Д), на нем появлялось плато, уменьшающееся с увеличением силы ионофоретического тока (рис. 2Е). Это должно указывать на нали-

ние в ответе очень ослабленного и быстро «утомляемого» деполяризационного электрогенеза. Деполяризация, наблюдаемая при пропускании ионофоретических токов большой ам-

нейрона (рис. 3А). После перфузии 510 нМ раствора КК (приблизительно через 2 ч после перфузии 5,1 нМ КК) ответ на ТМА в концентрации 10^{-4} М отсутствовал, а ТМА в кон-

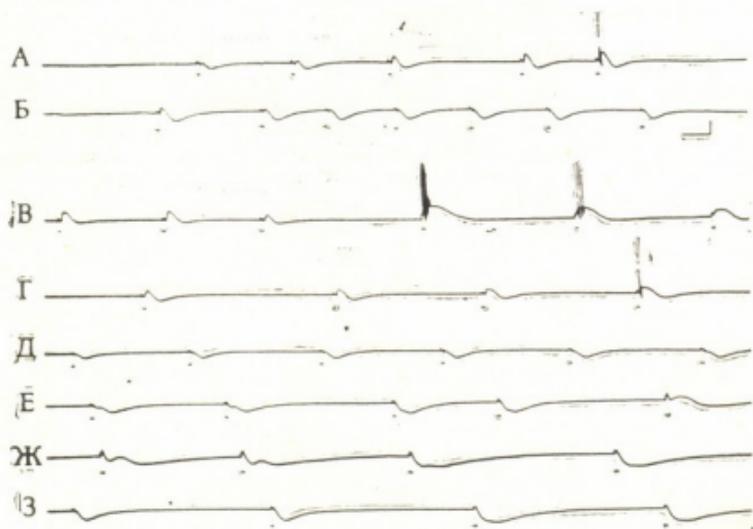


Рис. 2. Изменение двухфазного ответа на АХ, через 10 мин после перфузии 5,1 (В), 51 (Г) и 510 нМ (Д—З) КК; А—контроль, 120, 130, 140, 152, 180 нА; Б—контроль, мембрана нейрона деполяризована на 10 мВ, 130, 100, 90, 80, 70, 60, 45 нА; В—95, 105, 95, 450, 450, 450 нА; Г—50, 65, 90, 250 нА; Д—З—непрерывная запись; Д—30, 38, 45, 58, 62, 80 нА; Е—105, 140, 150, 150, 800 нА; Ж—750, 700, 600, 500 нА; З—100, 105, 450, 450 нА. Калибровка: 10 с, 20 мВ

плитуды (800 нА), может быть вызвана как фармакологическим действием АХ, так и изменением внеклеточного потенциала вблизи кончика микропипетки. Примечательно также значительное увеличение амплитуды и продолжительности гиперполяризационного компонента (сравни ответы при одинаковой силе тока на рис. 2А и Е).

В работе [2] было показано, что двухфазный ответ на АХ является результатом активации никотиновых (деполяризационный компонент) и мускариновых (гиперполяризационный компонент) холинорецепторов. Поэтому представляло интерес проверить действие никотинового холинорецептора после обработки КК. На рис. 3 показана активность того же самого нейрона, что и на рис. 2. В контроле тетраметиламмоний (ТМА) в концентрации 10^{-4} и 10^{-3} М вызывает деполяризацию и возбуждение

центрации 10^{-3} М оказывал незначительно больший эффект (рис. 3Б), чем 10^{-4} М в контроле. Ослабление действия ТМА имело место после многократного отмывания ганглия от КК. Однако на основании этих результатов нельзя судить, является ли причиной подавления АХ деполяризации последняя использованная концентрация КК (510 нМ) или первая же концентрация КК (5,1 нМ) вызывает необратимые изменения, проявляющиеся впоследствии.

Некоторые из нейронов, генерирующих двухфазный ответ на АХ, возбуждались при нанесении ГК. Для удобства сравнительного анализа на этих нейронах было проверено влияние КК на эффект ГК. В отличие от рассмотренной трансформации АХ-ответа при перфузии КК, деполяризационные ответы на ГК только облегчались. Пример такого облегчающего действия КК показан на рис. 4,

представляющем запись активности того же нейрона, что и на рис. 2. В контроле и после перфузии 5,1 нМ КК ответ на ионофоретическое подведение ГК отсутствовал (рис. 4А). Через 15 мин после перфузии 51 нМ раствора КК появилась незначитель-

ная деполяризация, вызванная нанесением ГК при силе тока 500 нА (рис. 4Б). Дальнейшее увеличение концентрации КК (510 нМ на рис. 4В и 5,1 мкМ на рис. 4Г) вызвало значительное облегчение ответов на ГК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отличие от сильно выраженного возбуждающего действия КК в ЦНС млекопитающих, в нервно-мышечном соединении беспозвоночных (предположительно глутаматергическом синапсе) деполяризационный эффект КК значительно меньше эффекта ГК. Однако в соответствии с результата-

особое внимание привлекают циклические нуклеотиды. Согласно существующим представлениям, одни медиаторы — норадреналин, серотонин и другие — активируют аденилатциклазу, синтезирующую цАМФ из АТФ, другие, например ацетилхолин, активируют гуанилатциклазу, синтезирующую

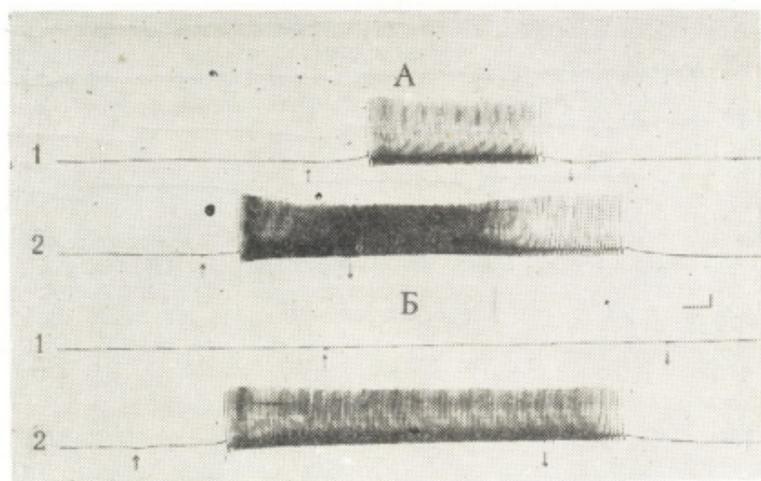


Рис. 3. Подавление ответа на перфузию ТМА под влиянием КК. Тот же нейрон, что и на рис. 2. Стрелка вверх — нанесение ТМА, стрелка вниз — отмывание; 1 — концентрация ТМА 10^{-4} М, 2 — концентрация ТМА 10^{-3} М; А — контроль; Б — через 2 ч после перфузии 5,1 нМ и через 0,5 ч после перфузии 510 нМ КК. Калибровка: 10с, 20 мВ

ми, полученными на млекопитающих [21], КК потенцирует деполяризационный эффект ГК как в нервно-мышечном соединении [7], так и на нейронах улитки [22]. Результаты, полученные в данной работе, подтверждают эти наблюдения.

Вместе с тем, под влиянием КК в одних и тех же нейронах изменяется эффект не только ГК, но и АХ. Это дает основание для предположения, что действие нейротоксина опосредуется метаболическими процессами, происходящими во время синаптической передачи. С этой точки зрения

цГМФ из ГТФ. Нуклеотиды активируют различные протеинкиназы, которые, фосфорилируя мембранные белки, образующие ионные каналы [17], вызывают изменение электрических параметров мембраны.

Некоторые данные поддерживают предположение, что нейротоксичность КК является следствием увеличения уровней циклических нуклеотидов, а не чрезмерной активации рецепторов ГК. Известно, что, наряду с деструкцией нейронов, КК вызывает морфологические и биохимические изменения в глиальных клетках [12], одна-



ко ионофоретическое нанесение ГК на глияльные клетки не вызывает какого-либо эффекта [13]. КК увеличивает внеклеточную концентрацию ионов калия [8], а высокая концентрация внеклеточного калия увеличивает содержание цГМФ в нервной ткани [10]. В несколько меньшей степени содержание цГМФ увеличивают ГК, АХ и мускариновые холиномиметики [10, 19]. Эти данные хорошо объяс-

няют наблюдаемое в экспериментах потенцирование депполяризационного ответа на ГК и гиперполяризационного компонента двухфазного ответа на АХ при воздействии КК. И, наконец, на фоторецепторах сетчатки было показано, что повышение содержания цГМФ, вследствие дефицита активности фосфодиэстеразы, фермента, гидролизующего цГМФ и цАМФ, вызывает дегенерацию клеток [14].

КК также вызывает значительно понижение активности фосфодиэстеразы и в меньшей степени активности аденилатциклазы [16], что может вызвать увеличение содержания цАМФ. Так как цАМФ управляет кальциевыми ионными каналами мембраны нейронов [3], то высокий уровень цАМФ может вызвать накопление ионов кальция. Высокая концентрация внутриклеточного кальция мо-

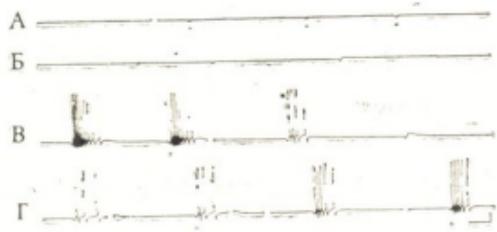


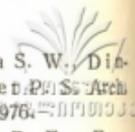
Рис. 4. Облегчающее влияние КК на депполяризационный эффект ГК. Тот же нейрон, что и на рис. 2. А — через 15 мин после перфузии 5,1 мМ КК, 150, 320, 530 нА; Б — через 15 мин после перфузии 51 мМ КК, 140, 320, 500 нА; В — через 30 мин после перфузии 510 мМ КК, 850, 780, 600, 450 нА; Г — через 20 мин после перфузии 5,1 мМ КК, 260, 300, 380, 450 нА. Калибровка: 10 с 20 мВ

няют наблюдаемое в экспериментах потенцирование депполяризационного ответа на ГК и гиперполяризационного компонента двухфазного ответа на АХ при воздействии КК. И, наконец, на фоторецепторах сетчатки было показано, что повышение содержания цГМФ, вследствие дефицита активности фосфодиэстеразы, фермента, гидролизующего цГМФ и цАМФ, вызывает дегенерацию клеток [14].

жет быть причиной деструктивных изменений в нейронах, как это наблюдается в мышечных клетках [11]. Следует отметить, что наблюдаемое в наших опытах подавление депполяризационного компонента двухфазного ответа под влиянием КК согласуется с показанным другими авторами подавлением ответа никотинового холинорецептора при внутриклеточной инъекции цАМФ [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабминдра В. П., Демьяненко Г. П. ДАН СССР, 246, 1493—1495, 1979.
2. ДANELIA Д. С., Бекаури Н. И., ГОНАШВИЛИ Э. В. Изв. АН ГССР, сер. биол., 12, 4, 227—231, 1986.
3. Костюк П. Г. Успехи физиол. наук, 15, 7—22, 1984.
4. Сытинский И. А., Туровский В. С. Успехи совр. биол., 93, 253—269, 1982.
5. Акоруан А. Р., Chemeris N. K., Iljin V. I., Veprintsev B. N. Brain Res., 201, 480—484, 1980.
6. Coyle J. T. J. Neurochem., 41, 1—11, 1983.
7. Daoud A., Usherwood P. N. R. Comp. Biochem. Physiology, 52 C, 51—53, 1975.
8. Evans R. H. J. Physiol., 298, 25—35, 1980.
9. Ferkany J. W., Coyle J. T. J. Pharmacol. Exp. Ther., 225, 399—406, 1983.
10. Kinscherf D. A., Chang M. M., Rubin E. H., Schneider D. R., Ferrendelli J. A. J. Neurochem., 26, 527—530, 1976.
11. Komatani T., Kasi N., J. Membr. Biol., 56, 159—168, 1980.
12. Krespan B., Berl S., Nicklas W. J. J. Neurochem., 38, 509—518, 1982.
13. Krnjevic K., Schwartz S. Exp. Brain Res., 3, 306—319, 1967.
14. Lolley R. N., Farber D. B., Ray-



- born M. E., Hollyfield J. G. *Science*, 196, 664—666, 1977.
15. McLennan H., Lodge D. *Brain Res.*, 169, 83—90, 1979.
 16. Minneman K. P., Quik M., Emson P. C. *Brain Res.*, 151, 507—521, 1978.
 17. Miyamoto E., Petzold G. L., Kuo J. F., Greengard P. J. *Biol. Chem.*, 248, 179—189, 1973.
 18. Olney J. W., Rhee V., Ho O. L. *Brain Res.*, 77, 507—512, 1974.
 19. Opmeer F. A., Gumulka S. W., Dinnendahl V., Schönhöfer P. *Arch. Pharmacol.*, 292, 259—265, 1976.
 20. Pastuszko A., Wilson D. F., Ercinska M. J. *Neurochem.*, 43, 747—754, 1984.
 21. Shinozaki H., Konishi S. *Brain Res.*, 24, 368—371, 1970.
 22. Walker R. J. *Comp. Biochem. Physiol.* 550, 61—67, 1976.
 23. Westbrook G. L., Lothman E. W. *Brain Res.*, 273, 97—109, 1983.

კაინის მჟავის გავლენა აცეტილქოლინის და გლუტამატის მადეპოლარიზებელ ეფექტზე

დ. დანელია

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის კიბერნეტიკის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ლოკოკინის ნეირონებზე შეისწავლებოდა კაინის მჟავის (კმ) გავლენა გლუტამინის მჟავისა (გმ) და აცეტილქოლინის (აქ) იონოფორეტული დატანით გამოწვეულ დეპოლარიზაციულ პასუხებზე. კმ იწვევდა გმ-ს დეპოლარიზაციულ ეფექტის პოტენციალს. ნეირონებში, რომლებიც აქზე პასუხობდნენ ორკომპონენტური დეპოლარიზაციულ - ჰიპერპოლარიზაციული პოტენციალით, კმ-ს დაბალი კონცენტრაციები თავიდან იწვევდნენ დეპოლარიზაციული კომპონენტის პოტენციალს, ხო-

ლო 1, 5—2 საათის შემდეგ აღინიშნებოდა დათრგუნვა, ისევე როგორც მაღალი კონცენტრაციის კმ-ის შემოქმედებით. ამასთან შეიმჩნეოდა პასუხის ჰიპერპოლარიზაციული კომპონენტის პოტენციალი. გამოტყმულია მოსაზრება, რომ კმ-ს ნეიროტოქსიურობა არ უნდა იყოს გმ-ს რეცეპტორების აქტივაციის შედეგი. განიხილება კმ გამოწვეულ ეფექტებში ციკლური ნუკლეოტიდების მონაწილეობის შესაძლებლობა.

THE ACTION OF KAINIC ACID ON DEPOLARIZING EFFECT OF ACETYLCHOLINE AND GLUTAMATE

D. C. DANELIA

Institute of Cybernetics, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The effect of kainic acid (KA) on the snail neurons excitatory responses evoked by iontophoretically applied glutamic acid (GA) and acetylcholine (ACh) was investigated. KA potentiated the depolarizing action of GA. In neurons, responding to ACh by biphasic depolarizing-hyperpolarizing potential low concentrations of KA first potentiated depolarizing component of the response but after 1,5—2 hours and with increase of

KA concentration the depolarization was depressed. The last was accompanied by the potentiation of hyperpolarizing component of response. Alterations of GA and ACh actions were observed in the same neurons. It is supposed that KA neurotoxicity is not a consequence of GA receptor activation. The possibility of cyclic nucleotides participation in mediating KA action is discussed.

УДК 577.153.35

ЭГТА-ЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ НА Na, K-АТФазу

Л. Г. Цакадзе, К. Д. Куталия, З. П. Кометиани

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

Поступила в редакцию 3.06.1986

Изучалось ЭГТА-зависимое действие нейротрансмиттеров (НТ) на Na, K-АТФазную систему головного мозга крыс. Показано, что регуляция нейротрансмиттерами активного транспорта не осуществляется через связывание эндогенного кальция. Высказано предположение об участии в них Ca-кальмодулинзависимой или Ca-фосфолипидзависимой реакции.

Действие НТ на Na, K-АТФазную систему синапсом носит избирательный, специфический и универсальный характер [1—3]. Универсальность эффекта выражается в зависимости Na, K-АТФазной активности от концентрации НТ и присутствия ЭГТА в реакционной среде. ЭГТА снимает активирующее действие малых концентраций НТ на Na,

K-АТФазу и уменьшает тормозящее действие больших концентраций. Естественно, возникает вопрос о выяснении роли ионов кальция в осуществлении воздействия НТ на Na, K-АТФазную систему, что может существенно способствовать расшифровке молекулярного механизма эффекта и понятия ее функциональной значимости.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служила субклеточная фракция синаптических мембран головного мозга крыс, полученная по ранее описанной методике [1, 2].

Реакционная среда для определения суммарной АТФазной активности состояла из 3 мМ АТФ, 3 мМ MgCl₂, 120 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 40 мМ Трис-HCl буфер (рН 7,8). Mg-АТФазная активность измерялась в отсутствии в реакционной среде NaCl и при добавлении 0,2 мМ оубаина. Na, K-АТФазная активность опреде-

лялась как оубаинчувствительная часть суммарной АТФазы. Получение препаратов и определение АТФазной активности происходило по ранее описанной методике [3]. Экспериментальные данные обработаны статистически с использованием законов распространения средних ошибок при использовании косвенных измерений в методе малых выборок и представлены в виде средних арифметических, средней квадратичной ошибки среднего арифметического и числа идентичных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что введение экзогенных ионов кальция тормозит Na, K-АТФазную активность и влияет на активность оубаинчувстви-

тельной части суммарной АТФазы (Mg-АТФазы). По-видимому, изменения Mg-АТФазной активности можно объяснить конкуренцией между

ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} и работой Са, Mg-АТФазы. Что касается Na, К-АТФазы, добавление ионов Ca^{2+} в реакционную среду ($[Ca^{2+}] > 10^{-3}$ М) всегда вызывает достоверное уменьшение активности. Однако ранее нами было получено, что введение в реакционную среду 0,4 мМ ЭГТА вы-

жет служить табл. 1, где показано, что ингибция, вызванная серотонином, частично снимается внесением в реакционную среду 0,4 мМ ЭГТА, т. е. эффект тот же, что и на непромытом в ЭГТА препарате.

Таблица 1

Зависимость Na, К-АТФазной активности от серотонина и ЭГТА (фракция синаптических мембран предварительно промыта в растворе 5 мМ ЭГТА и бидистиллятом; за 100% принята активность в отсутствие серотонина)

Добавка	Na, К-АТФазная активность (%)	
	—ЭГТА	+0,4 мМ ЭГТА
Контроль	100 ± 1,75 (6)	100 ± 2,0 (6)
0,1 мМ серотонина	100,89 ± 0,69 (6)	96,86 ± 2,63 (6)
2 мМ серотонина	35,87 ± 0,27(6)	67,42 ± 2,37 (6)

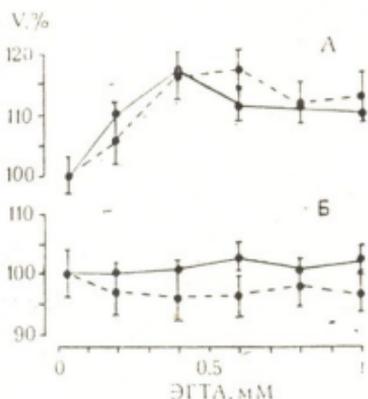


Рис. 1. Зависимость Na, К-АТФазной (А) и Mg-АТФазной (Б) активностей от ЭГТА (%): сплошная линия — фракция синаптических мембран, промытая в 5 мМ ЭГТА и в воде, прерывистая — число идентичных образцов — 4

Из всего вышесказанного следует, что эффект ЭГТА на Na, К-АТФазу носит сложный характер и для ее объяснения необходима дополнительная информация.

Существует предположение, что в действии НТ на Na, К-АТФазу в зависимости от эффекта на них ЭГТА определенную роль играет степень образования мембранных везикул. Приняв эту гипотезу, можно построить множество спекулятивных предположений на основе различной ориентации поверхности мембран в везикуле, иммобилизации структурно-связанного Ca^{2+} и т. д. Для выяснения этого вопроса было изучено влияние неионного детергента, луброла WX, на АТФазные активности и зависимости Na, К-АТФазной активности от НТ и ЭГТА.

На рис. 2 показано влияние луброла на Na, К-АТФазу и Mg-АТФазу. Луброл (в пределах 0,002 мг/мл) увеличивает Na, К-АТФазу почти вдвое. Mg-АТФаза также возрастает. Активирующее действие малых доз детергента вызвано уменьшением степени везикуляции, что делает Na, К-АТФазу более доступной для регуляторных факторов ферментного катализа [9, 7]. Дальнейшее увеличение концентрации детергента, вызывающего полное разрушение мембранной

зывает существенное увеличение Na, К-АТФазной активности NaI обработанных и нативных препаратов (несмотря на то, что препараты были предварительно несколько раз промыты в 5 мМ растворов ЭДТА и ЭГТА и дополнительно промыты бидистиллятом) [4]. Эти результаты согласуются с экспериментами, представленными на рис. 1. Как видно из рисунка, промывка фракции синаптических мембран в 5 мМ растворе ЭГТА и в бидистилляте не влияет на зависимость Na, К-АТФазной активности (также и Mg-АТФазной) от последующего внесения 0,4 мМ ЭГТА в реакционную среду, т. е. сохраняется способность активировать Na, К-АТФазу; Mg-АТФаза же не чувствительна к воздействию. Интересен тот факт, что после промывки препарата также остается без изменения ЭГТА зависимый эффект НТ на Na, К-АТФазу. Примером мо-

структуры, понижает активность АТФаз.

Установив эффективную дозу действия луброла (~0,002 мг/мл) для исследуемого препарата, на ее фоне изучали зависимость Na, К-АТФазной активности от НА. Концентрации были выбраны с учетом двухфазности характера воздействия НА — активационного и ингибиционного (0,08 мМ и 1 мМ соответственно) [2, 3] (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость эффекта НА на Na, К-АТФазу от добавления в реакционную среду луброла и ЭГТА (за 100% принята Na, К-АТФазная активность в отсутствии НА)

Добавления	Na, К-АТФазная активность (%)	
	+0,08 мМ НА	+1 мМ НА
—	106,01 ± 1,23 (4)	64,61 ± 1,53 (4)
0,002 мг/мл луброла	115,68 ± 2,05 (4)	84,81 ± 2,05 (4)
0,4 мМ ЭГТА	98,79 ± 1,80 (4)	90,39 ± 1,85 (4)
0,002 мг/мл луброла	95,43 ± 1,69 (4)	88,80 ± 1,93 (4)
0,4 мМ ЭГТА		

Характер эффекта НА в присутствии луброла сохраняется, тогда как 0,4 мМ ЭГТА полностью снимает их.

Таким образом, при введении 0,002 мг/мл луброла в реакционную среду не изменяется характер действия НТ и ЭГТА на Na, К-АТФазную активность, что исключает возможность опосредования полученных эффектов везикуляцией мембран. Ведь можно было бы допустить следующую схему регуляции активного транспорта нейротрансмиттерами: НТ открывают ионные каналы, происходит перераспределение ионов натрия и калия, что, со своей стороны, может вызвать соответствующее изменение Na, К-АТФазной активности.

ЭГТА, наряду с детергентом, также уменьшает степень везикуляции. Оба фактора — детергент и ЭГТА — в отдельности вызывают рост активности Na, К-АТФазы, однако по-разному влияют на процесс ее взаимоотношения с НТ. Не исключается возможность того, что механизм ре-

гуляции Na, К-АТФазной системы опосредован через какой-то фактор (механизм), являющийся Са²⁺-зависимым. Основное количество эндогенного Са²⁺ удаляется в результате промывки в ЭГТА, но остается прочно связанным с мембранными компонентами Са²⁺. Возможно в результа-

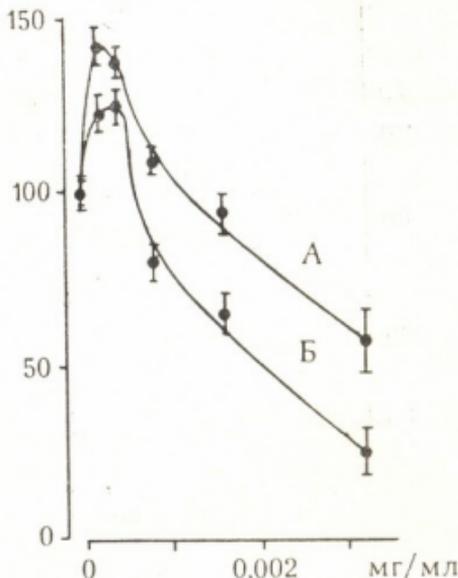


Рис. 2. Зависимость Na, К-АТФазной (А) и Mg-АТФазной (Б) активностей (%) от добавленного в реакционную среду луброла WX (мг/мл); число идентичных образцов — 4

те работы Na-насоса эта связь ослабевает с последующей иммобилизацией ионов Са²⁺.

Для проверки данного предположения мы исследовали влияние ионов кальция на взаимосвязь НТ с Na, К-АТФазой (рис. 3). Добавление низких концентраций Са²⁺ восстанавливает эффект НА на Na, К-АТФазную активность, как активационную (Б), так и тормозящую (В), тогда как введение ЭГТА в реакционную среду снижает эффект; а те же концентрации ионов Са²⁺ ингибируют Na, К-АТФазу (А). Следовательно, взаимосвязь НТ с активным транспортом должна иметь Са²⁺-зависимый характер. Однако эффект не является результатом конкуренции ионов Са²⁺ и Mg²⁺ за захват Mg-участков или образования комплекса Са—НТФ, так как в первом случае он

будет только активационного, а во втором — ингибиционного характера.

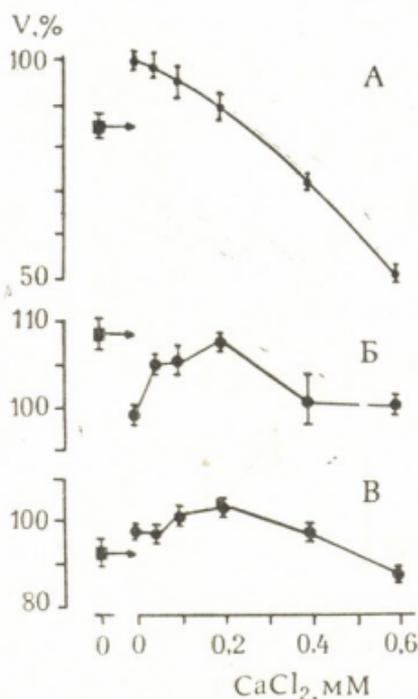


Рис. 3. Зависимость Na, K-ATФазной активности (в%) от добавленного в реакционную среду CaCl₂ (мМ) при отсутствии НА (А) и изменение Na, K-ATФазной активности от добавления 0,08 мМ НА (Б) и 1 мМ НА (В) при различных концентрациях CaCl₂. За 100% принята активность в отсутствие НА. В реакционной среде присутствует 0,4 мМ ЭГТА (кружочки). Для сравнения показана активность в отсутствие ЭГТА и CaCl₂ (прямоугольники). Число идентичных образцов - 8

Вовлечение ионов Ca²⁺ в процесс регуляции активного транспорта ионов регулируемым НТ, происходит через систему «вторичных передатчиков». В настоящее время известны два основных пути передачи сигналов с участием цАМФ- и цГМР-зависимых процессов. Участие цАМФ-зависимых процессов в эффектах НТ на Na, K-ATФазу исключается из проведенных нами ранее работ [2]. Что же касается цГМР-зависимых реакций, для них необходима высокая концентрация Ca²⁺, при которой Na, K-ATФазная реакция почти полностью заторможена; эффект же НТ сохраняется лишь при низких значениях Ca²⁺ (рис. 3).

Однако цАМФ- и цГМР-зависимые процессы не являются единственными. Доказано существование Ca²⁺-калмадулинзависимой и Ca²⁺-фосфолипидзависимой протеникиназных реакций. Возможно их вовлечение в исследуемые процессы. Есть основания предполагать, что обмен фосфолипидов, а именно инозитидов, которые коррелируют с освобождением внутриклеточного кальция [5], может участвовать в процессах регуляции нейротрансмиттерами системы активного транспорта; тем более что показана [8] избирательность эффекта фосфатидилинозитола на синапсомальную Na, K-ATФазу.

Не исключается и роль Ca²⁺-калмадулинзависимого процесса, что, наряду с механизмом активирующего действия ЭГТА на Na, K-ATФазу, требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кометиани З. П., Джарнашвили Т. Я. Изв. АН ГССР, сер. биол., 1, 2, 190—196, 1975.
2. Кометиани З. П., Джарнашвили Т. Я., Микеладзе Д. Г. Изв. АН ГССР, сер. биол., 3, 5, 444—450, 1977.
3. Кометиани З. П., Джарнашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Биохимия, 40, 1039—1046, 1975.
4. Кометиани З. П., Цакадзе Л. Г., Курдованидзе М. Л. Изв. АН ГССР, сер. биол., 4, 2, 123—127, 1978.
5. Berridge M. J., Irvine R. F. Nature, 312, 315—321, 1984.
6. Kometiani Z., Tsakadze L., Jariashvili T. J. Neurochem., 42, 5, 1246—1250, 1984.
7. Lin D., Massaro E. Int. J. Biochem., 8, 5, 365—368, 1977.
8. Nishikawa T., Goto M., Shimizu S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 2, 893—900, 1985.
9. Skou J. C. Biochem. Biophys. Acta, 53, 314—325, 1962.

ლ. წაკაძე, ძ. კუტალია, ზ. კომეთიანი

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

რეზიუმე

შესწავლილ იქნა ეგტა-ს, ლუბროლ WX, კალციუმის იონების გავლენა ვირთაგვას თავის ტვინის Na, K-ატფაზურ სისტემაზე ნეიროტრანსმიტერების ზემოქმედების ფონზე.

ნაჩვენებია, რომ ნეიროტრანსმიტერებით აქტიური ტრანსპორტის რეგულაცია

არ ხორციელდება ენდოგენური კალციუმის შებოჭვით. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ აღნიშნულ პროცესში მონაწილეობს Ca-კალმოდულინდამოკიდებული, ან Ca-ფოსფოლიპიდდამოკიდებული რეაქციები.

EGTA-DEPENDENT EFFECT OF NEUROTRANSMITTERS ON Na,K-ATPase

L. G. TSAKADZE, K. D. KUTALIA, Z. P. KOMETIANI

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

S u m m a r y

The influence of EGTA, lubrol WX and calcium ions on the effect of neurotransmitters on the Na,K-ATPase system has been studied.

It has been shown that the active transport regulation by neurotransmitters

is not mediated by the endogenous calcium binding.

The participation of Ca-calmodulin-dependent and Ca-phospholipid-dependent reaction is supposed.

УДК 581.143.6

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ФОТОМИКСОТРОФНОГО КАЛЛУСА ТОПОЛЯ

М. Л. Долидзе, А. И. Литвинов, Г. А. Санадзе

Тбилисский государственный университет

Поступила в редакцию 9.03.1987

Описаны некоторые особенности роста и функциональной активности фотомиксотрофного каллуса листа тополя. Ростовая активность культуры синхронизирована с дыханием, фотосинтезом, образованием пигментов, поглощением сахарозы из питательной среды и накоплением CO_2 в культуральных сосудах. Отмечается светозависимый характер роста, превышение уровня дыхания над фотосинтезом и высокий уровень темновой ассимиляции CO_2 . Обсуждаются направления дальнейших исследований, которые могут дать ответ на причины подавления синтеза изопрена в зеленом каллусе тополя.

Хлорофиллоносные каллусные и клеточные культуры высших растений привлекают к себе все большее внимание в качестве нового объекта исследований в фотосинтезе. С одной стороны, выявлено их сходство с листьями растений в отношении фотосинтетической и фотохимической активности [18, 26, 29], фотодыхания [12], состава пигментов и липидов [19]. С другой стороны, культивируемые зеленые клетки отличаются пониженным содержанием хлорофилла [29, 30], повышенным накоплением сахаров и сахарофосфатов [20], органических кислот [18, 24, 26] и аминокислот [16, 20], возрастанием активности фосфоенолпируваткарбоксилазы и снижением активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы [18, 25, 28], превышением интенсивности дыхания над фотосинтезом [4, 31].

Интерес к хлорофиллоносным изолированным культурам высших растений обусловлен также тем, что они могут стать источником уникальных органических веществ, образование которых непосредственно связано с фотосинтезом.

Некоторые высшие растения синтезируют и выделяют в атмосферу свободный изопрен. Это явление тесно

связано с функционированием фотосинтетического аппарата и изучается на целых растениях [33], отдельных листьях [8], изолированных протопластах и хлоропластах [6, 7]. Наши исследования по культивированию тканей и клеток изопренвыделяющих растений [5, 11] преследуют две цели. Во-первых, создание удобного модельного объекта в изучении фотосинтеза и выделения изопрена, во-вторых, апробирование возможности препаративного получения этого важного вещества с помощью изолированных культур.

Каллус листа тополя был инициирован нами в 1981 году. Первоначально он был весьма гетерогенным, а фиксация углекислоты зелеными участками каллуса почти не превышала таковую в несодержащих хлорофилл участках. В результате селекции, упрощения органического состава питательной среды и снижения концентрации сахарозы гетерогенность каллуса значительно уменьшилась [5, 11], а интенсивность фотосинтеза в расчете на содержание хлорофилла возросла до уровня фотосинтеза листьев [2, 10].

Таким образом, нами была получена каллусная культура древесного



растения с высоким фотосинтетическим потенциалом, однако выделения изопрена обнаружено в ней не было. Поэтому была поставлена задача изучения некоторых общих ростовых и функциональных свойств изолиро-

ванной культуры тополя, что должно было, по нашему мнению, ~~позволять~~ формулировать задач дальнейших исследований, связанных с выяснением причин подавления синтеза изопрена в этой системе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Условия получения и культивирования каллуса листа тополя (*Populus deltoides* Marsh.) в жидкой питательной среде описаны ранее [5]. Питательная среда содержит соли по Мурашиге и Скугу, сахарозу — 10 г/л, инозит — 100 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту — 1 мг/л, аденин — 1 мг/л. Для стабилизации питательной среды в нее вносили удвоенное количество Na_2 ЭДТА [34]. При пассировании в 100 мл колбы с 30 мл питательной среды помещали около 1 г каллуса. Колбы закрывали фольгой.

центрация бикарбоната натрия — 5 ммоль, его удельная радиоактивность — 77,7 МБк/ммоль. В реакционные сосуды с 0,5 мл среды роста вносили по 100 мг каллуса. Температура в опытах — 28°C, освещенность — 10^4 люкс, время преилюминации — 30 мин, время реакции — 10 мин. Для просчета кислотоустойчивых продуктов ассимиляции использовали диоксидный сцинтиллятор Брея.

Интенсивность дыхания измеряли на инфракрасном газоанализаторе

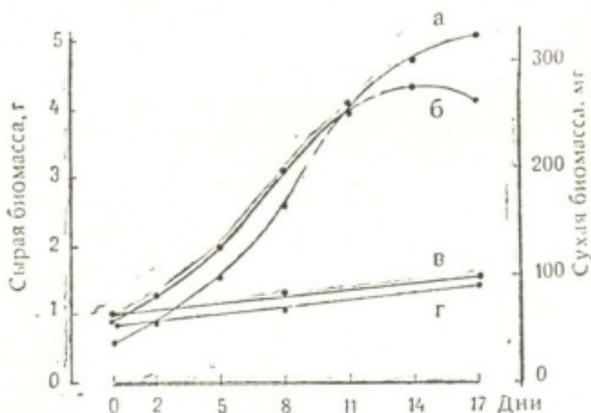


Рис. 1. Рост каллуса тополя на свету, в темноте и в присутствии диурона: а) — накопление сырой биомассы на свету; б — накопление сухой биомассы на свету; в — накопление сырой биомассы на свету и в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М диурона; г — накопление сырой биомассы в темноте

Сухую массу каллуса определяли после его высушивания в течение суток при 65°C. Пигменты экстрагировали из ткани 80%-ным ацетоном, а их концентрацию рассчитывали по уравнениям, предложенным в работе [23].

Интенсивность фотосинтеза определяли радиометрически. Конечная концентрация биологическая, т. 13, № 5

ОА-5501 по замкнутой системе. Опыты проводили в среде роста, в темноте, при температуре 28°C. Концентрацию CO_2 в газовой фазе культуральных сосудов определяли с помощью модифицированного газоанализатора этой же марки. Концентрацию сахарозы в среде роста определяли с антроновым реактивом [1].

В таблицах и на рисунках приведены средние значения 2—3 циклов выращивания. Для каждого измерения

использовали по 2—3 колбы, причем анализы проводились в 2—3-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характер роста каллуса тополя показан на рис. 1. Прирост как сырой (рис. 1а), так и сухой биомассы (рис. 1б) происходит без явного лаг-периода. Наибольшая интенсивность ростовых процессов наблюдается на 5—11 день, затем в накоплении сырой биомассы наступает замедление,

филла и к концу цикла она составляет 10—15 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. массы.

Диурон в использованной концентрации не влиял на содержание хлорофилла (40—60 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. массы).

Накопление пигментов (рис. 2) и биомассы (рис. 1а, б) имеют сходный характер. Наблюдается также

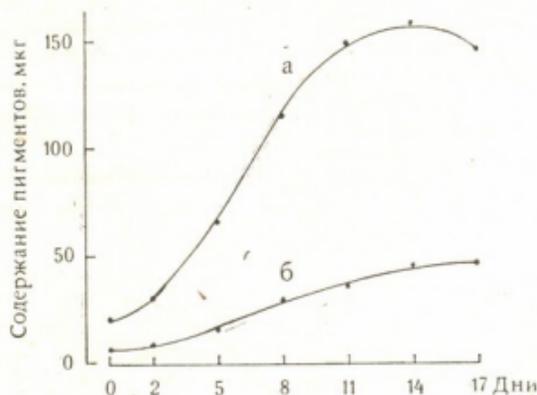


Рис. 2. Накопление каллусом тополя хлорофилла (а) и каротиноидов (б) в цикле роста

а в накоплении сухой биомассы — стационарная фаза.

Выращивание каллуса на свету в присутствии диурона в питательной среде (рис. 1в) или его культивирование в темноте (рис. 1г) вызывают резкое замедление роста: если сырая масса каллуса на свету увеличивается при-

соответствие в относительном изменении биомассы и содержания хлорофилла (табл. 1). Плотность каллуса сначала растет, затем падает, достигая к концу цикла выращивания первоначального значения. Изменение относительного содержания хлорофилла происходит сходным обра-

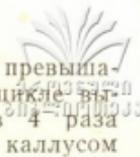
Таблица 1

Плотность каллуса тополя и содержание в нем хлорофилла

Возраст, дни	0	2	5	8	11	14	17
Сухая масса, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. мас.	42	57	58	54	51	50	40
Хлорофилл, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. мас.	50	43	63	76	62	52	46

мерно в 10 раз, то в темноте или в присутствии диурона прирост весьма незначителен. Перевод каллуса со света в темноту вызывает постепенное снижение концентрации хлоро-

зом, однако оно заметно падает в первые сутки культивирования, что отмечается также для некоторых других изолированных каллусных и клеточных культур [24, 27].



Изменение скорости ассимиляции углекислоты в зависимости от возраста культуры показано на рис. 3. Резкое увеличение скорости фотосинтеза после пассажа каллуса в свежую питательную среду зарегистрировано уже в первые сутки. Высокий уровень фотосинтеза сохраняется в течение первой недели и составляет 50—60 мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{мг}^{-1} \text{ хл. ч}^{-1}$ (рис. 3а). Темновая фиксация CO_2 равна в

скорости темнового дыхания превышает скорость фотосинтеза в цикле выращивания как минимум в 4 раза (табл. 2). Выделение CO_2 каллусом на свету по сравнению с его выделением в темноте снижается не менее, чем на 20—30%.

Дополнительную информацию о функциональной активности каллуса в цикле выращивания можно получить при регистрации изменений в

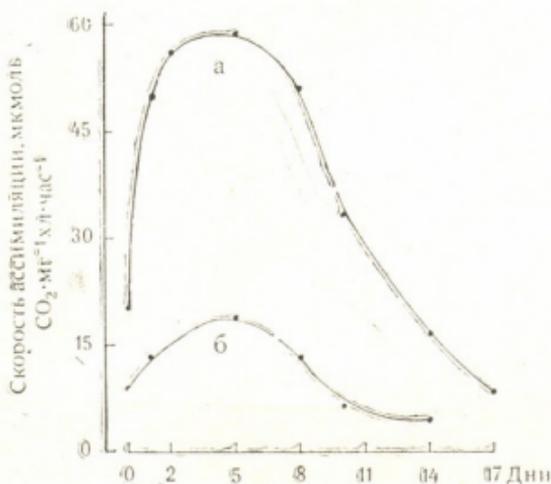


Рис. 3. Ассимиляция углекислого газа каллусом тополя на свету (а) и в темноте (б)

это время 15—20 мкмоль $\cdot \text{мг}^{-1} \text{ хл. ч}^{-1}$ (рис. 3б), что составляет 25—30% от световой. По мере старения культуры как световое, так и темновое усвоение углекислоты снижается, однако первое постоянно выше второго.

После пересадки каллуса на свежую питательную среду его дыхание,

в составе среды выращивания. Наши прямые измерения показали, что рост каллуса тополя сопряжен с закономерными изменениями рН среды (рис. 4). В течение первых двух суток рН питательной среды падает, причем тем более значительно, чем выше ее первоначальное значение.

Таблица 2

Зависимость дыхания и фотосинтеза от возраста каллуса тополя

Функциональная активность	Возраст, дни				
	2	7	10	14	17
Дыхание, мкм $\text{CO}_2 \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. мас. ч. $^{-1}$	14,1	11,8	7,5	6,3	4,4
Фотосинтез, мкм $\text{CO}_2 \cdot \text{г}^{-1}$ сыр. мас. ч. $^{-1}$	2,2	2,1	1,7	0,8	0,3

так же как и фотосинтез, быстро активизируется и затем поддерживается на высоком уровне в течение 10—11 дней (табл. 2). Примечателен тот факт, что в расчете на сырую массу

Затем имеет место подщелачивание среды роста от рН 4,9 до 6,2. Это возрастание рН связано с нормальным функционированием каллуса, поскольку его деградация и обесцвечивание

вание в последующие 4—5 дней сопровождаются заметным помутнением среды и резким повышением рН до 7—7,8. Подобное изменение рН питательной среды при выращивании изолированных культур высших растений в накопительном режиме носит общий характер [13].

ращивания сахаразы в среде не является. Интенсивное дыхание, превращающее интенсивность фотосинтеза, плотная изоляция колб алюминиевой фольгой приводят к накоплению в них углекислого газа (табл. 4), т. е. рост каллуса тополя происходит в условиях довольно высокого парци-

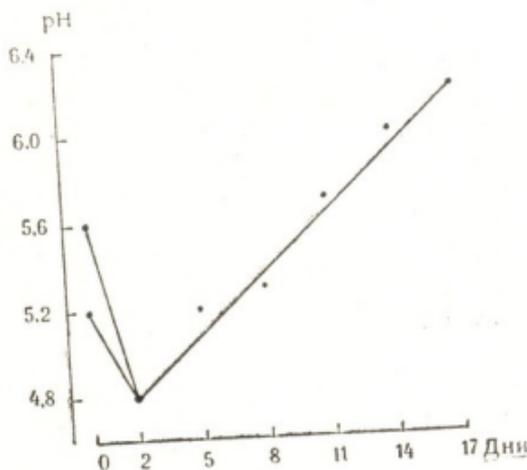


Рис. 4. Изменение рН питательной среды во время культивирования каллуса тополя

Рост каллуса тополя сопровождается поглощением сахаразы из питательной среды (табл. 3). Наиболее интенсивное потребление сахаразы происходит в экспоненциальную фазу роста. После двухнедельного вы-

ального давления CO_2 . Можно предположить, что накопление CO_2 в газовой фазе культуральных сосудов — обычное явление, однако оно отмечается только в одной известной нам работе [21].

Таблица 3

Изменение концентрации сахаразы в питательной среде

Возраст, дни	0	2	6	10	14	18
Сахараза, вес, %	1	0,90	0,65	0,26	0,1	—

Таблица 4

Изменение CO_2 в атмосфере культуральных сосудов

Возраст, дни	0	2	6	10	14	18
CO_2 , объем. %	0,04	0,6	0,9	1,2	0,8	0,2

При освещении изолированных гетеротрофных культур высших растений многие из них зеленеют. Скорость роста таких культур и конечное накопление биомассы может при этом остаться примерно на прежнем уровне [36] или же существенно возрасти [9, 15, 21]. Интенсификация ростовых процессов под действием света может быть обусловлена улучшением условий для утилизации углеводов [9, 15], фотосинтетическим усвоением CO_2 [17, 24], синтезом фитогормонов [32], световой активацией ключевых ферментов метаболизма, а также сочетанием этих и других факторов.

По своей природе изолированные зеленые ткани и клетки могут быть фотогетеротрофными и фотомиксотрофными [35]. В первом случае преобладающим или даже единственным источником углерода в ходе светозависимого метаболизма являются органические субстраты питательной среды, во втором — наряду с окислительными процессами значительный вклад в утилизацию углерода вносит фотосинтетическое усвоение углекислоты.

Ранее нами было показано, что уменьшение интенсивности освещенности вызывает замедление скорости роста и накопления биомассы каллуса тополя [3]. Последствия перевода культуры со света в темноту еще более значительны: в первом пассаже в темноте масса каллуса не превышает массу эксплантата даже вдвое (рис. 1), во втором — рост полностью прекращается, каллус теряет хлорофилл и при последующем освещении не зеленеет, однако деструктивных изменений не наблюдается в течение 1,5—2 месяцев. На свету процессы роста и образования пигментов хорошо синхронизированы, а диурон, ингибитор второй фотосистемы, сильно замедляет рост каллуса (рис. 1, 2 и табл. 1). Таким образом, совокупность приведенных фактов указывает на важную роль фотосинтеза в функционировании каллусной культуры тополя.

Сопоставление результатов, представленных на рис. 1 и 3 и в табл. 2, позволяет предположить, что в энергетические потребности каллусной

ткани вносят вклад как фотосинтез, так и фотосинтез. Однако замедление и, в конечном итоге, остановка роста в темноте указывают, что простым суммированием названных энергетических процессов события, по-видимому, не ограничиваются.

Полная остановка роста в темноте при наличии в питательной среде соответствующих субстратов описана для культуры водорослей [14, 35] и печеночника [22]. Как предполагают авторы, в этих случаях эффективность образования АТФ в митохондриях мала и при культивировании клеток в темноте их рост прекращается из-за нехватки энергии для транспорта окисляемых субстратов и (или) их последующего метаболизма. На свету же в результате образования АТФ в нециклическом фосфорилировании наблюдается стимуляция потребления субстратов и рост резко активизируется. Можно предположить, что сходные явления, связанные со световой стимуляцией роста, имеют место и для зеленого каллуса тополя.

Наши расчеты, сделанные на основе учета углерода, вносимого в питательную среду с сахарозой, а также углерода, содержащегося в сухой массе каллуса, и углерода, выделяемого при дыхании, показывают, что около 25—30% усвоенного каллусом углерода приходится на фотосинтез. Следует также принять во внимание, что фотосинтетическое поглощение CO_2 происходит так же эффективно в фосфатном буфере, не содержащем сахарозу, как и в среде роста, причем эта световая фиксация углекислоты снижается до уровня темновой фиксации в присутствии 10^{-6}M диурона. Все это позволяет нам утверждать, что каллусная культура тополя является по своей природе фотомиксотрофной.

В чем же причина подавления синтеза изопрена в каллусе тополя, связана ли она с эпигенетическими или генетическими изменениями? Дать однозначный ответ на поставленный вопрос сейчас не представляется возможным, однако мы надеемся, что существенную определенность может внести решение следующих первоочередных задач:

1. Способен ли каллус тополя к росту в воздушной атмосфере (непрерывная продувка стерильного воздуха). Если да, то как изменяются при этом свойства каллуса и, в частности, его способность к синтезу изопрена.

2. Отличаются ли структурные и функциональные свойства ключевого фермента фотосинтеза — рибулозо-

бисфосфаткарбоксилазы — в клетках каллуса и в клетках мезофилла листьев тополя.

3. Способен ли каллус тополя к регенерации в целое растение. Предполагается сравнить фотосинтетические свойства и способность к синтезу изопрена регенерированного и обычного тополя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Биохимические анализы, Тбилиси, 1951, 223—224.
2. Долидзе М. Л., Сургуладзе С. Г. IV Всесоюз. междуниверситетская конф. «Биология клетки», Изд-во ТГУ, Тбилиси, 1985, 254—255.
3. Долидзе М. Л., Литвинов А. И., Гоглидзе Н. Б. IV респ. науч.-метод. конф. биол. высш. учебн. завед. ГССР, Изд-во ТГУ, Тбилиси, 1985, 191—192.
4. Игнатъев А. Р., Полевая В. С., Шабаяева Э. В. Физиол. раст., 28, 659—662, 1981.
5. Литвинов А. И., Томарадзе Г. К., Сургуладзе С. Г., Санадзе Г. А. Изв. АН ГССР, сер. биол., 12, 2, 129—134, 1986.
6. Мгалоблишвили М. П., Литвинов А. И., Санадзе Г. А. ДАН СССР, 259, 766—768, 1981.
7. Мгалоблишвили М. П., Литвинов А. И., Калаидадзе А. Н., Санадзе Г. А. Физиол. раст., 29, 372—377, 1982.
8. Санадзе Г. А. Физиол. раст., 13, 753—761, 1966.
9. Смолов А. П., Полевая В. С. Физиол. раст., 27, 612—618, 1980.
10. Сургуладзе С. Г., Литвинов А. И., Санадзе Г. А. IV респ. научно-метод. конф. биол. вузов ГССР. Изд. ТГУ, Тбилиси, 1985, 228—229.
11. Томарадзе Г. К., Литвинов А. И. IV респ. научно-метод. конф. биол. вузов ГССР, Изд-во ТГУ, Тбилиси, 1985, 223—235.
12. Berlyn M. B., Zelitch I., Beaudette P. D. Plant Physiol., 64, 606—610, 1978.
13. Butenko R. G., Lipsky A. Kh., Chernyak N. D., Arya H. C. Plant Sci. Lett., 35, 207—212, 1984.
14. Droop M. R. In Algal Physiology and Biochemistry. Botanical Monographs, 10. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1974, 530—559.
15. Furuhashi K., Usui H., Yatazawa M. Plant and Cell Physiol., 20, 363—367, 1979.
16. Hanson A. D., Edelman J. Planta, 102, 11—25, 1972.
17. Horn J. M. E., Sherrard J. H., Widholm J. M. Plant Physiol., 72, 426—429, 1983.
18. Hüsemann W., Plohr A., Barz W. Protoplasma, 100, 101—112, 1979.
19. Hüsemann W., Radwan S. S., Mangold H. K., Barz W. Planta, 147, 379—383, 1980.
20. Kennedy R. A., Barnes J. E. Plant Physiol., 59, 600—603, 1977.
21. Kohno H., Yoshida F. Plant and Cell Physiol., 18, 907—913, 1977.
22. Katoh K. Physiol. Plant., 57, 67—74, 1983.
23. Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Biochem. Soc. Trans., 11, 591—592, 1983.
24. Nato A., Bazetoux, Mathieu Y. Physiol. Plant., 41, 116—123, 1977.
25. Nato A., Mathieu Y. Plant Sci. Lett., 13, 49—56, 1978.
26. Nashida K., Sato F., Yamada Y. Plant and Cell Physiol., 21, 47—55, 1980.
27. Sato F., Asada K., Yamada Y. Plant and Cell Physiol., 20, 193—200, 1979.
28. Sato F., Nishida K., Yamada Y. Plant Sci. Lett., 20, 91—97, 1980.
29. Seeni S., Gnanam A. Physiol. Plant., 49, 465—472, 1980.
30. Seeni S., Gnanam A. Plant and Cell Physiol., 22, 1131—1135, 1981.
31. Seeni S., Gnanam A. Plant and Cell Physiol., 24, 1033—1041, 1983.
32. Tillberg E. Physiol. Plant., 31, 106—111, 1974.
33. Tingey D. T., Manning M., Grothaus L. C., Burns W. F. Physiol. Plant., 47, 112—118, 1979.
34. Vyskot B., Bezdek M. Biologia Plantarum, 26, 132—143, 1984.
35. Wiessner W. In Encyclopedia of Plant Physiol. New Series, 6, Springer, 1979, 181—189.
36. Yamada Y., Sato F. Plant and Cell Physiol., 19, 591—699, 1978.

მ. დოლიძე, ა. ლიტვინოვი, გ. სანაძე

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რეზიუმე

აღწერილია ვერხვის ფოთლის ფოტო-მიქსოტროფული კალუსის ზრდისა და ფუნქციური აქტივობის ზოგიერთი თავისებურება. კულტურის ზრდის აქტივობა სინქრონულ დამოკიდებულებაში იმყოფება სუნთქვასთან, ფოტოსინთეზთან, პიგმენტების წარმოქმნასთან, საკვები არიდან სახაროზის შთანთქმასთან და კულტურალურ ჭურჭლებში CO₂-ის დაგროვებას-

თან. აღინიშნება ზრდის დამოკიდებულება სინათლისაგან, სუნთქვის უფრო მაღალი დონე ფოტოსინთეზთან შედარებით და აგრეთვე CO₂-ის სიბნელეში ასიმილაციის მაღალი დონე. განხილულია შემდგომი კვლევის მიმართულებები, რომლებმაც შეიძლება პასუხი გაგვცეს ვერხვის მწვანე კალუსში იზოპრენის სინთეზის დათრგუნვის მიზეზებზე.

SOME PROPERTIES OF PHOTOMIXOTROPHIC POPLAR CALLUS

M. L. DOLIDZE, A. I. LITVINOV, G. A. SANADZE

Tbilisi State University, USSR

S u m m a r y

Some peculiarities of growth and functional activities of poplar leaves photomixotrophic callus are described. Culture growth activity is synchronized with respiration, photosynthesis, pigments formation, sucrose absorption from the nutrient medium and CO₂ accumulation in culture flasks. Light-depending chara-

cter of growth, exceeding respiration level at photosynthesis and high level of CO₂ dark assimilation are noted. The directions for further investigations that might reveal the causes of isoprene synthesis depression in the poplar green callus are discussed.

УДК 576.8.097.29

МИКРОБИОЛОГИЯ

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕМОЛИЗИНЫ

Д. К. Мешвелиани, Р. Ш. Адамия, Р. П. Вашакидзе
Н. А. Мамулашвили, Т. Г. Чанишвили

*Тбилисский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
Минмедбиопроста СССР*

Институт молекулярной биологии и биофизики АН ГССР, Тбилиси

Инфекционные заболевания, вызванные патогенными микроорганизмами, широко распространены и являются объектом тщательного изучения как медиков, так и биологов. Как известно, гемолизин патогенных бактерий играет значительную роль в таких заболеваниях, являясь ведущим фактором вирулентности этих микроорганизмов. В обзоре рассмотрены литературные данные по изучению биологических свойств, физиологии и характеристики генетического локуса гемолитических патогенных штаммов. Особое внимание уделяется исследованию энзимологического действия гемолизинов на мембраны эритроцитов и клетки различных тканей и органов.

Многие микроорганизмы обладают способностью продуцировать большое количество внеклеточных белков; некоторые из них неблагоприятно влияют на ткани и органы человека и животных. Среди этих белков — ферменты, разрушающие соединительную ткань (гиалуронидаза), нуклеиновые кислоты (ДНКазы), белки (протеазы), компоненты сывороток (фосфолипазы) и т. д.

Одна группа внеклеточных белков — экзотоксины — играет значительную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, вызванных микроорганизмами. Самыми широко распространенными внеклеточными токсинами как грамположительных (g^+), так и грамотрицательных (g^-) бактерий являются гемолизины. Гемолизины вызывают разные патологические изменения: дерматонекроз, токсический шок, гнойные инфекции и др. Общее свойство всех гемолизинов — разрушающее воздействие на мембрану эритроцитов и их последующий лизис. В зависимости от источника гемолизины различаются как по моле-

кулярной массе (М.м.) и физиологическим свойствам, так и биохимическим воздействием на те или иные ткани.

В предлагаемом обзоре рассмотрены некоторые биологические свойства, дана характеристика структуры локуса гемолизинов, как g^+ так и g^- микроорганизмов.

Гемолизины грамотрицательных бактерий. Многие интра- и экстраинтестинальные инфекционные заболевания человека и животных вызываются различными патогенными штаммами *E. coli*. К таким заболеваниям относятся бактериемия, септицемия, колиты, холецистит, а также некоторые инфекции мочевого тракта.

Большинство патогенных штаммов *E. coli* обладают способностью гемолизировать эритроциты (Hly^+) посредством продуцируемого ими внеклеточного белка α -гемолизина (α -токсина). Наряду с гемолизином, патогенные штаммы *E. coli* обладают и другими факторами патогенности, такими как эндотоксины или O и K антигены. Но



основным из них является α -гемолизин. Рядом авторов было четко показано, что патогенность штамма резко снижается при отсутствии Hly⁺ фенотипа, даже при наличии всех остальных перечисленных факторов патогенности [23, 52].

Исследования по изучению физиологии патогенных штаммов *E. coli* в разных лабораториях однозначно указывают на существенную роль α -гемолизина в патогенезе инфекционных заболеваний [3, 34, 65]. С другой стороны, данные о структуре и биохимических свойствах α -гемолизина у разных исследователей не всегда совпадают [24, 16]. Противоречивые данные о молекулярной массе α -гемолизина. Гебель и Хеджпез [24] сообщают, что М.м. α -гемолизина составляет 58 килодальтон (Кд), а Фелмли и сотр. [16] гемолитическую активность относят к белку с М.м. 107 Кд. Снандерс [9] предполагает, что активный α -гемолизин находится в мультимерной форме с молекулярной массой 400 Кд и взаимосвязан с липидами и полисахаридами.

Шпрингер и Гебель [65] показали, что уровень синтеза и секреции α -гемолизина зависит от условий выра-

во внеклеточное пространство и достигает своего максимума до стационарной фазы роста, после чего быстро деградирует (рис. 1). Этот процесс сопровождается накоплением в среде белка с М.м. 60 Кд, являющегося продуктом протеолиза белка с М.м. 107 Кд, так как он инактивировался антисывороткой к очищенному белку с М.м. 107 Кд [54]. Было также показано, что в присутствии миоглобина и гемоглобина количество белка в среде резко увеличивается [64]. Вместе с тем установлено, что активный токсин с М.м. 58 Кд стабилен в присутствии гемоглобина в среде и быстро инактивируется без него [37]. Основываясь на этих данных ученые предполагают, что гемоглобин является индуктором биосинтеза α -гемолизина или его стабилизирующим агентом в среде.

Исследование дефектных по Hly фенотипу штаммов *E. coli* выявило три мутантных типа этого класса. В одном случае клетки продуцировали токсин с М.м. 107 Кд, который не подвергался протеолизу с накоплением белка с М.м. 58 Кд. В мутантах второго типа синтез α -гемолизина не происходил вообще, в то время как в третьем типе α -гемолизин синтезировался, но накапливался внутри клетки, без выхода во внеклеточное пространство. Эти наблюдения позволили идентифицировать три цистрона, ответственных за синтез и секрецию α -гемолизина, соответственно обозначенные hly C, hly A и hly B цистронами. Предполагалось, что ген hly C ответственен за синтез белка, действующего как протеолитический активатор структурного белка α -гемолизина. Структурный белок α -гемолизина детерминируется цистроном hly A. Цистрон hly B ответственен за транспорт белка во внеклеточное пространство. Позже было показано [16, 69], что hly B состоит из двух цистронов: hly Ba (hlyD), ответственного за периплазматический транспорт белка и hlyBb (hlyD) — за проникновение через наружную мембрану.

Шпрингер и Гебель [65] изучали мутанты гемолитического штамма *E. coli* по транспортным генам. Они пришли к выводу, что выделение α -гемолизина состоит из двух процессов: I процесс — транспортирование через цитоплазматическую мембрану

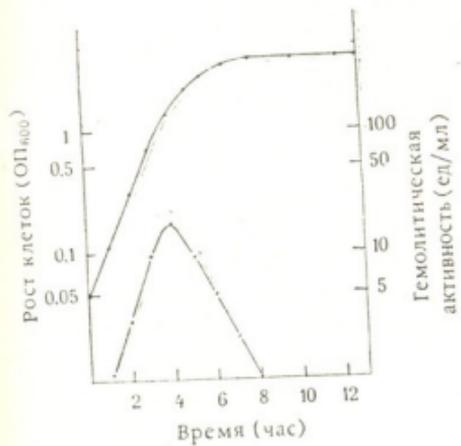


Рис. 1. Изменения гемолитической активности в процессе роста клеток *E. coli* LE 2001

щивания бактерии. Количество активного белка с М.м. 58 Кд достигает максимума в поздней логарифмической фазе роста клеток. Позднее Нинко и сотр. смогли четко показать, что α -гемолизин с М.м. 107 Кд выходит

в периплазму и II процесс — прохождение через внешнюю мембрану, которое может блокироваться конформационными изменениями в структуре мембраны. Основываясь на генетических данных, эти же авторы предполагают, что есть возможность участия в этом процессе продуктов функционирования плазмидной ДНК. Было показано, что детерминанты α -гемолизина могут локализоваться как в плазмиде, так и в хромосоме бактерий [24, 34, 65]. Гибридизация между хромосомальными детерминантами токсина из разных серологических групп, а также с различными плазмидными детерминантами выявила высокую гомологию нуклеотидных последовательностей. Некоторые различия на участке структурного гена *hlyA* коррелируют с вирулентностью отдельных штаммов [12]. Выявлено также [3], что штаммы *E. coli*, вызывающие инфекционные заболевания человека, содержат хромосомальный детерминант α -гемолизина, а штаммы *E. coli* животной этиологии — плазмидный. Жакер и сотр. [33] показали, что детерминант гемолизина содержится в транспозонподобном элементе, который может находиться как в плазмиде, так и в хромосоме бактерии.

Хуарес и Гебель [39] описали интересный случай зависимости экспрессии плазмидной детерминанты от хромосомального локуса. Мутагенезацией с помощью *MuI* штамма *E. coli* 5K, содержащего плазмиду с множественным числом копии *rANN* 202-213, было получено два типа мутантных клеток, вырабатывающих токсин, но не способных выделять α -гемолизин во внеклеточное пространство. Мутация первого типа затрагивала хромосому бактерии, а второго типа — плазмидную детерминанту. В первом случае токсин вырабатывался внутриклеточно в том же количестве, как и клетками дикого штамма. Во втором — количество внутриклеточного токсина несколько снижалось, выявляя фенотип мутации *hlyB*. Затронутый мутацией хромосомальный участок не состоит в родстве с какой-либо плазмидой кодирующей *Hly*⁺ фенотип, так как гибридизационный анализ не выявил между ними гомологию. Это единственный случай наблюдения, когда

секреция гемолизина, кодируемая плазмидой, в окружающую среду происходит под специфическим влиянием хромосомальной мутации.

Фелмли и сотр. [17] показали, что N-концевой участок структурного гена *hlyA* кодирует аминокислотную последовательность, похожую на сигнальную (signal like sequence), отщепление которой сопровождается накоплением α -гемолизина в мембране без его выхода во внеклеточное пространство. Эти же авторы выявили, что α -гемолизин выходит в окружающую среду из клетки без отщепления у нее сигнальной последовательности. Отсутствует лишь N-концевая аминокислота формил-метионин. Секреция α -гемолизина клетка-

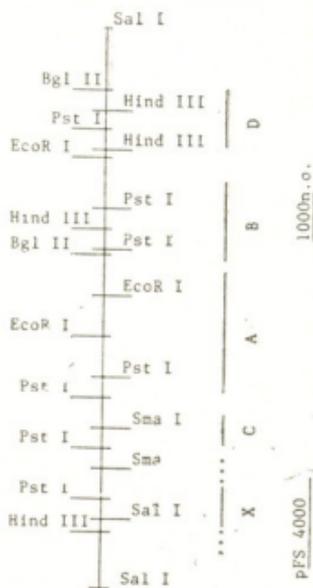


Рис. 2. Рестрикционная карта детерминанта α -гемолизина штамма *E. coli* серотипа O4, клонированного в плазмиде pFS 4000

ми *E. coli* сходна с выделением овальбумина эукариотическими клетками, что также происходит без отщепления сигнальной последовательности [59]. Успешная секреция овальбумина через мембрану рекомбинантных клеток *E. coli* предполагает, что *g*⁻ бактерии могут производить внеклеточные белки без отщепления сигнальной последовательности [20].

Фелмли и сотр. [17] сконструировали плазмиду pFS 4000, содержащую детерминанту гемолизина штам-



ма *E. coli* серотипа 04, изолированного у больного инфекцией мочевого тракта и секвенировали этот участок длиной 8211 пар оснований — п.о. (рис. 2). На одной цепи ДНК находятся, следующие один за другим, открытые рамки считывания (ОРС), физически совпадающие с четырьмя цистронами гемолизина [56, 69]. Соответствующие плазмиды рFS 4000 кодируют белки с М.м. 19,7, 109,8, 79,9 и 54,6 Кд, что совпадает с предсказуемой М.м. белков по размеру ОРС [17].

Выявленные М.м. продуктов генов *hly A* и *hly C* совпадают с результатами ранних исследований [55, 56]. М.м. двух транспортных белков неидентичны с данными, полученными в лаборатории Гебеля, по данным которого М.м. продуктов *hly B*, *hly C* составляет соответственно 46 и 64 Кд. Далее в лаборатории Велча было показано [17], что протеолитическое разрушение продукта гена *hly A* в миниклетках происходит без присутствия гена *hly C*. Это опровергает ранее высказанное мнение о том, что продукт гена *hly C* действует как протеаза, активирующая гемолизин [24, 55]. Функции белка продукта гена *hly C* пока неполностью ясны, хотя с помощью делеции и *in vitro* было показано, что область, содержащая свыше 300 п.о. до начала стартового кодона *hlyC*, необходима для синтеза гемолизина [17]. Эта область не содержит ОРС, а присутствие множества прямых и непрямых повторов указывает на возможный сайт регуляции. Секвенс участка ДНК *hlyC-hlyA* выявляет шесть возможных кандидатов промотора для *hly C* и не идентифицирует ни одного участка, похожего на терминатор между *hly C* и *hly A*. Способность субклонированных цистронов *hly B* и *hly D* независимо друг от друга продуцировать белки в обоих направлениях указывает на существование специфических промоторов у этих генов. Этими же авторами была предложена модель транскрипционной организации детерминанты гемолизина с тремя транскрипционными единицами: I. *hly C-hly A*, II. *hly B* и III. *hly D*.

С эволюционной точки зрения есть основание предполагать, что детерминанта гемолизина *E. coli* является

приобретенной в процессе эволюции от микроорганизмов, не очень родственных с *E. coli*. ДНК-ДНК-гибридизация показала, что детерминанта гемолизина уникальна для лимитированного количества штаммов *E. coli*. Г-Ц содержание этой детерминанты отличается от нуклеотидного состава генома *E. coli*. В генах, кодирующих гемолизин, часто встречаются редкие кодоны *E. coli* [30, 31, 35, 72]. Цабала и сотр. [73] идентифицировали активные к рекомбинации IS-91-подобные элементы, фланкирующие детерминанту с обеих сторон.

По ряду причин биологические свойства *E. coli* исследованы лучше, чем других представителей *g⁻* бактерий. Изучение α -гемолизина *E. coli* не составляет исключение в этом аспекте. Многое известно о физиологии, продукции и строении детерминанты α -гемолизина этих штаммов. Гемолизины других *g⁻* бактерий изучены не столь глубоко, хотя с развитием методики рекомбинантной ДНК, за последние 10 лет, появились и данные о гемолизинах некоторых *g⁻* продуцентов этого токсина.

В ряде лабораторий были изучены детерминанты гемолизина штаммов рода *Vibrio* и их экспрессия в рекомбинантных *E. Coli* [50,67]. *Vibrio parahaemolyticus* вызывает пищевое отравление человека, что сопровождается острым гастроэнтеритом. Этот штамм продуцирует несколько гемолизинов одновременно. Одним из них является термостабильный токсин, детерминанта которого была клонирована в клетках *E. coli* K12 C600. Основное количество токсина, продуцируемого рекомбинантными клетками, накапливалось в периплазме и лишь 15% секретировалось в среду. Детерминанта одного термостабильного гемолизина локализовалась на участке ДНК длиной 900 п.о., другого же — на участке ДНК длиной 1300 п.о. Интересно, что гибридизация этих последовательностей с ДНК геномов других *V. cholerae* выявила гомологию и дала возможность применять эти гибридные плазмиды для филогенетических исследований [67].

Манинг и сотр. [50] клонировали генетическую детерминанту гемолизина *V. cholerae* биотипа EL Tor В *E. coli*. На этом участке ДНК было

идентифицировано три цистрона hly A, hly B и hly C. hly A кодировал структурный белок с М.м. 80 Кд, а hly B и hly C соответственно 71 и 22 Кд, необходимые для экспрессии гемолизина. Как и в случае с гемолизином *V. parahaemolyticus*, высев токсина *V. cholerae* рекомбинантными клетками в окружающую среду был незначительным и накапливался внутриклеточно.

Гольдберг и сотр. [25] клонировали генетическую детерминанту гемолизина другого штамма *V. cholerae* биотипа EL Tor — RV-79. Внеклеточная продукция гемолизина рекомбинантными клетками *E. coli*, содержащими детерминанту токсина этого штамма, как и в вышеуказанном случае, наблюдалась в малом количестве. Участок ДНК, который необходим для синтеза гемолизина, равен 2300 п.о., а М.м. токсина составляла всего 20 Кд, чему соответствовало бы 540 п.о. Исходя из этого, предполагалось, что или близлежащий к структурному гену участок ДНК необходим для активации гемолизина, или синтезируется большой белок-предшественник, который впоследствии подвергается протеолизу. Позже Маху и сотр. [51] показали на штамме *V. cholerae* EL Tor RJ1 существование регуляторного гена детерминанты гемолизина, который был отдален от детерминанты, как минимум, на один генетический локус. Интересно, что генетическая детерминанта гемолизина выявляет высокую гомологию с последовательностью ДНК из многих *Vibrio cholerae*, включая и классически негемолитические штаммы.

Динг и сотр. [13] изучали детерминанту гемолизина штамма *Pseudomonas aeruginosa* PO103. Детерминанта кодировала гемолитичный белок с М.м. 80 Кд и выявляла также активность фосфолипазы С. Как и в вышеописанных случаях, секреция гемолизина в окружающую среду рекомбинантными клетками *E. coli* наблюдалась в малых количествах. Интересно, что инактивация промотора гена *tet* *E. coli* уменьшала экспрессию гемолизина, хотя не предотвращала ее в целом.

Гемолизины грамположительных бактерий. Многие штаммы g^+ бакте-

рии — *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus* и др. продуцируют внеклеточные гемолизины, однако, по сравнению с гемолизином *E. coli*, они малоизучены. Некоторые штаммы *S. aureus* способны продуцировать одновременно несколько гемолизин — α , β , γ и δ . Наиболее изученным среди них является α -гемолизин *S. aureus*, штаммы которого вызывают множество инфекционных заболеваний человека и животных. Патогенные штаммы *S. aureus* поражают кожу (фурункулы, раневые инфекции), слизистую оболочку кишечника (энтерит), а также являются возбудителями мастита, сепсиса, пневмонии, менингита и других заболеваний. Патогенность этих микроорганизмов определяется как поверхностными компонентами стен бактериальных клеток, так и их способностью образовывать разные внеклеточные белки — токсины. Как было показано [45], α -гемолизин (α -токсин) является основным фактором вирулентности этих микроорганизмов. Кроме лизиса эритроцитов, α -гемолизин может оказывать цитотоксическое и кардиотоксическое воздействие (необратимый спазм коронарных сосудов), поражает нервные клетки и нейронные волокна. На этой основе биологическая активность и физико-химические свойства α -токсина стали объектом изучения многих лабораторий [11, 14, 21].

Стафилококковый α -гемолизин является токсичным, дерматонекротическим иммуногенным, поверхностно-активным внеклеточным белком с М.м. 33 Кд и значением изоэлектрической точки pI 8,4—8,7 [19, 62, 70]. Коэффициент седиментации токсина равен 2,85—3,15 s, хотя имеются данные, показывающие, что он составляет 10—12 s, указывая на возможность существования мультимерных форм α -гемолизина [27].

Обработка α -гемолизина трипсином расщепляет полипептид на две цепи. Одна, тяжелая цепь (17 Кд), сохраняет летальную, но теряет дерматонекротическую активность, а вторая — легкая (14 Кд) цепь нестабильна [42]. Анализ аминокислот выявил их неравномерное распределение на этих цепях. Интересно, что тяжелая цепь содержит одно гисти-



диновое основание, инактивация которого методом Веила [71] уменьшает токсичность этой цепи более чем на 60% [42].

Гидрофильный профиль белка α -гемолизина, изученный методом Кит и Дулитл [48], показал наличие трех участков высокой и несколько участков слабой гидрофобности. Было предположено, что высокогидрофобные участки способны взаимодействовать с гидрофобными участками на мембране клеток, которые они разрушают.

Изучение аминокислотной последовательности N-конца токсина выявило участок из 26 аминокислот, похожий на сигнальную последовательность внеклеточных белков [29]. Эта аминокислотная последовательность имеет конформацию α -спирали, что соответствует результатам исследований Чоу и Фасмана [10] о конформации сигнальных последовательностей внеклеточных белков.

Синтез α -токсина клетками *S. aureus* и его секрета в окружающую среду зависит от условий культиви-

ной фазе, достигая 2% от общего количества белка. Пик продукции α -токсина наступает через 15 часов после начала культивирования и уменьшается через 24—30 ч. К этому времени в среде не обнаружено наличия протеолитических ферментов или других субстратов, вызывающих снижение активности токсина. Инактивация α -гемолизина, вероятнее всего, происходит за счет денатурации белка при непрерывном встряхивании при 37°C. Отсутствие клеточной ДНК *S. aureus* в супернатанте лизата указывает, что выход токсина во внеклеточное пространство не сопровождается лизисом клеток [14]. Наши результаты полностью совпадают с приведенными литературными данными (рис. 3).

Основываясь на «бифазной манере» продукции α -токсина Абас-Али и Колеман [1] предположили, что увеличение количества α -гемолизина в стационарной фазе роста клеток можно объяснить регуляторным механизмом, основанным на принципе «конкуренции» («соревнования») между механизмами синтеза клеточных и внеклеточных белков на уровне транскрипции. Йошикава [38] предположил существование контроля за секретацией внеклеточного токсина на уровне процессов, происходящих в мембранах клеток. Такого же мнения придерживаются другие исследователи [6, 57].

Первое сообщение о существовании регуляторного гена детерминанты α -гемолизина было сделано Фейрвезер и сотр. [15] в 1983 г. Авторы клонировали детерминанту токсина штамма *S. aureus* Wood 46 в плазмиду pBR 322 и трансформировали в дефектный по гемолизину штамм *S. aureus* 8325-4. Трансформированные клетки продуцировали гемолизин, также как и клетки дикого штамма. С другой стороны, трансформирование этой же плазмиды в дикый штамм 8325-4 вызывало резкое повышение экспрессии α -гемолизина. Это указывает на то, что ген α -гемолизина штамма Wood 46 подвергается регуляции характерного для штамма 8325-4. О'Рейли и сотр. [58] в 1986 году показали существование позитивного регулятора в хромосоме штамма *S. aureus* 8325-4, необходимого для экспрессии α -гемоли-

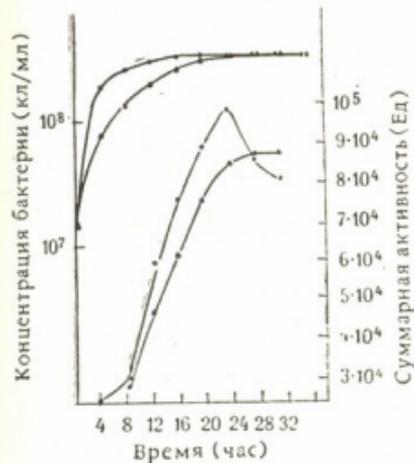


Рис. 3. Изменения гемолитической активности в процессе роста клеток *S. aureus* 015: ○ — гемолитическая активность при выращивании с аэрацией; △ — без аэрации; ● — рост бактерий с аэрацией; ▲ — без аэрации

рования бактерии и происходит в «бифазной манере». В отличие от *E. coli*, в экспоненциальной фазе роста клеток *S. aureus* наблюдается низкое количество токсина в среде, резко увеличивающееся в стационар-

зина. Инактивация этого регулятора вызывала блокирование синтеза не только α -гемолизина, но и других внеклеточных белков.

С целью дальнейшего изучения экспрессии α -гемолизина на уровне транскрипции Грей и Кехое [29] секвенировали участок клонированной детерминанты α -токсина из штамма *S. aureus* Wood 46 (рис. 4). Авторы показали, что ген α -токсина содержит ОРС длиной 1002 п.о., которая кончается кодоном терминации ТАА и содержит три кодона метионина ближе к 5'-концу. Вопрос о том, который из этих трех кодонов явля-

новном, на эритроцитах кролика, так как они примерно на 2 порядка чувствительнее к токсину, чем эритроциты человека, лошади и овцы (высокоочищенный α -токсин выявляет гемолитическую активность к эритроцитам кролика в количестве менее 0,1 мкг). Механизмы воздействия токсина изучались как на мембранах клеток различного происхождения, так и на искусственных мембранах. Телесман и Мосбил [68], исследуя кинетику воздействия меченого токсина на мембрану эмбриональных легочных фибробластов человека, показали, что α -токсин вызывает обра-

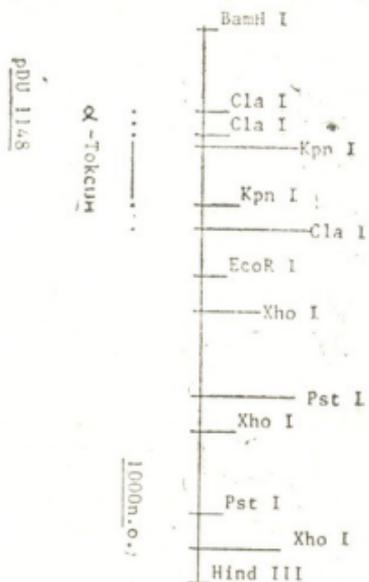


Рис. 4. Рестрикционная карта гена α -токсина штамма *S. aureus* Wood 46, клонированного в плазмиду pDU 1148

ется непосредственно инициаторным, остается нерешенным. На 5'-конце находится также нуклеотидная последовательность, имеющая сходство с сайтом прикрепления рибосом (участок Шаин-Дергано).

Если регуляция синтеза и секреции α -гемолизина по сравнению с α -гемолизинем *E. coli* менее изучена, то механизмы воздействия на клетки стафилококкового токсина исследованы глубже, чем токсина кишечной палочки. Фрейр и сотр. [21] показали, что летальная доза (LD_{50}) при внутривенном введении α -токсина для мышей составляет 1 мкг, а для кроликов 4 мкг. Гемолитическую активность α -токсина проверяли, в ос-

зование маленьких (диаметром 0,6—0,8 А) функциональных отверстий в цитоплазматической мембране. Проникновение через мембрану других агентов, таких как тритон-X100, мелиттин и стафилококковый β -лизин, не сопровождается такой активностью. Фрейр и сотр. [22] изучали взаимодействие α -токсина с изолированными рибосомами и мембранами эритроцитов. Они наблюдали появление большого количества маленьких (диаметром 10 нм) кольцевидных образований токсина, идентичных с мультимерной формой α -гемолизина, с коэффициентом седиментации 12 s, которая обычно присутствует в низ-

ких концентрациях вместе с мономерной формой токсина.

Изучение взаимодействия α -токсина с эритроцитами человека показало, что α -гемолизин лизирует клетки лишь при высоких концентрациях. Оказалось, что при низких концентрациях его присоединения с мембраной не происходит вообще. Эти же авторы показали, что воздействие на мембрану эритроцитов человека происходит во время образования гексамерной формы токсина. Интересно, что Бхакди и сотр. [5] выявили резкое повышение чувствительности эритроцитов человека к α -токсину при pH 5,0. К сожалению нет данных об исследовании структуры токсина при таком значении pH, но ясно одно, что при воспалительных процессах, во время которых значение pH несколько понижается, α -токсин *in vivo* проявит свою цитотоксическую активность локально, даже при низ-

во всех мембранных структурах и являющийся полоской № 3 при электрофорезе мембранных экстрактов. Инактивация этого гликопротеина антисывороткой предотвращала лизис некоторых клеток α -гемолизинном.

Интересное развитие получило исследование Кессиди и Харшмана [8], которые показали, что полоска № 3 эритроцитов человека теряет способность связывания α -токсина после ее обработки антисывороткой, полученной против полоски № 3 эритроцитов кролика. Бретчер [7] ранее показал, что полоска № 3 присутствует в эритроцитах человека гораздо в большем количестве, чем в эритроцитах кролика. Исходя из этих данных, эритроциты человека должны быть более чувствительны к α -гемолизину, чем эритроциты кролика, а не наоборот.

Как было сообщено ранее, наряду с α -гемолизинном, штаммы *S. aureus*

Таблица 1

Некоторые характеристики стафилококковых β -, γ - и δ -гемолизинов

Гемолизин	Количество субъединиц	Молекулярный вес (дальтон)	Изоэлектрическая точка pI	Коэффициент седиментации (S _{20,w})
β -гемолизин	1	29 000/4/	9,0/4/	1,7 /28/
γ -гемолизин	2	29 000/4/ 29 000/4/	9,8/53/ 5,0/47/	—
δ -гемолизин	1	2,977/18/	9,5/47/	—

ких концентрациях. Фрейр и сотр. сообщают также, что α -токсин способен проникать через разные искусственные липидные пленки. Авторы предполагают, что механизм проникновения через такие пленки основывается на гидрофобных взаимодействиях.

В литературе обсуждается вопрос о существовании специфического рецептора на мембране для связывания α -токсина. Исследователи многих лабораторий [8, 49] предполагают, что ганглиозиды, гликопорины и гликопротеины, входящие в структуру мембран, могут обеспечивать существование специфического рецептора. Махаран и сотр. [49] предположили, что специфическим рецептором для связывания α -токсина к мембране может служить минорный гликопротеин, присутствующий практически

продуцируют и β -, γ - и δ -токсины (табл. 1).

Одним из самых редких свойств β -гемолизина является его так называемый «Хот-Колд» эффект, который заключается в том, что при инкубации эритроцитов с β -токсином при 37°C лизис клеток не наблюдается. Достаточно охладить смесь до 10°C и происходит мгновенный гемолиз [63].

Градиентное элюирование γ -токсина с колонки гидроксиапатита выявило наличие двух субъединиц этого токсина — γ -1 и γ -2, которые по отдельности не представляли гемолитический токсин. Оказалось, что при процентном изменении соотношения двух субъединиц наблюдается, соответственно с пропорциями, γ -1 и γ -2 повышение гемолитической и понижение цитотоксической активности, или наоборот [32].

Уникальным свойством δ -токсина является термостабильность: во время инкубации при 90°C в течение 10 мин токсин теряет лишь 50% своей активности. По сравнению с α -токсинем гемолитическая активность δ -лизина немного ниже (0,5—1,0 мкг δ -токсина лизирует 80% эритроцитов), но спектр воздействия на клетки намного шире. Активность δ -токсина на клетки характеризуются отсутствием lag-фазы и соответственно быстротой реакции [41].

Некоторые патогенные штаммы грамположительных бактерий рода *S. ruogenes*, *B. cereus* продуцируют внеклеточные гемолизины, известные как токсины, которые активируются тиол-(SH)-окисляющими агентами. Такими агентами являются цистеин, 2-меркаптоэтанол, дитиотреитол и т. п. Активность этих токсинов ингибируется стеролом и частично холестеролом. Хотя М.м. и аминокислотный состав этих гемолизинов различны, они инактивируются в перекрестном тесте антисывороткой. Самым хорошо изученным из этих токсинов является стрептолизин О (СЛО), продуцируемый штаммами *S. ruogenes*. Как известно, этот штамм принадлежит к группе А стрептококков, которые являются причиной инфекционных заболеваний горла и ревматических явлений сердца. В опытах *in vitro* на мембранных системах активность СЛО проявляется в возникновении больших функциональных отверстий, которые способствуют выходу белков с большой М.м. из цитоплазмы. Молекулярный механизм разрушения мембранной структуры неизвестен. Кехое и сопр. [44] клонировали детерминанту СЛО *S. ruogenes* Richards в плазмиду с низким числом копий в клетке *E. coli*. Авторы показали, что клонированная в плазмиде рМК157 нуклеотидная последовательность размером 1800 п.о. кодирует токсин с М.м. 68 Кд. Соотношение М.м. токсина с размером его генетического детерминанта указывает на то, что один цистрон в состоянии кодировать активный СЛО.

Цереолизин, продуцируемый штаммами *B. cereus*, так же является гемолизином, который активируется тиол-окисляющими агентами. Креф и сопр. [46] клонировали генетическую детерминанту гемолизина *B. cereus* в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. Просветление вокруг клонов *E. coli* на чашках с кровяным агаром, как и в случае СЛО, наблюдалось лишь через 48—72 г. Выход токсина в окружающую среду, вероятно, происходит после автолиза клеток. Внеклеточная секреция цереолизина клонами *B. subtilis* не отличается от продукции токсина клетками дикого типа.

На основании вышесказанного можно заключить, что в исследовании бактериальных гемолизинов, которые являются широко распространенными внеклеточными белками большинства патогенных g^- и g^+ микроорганизмов, достигнуты значительные успехи. Применение новейших методов очистки белков позволило получить высокоочищенные препараты токсинов. Известны молекулярные структуры α - и δ -токсинов, а также локализация детерминант *hly* некоторых микроорганизмов. Знания в области биологического воздействия токсинов на ткани и мембранные системы недостаточны, хотя энзиматическая активность α -токсина изучена настолько, что механизм его биологического воздействия на ткани, возможно, будет расшифрован в ближайшем будущем. Малоизвестна также роль большинства гемолизинов в процессе инфекционных заболеваний, вызываемых этими патогенными штаммами. Определенные трудности в исследовании этих белков вызваны тем, что клонированные детерминанты гемолизинов как g^- , так и g^+ бактерии не секретируются в клетках *E. coli*. Возможность применения техники рекомбинантной ДНК к грамположительным бактериям вселяет надежду на скорейшее решение ряда проблем, связанных с исследованием бактериальных гемолизинов.



1. Abas-Ali B., Coleman G. *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 420-422, 1977.
2. Abas-Ali B., Coleman G. J. *Gen. Microbiol.*, 99, 277-282, 1977.
3. Berger H., Hacker J., Juarez A., Hughes C., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 152, 1241-1247, 1982.
4. Berncheimer A. W., Avigad L. S., Kim K. S. *Ann. N. Y. Sci.*, 236, 292-306, 1974.
5. Bhakdi S., Muhli M., Füssle R. *Infect. Immun.*, 46, 318-323, 1984.
6. Bjorklind A., Arvidson S. *FEMS Letts*, 7, 303-306, 1980.
7. Bretcher M. S. *Nature, New Biol.*, 236, 11-12, 1972.
8. Cassidi P., Six H. R., Harshman S. *Biochem.*, 15, 2348-2355, 1976.
9. Cavaliëri S. J., Snyder I. S. *Infect. Immun.*, 36, 455-461, 1982.
10. Chou P. Y., Fasman G. D. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 251-276, 1978.
11. Coleman G. *Bacterial Toxins*, Acad. Press, New York, 1984.
12. De la Cruz F., Müller D., Ortiz J. M., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 143, 825-833, 1980.
13. Ding J., Thai P. *Gene*, 33, 313-321, 1985.
14. Duncan J. L., Chou G. J. *Infect. Immun.*, 4, 456-461, 1971.
15. Fairweather N., Kennedy S., Foster T. J., Kehoe M., Dougan G. *Infect. Immun.*, 41, 1112-1117, 1983.
16. Felmler T., Pellett S., Lee E.-Y., Welch R. J. *Bacteriol.*, 163, 88-93, 1985.
17. Felmler T., Pellett S., Welch R. J. *Bacteriol.*, 163, 94-105, 1985.
18. Fitton J. E., Dell A., Shaw W. V. *FEBS Letts* 115, 209-212, 1980.
19. Forlani L., Berncheimer W. J. *Bacteriol.*, 106, 138-142, 1971.
20. Fraser T. H., Bruce B. J. *PNAS USA* 75, 5936-5940, 1978.
21. Freer J. H., Arbuthnott J. P. In *Mechanisms in Bacterial Toxinology* 169-193, New York, 1976.
22. Freer J. H., Arbuthnott J. P. *J. Gen. Microbiol.*, 75, 321-332, 1973.
23. Goebel W., Schremf H. J. *Bacteriol.*, 106, 311-317, 1971.
24. Goebel W., Hedgpeth J. J. *Bacteriol.*, 151, 1290-1298, 1982.
25. Goldberg S., Murphy J. J. *Bacteriol.*, 160, 239-244, 1984.
26. Gonzalez-Carrero M. I., Zabala J. C., de la Cruz F., Ortiz J. M. *MGG* 199, 106-110, 1985.
27. Good R. L., Baldwin J. N. *Appl. Environ. Microbiol.*, 28, 86-90, 1974.
28. Gow J. A., Robinson J. J. *Bacteriol.*, 97, 1026-1032, 1969.
29. Gray G. S., Kehoe M. *Infect. Immun.*, 46, 615-618, 1984.
30. Gribskow M., Devereux J., Burgess R. R. *Nucleic Acid Res.*, 12, 539-549, 1984.
31. Grojean H., Fiers W. *Gene* 18, 199-209, 1982.
32. Guyonett F., Prommet M. *Ann. Inst. Pasteur* 118, 19-33, 1970.
33. Hacker J., Knapp S., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 154, 1145-1152, 1983.
34. Hacker J., Hughes C., Hof H., Goebel W. *Infect. Immun.* 42, 57-63, 1983.
35. Ikemura T. *J. Mol. Biol.*, 151, 389-409, 1981.
36. Inoye S., Saberon X., Freceschin T., Nakamura K., Itacukuba K., Inoye M. *PNAS USA* 79, 3438-3441, 1982.
37. Jorgensen S. E., Shortly E. O., Kurtz J. H., Mussen A. V., Wu G. K. E. *J. Med. Microbiol.* 9, 173-189, 1976.
38. Yoschikawa M., Matsuda F., Naka M., Mirofushi E., Tsenematsu Y. *J. Bacteriol.*, 119, 117-122, 1974.
39. Juarez A., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 159, 1083-1085, 1984.
40. Juarez A., Hārthlein M., Goebel W. *Infect. Immun.*, 160, 161-168, 1984.
41. Kantor H. S., Temples B., Show W. V. *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 142-156, 1972.
42. Kato I., Watanabe M. *Toxicol.*, 18, 361-365, 1980.
43. Kehoe M., Duncan J., Fairweather N., Dougan G. *Infect. Immun.*, 41, 1105-1111, 1983.
44. Kehoe M., Timmis K. *Infect. Immun.*, 43, 804-810, 1984.
45. Kinsman O. S., Arbuthnott J. P. *J. Med. Microbiol.*, 13, 281-290, 1980.
46. Krefl J., Berger H., Hārthlein H., Müller B., Weidinger G., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 155, 681-689, 1983.
47. Kreger A. S., Kim K. S., Zaboretzky F., Berncheimer A. W. *Infect. Immun.*, 3, 449-465, 1971.
48. Kyte J., Dulittle R. F. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132, 1972.
49. Macharay I., Facrell H. B. *Can. J. Microbiol.*, 26, 524-531, 1980.
50. Maning P. A., Brown M. H., Heuzenreuder M.-V. *Gene* 31, 225-231, 1984.

51. Mechow S. Vaida A. B., Brumucci M. G. J. *Bacteriol.*, 163, 799—802, 1985.
52. Minshew B. H., Jorgensen J. Counts G. W., Falkow S. *Infect. Immun.*, 20, 50—54, 1978.
53. Mölby R., Wadström T. *Infect. Immun.*, 3, 633—635, 1971.
54. Nicoud J.—M., Mackman N., Holland I. B. *MGG* 199, 111—116, 1985.
55. Noegel A., Rdest U., Springer W., Goebel W. *MGG* 175, 343—350, 1978.
56. Noegel A., Rdest U., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 145, 233—247, 1981.
57. Omura S. *Bact. Rev.*, 40, 681—697, 1976.
58. O'Railly M., Avazedo J. C. S., Kennedy S., Foster T. J. *Microb. Pathol.*, 1, 125—138, 1986.
59. Palmiter R. D., Gagnon J., Walsh K. A. *PNAS USA*, 75, 94—98, 1978.
60. Phimister G. M., Freer J. H. J. *Med Microbiol.*, 18, 197—204, 1984.
61. Scott D. E., Silhavy T. J. *J. Cell. Biol.*, 95, 689—696, 1982.
62. Six H., Harshman S. *Biochem.*, 12, 2677—2683, 1973.
63. Smith C. J., Mölby R., Wadström T. *Infect. Immun.*, 12, 1104—1111, 1975.
64. Smith H. W. J. *Phathol. Bacteriol.*, 85, 197—207, 1963.
65. Springer W., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 144, 53—59, 1980.
66. Stark J. M., Shuster C. W. *Bacteriol.*, 152, 863—867, 1982.
67. Tanigushi H., Ohta H., Ogawa M., Mizugushi Y. J. *Bacteriol.*, 162, 510—515, 1985.
68. Thelestam M., Mölby R. *Infect. Immun.*, 11, 640—648, 1975.
69. Wagner W., Vogel M., Goebel W. J. *Bacteriol.*, 154, 200—210, 1983.
70. Watanabe M., Kato I. J. *Exp. Med.*, 44, 165—178, 1974.
71. Weil L., James S., Bucher A. R. *Arch. Bioch. Biophys.*, 34, 1—12, 1951.
72. Welch R. A., Hull R., Falkow S. *Infect. Immun.*, 42, 178—186, 1983.
73. Zabala J. C., de la Cruz F., Ortiz J. M. *MGG* 197, 90—97, 1984.

ბაქტერიული ჰემოლიზინები

დ. მუშველიანი, რ. ადამია, რ. ვაშაკიძე, ნ. მამულაშვილი, თ. ჭანიშვილი

სსრკ სამედიცინო და ბიოლოგიური მრეწველობის სამინისტროს თბილისის ვაქცინებისა და შრატების სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტი, თბილისი საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოფიზიკის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

მიმოხილვაში განხილულია, როგორც გრამ-უარყოფითი *E. coli*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, ასევე გრამ-დადებითი ბაქტერიების — შტამების *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. cereus* — ჰემოლიზინების ბიოლოგიური თვისებები. მოცემულია რი-

გი ჰემოლიზინების ლოკუსის სტრუქტურა. აღწერილია ჰემოლიზინების ზემოქმედება ერთოროციტების მემბრანაზე და სხვადასხვა ქსოვილების და ორგანოების უჯრედებზე.

BACTERIAL HEMOLYSINS

D. K. MESHVELIANI, R. S. ADAMIA, R. P. WASHAKIDZE, N. A. MAMULASHVILI
T. G. CHANISHVILI

Institute of Vaccines and Sera, USSR Ministry of Medical and Biological Industry, Tbilisi, USSR
Institute of Molecular Biology and Biophysics, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The review describes biological properties and characteristics of some hemolysin genes as g^- strains from *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. cereus*, as well g^- strains from *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*.

Some results of expression and secretion of α -hemolysin of *S. aureus* and *E. coli* are provided.

The effect of α -hemolysin on erythrocyte membrane and cells from different tissue and organs is also described.

УДК: 616.24 — 002.3 : 576.8.007.3

ИММУНОЛОГИЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЦЕЛЯХ ОЦЕНКИ КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ НАГНОИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

И. И. Тимошук

*НИИ экспериментальной и клинической хирургии им. акад. К. Д. Эристави
МЗ ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 13.10.1986

У больных при хронических нагноительных заболеваниях легких, в сравнении с группой здоровых доноров, регистрируется значительная инверсия основных параметров, ответственных за состояние естественной резистентности, клеточного и гуморального иммунитета, свидетельствующая о существенном изменении режима их работы. Показателем стойкого выздоровления больных при хронических нагноительных заболеваниях легких служит положительная динамика изменений определенного комплекса иммунологических параметров. Достоверность прогноза возрастает при одновременном исследовании периферической крови — плеврального экссудата и периферической крови — бронхиального секрета.

Хронические нагноительные заболевания легких (ХНЗЛ) — одна из наиболее сложных и интересных проблем современной пульмонологии. Высокая поражаемость лиц активного трудового возраста обуславливает остроту вопроса реабилитации подобных больных, т. е. достижение стабилизации процесса, облегчение состояния больных и продление их жизни, повышение и восстановление

трудоспособности [4, 8]. В связи со сказанным поиск надежных, адекватных этиологии и патогенезу, критериев оценки состояния больных является безусловно актуальным [2, 7]. С учетом роли защитных сил организма в развитии, формировании и течении ХНЗЛ наиболее перспективными являются иммунологические методы исследования [3].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из мокроты 110 больных ХНЗЛ высевалась культура стафилококка, в 54,5% случаев чувствительная к стафилококковому бактериофагу.

В зависимости от характера лечения больные были распределены по следующим группам: I группа — 25 пациентов — получала только антибиотики; 50 больным II группы было проведено лечение априогенным интравенозным стафилококковым бактериофагом производства Тбилисского НИИ вакцин и сывороток МЗ

СССР; больным III группы проводилось комбинированное лечение стафилококковым бактериофагом, антибиотиками и стафилококковым анатоксином; больным IV группы — 19 человек — было проведено хирургическое лечение.

Контрольную группу составили 100 здоровых доноров.

У больных и доноров определяли: комплементарную, лизоцимную, бактерицидную активность биологических жидкостей; фагоцитарную ак-

тивность нейтрофилов, бактерицидную активность кожи, концентрацию иммуноглобулинов классов М, G и А, а также и секреторного IgA; относительное и абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность; число лимфоцитов с рецепторами для стафилококкового антигена; титр антистафилококковых, антистафилококковых, антистафилококковых, антистафилококковых антител, а также титр антифаговых антител. Во всех случаях пользовались классическими вариантами реакций.

Материалом для исследования служили периферическая кровь, плевральный экссудат и бронхиальный секрет. Концентрацию иммуноглобулинов в плевральном экссудате и в бронхиальном секрете стандартизировали по уровню белка [6].

Больных обследовали до, на 7, 14 и 21-й день лечения, доноров — однократно. Всего обследовано 210 лиц, поставлено 10 054 реакции. Полученный цифровой материал обработан методами математического анализа [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных при ХНЗЛ (табл. 1) регистрировалось снижение бактерицидных свойств сыворотки и кожи (увеличение оптической плотности

иммуноглобулинов за счет классов М, G и А.

Наиболее стабильной оказалась система комплемента в сыворотке, по-

Таблица 1

Некоторые показатели естественной резистентности и гуморального иммунитета у больных при хронических нагноительных заболеваниях легких

Иммунологические параметры	Больные, n=110		Доноры, n=100	
	M±m	Z	M±m	Z
КАС	0,038±0,0016	0,021—0,054	0,035±0,0015	0,02—0,05
ЛАС, %	48,5 ±1,2*	35,9 —61,1	27,5 ±0,75	20,0 —35,0
БАС, %	чаще снижена		74,0 ±0,9	65,0 —83,0
БАК	чаще снижена		50,0 ±1,25	37,5 —62,5
Аутомикрофлора кожи предплечья	чаще снижена		50,0 ±1,25	37,5 —62,5
ФАН	чаще снижена		50,0 ±1,25	37,5 —62,5
АФП погл. (тыс.)	7,538±0,2*	5, 4—9, 6	18,0 ±0,3	15,0 —21,0
ПНФ, %	21,5 ±1,5*	5, 8—37,2	3,4 ±0,12	2,2 —4, 6
Иммуноглобулины, г/л класса М	1,5 ±0,06*	0,87—2, 13	1,1 ±0,02	0,9 —1, 3
класса G	12,3 ±0,26	9,57—14,73	12,0 ±0,13	10,7 —13,3
класса А	2,4 ±0,07	1,67—3,13	2,25 ±0,06	1,65 —2, 85
Sig A	0,76 ±0,05*	0,24—1,28	0,116±0,002	0,096—0, 136

Примечание: * — достоверность различий показателей у больных и здоровых доноров <0,05

питательной среды после добавления сыворотки, а также увеличение числа колоний аутомикрофлоры и накопление патогенных штаммов, снижение бактерицидного индекса кожи), фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови как за счет поглощательной, так и переваривающей способности. Одновременно отмечалось повышение лизоцимной активности сыворотки и общей концентрации

казатель которой, хотя и колебался у больных, но не выходил за пределы нормы. У больных отмечалось также снижение активности Т-системы иммунитета, выражением которого может служить не только существенное уменьшение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов в единице объема периферической крови, но и угнетение их функции, например антителозависимой клеточ-

но-опосредованной цитотоксичности (табл. 2). Одновременно у больных также регистрировалось достоверное увеличение относительного и абсолютного содержания М-розеткообразующих клеток, активно продуцирую-

Интенсивность изменений исследуемых параметров с продолжительностью заболевания нарастала и достигала максимума при продолжительности свыше 10 лет. Интенсивность отклонений показателей выражалась

Таблица 2

Некоторые показатели клеточного иммунитета у больных при хронических нагноительных заболеваниях легких и доноров

Параметры	Больные, n=110		Доноры, n=100	
	M±m	Z	M±m	Z
Относит. сод. лимфоц., %	23,0 ± 0,7	16,0 — 30,0	24,0 ± 0,27	21,3 — 26,7
Абсолют. сод. лимфоц., тыс.	1,66 ± 0,07	0,93 — 2,39	1,69 ± 0,08	0,89 — 2,49
Относит. сод. Е-РОК., %	47,0 ± 1,1*	35,6 — 58,4	56,0 ± 2,8	28,0 — 84,0
Абсолют. сод. Е-РОК., тыс.	0,78 ± 0,035*	0,42 — 1,14	0,96 ± 0,026	0,7 — 1,22
Относит. сод. М-РОК., %	17,0 ± 0,9	7,6 — 26,4	14,0 ± 0,8	6,0 — 22,0
Абсолют. сод. М-РОК., тыс.	0,28 ± 0,011	0,17 — 0,39	0,24 ± 0,012	0,12 — 0,36
АЗКЦ (ЦИ, %)	17,5 ± 1,2	5,0 — 30,0	31,6 ± 1,8	13,6 — 49,6

Примечание: * — достоверность различий показателей у больных и здоровых доноров < 0,05

щих иммуноглобулины всех определяемых классов (сывороточных IgM, IgG, IgA и секреторного IgA).

У обследованных нами больных титры антистафилококковых антител, как антитоксических, так и антибактериальных, практически не отличаются от таковых здоровых доноров. У больных (в сравнении с нормой) регистрировалось также существенное падение относительного содержания в периферической крови лимфоцитов с рецепторами для стафилококкового антигена (табл. 3).

не только в росте их абсолютных значений, но и в частоте регистрации подобных случаев. С продолжительностью заболевания нарастала и степень сенсibilизации организма больных и проницаемость стенок сосудов в очаге поражения, что подчеркивается значительным повышением концентрации IgG и секреторного IgA в сыворотке.

На фоне лечения показатели почти всех исследуемых параметров в сравнении с исходными претерпевали более или менее существенные измене-

Таблица 3

Некоторые показатели противостафилококкового иммунитета у больных при хронических нагноительных заболеваниях легких и здоровых доноров

Параметры	Больные, n=110		Доноры, n=30	
	M±m	±S	M±m	±S
Титр антистафилококковых антитоксических антител	1 АЕ	—	1 АЕ	—
Титр антистафилококковых антибактериальных антител	1:20	—	1:20	—
Число лимфоцитов с рецепторами для стафилококкового антигена	18,3 ± 1,1*	11,4	29,7 ± 1,8	9,8

Примечание: * — достоверность различий показателей у больных и здоровых доноров < 0,05

ния. Причем наиболее подвижными оказались системы комплемента и лизоцима в сыворотке, макрофагальная система в периферической крови, Т- и В-системы иммунитета, что свидетельствует об их больших компенсаторных возможностях. Наименее оперативными были такие механизмы как бактерицидная активность сыворотки и кожи. В наших случаях лишь у некоторых больных на 21-й день комбинированной терапии и хирургического вмешательства намечалась тенденция к восстановлению бактерицидных свойств сыворотки и кожи (недостовверное снижение оптической плотности питательной среды после добавления сыворотки, уменьшение общего числа колоний аутомикрофлоры кожи предплечья и относительного количества патогенных штаммов).

При анализе индивидуальных иммунологических и клинических показателей на 7, 14 и 21-й день лечения обращает на себя внимание тот факт, что для оценки результатов лечения и степени активности воспалительного процесса в бронхолегочной ткани существенно не абсолютное значение показателя того или иного парамет-

Таблица 4

Характер динамики изменений показателей комплекса иммунологических параметров и повторная обращаемость больных при ХНЗЛ на фоне лечения

Исход заболевания	Положительная динамика	Отсутствие динамики	Отрицательная динамика
Выздоровление	23/1	31/11	3/3
Улучшение	10/3	21/12	7/5
Без изменений	—/—	4/4	5/5
Ухудшение	—/—	—/—	6/6

ра, а характер динамики его изменений, отражающий надо полагать, тенденции развития патологического процесса. Существенным является характер динамики изменений показателя не одного какого-либо иммунологического параметра, а комплекса параметров.

Так, в наших случаях стойкое выздоровление имело место лишь при положительной динамике изменений

показателей комплекса параметров, ответственных за естественную реактивность организма и специфическую реакцию. Причем наиболее показательны в этом плане такие параметры, как лизоцимная активность сыворотки, поглотительная и переваривающая функции нейтрофилов периферической крови, концентрация IgG и секреторного IgA, титр антистафилококковых антител, относительное количество лимфоцитов с рецепторами для стафилококкового антигена и антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность. При отрицательном характере динамики изменений показателей комплекса иммунологических параметров, либо при ее отсутствии имела место более или менее длительная ремиссия (табл. 4).

Сравнительный межгрупповой анализ изменений показателей иммунологических параметров с учетом клинического состояния больных и повторной их обращаемости свидетельствует о высокой эффективности хирургического метода лечения при ХНЗЛ; в этой группе регистрируется максимальное число ($58,0 \pm 10,0\%$) больных со стойким выздоровлением и наименьшее число повторных обращений. Надо полагать, что хирургическое удаление мощного воспалительно-деструктивного очага уже само по себе приводит к очищению организма от продуктов тканевого распада и микробных метаболитов, оказывающих супрессорный эффект на иммунную систему организма [1]. Достаточно высока эффективность комбинированной терапии, включающей антибиотики, стафилококковые бактериофаги и анатоксин. Видимо, в условиях продукции антифаговых антител стафилококковый анатоксин играет роль дополнительного стимулятора иммунной системы организма. Наименее эффективным является антибиотикотерапия. В этой группе — наименьший процент истинного выздоровления больных и наибольшее число повторных обращений.

В соответствии с данными литературы, титр антифаговых антител в клинических условиях обычно не определяли. Известно, что парентеральное введение бактериофага, обладающего корпускулярным строением, приводит к образованию антител,

нейтрализующих его литическую активность. В связи со сказанным в клинике априорно применяли единую схему лечения бактериофагом. В этих случаях бактериофаг назначали в течение нескольких дней, что существенно ограничивало возможности бактериофаготерапии. Однако результаты наших исследований позволили показать, что кинетика (сроки, продолжительность, высота) антителогенеза на внутривенное введение фага зависит от индивидуальных особенностей организма, что может служить основанием для подбора схем лечения в каждом конкретном случае. При этом следует учитывать не только титр антифаговых антител, но и процент инактивации фага: дозу фага следует увеличить в случаях, когда разведение сыворотки приводит к достоверному снижению константы скорости нейтрализации и процента инактивации; фаг следует исключить из схемы лечения, когда разведение сыворотки практически не отражается ни на константе скорости нейтрализации, ни на степени инактивации.

Антифаговые антитела определялись не только в сыворотке, но и в плевральном экссудате. Причем на фоне внутривенных инфузий в сыворотке антифаговые антитела регистрировались раньше и дольше и титр их был значительно выше, чем в плевральном экссудате (рис. 1). В сыворотке антифаговые антитела обнаруживались уже на 2—5 сутки, а их максимальная концентрация на 7—25 сутки при продолжительности от 3 до 1,5—2 месяцев (рис. 2).

В плевральном экссудате, формирующемся после хирургического вмешательства, были выявлены все исследуемые защитные свойства. Так, экссудат содержит комплемент и лизоцим; нейтрофильные клетки экссудата способны к активному поглощению и перевариванию микробных тел, а лимфоциты — к спонтанному розеткообразованию с эритроцитами барана и мыши, к антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, к розеткообразованию со стафилококковым антигеном. В экссудате содержатся и сывороточные иммуноглобулины классов М, G, А и секреторный IgA. Однако активность указанных систем в экссудате на

следующие после операции сутки несколько ниже, чем в сыворотке крови. Исключение составляет стафилолизосима, активность которой в экссудате к моменту формирования выше таковой сыворотки крови.

В ближайшем постоперационном периоде активность исследуемых защитных систем в экссудате изменяется. Характер изменений показателей исследуемых иммунологических параметров в экссудате коррелирует с особенностями клинического течения основного заболевания. Причем в экссудате также, как и в сыворотке крови, наиболее информативным яв-

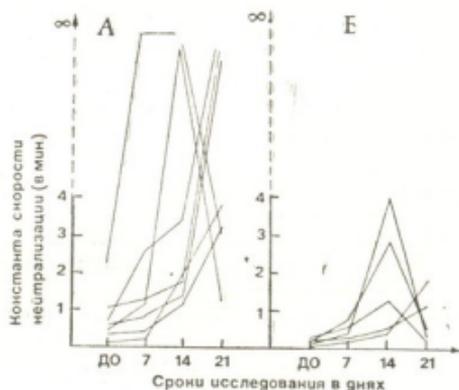


Рис. 1. Динамика накопления антифаговых антител в сыворотке (А) и в плевральном экссудате (Б) на фоне в/в инфузий стафилококкового бактериофага

ляется характер динамики изменений показателя не одного какого-либо параметра, а комплекса параметров. Так, благоприятным прогностическим критерием в свете гнойных плевральных осложнений следует считать восстановление активности системы комплемента, повышение концентрации Slg A, снижение уровня общего белка и общей концентрации иммуноглобулинов, а также существенное нарастание титров антистафилококковых антител.

У больных при ХНЗЛ в бронхиальном секрете имеет место ослабление местных и подключение общих компенсаторных механизмов, о чем свидетельствует снижение концентрации секреторного IgA, а также сывороточного IgA и IgM. Отмечается также повышение концентрации IgG. На

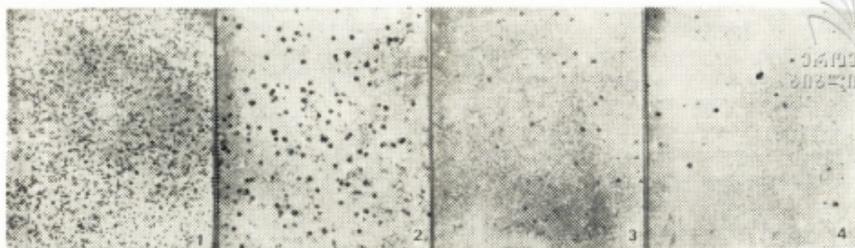


Рис. 2. Данные реакции нейтрализации литической активности фага (сыворотка) на фоне в/в инфузий стафилококкового бактериофага

фоне лечения в бронхиальном секрете регистрируется повышение уровня секреторного и сывороточного IgA, снижение концентрации IgG.

Подводя итог проделанной работе,

следует отметить высокую информативность комплексного иммунологического подхода к вопросу оценки коррекции патологии при ХНЗЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоцкий С. М., Снастина Т. Н. Иммунология, 2, 14—21, 1985.
2. Губергриц А. Я., Сохин А. А., Моногарова Н. Е., Курилова В. Г. Тер. арх., 3, 55—58, 1985.
3. Жуков М. Д., Тен Ю. В., Гейн В. В., Быкодарова Т. Н., Захарова Г. Т. Грудная хирургия, 3, 62—65, 1984.
4. Клячкин Л. М., Зорина С. А., Ивановский Г. И., Савинов В. А. Тер. арх. 3, 34—36, 1985.
5. Макаров П. О. Практикум по физиологии и биофизике органов чувств-анализаторов, М., «Высшая школа», 1973.
6. Першин Б. Б. Вакцинация и местный иммунитет, «Медицина», Л., 1980.
7. Сильвестров В. П., Караулов А. В., Марциновский В. Ю., Ляков В. Ф. Тер. арх., 1, 70—75, 1985.
8. Чучалин А. С., Копылев И. Д., Даниляк И. Г., Дидковский Н. А. Клин. мед., 2, 11—14, 1982.

იმუნოლოგიური მახვილობების გამოყენება ფილტვის ქრონიკული ჩირქოვანი დაავადებების კორექციის უმჯობესი მიზნით

ი. ტიმოფევი

საქართველოს სსრ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს ჯ. ერისთავის სახელობის ექსპერიმენტული და კლინიკური ქირურგიის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

ფილტვის ქრონიკული ჩირქოვანი დაავადებების დროს ავადმყოფებს აღნიშნებათ ორგანიზმის ბუნებრივი რეზისტენტობის, უჭრედული და ჰუმორული იმუნიტეტის ძირითადი პარამეტრების ინვერსია, რაც მიუთითებს ამ პარამეტრების მუშაობის რეჟიმის მნიშვნელოვან ცვლაზე.

ფილტვის ქრონიკული ჩირქოვანი და-

ვადებებით დაავადებულთა გამოჯანმრთელების მახვენებელია ზოგიერთი იმუნოლოგიური პარამეტრების ცვლილებების დადებითი დინამიკა.

პროგნოზის სარწმუნოება იზრდება პერიფერიული სისხლის — პლევრალური ექსუდატისა და პერიფერიული სისხლის — ბრონქიალური სეკრეტის ერთდროული გამოკვლევის დროს.

THE USE OF IMMUNOLOGIC INDICES FOR PATHOLOGY CORRECTI-
ON EVALUATION IN CHRONIC SUPPURATIVE LUNG DISEASES



I. I. TIMOSHCHUK

K. D. Eristavi Institute of Experimental and Clinical Surgery, Georgian Ministry
of Health, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Significant inversion of the basic parameters responsible for the state of natural resistance, cellular and humoral immunity testifying to the virtual change of regimen of their work was occurred in the patients with chronic suppurative pulmonary diseases, compared to healthy subjects.

The value of stable recovery of the patients with chronic diseases of the lungs serves as positive dynamics of changes of certain immunologic parameters. The reliability of prognosis increased with simultaneous study of peripheral blood-pleural exudate and peripheral blood-bronchial secretion.

УДК 577.391.54

РАДИОБИОЛОГИЯ

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОБЛУЧЕННОГО БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И РАДИОЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ МЕКСАМИНА

К. Ш. Надарейшвили, А. Р. Егизарова, Т. В. Санаа

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

Поступила в редакцию 26.02.1987

Методом микрокалориметрии исследованы изменения термодинамических свойств молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) при воздействии X-лучей в дозах 4—200 Гр. Обнаружено, что энтальпия, энтропия и удельная теплоемкость уменьшаются после облучения, а максимальная температура плавления при расширении температурного интервала денатурационного перехода остается величиной постоянной. Радиопротектор мексамин, введенный в концентрации 0,01 М в буферный раствор БСА до облучения, значительно снижает денатурирующее влияние радиации.

В литературе имеется обширный материал по исследованию влияния радиации на белки. В подавляющем большинстве случаев объектом исследования в этих работах являлись ферменты (РНКаза, каталаза, лизоцим, АТФаза и т. д.). Выбор их в качестве объекта исследования объясняется не только важной ролью ферментов в жизнедеятельности, но и возможностью однозначного определения степени радиационного поражения молекул по изменению ферментативной активности. Однако, наряду с ферментами, не менее важно исследовать действие радиации на белки, не обладающие каталитической активностью, так как многие из них принимают активное участие в ключевых процессах, протекающих в живом организме. Влияние ионизирующей радиации на физико-химические свойства белков широко и многопланово исследуется методами спектроскопии, электрофореза, седиментации и т. д. [3]. В меньшей степени исследовались особенности действия радиации на термодинамические параметры белков. Между тем такого рода исследования могут по-

зволить определить характер конформационных превращений, механизм стабилизации структуры макромолекул, величину поглощенной энергии, гомогенность раствора белка и т. д.

К одной из важных групп белков относятся белки сыворотки крови: альбумины и глобулины. Альбумины, например, определяют осмотический гомеостаз, осуществляют транспорт ряда нутритивных и регуляторных соединений к органам и тканям, удаляют из них некоторые метаболиты, участвуют в метаболизме липидов и во многих других процессах. Информацию о характере влияния радиации на тепловые свойства альбуминов может дать метод микрокалориметрии. С помощью термограмм, полученных до и после воздействия радиации, можно определить изменения термодинамических параметров белков, гомогенность исследуемого объекта, зафиксировать появление олигомеров различных порядков и т. д. В доступной литературе практически нет сведений о термодинамических свойствах облученных белков и влиянии радиозащитных веществ на эти свойства. С помощью мономоле-

кулярной техники ранее было показано, что свободная энергия и энтропия сжатия монослоя сывороточного альбумина человека (САЧ) при воздействии радиации уменьшаются по сравнению с этими же величинами необлученного белка [1]. Этот эффект объяснялся образованием внутримолекулярных связей. В связи с этим определенный интерес представляет исследование влияния радиа-

ции на термодинамические свойства белков не в состоянии монослоя, но да их подвижность ограничена степенями свободы, а в растворе, где такого ограничения нет.

Учитывая изложенное, мы задались целью изучить влияние радиации и радиопротектора мексамина на термодинамические параметры макромолекул БСА микрокалориметрическим методом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использован БСА фирмы Sigma (США), растворенный либо в бидистилляте (рН 5,5—5,6), либо в калий-фосфатном буфере (рН 7,0—7,1, 1/15 М, $\mu=0,4$). Измерения термодинамических параметров велись на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре типа ДАСМ-4 (СССР). Чувствительность калориметра — 20 мВ/см, скорость прогрева — 1°C/мин, точность измерения температуры — 0,1°C. По данным термограмм определялись: энтальпия (калориметрическая) — $\Delta H^{кал}$, изменение удельной теплоемкости — $\Delta C_{рм}$, срединная или максимальная температура плавления — T_m , ширина температурного интервала — $\Delta T^{1/2}$, величина обратная остроте денатурационного перехода [6]:

$$\Delta T^{1/2} = 4R(T_m)^2 / \Delta H^{кал}, \quad (1)$$

где R — универсальная газовая постоянная. Эффективная энтальпия вычислялась по формуле [4]:

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Термодинамические параметры необлученного БСА, растворенного в калий-фосфатном буфере и в бидистилляте даны в табл. 1. Значения $\Delta H^{кал}$ и T_m для БСА в буфере равны 190 ккал/моль и 61°C соответственно, что находится в хорошем согласии с данными других авторов [4, 8, 9]. Величина $\Delta H^{эфф}$ меньше, чем $\Delta H^{кал}$, температурный интервал $\Delta T^{1/2}$ достаточно узкий (8,7°C), следовательно можно предположить, что раствор БСА в буфере гомогенен и процесс плавления кооперативный. Иная картина наблюдается для белка, раство-

$$\Delta H^{эфф} = 4R(T_m)^2 \cdot \Delta C_{рм} / \Delta H^{кал} \quad (2)$$

Как известно, $\Delta H^{эфф}$ служит мерой кооперативности процессов плавления. Если $\Delta H^{эфф}$ не сильно отличается от $\Delta H^{кал}$, то допускается, что система гомогенная и процесс плавления кооперативный. В этом случае, как правило, ширина температурного перехода $\Delta T^{1/2}$ достаточно узкая.

Облучение БСА осуществлялось с помощью двух спаренных рентгеновских аппаратов типа РУМ-17 при условиях: 15 мА, 200 кВ, фильтры — 0,5 мм Cu+1 мм Al. При выборе концентрации раствора БСА мы исходили из литературных данных: в различных работах она изменялась от 1,5 [4] до 200 мг/мл [9]. В условиях нашего эксперимента концентрация БСА ниже 5 мг/мл не давала достаточно четких пиков на термограмме, поэтому была выбрана концентрация 5 мг/мл — как наиболее оптимальная.

реинного в воде. Значения термодинамических параметров значительно меньше, чем у БСА в буфере: энтальпия на 45%, удельная теплоемкость на 104%, энтропия на 33%. Острота пика теплового перехода становится при этом более размытой ($\Delta T^{1/2}$ 18,6°C), то есть температурный интервал уширяется более чем в два раза. Наблюдаемая разница в термодинамических величинах для БСА, растворенного в бидистилляте и буфере, возможно вызвана близостью рН воды (5,5) к рН изоточки БСА (4,8), то есть к области, в которой

могут иметь место агрегация молекул. В результате, в водном растворе БСА наряду с мономерами, могут появиться белки с более высокими значениями молекулярных весов чем мономеры.

В табл. 2 даны результаты микрокалориметрического исследования воздейст-

молекул, степень ее упорядочива-
сти, а также может привести к упорядочиванию шивок между молекулами. Эти процессы протекают тем интенсивнее, чем выше доза радиации. В одной из наших работ [5] было показано, что раствор миозина при воздействии радиации в дозе 1000 Гр

Таблица 1
Термодинамические параметры необлученного БСА

Исследуемый параметр	БСА в буфере pH 7,1	БСА в дистилляте pH 5,5	% изменений
ΔH , ккал/моль	$190 \pm 7,5$	$127,0 \pm 4,9$	- 45; $p < 0,001$
$\Delta H^{эф}$, ккал/моль	$79,3 \pm 4,6$	$56,0 \pm 1,0$	- 41; $p < 0,001$
$\Delta C_{p,m}$, ккал/мольград	$16,8 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,7$	- 104; $p < 0,001$
ΔS , ккал/мольград	$0,57 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$	- 33; $p < 0,001$
T_m , °C	$61,1 \pm 0,2$	$59,3 \pm 0,6$	- 3; $p < 0,01$
$\Delta T^{1/2}$, °C	$8,7 \pm 0,1$	$18,6 \pm 1,8$	+ 121; $p < 0,001$

- уменьшение, + увеличение по отношению к контролю

вия радиации на молекулы БСА, растворенного в буфере. С ростом дозы радиации от 4 до 200 Гр значения энтальпии (калориметрической) уменьшаются на 4 и 20% соответственно. Достоверное уменьшение $\Delta H^{кал}$ наблюдалось, начиная с дозы 40 Гр. Наиболее чувствительным из исследованных нами параметров оказалась удельная теплоемкость. Достоверный эффект облучения в отношении $\Delta C_{p,m}$ был зафиксирован при дозе 40 Гр (-20%), а максимальное уменьшение происходило при 200 Гр (-25%). В этих исследованиях, как и в предыдущих (табл. 1), $\Delta H^{эф}$ меньше $\Delta H^{кал}$, а $\Delta T^{1/2}$ возрастает при всех использованных дозах—в среднем на 16% ($p < 0,05$).

Основная часть энергии, поглощаемая молекулой при денатурации, по видимому, затрачивается на разрыв водородных связей между боковыми группами полипептидной цепи молекулы [6]. Эти связи порядка 2—9 ккал/моль, что 10—12 раз слабее ковалентных связей, стабилизирующих первичную структуру молекулы. Разрушение некоторой доли водородных связей может привести к появлению новых реакционных групп в молекулах. Взаимодействие последних изменяет нативную конформацию

переходит в гель. Мы предполагаем, что наблюдаемые в наших опытах изменения термодинамических свойств БСА являются следствием появления молекул белка различной конформации и молекулярных весов (димеров, тримеров), вследствие чего исходный гомогенный раствор переходит в гетерогенный.

При введении в раствор БСА мексамина в концентрации 0,01 М до его облучения наблюдается четкий защитный эффект, тогда как сам мексамин без облучения не влияет на термодинамические параметры исследуемого белка. Так например, если энтальпия $\Delta H^{кал}$ БСА, облученного в дозах 80—200 Гр, была меньше необлученного на 18—20%, то в присутствии мексамина эта разница становилась незначительной и равной 1—3%. Значение же $\Delta T^{1/2}$ полностью восстанавливалось: для необлученного и облученного в дозах 200 Гр, для БСА+0,01 М мексамина эта величина равнялась 8,7°C. При концентрациях меньших, чем 0,01 М защитный эффект мексамина был менее выраженным.

На основании результатов данной работы трудно определить по какому именно механизму действует радиопротектор мексамин, сохраняя термо-



Влияние радиации на термодинамические параметры БСА

Доза, Гр	$\Delta H^{кол}$ ккал/моль	$\Delta H^{кол}$ % изменений		$\Delta C_{p, кол}$ ккал/мольград	$\Delta C_{p, кол}$ % изменений		$\Delta T^{1/2}$ °C	$\Delta T^{1/2}$ % изменений		$\Delta H^{фр}$ ккал/моль	$\Delta H^{фр}$ % изменений	
		без мексамина	с мексамином		без мексамина	с мексамином		без мексамина	с мексамином		без мексамина	с мексамином
4	182,2 ± 5,3	-4 p > 0,1	—	14,97 ± 0,22	-6 p > 0,1	—	9,23 ± 0,30	+8 p < 0,1	—	73,41 ± 0,03	-14 p < 0,001	—
40	179,2 ± 3,0	8 p < 0,05	—	13,22 ± 0,83	-20 p < 0,01	—	10,22 ± 0,23	+15 p < 0,001	—	65,86 ± 0,06	-13 p < 0,001	—
80	169,4 ± 5,4	-16 p < 0,05	-3 p < 0,1	13,86 ± 0,76	-22 p < 0,01	-5 p < 0,01	10,28 ± 0,64	+20 p < 0,05	+3 p > 0,1	73,02 ± 0,06	-7 p < 0,001	-3 p < 0,05
200	152,0 ± 3,6	-23 p < 0,05	-13 p < 0,05	12,50 ± 0,39	-25 p < 0,001	-17 p < 0,1	10,03 ± 0,33	+16 p < 0,1	+11 p > 0,1	75,74 ± 0,06	-3 p < 0,001	-2 p < 0,05

% изменения по отношению к контролю: неолучивший БСА; мексамин в концентрации 0,01 М

динамические свойства альбумина при воздействии радиации. Существует ряд гипотез о механизмах противолучевой защиты [2, 7]. Мы оценили соотношение числа молекул белка и мексамина, зная количество и концентрацию этих веществ, использованных в опытах. На одну молекулу БСА приходится приблизительно 130 молекул мексамина. Вероятно, это количество протектора достаточно как для инактивации свободных радикалов молекул воды, возникающих в процессе облучения, так и для адсорбции протектора на самой молекуле белка; оно скрепляет ее структуру, препятствуя тем самым конформационным изменениям, согласно адсорбционной гипотезе Эйдуса [7]. Кроме того, часть энергии поглощается молекулами самого мексамина.

Таким образом, в работе показано,

что при облучении БСА, растворенного в калий-фосфатном буфере, наблюдается достоверное ³⁷увеличение его термодинамических параметров и уширение температурного интервала плавления — вследствие конформационных изменений в молекуле белка, а при высоких дозах — появление, наряду с мономерами, молекул с более высокими значениями молекулярных весов. Постоянство величины максимальной температуры плавления T_m при всех использованных в опытах дозах облучения указывает на то, что в структуре молекулы альбумина не происходит глубоких изменений. Радиопротектор мексамин, введенный в концентрации 0,01 М в раствор БСА до его облучения, значительно снижает денатурирующее влияние радиации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егiazарова А. Р. Изв. АН ГССР, сер. биол., 5, 5, 468—476, 1979.
2. Гончаренко Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Химическая защита от лучевого поражения, Изд.-во МГУ, 1985.
3. Кузин А. М. В кн.: Радиационная биохимия, Изд.-во АН СССР, 14, 1962, 40—64.
4. Лейбман Д. Я., Тиктопуло Е. И., Привалов П. Л. Биофизика, 20, 8, 1975, 376—379.
5. Надарейшвили К. Ш., Егiazарова А. Р. Радиобиология, 6, 4, 1966, 790—795.
6. Привалов П. Л. Биофизика, 8, 3, 1963, 308—316.
7. Эйдус Л. X. В кн.: Физико-химические основы радиационных процессов и защита от излучений, Атомиздат, М., 1979.
8. Luwry B., Bilton K., Brands J. F. Biopolymers, 4, 25—27, 1966.
9. Steen J. M. Arch. Bioch. Biophys., 112, 3, 599—604, 1965.

დასახელებული ხარის შრატის ალბუმინის თერმოდინამიკური პარამეტრების ცვლილებანი და მქსამინის რადიოდაცვიითი ეფექტი

ა. ნადარეიშვილი, ა. ბიბიაზაროვა, თ. სანია

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

რ ე ზ ი მ ე

მიკროკალორიმეტრული მეთოდით შესწავლულ იქნა დაუსხიეველი და დასხიევებული (4—2000 გრ) ხარის შრატის ალბუმინის (ხშა) მოლეკულების თერმოდინამიკური თვისებები. აღმოჩნდა, რომ დასხიევის შემდეგ ენტალპია, ენტროპია და სითბოს ხედვითი ტეკადობა კლებულობს, ზოლო ლდობის მაქსიმალური ტემპერატუ-

რა რჩება მუდმივი დენატურაციის ტემპერატურული ინტერვალის გაფართოების ფონზე. ხშა ბუფერულ ხსნარში დასხიევაამდე შეყვანილი 0,01 მ კონცენტრაციის რადიოპროტექტორი მქსამინი მნიშვნელოვნად ამცირებს რადიაციის მადენატურიებელ გავლენას.

THE CHANGES OF THERMODYNAMIC PARAMETERS OF X-IRRADIATED BOVINE SERUM ALBUMIN AND PROTECTIVE EFFECT OF MEXAMIN



K. Sh. NADAREISHVILI, A. R. EGIAZAROVA, T. V. SANAIA

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

S u m m a r y

The changes of thermodynamic properties of Bovine serum albumin (BSA) molecule during X-radiation in 4—200 Gr dose were studied by the microcalorimetric method. The enthalpy, entropy and specific heat were found to decrease after irradiation but the maximal temperature of melting remained

at constant value during temperature interval dilatation of denaturation passage. Radio-protector mexamin, injected in BSA buffer solution at 0.01M concentration before radiation, significantly decreased the denaturing influence of radiation.

THE CHANGES OF THERMODYNAMIC PARAMETERS OF X-IRRADIATED BOVINE SERUM ALBUMIN AND PROTECTIVE EFFECT OF MEXAMIN



K. Sh. NADAREISHVILI, A. R. EGIAZAROVA, T. V. SANAIA

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

S u m m a r y

The changes of thermodynamic properties of Bovine serum albumin (BSA) molecule during X-radiation in 4—200 Gr dose were studied by the microcalorimetric method. The enthalpy, entropy and specific heat were found to decrease after irradiation but the maximal temperature of melting remained

at constant value during temperature interval dilatation of denaturation passage. Radio-protector mexamin, injected in BSA buffer solution at 0.01M concentration before radiation, significantly decreased the denaturing influence of radiation.

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ АДРЕНОМИМЕТИКОВ И АДРЕНОЛИТИКОВ НА КЛЕТКУ *Nitella syncarpa*

Д. А. Ониани, В. П. Шибут

Тбилисский государственный университет

ВНИИ микробиологических производств, Минск

Поступила в редакцию 16.10.1986

С использованием микроэлектродной техники и метода Штруггера исследовалось действие 7 адреномиметиков и адренолитиков на потенциал покоя и скорость движения протоплазмы клеток *Nitella syncarpa*. Обнаружена известная аналогия между реакцией на эти соединения клетки *Nitella* и типичных животных клеток. Методами теоретического конформационного анализа в попарно-аддитивном приближении определены конформационные возможности молекул фенитрона и изадрина. Можно предположить, что разница в характере вызываемых этими соединениями биологических эффектов обусловлена различиями в пространственной организации этих молекул.

Известно, что многие биогенные амины — природные биологические регуляторы животного организма — встречаются также в растениях [11] и способны влиять на различные функции растительной клетки [10]. Кроме того, в некоторых растениях обнаружены также признаки ацетилхолинэстеразной активности [12].

Приведенные факты, а также выполненные ранее исследования, посвященные действию ряда адренергических соединений на клетку *Nitella* позволили высказать предположение о существовании в ней неких систем, аналогичных адренореактивным системам животной клетки [4, 5]. В настоящей работе предприняты дальнейшие попытки проверки этой гипотезы посредством выяснения некоторых деталей механизма действия адреномиметиков и адренолитиков на два показателя состояния клетки — потенциала покоя и скорости движения протоплазмы.

Использовались вторые и третьи интернодальные клетки; в ходе эксперимента они находились в среде, содержащей: 10^{-4} М КСl, 10^{-3} М NaCl, 10^{-4} М CaCl₂.

Исследовались потенциал покоя, регистрация которого осуществля-

лась с помощью микроэлектродной техники [6], и скорость движения протоплазмы, определяемая по Штруггеру [9]. Теоретический конформационный анализ в попарно-аддитивном приближении молекул изадрина и фенитрона был выполнен с использованием системы атом-атомных потенциалов, приведенной в [13], и алгоритмов, описанных в [2].

Испытывалось действие на клетку *Nitella* 7 соединений: адреналина, норадреналина, изадрина, эфедрина индерала, дигидроэрготоксина и фенитрона; при этом в динамике изучалось изменение потенциала покоя и скорости движения протоплазмы.

Вызываемые перечисленными препаратами изменения потенциала покоя и скорости движения протоплазмы носили двухфазный характер: реакция циклозиса несколько запаздывала по сравнению с изменением потенциала.

Предобработка клеток блокатором α -адренорецепторов — дигидроэрготоксином в концентрации 10^{-7} г/мл, еще не вызывающей изменений регистрируемых параметров, резко ослабляла реакцию на α -адреномиметик — норадреналин; аналогично этому,



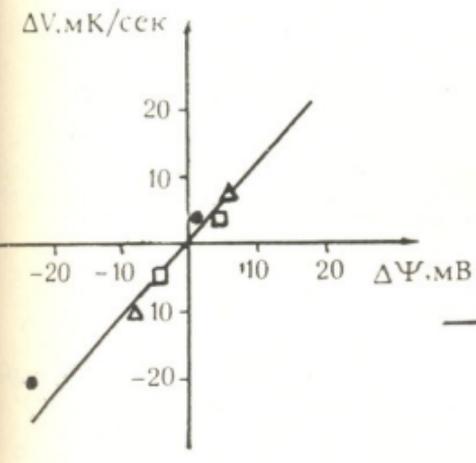
блокатор β -адренорецепторов, индерал, предотвращал развитие реакции на типичный β -адреномиметик — изадрина.

Различным оказался характер действия адренолитиков и адреномиметиков на клетку. Согласно модели, описывающей механизм потенциалзависимости сдвигов скорости движения протоплазмы ΔV [7], в случае, если такие сдвиги полностью опосредованы через изменения потенциала покоя $\Delta \Psi$, в моменты t_v^{\max} , соответствующие экстремумам функции $\Delta V(t)$, должно выполняться равенство

$$\Delta V(t_v^{\max}) = \alpha \Delta \Psi(t_v^{\max}),$$

где α — константа. Нанося на плоскость $(\Delta V, \Delta \Psi)$ точки, соответствующие экстремумам ΔV при различных

а



изадрина, где признаки потенциалзависимости сдвигов скорости движения протоплазмы соответствуют: Степень потенциалзависимости ΔV убывает в следующем ряду: фенитрон > индерал > дигидроэрготоксин > адреналин > эфедрин > норадреналин > изадрина. Она весьма четко выражена в случае адренолитиков (три первые соединения) и практически отсутствует у адреномиметиков.

Все эти обстоятельства говорят в пользу упоминавшейся выше гипотезы об аналогии организации адренореактивных структур растительной и животной клетки. В связи с этим можно также задаться вопросом о сходстве пространственной организации соответствующих центров взаимодействия.

На основании анализа конформационных возможностей ряда активных

б

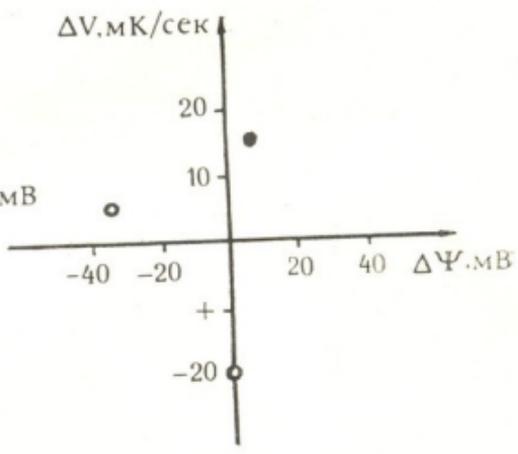


Рис. 1. Связь между экстремальными сдвигами скорости циклолиза ΔV и соответствующими им сдвигами потенциала покоя $\Delta \Psi$, наступающими под действием фенитрона (а) и изадрина (б) в концентрациях 10^{-8} г/мл — □, 10^{-7} г/мл — Δ, 10^{-6} г/мл — ●, 10^{-5} г/мл — +, 10^{-4} г/мл — ○

скорости циклолиза ΔV и соответствующими им сдвигами потенциала покоя $\Delta \Psi$, наступающими под действием фенитрона (а) и изадрина (б) в концентрациях 10^{-8} г/мл — □, 10^{-7} г/мл — Δ, 10^{-6} г/мл — ●, 10^{-5} г/мл — +, 10^{-4} г/мл — ○

концентрациях испытуемого препарата, можно оценить степень потенциалзависимости вызываемых им сдвигов скорости движения протоплазмы [8]. На рис. 1 приведены в качестве примера такие диаграммы для фенитрона — случай реакции ΔV , полностью опосредованной через сдвиг $\Delta \Psi$ (точки ложатся на прямую, проходящую через начало координат) — и 5. Серия биологическая, т. 13, № 5

и неактивных аналогов природных адреномиметиков были предложены различные модели расположения на адренорецепторах сайтов, ответственных за взаимодействие с различными функциональными группами молекулы агониста [1]. Эти модели различаются между собой лишь во второстепенных деталях; более того, оказалось что требования, предъяв-

ляемые к пространственной структуре лиганда α - и β -рецепторами, одинаковы.

В случае молекулы фенитрона также всем этим требованиям соответствуют структуры III и IV; наиболь-

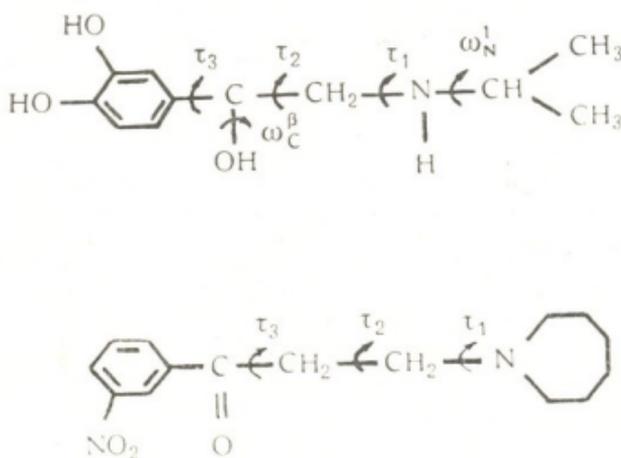


Рис. 2. Обозначения углов внутреннего вращения в молекулах фенитрона (а) и изадрина (б)

Пюльманом с сотрудниками [14] определены значения пяти внутримолекулярных расстояний в молекуле лиганда: D_1 — между центром фенильного кольца и атомом кислорода β -оксигруппы, D_2 — между центром фенильного кольца и атомом азота, D_3 — между атомом азота и атомом кислорода β -оксигруппы, D_4 и D_5 — соответственно отклонения атомов азота и кислорода от плоскости фенильной группы. Конформационные возможности важнейших адреномиметиков таковы, что предполагаемые моделью [14] значения величин $D_1 \dots D_5$ легко реализуются в весьма стабильных конформациях.

Аналогичное сопоставление было произведено нами на основании расчета стабильных конформаций изадрина и фенитрона. Результаты расчета приведены в таблице. На рис. 3 приведены стереоизображения стабильных конформаций изадрина и фенитрона.

Среди стабильных конформаций молекулы изадрина две структуры — V и VI — идеальным образом удовлетворяют требованиям модели [14].

Шне различия касаются расстояний D_4 (что очевидно уже из валентной структуры фенитрона) и D_5 .

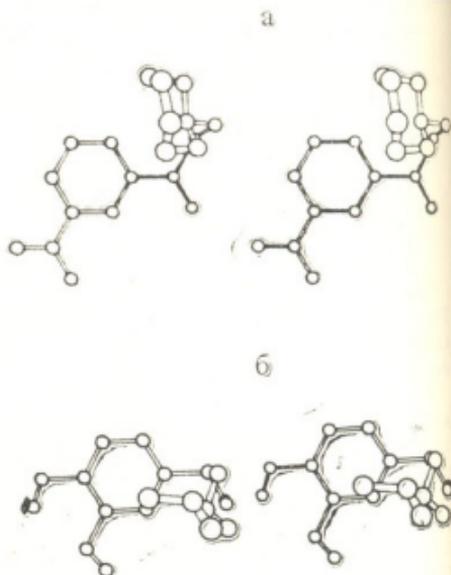


Рис. 3. Стереоизображения стабильных конформаций (таблица) молекул фенитрона (а) и изадрина (б)



В связи с упоминавшимися различиями в характере биологического действия обоих соединений эти результаты могут быть истолкованы следующим образом.

Отклонения значений D_4 и D_5 , по-видимому, не столь существенны с точки зрения пространственной комплементарности поверхности рецепто-

литики действуют по тому же механизму. Не исключено, в частности, что центры, с которыми они взаимодействуют, являются элементами системы транспорта аминов, существование которой у клеток *Nitella* недавно обнаружено [3].

Тогда наблюдаемую совокупность данных можно объяснить таким об-

Таблица

Стабильные конформации молекул фенитрона и изадрина и соответствующие им внутримолекулярные расстояния

Соединение	*N конформации	Углы внутреннего вращения, град					ΔU , ккал/моль	Внутримолекулярные расстояния, Å				
		τ_1	τ_2	τ_3	ω_N^1	ω_{CB}^1		D_1	D_2	D_3	D_4	D_5
Фенитрон	I	120	-57	95	—	—	0,0	3,7	4,1	3,8	2,2	0,0
	II	117	59	-94	—	—	0,1	3,7	4,1	3,8	2,2	0,0
	III	115	52	82	—	—	1,5	3,7	5,0	3,0	2,3	0,0
	IV	119	-55	-82	—	—	1,7	3,7	5,1	3,2	2,3	0,0
	V	123	175	-84	—	—	2,9	3,7	5,7	4,6	1,3	0,0
	VI	111	-175	84	—	—	3,1	3,7	6,3	4,6	1,3	0,0
Изадрин	I	94	63	-87	99	70	0,0	3,7	3,9	3,1	2,1	0,7
	II	93	62	93	98	69	0,1	3,7	3,9	3,0	2,2	0,7
	III	91	-61	-79	96	69	0,5	3,7	3,9	3,7	2,4	0,9
	IV	96	-60	101	97	69	0,6	3,7	3,9	3,7	2,4	0,9
	V	93	-176	-81	96	73	1,3	3,7	5,1	3,0	1,5	0,9
	VI	94	-177	98	96	72	1,5	3,7	5,1	3,0	1,5	0,8
Внутримолекулярные расстояния молекул [13]								3,6—3,7	5,1—5,2	2,8—2,9	1,2—1,4	0,7—0,9

ра и соприкасающейся с ним части молекулы; с другой стороны, они относятся к атомам, ответственным, как отмечалось [1], за проявление так называемой «внутренней активности». В результате фенитрон действует на адренорецепторы по механизму конкурентного антагонизма.

С учетом установленных выше аналогий можно предположить, что и в случае растительной клетки адрено-

разом, что адреномиметики, попадая внутрь клетки, непосредственно взаимодействуют с некими системами, участвующими в процессе циклолиза, в то время как адренолитики, лишённые такой возможности, действуют как неспецифические мембранотропные агенты, вызывая изменение потенциала покоя и полностью потенциалзависимые сдвиги скорости циклолиза.

ЛИТЕРАТУРА

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. Кудряшов А. П., Гончарик М. Н. ДАН БССР, 24, 1128—1131, 1980.
4. Ониани Д. А., Кудрин А. Н. Сооб-

5. Ониани Д. А., Кудрин А. Н. Сообщения АН ГССР, 86, 457—460, 1977.
6. Ониани Д. А. Исследование влияния физиологически активных веществ на скорость движения и мембранный потенциал клеток *Nitella*. Канд. дисс., Тбилиси, 1975.
7. Ониани Д. А., Плакс А. В., Коненда Е. С. Биофизика, 31, 361—362, 1986.



8. Оნიანი Д. А., Шибут В. П., Горелашвили Н. П. Труды II респ. конфер.: «Проблемы экологической биологии», ТГУ, Тбилиси, 148—149, 1986.

9. Штрюггер З. Практикум по физиологии растительных клеток и тканей. ИЛ, Москва, 1953.

10. Юри В. М., Гусев В. В., Кудряшов А. П. Изв. АН БССР, сер. хим. наук, I, 97—100, 1979.

11. Salleo A., Salleo S. *Annali di Bot. Ital.*, **111**, 298—299, 1977.

12. Dettbarn W. D. *Nature*, **194**, 1175—1178, 1962.

13. Nikiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chinpens G. I. *Intern. J. Peptide Protein Research*, **13**, 363—373, 1979.

14. Pullman B., Coubeils J.—L., Courriere P., Gervois J.—P. *J. Med. Chem.*, **15**, 17—23, 1972.

Nitella syncarpa-ს უჯრედებზე ადრენომიმეტიკებისა და ადრენოლიტიკების მოქმედების შესახებ

ჯ. ონიანი, ვ. შიბუტი

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რ ე ზ ი მ ე

გამომქვანებულია მცენარეული და ცხოველური უჯრედების განსაზღვრულ ანალოგიური რეაქციები 7 ადრენომიმეტიკისა და ადრენოლიტიკის ზემოქმედებების საპასუხოდ. ნავარაუდევია, რომ ამ ნაერ-

თებით გამოწვეული განსხვავებული ბიოლოგიური ეფექტები პირობადებულია მათი მოლეკულების სივრცითი ორგანიზაციის სხვადასხვაობით.

ON ACTION MECHANISMS OF ADRENOMIMETICS AND ADRENOLYTICS ON NITELLA SYNCARPA CELL

D. A. ONIANI, V. P. SHIBUT

Tbilisi State University, USSR

S u m m a r y

A certain analogy between the reaction of plant and animal cells to 7 adrenomimetics and adrenolytics has been shown; the difference in biological effects

of compounds of both group is supposedly accounted for by differences in space structure of their molecules.

УДК 612.018 : 576.3 : 547.963.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ХРОМАТИНА IN VIVO С ПОМОЩЬЮ МЕЧЕНОГО АКТИНОМИЦИНА Д

Н. В. Карсанов, Д. Э. Джагаров, З. Г. Гвишиани

Государственный научно-исследовательский центр медицинской биофизики
МЗ ГССР, Тбилиси

Поступила в редакцию 3.01.1986

Предложен метод, позволяющий по связыванию меченого актиномицина Д (АМД) *in vivo* с ДНК хроматина судить о доле ее, находящейся в транскрипционноактивной конформации.

Метод апробирован в процессе исследования состояния ДНК хроматина сердечной мышцы при стенозе аорты, адреналиновом поражении миокарда и гипотиреозе — патологических состояниях, сопровождающихся изменением синтеза РНК в сердце. Показано, что при стенозе аорты и адреналиновом поражении миокарда, характеризующихся повышением транскрипции, связывание АМД ядрами возрастает, а при гипотиреозе, ведущем к понижению активности генетического аппарата и, как следствие этого, атрофии тканей, способность хроматина связывать АМД снижается.

Антибиотик актиномицин Д (АМД) давно используется в молекулярной биологии для подавления синтеза РНК. Действие его избирательно и высокоспецифично — для подавления синтеза ДНК требуется доза, почти в сто раз превышающая необходимую для ингибирования синтеза РНК [13].

Ингибирующее действие АМД на транскрипцию обусловлено его связыванием с ДНК [6, 7]. Об этом свидетельствует, в частности, хорошая корреляция между способностью производных АМД ингибировать синтез РНК и константой скорости диссоциации комплекса антибиотик—ДНК [10].

Для связывания антибиотика с ДНК важное значение имеет вторичная и третичная структура ДНК, а также содержание ГЦ пар [7, 17], которые, по-видимому, легко образуют участки вторичной структуры ДНК, необходимые для интеркаляции АМД [17].

Из теоретической модели связыва-

ния АМД с ДНК хроматина следует, что транскрипционноактивные гены имеют большее количество участков для прочного связывания АМД, чем неактивные [16]. В пользу этого свидетельствует прямая корреляция между активностью синтеза РНК и количеством антибиотика, необходимого для его ингибирования [12], а также электроно-микроскопические наблюдения, показавшие, что эухроматин связывает гораздо больше меченого АМД, чем гетерохроматин [7].

Исходя из свойства АМД избирательно связываться с транскрипционноактивными генами, многие исследователи пытались количественно оценить матричную активность хроматина по связыванию с ним АМД *in vitro*. Однако такие попытки не принесли успеха — не было найдено различий в связывании АМД хроматином, выделенным из тканей, резко отличающихся по скорости синтеза РНК и содержанию эухроматина [14]. Очевидно, это связано с тем, что в про-

цессе выделения хроматина происходит повреждение нативной структуры ядра и хроматина, теряются многие растворимые факторы, которые могут играть важную роль в регуляции генетической активности [11, 14], и нарушается связь с цитоплазмой, которая, как известно, оказывает мощное специфическое воздействие на ядерный аппарат транскрипции [5].

Учитывая вышесказанное, а также то, что в организме АМД практически не подвергается разрушению или переходу в какие-либо неактивные формы [8, 15, 18], связывается только с ДНК [19] и фактически не взаимодействует с РНК и белками хро-

матина [9, 19], мы решили разра-
тывать метод, позволяющий использо-
вать АМД в качестве зонда для вы-
явления транскрипционных участ-
ков хроматина, имеющих транскрипци-
онно-активную конформацию *in vivo* в
условиях естественного окружения и
взаимосвязей ядра.

Метод апробирован нами при ис-
следовании хроматина сердечной
мышцы при стенозе аорты, адренили-
новом поражении миокарда и гипо-
тиреозе — патологических состояниях,
сопровождающихся выраженными из-
менениями генетической активности
[1—4, 6].

МЕТОДЫ

В опытах использовали 58 самцов
белых крыс. [³H]АМД (Amersham,
Англия) разбавляли немеченным
АМД (Реанал, ВНР) до получения
препарата с удельной активностью
10 ГБк/мМ. АМД в оптимальной до-
зе вводили внутривенно за час до за-
боя. Все операции с АМД проводили
при слабом рассеянном свете для
предотвращения световой деградации
соединения.

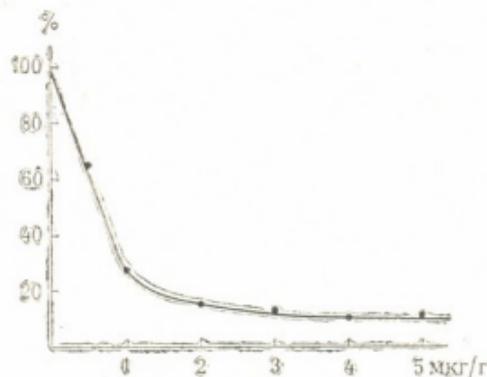


Рис. 1. Зависимость включения метки [¹⁴C] оротата в РНК сердечной мышцы (в процентах к включению в отсутствие ингибитора) от введенной дозы АМД (мкг на г массы тела). Каждая точка — среднее четырех случаев

Оптимальную дозу меченого АМД для сердца крысы определяли путем изучения ингибирующего действия АМД на синтез РНК в сердечной
358

мышце и данных литературы [6, 20]. Она оказалась равной 0,1 мг на 100 г массы тела животного. При этой дозировке происходит насыщение большинства транскрипционноактивных участков хроматина, связывающих антибиотик, о чем свидетельствует кривая зависимости подавления синтеза РНК *in vivo* от введенной животному дозы антибиотика (рис. 1).

Ядра из сердечной мышцы выделяли центрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы [2]. Процесс центрифугирования позволяет одновременно избавиться как от свободного, так и слабо, неспецифично связанного ядрами АМД, который при этом остается в верхних слоях градиента сахарозы. Ядра экстрагировали 0,03 н КОН и брали аликвоты для определения радиоактивности и концентрации ДНК.

Радиоактивность препаратов определяли на радиоспектрофотометре «Марк-2» фирмы «Нуклеар Чикаго» (США), а концентрацию нуклеиновых кислот — как описано ранее [2].

Стеноз аорты моделировали путем коарктации брюшной аорты по методу Когана [4]. Гипотиреоз вызывали скормливанием мерказолилом (ПХФО «Здоровье», г. Харьков) из расчета 20 мг в сутки ежедневно в продолжение двух месяцев. Адренилиновое поражение миокарда (адренилиновый миокардит) вызывали однократной внутривенной инъекцией 0,5 мл



0,1%-ного адреналина. Животных со стенозом аорты забивали через 72 ч после воспроизведения патологии, с гипотиреозом — через два месяца

после начала дачи мерказолида крыс с адреналиновым поражением сердца — через 72 ч после воспроизведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из представленных в таблице данных следует, что при стенозе аорты, характеризующемся гиперфункцией сердечной мышцы и, как следствие этого, ее гипертрофией [4] (о возникновении последней у наших экспериментальных животных свидетельствует увеличение массы и весового коэффициента сердца), связывание АМД ядрами в среднем увеличивается на 23,5%.

аорты — количество связанного АМД возрастает почти в 2 раза (таблица). При продолжительном гипотиреозе, в отличие от двух предыдущих патологических состояний, наблюдается не активация генетического аппарата клетки, а, наоборот, спад его активности [3], что и приводит к атрофии миокарда; имеет место значительное уменьшение (на 61,3%) связывания АМД (таблица).

Таблица 1

Связывание актиномицина Д ядрами сердечной мышцы в норме, при стенозе аорты, адреналиновом поражении миокарда и гипотиреозе

Группа	Масса тела, г	Масса сердца, мг	Весовой коэффициент сердца, мг/г	Количество молекул актиномицина Д, связанных с 10 ⁶ пар нуклеотидов ДНК
Норма, n*=7	150,2±6,8	526,2±30,5	3,50±0,06	452±29
Стеноз аорты, n=8	162,4±8,3	640,0±23,4**	3,94±0,12	558±32**
Миокардит, n=6	137,3±8,1	575,0±32,4	4,19±0,19***	889±137***
Гипотиреоз 2-месячный, n=7	113,9±13,9**	387,3±38,1**	3,40±0,19	175±19****

* — число случаев, ** — P < 0,05, *** P < 0,01, **** P < 0,001. Все сравнения с нормой

При адреналиновом повреждении миокарда, которое, как известно, сопровождается активацией генетической активности для обеспечения восстановительных процессов в поврежденных участках сердечной мышцы [1], также имеет место увеличение связывания АМД ядрами, причем более выраженное, чем при стенозе

Полученные результаты говорят о взаимосвязи активности генетического аппарата и способности хроматина связывать АМД. Таким образом, настоящая работа подтверждает целесообразность использования АМД для изучения транскрипционноактивной конформации хроматина *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гроздова М. Г., Северин С. Е. Моделирование заболеваний, «Медицина», М., 1973, 202—222.
2. Карсанов Н. В., Джагаров Д. Э. Мол. биол., 1979, 13, 38—46, 1979.
3. Карсанов Н. В., Смоленская Л. И., Джагаров Д. Э., Варзанашвили Н. А. Укр. биох. ж., 58, 8—15, 1986.
4. Коган А. Х. Бюлл. экспер. биол. мед., 51, 112—115, 1961.
5. Лихтенштейн А. В., Шапог В. С. Успехи соврем. биол., 94, 3—20, 1982.
6. Меерсон Ф. З., Явич М. П., Горач Г. Г. Вопр. мед. химии, 24, 275—281, 1978.
7. Молекулярные основы действия антибиотиков (под ред. Гэйла Э., Кандалифа Э., Рейнолдса П и др.). «Мир», М., 1975, 249—268.
8. Galbraith W. M., Mellei L. V. Cancer Chemother. Rep., 59, 1061—1069, 1975.

9. Kleiman L., Huang R. C. C. J. Mol. Biol., 55, 503—521, 1971.
10. Muller W., Crothers D. M. J. Mol. Biol., 35, 251—290, 1968.
11. Paine P. L., Austerberry C. F., Desjarlais L. J., Horowitz S. B. J. Cell Biol., 97, 1240—1242, 1968.
12. Posner B. I., Fanburg B. L. Circ. Res., 23, 137—145, 1968.
13. Reich E., Goldberg I. H. Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol., 183—234, 1964.
14. Rigertz N. R., Bolund L. Biochim. Biophys. Acta, 174, 147—154, 1969.
15. Schwartz H. S., Sodergren J. E., Ambaye R. Y. Cancer Res., 28, 192—197, 1968.
16. Sobell H. M. Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5328—5331, 1985.
17. Terrance W. J., Stone M. P., Krugh T. R. Biochemistry, 24, 7471—7479, 1985.
18. Weiss E., Heinrich P. C. Mol. Pharmacol., 14, 1148—1155, 1978.
19. Weissbach H., Redfield B., O'Connor T., Chirigos M. A. Cancer Res., 26, 1832—1837, 1966.
20. Yu F. L. FEBS Lett., 156, 83—87, 1983.

ჰრომატინის კონფორმაციის გამომკვლევა ნიშანდებული აქტინომიცინ D-ს საშუალებით

ნ. კარსანოვი, დ. ჯაგაროვი, ზ. გვიშიანი

საქართველოს სსრ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს სამედიცინო ბიოფიზიკის რესპუბლიკური ცენტრი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

შემოთავაზებული მეთოდი საშუალებას იძლევა წარმოდგენილ იქნეს ტრანსკრიფციულად აქტიური ქრომატინის კონფორმაცია მასთან დაკავშირებული ნიშანდებული აქტინომიცინ D-ით.

მეთოდის აპრობაციის მიზნით ჩატარებულია გამოკვლევები გულის კუნთის ქრომატინის დნმ-ზე ისეთი პათოლოგიების დროს, როდესაც აღინიშნება აორტის სტენოზი, მიოკარდიუმის ადრენალინით დაზიანება და ჰიპოთირეოზი.

ნაჩვენებია, რომ აორტის სტენოზის და მიოკარდიუმის ადრენალინით დაზიანებისას, გენეტიკური აპარატის აქტივაციის ფონზე მატულობს ნიშანდებული აქტინომიცინ D-ს დაკავშირება ბირთვებთან. ჰიპოთირეოზის დროს, რომელსაც თან ახლავს გენების აქტივაციის დაქვეითება და ქსოვილის ატროფია, ქრომატინთან აქტინომიცინ D-ს დაკავშირების უნარი მცირდება.

STUDY OF CHROMATIN CONFORMATION IN VIVO BY LABELLED ACTINOMYCIN D

N. V. KARSANOV, D. E. JAGAROV, Z. G. GVIISHIANI

The Republican Research Centre of Medical Biophysics, Ministry of Public Health, Georgian SSR, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

A method has been suggested, allowing to determine transcriptionally active conformation of chromatin DNA part by its binding in vivo with labelled actinomycin D (AMD).

The method was tested in the process of investigation on myocardial chromatin DNA state in aortic stenosis, adrenaline-induced damages of the myocardium and hypothyreosis—pathologies, accompanied by a change in RNA synthe-

sis in the heart. It has been shown, that in aortic stenosis and adrenaline-induced myocardial damages which are characterized by a rise in transcription, the AMD binding by nuclei increases. At the same time in hypothyreosis leading to a decrease in the activity of genetic apparatus which results in atrophy of tissue, the ability of chromatin to bind AMD is reduced.

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 редакции, а также краткие сообщения и рецензии. Периодически в журнале будет помещаться краткая хроника о проведенных в республике научно-организационных мероприятиях.

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

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

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

Статья должна быть подписана авторами. В конце статьи необходимо указать полностью имя, отчество и фамилию 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 выводы 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 глящей 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 неперидических — 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.

696/23



Цена 85 коп.

Индекс 76204

100-2