

784-3  
1988



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**

**1988 N1**

თბილისი  
ТБИЛИСИ  
TBILISI

ტომი  
ТОМ  
VOL.

**14**

СПИСОК РАЗДЕЛОВ БИОЛОГИИ,  
ПО КОТОРЫМ ПРИНИМАЮТСЯ СТАТЬИ

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

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე   
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИНСКОЙ ССР

**ბიოლოგიის სერია**  
**СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ**

ტომი 14, №1  
Том

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

გამომცემლობა „მეცნიერება“  
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕЦНИЕРЕБА»

თბილისი  
ТБИЛИСИ

• 1988

სარედაქციო კოლეგია:

მთავარი რედაქტორი ვ. ოკუჯავა

მთავარი რედაქტორის მოადგილე თ. ონიანი

სწავლული მდივანი გ. ბეკაია

ლ. გაბუნია, ს. დურმიშიძე, მ. ზაალიშვილი, გ. თუმანიშვილი, გ. კანდელაკი,

კ. ნადარეიშვილი, გ. ნახუტრიშვილი, გ. სანაძე, ბ. ყურაშვილი,

თ. ჭანიშვილი, ნ. ჯავახიშვილი

პასუხისმგებელი მდივანი ს. ლაბაძე

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. М. Окужава

Зам. главного редактора Т. Н. Ониани

Ученый секретарь Г. Л. Бекаия

Л. К. Габуня, Н. А. Джавахишвили, С. В. Дурмишидзе, М. М. Заалишвили,

Г. В. Канделаки, Б. Е. Курашвили, К. Ш. Надарейшвили, Г. Ш. Нахуцришвили,

Г. А. Санадзе, Г. Д. Туманишвили, Т. Г. Чанишвили,

Ответственный секретарь С. Р. Лабадзе

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief V. M. Okujava

Associate Editor T. N. Oniani

Editorial Secretary G. L. Bekaia

T. G. Chanishvili, N. A. Djavakhishvili, S. V. Durmishidze,

L. K. Gabunia, G. V. Kandelaki, B. E. Kurashvili,

K. Sh. Nadareishvili, G. Sh. Nakhutsrishvili,

G. A. Sanadze, G. D. Tumanishvili, M. M. Zaalishvili,

Executive Secretary S. R. Labadze

© Известия АН ГССР  
Серия биологическая, 1988

Корректор Д. Р. Арчвадзе

Сдано в набор 26.11.1988; Подписано к печати 19.02.1988; Формат бумаги

70×108<sup>2</sup>/<sub>16</sub>; Бумага № 1; Печатных л. 6,7; Уч.-издат. л. 5,5

УЭ 096683;

Тираж 1000;

Заказ 3768;

Цена 85 коп.

---

გამომცემლობა „მეცნიერება“, თბილისი, 380060, კუტუზოვის ქ., 19

Издательство «Мецниереба», Тбилиси, 380060, ул. Кутузова, 19

---

საქართველოს სსრ მეცნ. აკადემიის სტამბა, თბილისი 380060, კუტუზოვის ქ. 19

Типография АН Грузинской ССР, Тбилиси, 380060, ул. Кутузова, 19

СОДЕРЖАНИЕ — შიგნისი — CONTENTS

- И. И. Месхишвили. Изменения фазовой структуры систолы левого желудочка при острой алкогольной интоксикации средней степени у кроликов 5
- ი. ი. მესხიშვილი. ბოცვერების გულის მარცხენა პარკუჭის სისტოლს ფაზური სტრუქტურის ცვლილებები საშუალო სიმძიმის მწვავე ალკოჰოლური ინტოქსიკაციის დროს
- I. I. Meskhishvili. The changes of the left ventricle systolic phase structure during the middle degree of acute alcoholic intoxication in rabbits
- Н. Дж. Гиунашвили. Развитие в темноте процессов транспорта, аккумуляции и восстановления нитрата в листьях фасоли 11
- ნ. დ. ჯიუნაშვილი. ღობოს ფოთლებში ნიტრატების ტრანსპორტის, აკუმულაციისა და აღდგენის პროცესების განვითარება სიბნელეში
- N. J. Giunashvili. Development of the nitrate transport, accumulation and reduction in bean leaves in darkness
- Н. Д. Джапаридзе. Изучение синтеза белков в нейрональной, глиальной и синапсомальной фракциях головного мозга цыплят при импринтинге 15
- ნ. დ. ჯაპარიძე. ცილის სინთეზი წიწილების თავის ტვინის ნერვულ, გლიურ და სინაპტოსომურ ფრაქციებში იმპრინტინგის დროს
- N. D. Japaridze. The protein synthesis in neural, glial and synaptosomal fractions of chick brain during imprinting
- М. С. Чквидзе. Оценка состояния популяции рыжего соснового пилильщика по гемолимфе 20
- მ. ს. ჩკვიძე. ფიჭვის ქარცი ხერხიას პოპულაციების მდგომარეობის შესწავლა ჰემოლიმფის მიხედვით
- M. S. Chkoidze. Study of neodiprion sertifer glofer population condition according to hemolymph
- Н. В. Гогобашвили, И. Г. Гветадзе. Диагностическая значимость выявления антигенреактивных лимфоцитов в цереброспинальной жидкости при туберкулезном менингите 24
- ნ. ვ. გოგებაშვილი, ი. გ. გვეტაძე. თავზურგტვინის სითხეში ანტიგენრეაქტიული ლიმფოციტების გამოვლენების დიაგნოსტიკური მნიშვნელობა ტუბერკულოზური მენინგიტის დროს
- N. V. Gogebashvili, I. G. Gvetadze. Antigenreactive lymphocytes in the cerebrospinal fluid in tuberculous meningitis
- Э. Я. Нациашвили, Е. Н. Ахвледиани, А. И. Хирсели, М. О. Вазагашвили. Иммунологические аспекты применения фторуглеродных соединений в хирургии 29
- ე. ნაციაშვილი, ე. ახვლედიანი, ა. ხირსელი, მ. ვაზაგაშვილი. ფტორნახშირბადის ნაერთების ქირურგიული გამოყენების იმუნოლოგიური ასპექტები
- E. Ya. Natsiashvili, E. N. Akhvlediani, A. I. Khirseli, M. O. Vazagashvili. Immunologic aspects of the use of fluorocarbon compounds in surgery
- Б. М. Вишнепольский, М. К. Пирцхалава. Конформационный анализ циклического фрагмента из шарнирного участка иммуноглобулина G1 36
- ბ. ვიშნეპოლსკი, მ. ფირცხალავა. იმუნოგლობულინ G1 „სახსარ“-უბნის ციკლური ფრაგმენტის კონფორმაციული ანალიზი.
- B. M. Vishnepolski, M. K. Pirtskhalava. A conformational analysis of cyclic fragment of the hinge region of immunoglobulin G1

К. Ш. Джинория. Исследование конформационного состояния  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц гемоглобина методом водородного обмена ( $1\text{H}-2\text{H}$ ) . . . . .

ქ. ჯინორია. ჰემოგლობინის  $\alpha$ -და  $\beta$ -სუბერთეულების კონფორმაციული მდგომარეობის შესწავლა წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდით ( $1\text{H}-2\text{H}$ )

K. Sh. Jinoria. Investigation of isolated  $\alpha$  and  $\beta$  haemoglobin subunits conformational states using the method of hydrogen exchange ( $1\text{H}-2\text{H}$ )

Н. В. Карсанов, Б. Г. Джинчвелашвили. Конформационное состояние белков миофибрилл нормального миокарда . . . . . 46

ბ. ქარსანოვი, ბ. ჯინჩველაშვილი. ნორმალური მიოკარდიუმის მიოფიბრილების ცილების კონფორმაციული მდგომარეობა

N. V. Karsanov, B. G. Jinchvelashvili. Conformational state of normal myocardium myofibril proteins

Ц. Х. Салия, Г. Г. Жадац, Е. А. Пермяков, В. Л. Шныров. Влияние рН концентрации буферного раствора на тепловую денатурацию теней эритроцитов крыс . . . . . 57

ც. სალია, გ. ჯადანი, ე. პერმიაკოვი, ვ. შნიროვი. ბუფერული ხსნარების pH და კონცენტრაციათა გავლენა ვირთაგვების ერითროციტულ მემბრანათა სითბურ დენატურაციაზე

Ts. Kh. Salia, G. G. Zhadan, E. A. Permyakov, V. L. Shnyrov. Influence of pH buffer concentration on the thermal denaturation of rat erythrocyte ghosts

**Краткие сообщения**

**მოკლე წერილები**

**Short communications**

Н. Т. Ониани. Причины угнетения одиночных сокращений скелетной мышцы лягушки в гипертонических растворах . . . . . 62

ბ. თნიანი. ჰიპერტონულ ხსნარებში ბაყაყის ჩონჩხის კუნთის ერთხელობრივი შეკუმშვების ინჰიბირების მიზეზები

N. T. Oniani. The reasons for the frog skeletal muscle twitch inhibition in hypertonic solutions

В. М. Окуджава, Б. Г. Чанкветадзе, М. Д. Рухадзе, М. М. Рогава. Количественное определение некоторых транквилизирующих и противосудорожных лекарственных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением микроколонки . . . . . 66

ვ. ოკუჯავა, ბ. ჭანკვეტაძე, მ. რუხაძე, მ. როგავა. ზოგიერთი ტრანკვილიზატორის და ანტიკონვულსანტის რაოდენობრივი ანალიზი მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით

V. M. Okujava, B. G. Chankvetadze, M. D. Rukhadze, M. M. Rogava. Quantitative determination of some tranquilizers and anticonvulsant drugs using high performance liquid chromatography

**Рецензии**

**რეცენზიები**

**Reviews**

М. С. Гврйтишвили. Рецензия на книгу М. С. Мелиа, И. А. Шавлиашвили, Л. В. Мшвидобадзе «Грибы деревьев и кустарников лесов Грузии», Каталог, «Сабчота Сакартvelo», Тбилиси, 1987, 649 с. . . . . 69

მ. გვრიტიშვილი. რეცენზია მ. მელიას, ი. ა. შავლიაშვილის, ლ. მშვიდობაძის წიგნზე „საქართველოს ტყის ხემცენარეებსა და ბუჩქებზე გავრცელებული სოკოები“, კატალოგი, „საბჭოთა საქართველო“, თბილისი, 1987, 649 გვ.

M. S. Gvritishvili. Review by M. S. Melia, I. A. Shavliashvili, L. V. Mshvidobadze's book „On Fungi of Trees and Shrubs in the Forests of Georgia“, Catalogue, „Sabchota Sakartvelo“, Tbilisi, 1987, 649 p.

УДК 616.127—002.4—036.11—02

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## ИЗМЕНЕНИЯ ФАЗОВОЙ СТРУКТУРЫ СИСТОЛЫ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ У КРОЛИКОВ

И. И. Месхишвили

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

Поступила в редакцию 26.02.1987

1188/1

В условиях хронического эксперимента на кроликах изучены изменения фазовой структуры систолы левого желудочка (ФССЛЖ), систолического объема (СО) и других показателей функции сердечно-сосудистой системы (ССС) до и на разных этапах после внутривенной (в/в) и внутриаартериальной (в/а) инъекций 1,5 г/кг этанола (Э). Обнаружено, что по характеру изменений изученных показателей отчетливо выделяются две группы животных, наиболее выраженным признаком для которых является наличие или отсутствие нарушений ритма на фоне относительной брадикардии и тахикардии соответственно. Общим для обеих групп является снижение сократительной способности миокарда более чем на сутки после острой алкогольной интоксикации (ОАИ). Обнаружены достоверные изменения ФССЛЖ, в частности увеличение периода напряжения, изометрического сокращения, индекса напряжения миокарда и уменьшение систолического объема, скорости изгнания систолического объема, внутрисистолического показателя и минутного объема крови. Кроме того, в группе с аритмиями отмечались признаки ишемии миокарда и прогрессирующее увеличение продолжительности атрио-вентрикулярной проводимости.

Известно, что ОАИ, в зависимости от дозы или концентрации этанола в крови, вызывает различные нарушения деятельности сердца [1, 3, 5, 6]. Эти нарушения, также как степень опьянения, могут быть различными в зависимости от исходного состояния эмоционально-мотивационной сферы или психо-соматического статуса даже у одного и того же человека при одном и том же уровне содержания этанола в крови. В экспериментальных исследованиях такой значительной вариабельности последствий ОАИ в зависимости от исходного состояния животных не обнаружено, хотя дозозависимые, но качественно однотипные изменения были обнаружены во всех случаях [8]. Комплексных исследований изменений кардио-гемодинамики, включающих изучение фазовой структуры сердечного цикла и основных показателей

центральной гемодинамики, до сих пор не проведено. Между тем, такие исследования позволили бы наметить конкретные пути выявления физиологических механизмов вариабельности чувствительности к этанолу и поиска патогенетически обоснованных методов профилактики и коррекции нарушений сердечной деятельности при ОАИ различной степени тяжести.

В предыдущей работе [2] нами было показано, что у кроликов при легкой ОАИ индивидуальные различия реакции ССС на этанол слабо выражены. Хотя по критериям ФССЛЖ и изменениям центральной гемодинамики нарушения функции сердца варьировали — качественно разнонаправленные сдвиги, особенно по изменению частоты сердечных сокращений (ЧСС), отмечались крайне редко. Было сделано предположе-

საქ. სსრ კ. მედიცინა  
სსს, სსს. ნეშბუბ.  
გამომცემლობა



ние, что использованная доза алкоголя была не столь велика (0,5 г/кг массы тела), чтобы вызвать серьезные нарушения функции сердца и выявить индивидуальные различия

толерантности к алкоголю. Экспериментальной проверке этого предположения посвящена настоящая работа.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

На 20-ти половозрелых кроликах-самцах с массой тела 2,2—3,0 кг в хронических условиях было проведено по 2—3 тестирования на ОАИ при внутривенном и внутриартериальном введении этанола в дозе 1,5 г/кг. Этанол вводили в виде 48%-ного раствора, а при контрольных опытах (плацебо) вводили соответствующее количество физиологического раствора (ФР). Поликардиограмму регистрировали до и сразу после инъекции Э или ФР, с начальными интервалами 2—3 мин, а затем 15—30 мин в течение 3—4 ч, а также через 24—28 ч. Методика поликардиографического исследования была такой же, как в предыдущей работе [2]. Определяли продолжительность сердечного цикла

(С), электрической (С<sub>э</sub>), механической (С<sub>м</sub>) и общей (С<sub>о</sub>) систол, периода напряжения (Т) и составляющих его фаз асинхронного (АС) и изометрического (ИС) сокращений, периода изгнания (Е) и его фаз быстрого (ФБИ) и медленного (ФМИ) изгнаний, а также атриосистолическую фазу диастолы (Р-Q). Кроме того, рассчитывали значения коэффициента Блюмбергера (К), внутрисистолического показателя (ВСП), индекса напряжения миокарда (ИНМ), систолического объема крови (СО) и скорости его изгнания (СИСО), минутный объем (МО) и частоту сердечного сокращения (ЧСС).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты показали, что приблизительно у 40% животных ОАИ средней степени вызывает различные виды нарушения ритма, в том числе желудочковые экстрасистолы, бигеминию, тригеминию, резкое замедление пульса и т. д. Эти изменения развиваются главным образом на 7—10 мин после инъекции Э и продолжают не более 3—12 мин, редко дольше, а главное — прекращаются самостоятельно. Обычно вслед за аритмиями выявляются ЭКГ признаки ишемии миокарда (смещение S-T сегмента, повышение амплитуды Т, куполообразный Т и т. д.), которые самостоятельно не элиминируются в течение суток, а иногда и дольше.

Следует подчеркнуть, что развитие аритмии не зависит ни от способа (в/в или в/а), ни от частоты или кратности введения Э. Решающее значение в этом плане имеет скорость инфузии алкоголя. При быстром в/а введении Э животные часто погибают, но не от нарушения функций ССС или остановки сердечной деятельности, а от остановки дыхания.

В связи с изложенным в наших исследованиях, независимо от способа введения Э, использовалась постоянная скорость его инфузии, приблизительно соответствующая максимальной скорости всасывания при пероральном введении больших доз алкоголя. Несмотря на это, аритмия и другие выраженные нарушения сердечной деятельности наблюдались, как это было указано выше, не более чем в 40% случаев. У этих животных были выявлены и другие фазовые и общегемодинамические различия, что потребовало отдельного обобщения результатов для животных без проявления нарушения ритма (I группа — 25 случаев) и с аритмиями (II группа — 16 случаев). Обобщенные данные статистической обработки результатов исследований до и на разных этапах после ОАИ средней степени у этих групп кроликов представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

Как видно из таблиц, в первой группе Э вызывает относительную тахикардию, а во второй — брадикардию. Между тем, в ФССЛЖ отмечаются сходные изменения: АС и



Изменение ФССЛЖ у кроликов первой группы (без аритмии) при ОЛН средней степени

Показатели	Фон	Сразу после введения Э	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	24 ч
С, мс	244,4 ± 3,5	237,2 ± 1,5	223,1 ± 1,9*	219,0 ± 2,2*	229,9 ± 3,3*	221,3 ± 1,9*	250,2 ± 3,7
Сэ, мс	148,9 ± 1,6	148,4 ± 2,4	144,2 ± 1,4**	141,7 ± 2,7*	136,3 ± 2,6*	137,2 ± 1,3*	155,2 ± 2,9
Сэ—долж., мс	145,3 ± 2,1	142,1 ± 0,9	135,9 ± 1,2*	134,1 ± 1,3	138,9 ± 2,0**	135,2 ± 1,2*	147,8 ± 2,3
См, мс	115,5 ± 2,3	120,4 ± 1,6	107,3 ± 0,8*	103,5 ± 0,9*	107,1 ± 1,0*	103,0 ± 0,9*	112,8 ± 2,7
См—долж., мс	113,1 ± 1,6	110,8 ± 0,7	106,1 ± 0,9*	104,7 ± 1,1*	108,3 ± 1,6**	105,5 ± 0,9*	115,1 ± 1,7
Со, мс	137,7 ± 2,2	144,4 ± 2,6	132,1 ± 0,9**	128,1 ± 1,1*	131,5 ± 1,0**	127,8 ± 0,8*	136,5 ± 2,1
Со—долж., мс	132,1 ± 1,9	129,1 ± 0,8	123,2 ± 1,1*	121,4 ± 1,2*	126,0 ± 1,8**	122,4 ± 1,1*	134,6 ± 2,0
АС, мс	24,2 ± 0,5	23,9 ± 0,4	24,8 ± 0,5	24,5 ± 0,5	24,4 ± 0,4	24,9 ± 0,6	23,8 ± 0,6
ИС, мс	19,7 ± 0,5	22,5 ± 0,7*	21,9 ± 0,6*	21,7 ± 0,8**	23,1 ± 0,7*	22,9 ± 1,0*	25,1 ± 1,3*
Т, мс	43,9 ± 0,8	46,4 ± 0,7**	46,7 ± 0,9**	46,2 ± 0,7**	47,5 ± 0,8*	47,8 ± 0,9*	48,9 ± 1,6*
ФБИ, мс	37,6 ± 0,9	37,3 ± 0,8	34,1 ± 0,9*	34,6 ± 0,8**	33,3 ± 0,7*	32,3 ± 0,8*	31,3 ± 1,8*
ФМИ, мс	57,8 ± 1,6	60,4 ± 1,5	50,5 ± 0,9*	51,8 ± 1,5*	50,7 ± 1,2*	47,8 ± 1,3*	53,3 ± 1,6
Е, мс	95,4 ± 2,1	97,7 ± 1,8	84,6 ± 1,3*	81,9 ± 1,3*	84,0 ± 1,4*	80,1 ± 1,3*	88,6 ± 3,2
Е—долж., мс	93,4 ± 1,3	90,7 ± 0,6	85,2 ± 0,7*	83,6 ± 0,8*	87,9 ± 1,3*	84,5 ± 0,7*	95,8 ± 1,4
Р—О, мс	65,7 ± 0,6	66,9 ± 0,5	64,8 ± 0,5	63,8 ± 0,7	64,9 ± 0,6	64,6 ± 0,5	65,9 ± 0,8
СО, мл	1,22 ± 0,06	0,56 ± 0,04*	0,78 ± 0,06*	0,74 ± 0,07*	0,79 ± 0,07*	0,77 ± 0,06*	1,00 ± 0,08**
К	2,17 ± 0,2	2,11 ± 0,1	1,81 ± 0,1	1,77 ± 0,09	1,77 ± 0,2	1,68 ± 0,2	1,81 ± 0,4
ВСП%	82,6 ± 0,9	81,2 ± 0,6	78,8 ± 0,5*	79,1 ± 0,5*	78,4 ± 0,6*	77,8 ± 0,8*	78,6 ± 0,7*
ИНМ	31,4 ± 0,8	32,1 ± 0,8	35,4 ± 0,5*	36,1 ± 0,6*	36,1 ± 0,4*	37,4 ± 0,4*	35,8 ± 0,8*
СИСО, мл/с	12,8 ± 0,7	5,7 ± 0,4*	9,2 ± 0,7*	9,0 ± 0,9*	9,4 ± 0,8*	9,6 ± 0,7*	11,3 ± 0,9*
МО, мл	299,5 ± 14,6	141,7 ± 10,1*	209,7 ± 16,1*	202,8 ± 19,1*	206,2 ± 18,3*	208,7 ± 16,3*	240,0 ± 19,2*
ЧСС, мин	245,5 ± 3,4	253,0 ± 1,6	268,9 ± 2,3*	274,0 ± 2,8*	261,0 ± 3,7*	271,1 ± 2,3*	240,0 ± 3,6*

\* P < 0,01, \*\* P < 0,05

Изменение ФССЛЖ у кроликов второй группы (CS аритмиями) при ОАИ средней степени

Показатели	Фон	Сразу после введения Э	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	24 ч
С, мс	224,5 ± 2,7	253,0 ± 6,8*	252,9 ± 4,9*	254,9 ± 4,3*	264,8 ± 5,4*	267,4 ± 5,5*	226,6 ± 1,7
Сэ, мс	144,3 ± 2,5	157,7 ± 2,9*	171,8 ± 2,4*	170,2 ± 2,4*	169,3 ± 1,1*	169,4 ± 2,3*	143,5 ± 4,9
Сэ—долж.	136,6 ± 1,6	149,1 ± 4,0*	148,9 ± 2,9*	149,9 ± 2,5*	154,2 ± 3,1*	155,4 ± 3,2*	137,5 ± 1,0
СМ, мс	104,8 ± 1,6	127,1 ± 2,8*	123,2 ± 2,0*	123,8 ± 2,5*	133,5 ± 0,9*	123,2 ± 1,9*	109,4 ± 1,9
СМ—долж.	106,5 ± 1,3	116,0 ± 3,1*	115,8 ± 2,2*	116,6 ± 2,0*	119,9 ± 2,4*	120,8 ± 2,5*	107,2 ± 0,8
Со, мс	128,2 ± 1,6	151,3 ± 2,5*	150,4 ± 2,5*	151,6 ± 3,1*	151,3 ± 2,8*	151,2 ± 2,6*	135,4 ± 3,2
Со—долж.	123,7 ± 1,5	135,8 ± 3,6*	135,4 ± 2,6*	136,6 ± 2,3*	140,7 ± 2,9*	141,8 ± 2,9*	124,6 ± 0,9
АС, мс	27,1 ± 1,6	28,2 ± 1,2	27,5 ± 1,8	27,8 ± 1,9	27,7 ± 1,2	27,9 ± 1,2	26,8 ± 2,3
ИС, мс	23,3 ± 1,0	28,8 ± 0,7*	32,1 ± 1,3*	31,4 ± 1,2*	30,3 ± 1,1*	31,3 ± 0,9*	29,6 ± 0,7*
Т, мс	50,4 ± 1,4	57,0 ± 1,3*	59,6 ± 1,9*	59,2 ± 1,7*	58,0 ± 1,6*	59,2 ± 1,6*	55,4 ± 1,5**
ФБИ, мс	34,3 ± 0,5	35,0 ± 0,9	36,7 ± 0,7*	37,4 ± 1,0*	38,5 ± 1,0*	37,9 ± 1,4**	32,8 ± 0,5**
ФМИ, мс	50,3 ± 1,1	59,3 ± 1,8*	54,1 ± 1,2**	55,1 ± 1,6**	54,8 ± 1,8**	54,3 ± 1,3**	49,6 ± 1,7
Е, мс	84,6 ± 1,8	94,3 ± 2,4*	90,8 ± 1,6*	92,5 ± 2,8**	93,3 ± 1,8*	92,2 ± 2,3*	82,4 ± 1,3
Е—долж.	85,8 ± 1,1	96,9 ± 2,6*	96,7 ± 1,9*	97,6 ± 1,6*	101,5 ± 2,1*	102,5 ± 2,1*	86,6 ± 0,6*
Р—О, мс	60,9 ± 0,9	64,1 ± 1,3*	65,7 ± 0,8*	67,3 ± 0,7*	69,5 ± 0,7*	71,4 ± 0,7*	78,6 ± 1,8*
СО, мл	1,43 ± 0,09	0,97 ± 0,09*	0,95 ± 0,08*	0,81 ± 0,04*	0,89 ± 0,03*	0,78 ± 0,05*	1,03 ± 0,07*
К	1,68 ± 0,1	1,65 ± 0,2	1,52 ± 0,2	1,56 ± 0,3	1,61 ± 0,1	1,54 ± 0,2	1,49 ± 0,3
ВСП	80,7 ± 0,7	74,2 ± 0,9*	73,7 ± 0,9*	74,7 ± 1,1*	69,8 ± 0,5*	74,0 ± 0,8*	75,3 ± 0,6
ИНМ	37,3 ± 0,1	37,7 ± 0,2	39,6 ± 0,3*	39,1 ± 0,2*	38,3 ± 0,1*	39,2 ± 0,2*	40,2 ± 0,1*
СИСО, мл/с	16,9 ± 0,6	10,3 ± 0,9*	10,5 ± 0,8*	8,8 ± 0,6*	9,5 ± 0,5*	8,6 ± 0,7*	12,5 ± 0,8*
МО, мл	382,2 ± 24,1	230,1 ± 21,3*	225,7 ± 19,0*	190,7 ± 9,4*	201,7 ± 6,8*	175,0 ± 11,2*	272,7 ± 18,9*
ЧСС, мин	267,3 ± 3,2	237,2 ± 6,4*	237,6 ± 4,6*	235,4 ± 3,9*	226,6 ± 4,6*	224,4 ± 4,6*	264,8 ± 2,0*

\* P &lt; 0,01

\*\* P &lt; 0,05



К достоверно не изменяются; Т, ИС, ИНМ увеличиваются, а СО, СИСО, ВСП, МО уменьшаются. Кроме того, с 30-й мин после ОАИ почти все выявленные в начале наблюдения изменения *З ч* держатся стабильно. При этом отчетливо проявляются межгрупповые различия: если в первой группе С, Сэ, См, Со, ФБИ и Е достоверно уменьшаются, то в группе с аритмиями эти же показатели увеличиваются.

Нет сомнений, что в целом изменения кардиогемодинамики при ОАИ средней тяжести имеет явную тенденцию к гиподинамии. Через 24 ч в обеих группах Т, ИС, ИНМ остаются достоверно увеличенными, а ФБИ, СО, МО и ВСП — сниженными. При этом должные величины Сэ, Со меньше, а Е — больше, чем реальные, что указывает на функциональную неполноценность миокарда.

Особо надо отметить, что у животных второй группы, в отличие от первой, прогрессивно уменьшается скорость атриовентрикулярного проведения (P-Q). Этот интервал даже через 24 ч больше, чем во время ОАИ. К тому же у этих животных наблюдаются признаки ишемии миокарда, а общая картина изменений

сердечной деятельности во многом схожая с так называемым синдромом «праздничного сердца» у людей [4]. Тот факт, что у людей аритмии чаще развиваются на другой день после выпивки, могут указывать на отсутствие прямого доказательства наличия острого аритмогенного действия Э у здоровых лиц [7]. Однако рассмотренные выше экспериментальные данные однозначно указывают на то, что в наркологической практике необходимо учитывать и мероприятия по профилактике сердечно-сосудистых осложнений при ОАИ.

В заключение следует подчеркнуть, что, несмотря на межгрупповое различие изменений ФССЛЖ у кроликов, при ОАИ средней степени тяжести развиваются сдвиги, свидетельствующие о снижении сократительной способности миокарда, которое полностью не восстанавливается и через сутки. Причины медленного восстановления нормальной фазовой структуры и качественно разных реакций ССС при ОАИ средней степени тяжести требует дальнейшего изучения, также как приемлемость использованной нами модели для клинической экстраполяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко В. Х., Фельдман С. Б. Клин. мед., 3, 3—11, 1986.
2. Месхишвили И. И. В сб.: Актуальные проблемы биологии и медицины. (Прил. 1 к журн. Изв. АН ГССР, сер. биол.), 1987, 147—152.
3. Сметнев А. С., Горгаслидзе А. Г. Кардиология, 12, 5—8, 1986.
4. Greenspon Arnold J., Schaal Stephen F. Ann. Intern Med., 2, 135—139, 1983.
5. Hepp A., Schier H., Kochsiek K. Z. Kardiol., 8, 533—538, 1982.
6. Hrbek Jan. Acta Univer. palock. olomuc. Fac. med., 197—208, 1985.
7. Luck Jerry C., Engel Toby R. Ann. Intern. Med., 2, 253—260, 1982.
8. Turmel J. Oues Med., 5—6, 89—95, 1986.

გოცვერების გულის მარცხენა კარკუჭის სისტოლის ფაზური სტრუქტურის ცვლილებები საშუალო სიმძიმის მწვავე ალკოჰოლური ინტოქსიკაციის დროს

ი. მისინიშვილი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ქრონიკული ცდების პირობებში 20 ბოცვერზე პოლიკარდიოგრაფიული კვლევით მიღებულმა მონაცემებმა საშუალო სიმძიმის მწვავე ალკოჰოლური ინტოქსი-

კაციის (მანი) დროს მოითხოვა ცხოველთა ორი ჯგუფის გამოყოფა: პირველი, სადაც 48% ეთანოლის (1,5 გ-კგ წონაზე) ინტრავენტური ან ინტრააორტალური შე-

ყვანა იწვევდა შედარებით ტაქიკარდიას, და მეორე, სადაც ანალოგიურ პირობებში ვითარდებოდა ბრადიკარდია და არიტმია (ბიგემინიის და ტრიგემინიის ტიპის ექსტრასისტოლები). გარდა ამისა, ამ ზღუდებში, პირველისაგან განსხვავებით, შეიმჩნევა ატრიოვენტრიკულური გამტარებლობის პროგრესული გახანგრძლივება და მიოკარდიუმის იშემიის ნიშნები. ორივე შემთხვევაში აღინიშნებოდა გულის მარცხენა პარკუჭის სისტოლის ფაზური სტრუქტურის სარწმუნო ცვლილებები;

კერძოდ, დაძაბულობის პერიოდის, იზომეტრული შეკუმშვის ფაზის კარდიუმის დაძაბულობის ინდექსის გაზრდა და სისტოლური მოცულობის, სისტოლური მოცულობის განდევნის სიჩქარის, შიდასისტოლური მაჩვენებლისა და წუთმოცულობის შემცირება. საყურადღებოა, რომ საშუალო სიმძიმის მანი-დან 24 საათის შემდეგ ჰიპოდინამიის ნიშნები კვლავ რჩება, თუმცა ნაკლებად არის გამოხატული.

## THE CHANGES OF THE LEFT VENTRICLE SYSTOLIC PHASE STRUCTURE DURING THE MIDDLE DEGREE OF ACUTE ALCOHOLIC INTOXICATION IN RABBITS

I. I. MESKHISHVILI

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

### Summary

In chronic experiments on rabbits changes in the systolic phase structure of the left ventricle, systolic volume and other indices of the function of cardiovascular system prior to and at different stages of i. v. and i. a. injection of 1.5g/kg ethanol were studied. According to the pattern of changes two groups of animals were distinguished which were characterized by the presence or lack of rhythm disturbance on the face of bradycardia or tachycardia, respectively. Common for both groups was an attenuation of contractibility of myocardium for more than 24h after acute alcoholic intoxication.

Statistically significant changes were observed in the systolic phase structure of the left ventricle, in particular, an increase in tension period, isometric contraction, tension index of myocardium and a decrease in the systolic volume, systolic volume exhaust velocity, intrasystolic index and minute volume of the blood.

In addition, in the group with arrhythmia some signs of ischemia of myocardium and a progressive lengthening of atrioventricular conduction were noted.

УДК 577.15

БИОХИМИЯ

## РАЗВИТИЕ В ТЕМНОТЕ ПРОЦЕССОВ ТРАНСПОРТА, АККУМУЛЯЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИТРАТА В ЛИСТЬЯХ ФАСОЛИ

Н. Дж. Гиунашвили

*Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 23.06.1987

Сопоставлены динамика развития транспорта нитрата в первичные листья фасоли и развитие процессов аккумуляции и восстановления нитрата в темноте. Показано, что несмотря на сходство и синхронность тенденций развития исследуемых процессов отсутствует непосредственная функциональная взаимосвязь между нитратвосстанавливающей активностью нитратредуктазы и процессом переноса нитрата.

Восстановление нитратов представляется частично совокупным с процессами их транспорта и аккумуляции [4]. Однако восприятие нитрата происходит независимо от функционирующей нитратредуктазы [6].

В представленной работе сопоставлены динамика транспорта нитрата в листьях фасоли с характером развития процессов аккумуляции и восстановления нитрата в темноте.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на первичных листьях ростков фасоли сорта «Кахури кути» (8 дней), выращенных в асептических условиях при температуре 27°C на модифицированной среде Шайва  $R_3C_3$  с набором микроэлементов по Хогленду [2]. Нитраты, входящие в состав питательной среды, заменяли аналогичными хлоридами. Восстановление нитрата исследовали *in vivo* по истечении 3 ч инкубации [1]. Нитратредуктазную активность блокировали, включая в состав питательной среды вольфрамат натрия (0,25

мМ). Содержание нитрата при исследовании его транспорта определяли в листьях, фиксированных при 100°C в течение 30 мин. Содержание аккумулярованного нитрата определяли по истечении 8 ч темновой экспозиции ростков на основной (безнитратной) питательной среде. Аккумуляцию вычисляли по показателю роста содержания нитрата в 4-часовых интервалах. Нитрат определяли нитрированием салициловой кислоты [5]. Данные обрабатывали, руководствуясь критериями достоверности по Стьюденту [3].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении 48 ч экспозиции в темноте изменения базальной активности нитратредуктазы (НР) не наблюдали. С началом экспозиции на нитратной среде нитратредуктазная активность (НРА) возрастает до 6 ч

преинкубации и далее снижается (рис .1). В отсутствие нитрата в питательной среде содержание его в листьях не превышает границ погрешности измерения. В листьях ростков, экспонированных на среде, со-

державшей нитрат, количество находящегося в ткани нитрата постепенно возрастает, что свидетельствует о функционировании механизма его

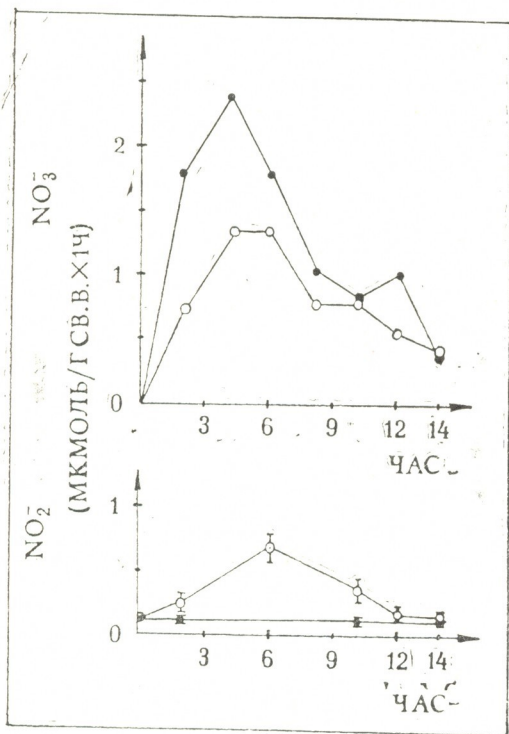


Рис. 1. Аккумуляция и восстановление нитрата в темноте в первичных листьях фасоли в течение экспозиции на среде, содержащей 50 мМ нитрата калия (светлые кружки—объект с активной, тёмные—с блокированной нитратредуктазой

транспорта (рис. 2). Таким образом, развитие нитратного метаболизма в условиях нашего опыта сопряжено с процессом транспорта нитрата. Однопиковая кинетика развития НРА, видимо, обусловлена включением индуктивного механизма синтеза энзима и дальнейшим балансированием процессов de novo синтеза и распада НР [4].

В отсутствие нитратного метаболизма накопление нитрата в ткани отражает процесс его транспорта. Исходя из этого, динамику переноса нитрата изучали блокируя нитратвосстанавливающую активность нитратредуктазы — ключевого энзима на пути ассимиляции нитрата [4]. В ростках с блокированной НР поступление нитрата в листья не прекращается (рис. 1,2). Таким образом,

функциональная зависимость переноса нитрата от НРА в исследуемом объекте не прослеживается. В отсутствие НРА накапливается больше нитрата, чем в контрольном варианте (рис. 2). Соответственно, процессы аккумуляции и восстановления нитрата конкурируют по субстрату. Таким образом, интенсивность аккумуляции зависит не только от количества субстрата, проникающего в ткань, но и от интенсивности нитратного метаболизма. НРА, в свою очередь, регулируется током нитрата, направленным из симпласта в апопласт [7]. Нитратный флюкс определяет также и количество поступающего в ткань нитрата. Таким образом, транспорт нитрата является фактором, регулирующим как интенсивность метаболизирования нитрата, так и его аккумуляцию. Развитие процессов транспорта нитрата, его аккумуляции и восстановления происходит сходным образом и почти полностью синхронно (рис. 1). Вероятно, общность регуляции аккумуляции и восстановления нитрата определяет аналогичность их развития, несмотря на антагонизм этих процессов.

По истечении 24 часов экспозиции на нитратной среде содержание нитрата во всех опытных вариантах изменяется весьма незначительно. Соответственно, количество транспортируемого в листья нитрата резко сокращается (рис. 1,2). Одновременно снижаются аккумуляция нитрата и НРА (рис. 1). Не исключено существование внутриклеточного механизма контроля поступления нитрата, лимитирующего перенос субстрата и тем самым регулирующего метаболизм нитрата и процесс его аккумуляции.

На основании представленных данных мы полагаем, что общность регуляции процессов восстановления и аккумуляции нитрата обуславливает сходство тенденций их развития с динамикой развития транспорта нитрата. Поступление же нитрата в листья фасоли осуществляется независимо от нитратвосстанавливающей активности нитратредуктазы.

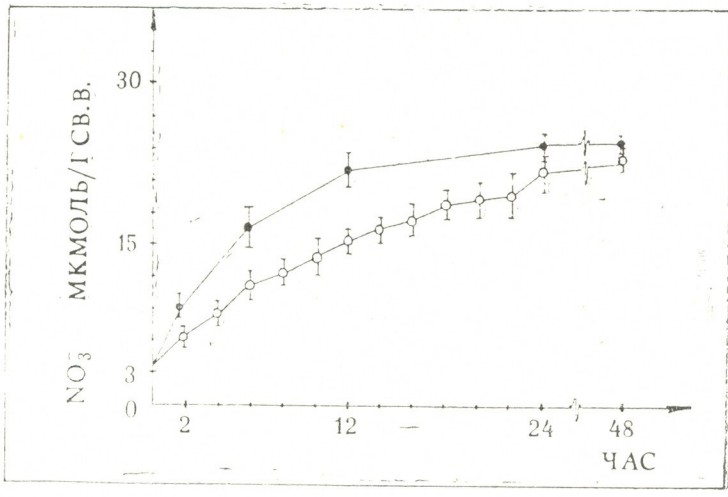


Рис. 2. Накопление нитрата в темноте в первичных листьях фасоли в течение преникубации на среде, содержащей 50 мМ нитрата калия (светлые кружки — объект с активной, тёмные — с блокированной нитратредуктазой)

ЛИТЕРАТУРА

1. Гиунашвили Н. Дж., Нуцубидзе Н. Н. Изв. АН ГССР, Сер. биол., 12, 3, 178—184.
2. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений, «Наукова думка», Киев, 1973, 28—53.
3. Чернавина И. А., Потапов Н. Г., Косулина Л. Г., Кренделева Т. Е. Большой практикум по физиологии растений, «Высшая школа», М., 1978, 184—201.
4. Butz R. G., Jackson W. A. Phytochemistry, 16, 409—417, 1977.
5. Cataldo D. A., Haroon M., Schrader L. E., Joungs V. L. Commun. Soil Sci. and Plant Anal., 6, 71—80, 1975.
6. Dean - Drummond C. E. Jacobsen E. Plant Science, 46, 169—173, 1986.
7. Shaner D. L., Boyer J. S. Plant Physiol., 508, 499—504, 1976.

ლობიოს ფოთლებში ნიტრატების ტრანსპორტის, აკუმულაციისა და აღდგენის პროცესების განვითარება სიბნელეში

6. ბიუნაშვილი

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მეცნარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

სინქრონულად იქნა შესწავლილი ნიტრატების ტრანსპორტის, აკუმულაციისა და აღდგენის პროცესები ლობიოს ფოთლებში. ნაჩვენებია, რომ ნიტრატების

ტრანსპორტი არ არის დამოკიდებული ნიტრატრედუქტაზას ნიტრატალმდგენელ აქტივობაზე.



DEVELOPMENT OF THE NITRATE TRANSPORT, ACCUMULATION AND REDUCTION IN BEAN LEAVES IN DARKNESS

N. J. GIUNASHVILI

Institute of Plant Biochemistry, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The processes of the nitrate transport, accumulation and reduction were studied synchronously in the dwarf bean leaves. The nitrate transport was shown not to depend on the nitrate reducing activity of nitrate reductase.



УДК 612.822.1

БИОХИМИЯ

## ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ, ГЛИАЛЬНОЙ И СИНАПТОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЦЫПЛЯТ ПРИ ИМПРИНТИНГЕ

Н. Д. Джапаридзе

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

Поступила в редакцию 17.12.1986

Методом меченых предшественников белкового синтеза изучен синтез белка в нервной, глиальной и синаптосомальной фракциях вентромедиальной части полосатого тела конечного мозга цыплят при монокулярном импринтировании (запечатлевании).

Показано, что через 30 мин после импринтирования нервные и глиальные клетки, а также синаптические окончания «обученного полушария» характеризуются высоким уровнем белкового синтеза по сравнению с «необученным полушарием».

Наибольшая интенсивность белкового синтеза наблюдается в глиальной и синаптосомальной фракциях «обученного полушария».

Импринтинг является особым видом памяти, которая формируется на самой ранней стадии постнатального развития и характерна для различных представителей птиц и млекопитающих. Сущность импринтинга заключается в установлении связи животного в определенный период жизни с объектом внешней среды и проявляется в реакции следования за этим объектом [12]. Этот вид памяти наиболее доступен для изучения у выводковых, зреловылупляющихся птиц, где контакт с объектом импринтирования не сопровождается каким-либо подкреплением [15].

Изучение процесса запечатлевания у цыплят обнаружило ведущую роль нервных клеток вентромедиальной части полосатого тела конечного мозга [22].

По данным биохимических исследований при запечатлевании происходит возрастание активности ацетилхолинэстеразы [20], изменение в метаболизме биогенных аминов [16], а также циклического аденозинмонофосфата и некоторых мембранных ферментов [17], изменение распреде-

ления определенных фракций как водорастворимых, так и мембранных белков [6, 7]. Изучение характера распределения фракции белков синаптосомальных мембран конечного мозга импринтированных цыплят обнаружило изменения в определенных группах белков. Одним из них является холинорецепторный белок [9].

При монокулярном запечатлевании у цыплят в «обученном полушарии» (полосатое тело) по сравнению с «необученным» резко усиливается РНК-полимеразная активность клеточных ядер головного мозга [5]. Применение методов интерферометрии и цитофотометрии обнаружило значительное увеличение сухого веса и количества цитоплазматической РНК нервных и глиальных клеток «обученного полушария» при монокулярном импринтировании [3, 4].

Следовательно, изучение метаболизма нервной ткани вентромедиальной части полосатого тела цыплят при запечатлевании выявило изменения в обмене белков, а также различных биологически активных веществ, ответственных за синаптические

скую передачу, что в свою очередь, очевидно, связано с изменением интенсивности синтеза белка как в нервных и глиальных клетках, так и синаптических окончаниях. Исходя из этих данных целесообразно изучить синтез белка в нервных и гли-

альных клетках, а также синаптических окончаниях методом меченых предшественников белкового синтеза. Для этой цели в настоящей работе был применен гидролизат белка, являющийся смесью различных аминокислот, меченных по  $^{14}\text{C}$ .

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на цыплятах породы белый леггорн. Следует отметить, что для монокулярного импринтирования цыпленка представляют собой удобный объект, так как у них имеется полный перекрест зрительных нервов в хиазме — каждый глаз связывается только с контралатеральным полушарием [2]. Кроме того, Р. С. Рижинашвили с соавт. [13, 14] установили, что у цыпленка при монокулярном импринтировании до 8—13-го дня жизни не происходит передача следов памяти из «обученного полушария» в «необученное». Эти данные указывают на то, что в ранний период жизни у цыпленка, из-за недоразвития комиссуральной системы, мозговые полушария функционируют раздельно. Эти особенности позволяют использовать каждое животное в качестве контроля при монокулярном запечатлевании. Поэтому исследования, проводимые на цыплятах, дают возможность изучить различия, возникающие между «обученным» и «необученным полушарием» в пределах одного индивида.

В наших опытах за день до вылупления яйцо изолировалось с целью устранения неспецифических побочных раздражений. Цыпленка монокулярно импринтировали в пик чувствительного периода (13—17 часов после вылупления) в аппарате Гесса [12]. Во время монокулярного импринтирования «контрольный глаз» спереди и сбоку был заклеен черной бумагой так, что цыпленок этим глазом не имел возможности видеть импринт-объект, но сверху и сзади глаз хорошо освещался. Импринт-объектом служил красный шар диаметром 18 см, который вращался на манеже аппарата по кругу.

До введения  $^{14}\text{C}$ -гидролизата белка его упаривали и растворяли в 0,9%-ном  $\text{NaCl}$ , так что каждый 1 мкл содержал 5 мккюри радиоактивности.

$^{14}\text{C}$ -гидролизат белка в количестве 1 мкл вводили отдельно в каждое полушарие. Продолжительность пульсового мечения составляло 30 мин. После взятия материала ткань замораживали в жидком азоте.

Механическая диссоциация ткани проводилась по методу Розе и др. [25], фракционирование ткани — с использованием ступенчатого градиента сахарозы, который состоял из следующих фракций: 0,4 мл 2М сахарозы и по 0,8 мл 1,45, 1,25, 1,0, 0,8 М сахарозы; центрифугирование — в течение 75 мин при 90000 g. Несмотря на то, что глиальная и нейрональная фракции после центрифугирования концентрировались на интерфазе 1,45—1,25 и 2,0—1,45 М сахарозы, наличие остальных ступеней сахарозного градиента являлось необходимым для чистоты указанных фракций. Идентификацию полученных фракций осуществляли под визуальным контролем. К полученным фракциям добавляли холодную трихлоруксусную 50%-ную кислоту (ТХУ), с таким расчетом, что конечная концентрация ТХУ в образце составляла 10%. Полученные фракции гомогенизировали и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Полученный осадок несколько раз промывали в 10%-ной ТХУ. Осадок растворяли кипячением в 1%-ном додецилсульфате  $\text{Na}$ , 50 мМоль трис- $\text{HCl}$ , рН-8,0 и вносили в диоксановую сцинтилляционную смесь. Радиоактивность пересчитывали с учетом тушения по специальной программе на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-4000. Результаты пересчитывали на  $\text{dpm}/\text{mg}$  белка.

Выделение синаптосомальной фракции проводили по методу Дода и др. [21]. Полученный синаптосомальный осадок растворяли в 1%-ном ДДС —  $\text{Na}$  при 37°. Определение включенной радиоактивности в синаптосо-

мальной фракции проводили следующим образом: к 5 мкл образца добавляли 100 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (1 мг на 1 мл) и 1 мл 10%-ной ТХУ, центрифугировали, осадок промывали дважды в 10%-ной ТХУ. Полученный осадок растворяли в 0,5 мл раствора 1%-ного ДДС—Na при 60°C и вносили в диоксановую сцинтилляционную смесь. Радиоактивность определялась по вышеуказанному способу. Для определения количества белка в случае нейрональной и глиальной фракции использовались образцы ТХУ-осадка, растворенного в ДДС—Na.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показали, что синтез белка *de novo* через 30 мин после импринтирования в нейрональной фракции «обученного полушария» на 21% выше, чем в «необученном полушарии». В глиальной фракции этот показатель равен 120%, что указывает на более сильную активацию синтеза белка в глиальных клетках «обученного полушария», чем в нерв-

При изучении синапсомальной фракции образцом служили ДДС—Na растворимые мембранные белки. Белок в обоих случаях определялся по модификации метода Лоури [24] для препаратов, содержащих ДДС—Na.

Экспериментальная группа состояла из 12 цыплят. Число параллельных измерений было не менее шести. Результаты обрабатывались статистическим методом неравнозначных измерений. Достоверность различий и уровень значимости определяли по распределению Стьюдента для малых выборок. Во всех случаях  $p < 0,001$ .

сокий уровень синтеза белка — на 46,1% выше контрольного уровня (рис. 1, 5, 6). По количеству новосинтезированного белка эта фракция превосходит фракции нервных и глиальных клеток «обученного полушария» (129400 dpm/мг белка).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при монокулярном запечатлевании в нервных и глиальных

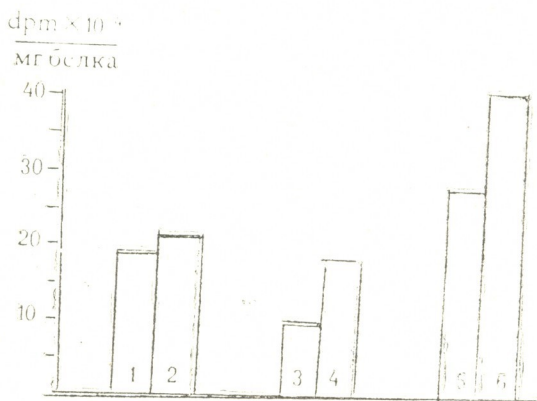
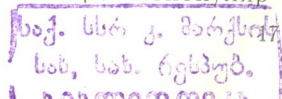


Рис. 1. Синтез белка *de novo* в нейрональной (1, 2), глиальной (3, 4), синапсомальной (5, 6) фракциях вентромедиальной части полосатого тела монокулярно импринтированных цыплят через 30 мин после облучения: 1, 3, 5 — левое «необученное полушарие»; 2, 4, 6 — правое «обученное полушарие»

ных клетках. Кроме того, количество новосинтезированного белка в глиальных клетках «обученного полушария» превосходит тот же параметр в соме нейрона (104130 > 41532 dpm/мг белка) — рис. 1-1, 2, 3, 4.

В синапсомальной фракции «обученного полушария» через 30 мин после импринтирования отмечается вы-

клетках «обученного полушария» в течение 30 мин после импринтирования происходит усиление синтеза белка. По данным литературы при запечатлевании наблюдается возрастание включения меченых предшественников в суммарный белок и РНК мозга [22]. Кроме того, нами было также показано, что при монокуляр-



ном запечатлевании в нервных и глиальных клетках «обученного полушария» происходит усиление белкового метаболизма: сухой вес нейронов увеличивается на 58%, а глиальных клеток — на 55% [3], количество цитоплазматической РНК возрастает на 260% по сравнению с нервными клетками «необученного полушария» [4].

Таким образом, полученные нами данные об увеличении синтеза белков головного мозга импринтированных цыплят соответствуют данным литературы. Нами показано, что в нейрональной фракции «обученного полушария» монокулярно импринтированных цыплят через 30 мин после обучения интенсивность синтеза белка значительно выше, чем в «необученном полушарии». В то же время нами обнаружено, что в глиальной фракции интенсивность синтеза и количество новосинтезированного белка значительно выше, чем в нейрональной фракции «обученного полушария» цыплят. Существующие представления о нейро-глиальных взаимоотношениях [11] позволяют заключить, что при импринтинге, также как и при других видах функциональной нагрузки, метаболические сдвиги, происходящие в глиальных

клетках, наряду с изменениями в нервных клетках и синаптических окончаниях способствуют консолидации следов памяти.

Как известно, синаптические окончания являются основным местом приложения изменений, связанных с формированием энграммы. При запечатлевании эти изменения выражены в усилении синтеза гликопротеинов [18], мембранных ферментов [17], определенных групп белков [6, 7], а также в увеличении протяженности активной зоны синапса [26].

Полученные нами данные указывают на интенсивный синтез белка в синаптосомальной фракции. По количеству новосинтезированного белка эта фракция превосходит остальные две. Следовательно, при монокулярном импринтинге в синаптических окончаниях вентромедиальной части полосатого тела цыплят через 30 мин после импринтирования интенсивность синтеза белка значительно выше, чем в соме нервных и глиальных клеток, что еще раз указывает на важную роль синаптических окончаний при формировании и закреплении следов образной долговременной памяти.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алексидзе Н. Г. Успехи нейрохимии, «Наука», Л., 1974, 132—181.
2. Бехтерев В. М. Избр. произв., М., 1954, 23.
3. Джапаридзе Н. Д., Рижинашвили Р. С., Сванидзе И. К., Мосидзе В. М., Марсагишвили Г. А. Сообщения АН ГССР, 104, 1, 190—191, 1981.
4. Джапаридзе Н. Д., Рижинашвили Р. С., Сванидзе И. К., Мосидзе В. М., Марсагишвили Г. А. Сообщения АН ГССР, 121, 2, 409—412, 1986.
5. Джохадзе Д. И., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А., Джохадзе Л. Д. Сообщения АН ГССР, 103, 2, 457—459, 1981.
6. Заалишвили Э. А., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщения АН ГССР, 97, 1, 181—183, 1980.
7. Заалишвили Э. А., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщения АН ГССР, 97, 1, 705—707, 1980.
8. Казахашвили М. Р. Цитология, 16, 8, 988—992, 1974.
9. Клейн Е. Э., Гвалия Н. В. Нейрохимия, 4, 1, 16—22, 1985.
10. Клементьев Б. И., Гринкевич Л. Н., Глущенко Г. С., Репин В. С., Певзнер Л. З. ДАН СССР, 221, 1, 243—246, 1973.
11. Певзнер Л. З. В сб.: Функция нейроглии, Тбилиси, 1979, 251—259.
12. Понугаева А. Г. Импринтинг (Запечатывание), Л., «Наука», 1973.
13. Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Мат. всес. конф. «Функциональная асимметрия и адаптация человека», М., 1976, 291.
14. Рижинашвили Р. С. 13-й съезд всес. физиол. общества им. И. П. Павлова, 1, Л., 1979, 12.
15. Слоним А. Д. Среда и поведение, Л., «Наука», 1970.



16. Соломонья Р. О., Собчинская Н. М., Заалишвили Э. М. Всес. симп. «Нейрохимические механизмы регуляции памяти», Пушкино, 1984, 35.

17. Собчинская Н. М., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщения АН СССР, **102**, 2, 461—463, 1981.

18. Соломонья Р. О., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, **3**, 5, 197—203, 1986.

19. Филипченко Р. Е., Певзнер Л. З., Слоним А. Д. ДАН СССР, **233**, 1, 252—255, 1975.

20. Charouthier G. La Recherche, **83**, 994, 1977.

21. Dodd P. R., Hardy J. A., Oakley A. E., Edwardson J. A., Perry E. H., Delaunoy J. P. Brain Research, **226**, 107—118, 1981.

22. Horn G. Гарские беседы, 7, Тбилиси, 1979, 246—266.

23. Hyden H., Lange P. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **65**, 4, 898—904, 1970.

24. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randal R. A. J. Biol. Chem., **193**, 265—275, 1961.

25. Rose S. P. R. Biochem. J., **102**, 33—43, 1967.

26. Rose R., Horn G. Exp. Brain Res., **5**, 105—116, 1981.

ცილის სინთეზი ფიზიოლოგიის თავის ტვინის ნერვულ, გლიურ და სინაპტოსომურ ფრაქციებში იმპრინტინგის დროს

5. ჯაპარიძე

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

რეზიუმე

შესწავლილია ცილის სინთეზი იმპრინტირებული წიწილების თავის ტვინის ნერვულ, გლიურ და სინაპტოსომურ ფრაქციებში.

ცილის სინთეზის მკვეთრი გაძლიერება აღინიშნება როგორც ნერვულ, ასევე გლიურ და განსაკუთრებით სინაპტოსომურ ფრაქციებში.

THE PROTEIN SYNTHESIS IN NEURAL GLIAL AND SYNAPTOSOMAL FRACTIONS OF CHICK BRAIN DURING IMPRINTING

N. D. JAPARIDZE

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

S u m m a r y

The protein synthesis in neural, glial and synaptosomal fractions of chick brain was studied during imprinting.

sis was observed not only in neural, but also in glial and especially in synaptosomal fractions.

A sharp increase of protein synthe-

УДК 630.453.793.2 : 630.174.754

ЭНТОМОЛОГИЯ

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИИ РЫЖЕГО СОСНОВОГО ПИЛИЛЬЩИКА ПО ГЕМОЛИМФЕ

М. С. Чкоидзе

*НИИ горного лесоводства им. В. З. Гулисанвили  
 Министерства лесного хозяйства ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 17.12.1986

Излагаются результаты гематологического исследования рыжего соснового пилильщика в норме и при патологии. Подробно изучены клеточный состав и количественное соотношение форменных элементов гемолимфы. Показано, что изменения состава гемолимфы рыжего пилильщика достаточно объективно характеризуют уровень физиологического состояния вредителя. По показаниям гемолимфы установлено, что популяция рыжего пилильщика, обитающего в Западной Грузии (Орджоникидзевский лесхоз), обладает высокой жизнеспособностью по сравнению с популяцией рыжего пилильщика, обитающего в Восточной Грузии (окрестности г. Тбилиси). Эти данные позволяют планировать определенный режим для борьбы с этим вредителем.

Вредные лесные насекомые наносят большой ущерб лесному хозяйству. Проводимая с вредителем борьба химическим методом требует больших затрат народнохозяйственных средств и вызывает опасность загрязнения окружающей среды остатками пестицидов.

В литературе имеются данные о том, что существует вполне опреде-

ленная связь между гематологическими показателями и жизнеспособностью популяции [1, 2, 3, 4, 8].

Использование гематологического метода стало необходимым для определения физиологического состояния вредителя, чтобы в зависимости от этого проводить интегрированную борьбу с ним в различных ареалах его распространения.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью выяснения физиологического состояния разных популяций рыжего пилильщика исследование проводилось в течение 3 лет (1982—1984 гг.), главным образом в трех очагах его размножения, расположенных в Западной и Восточной Грузии.

Для сравнения физиологического состояния популяций рыжего пилильщика в отдельные годы (1982, 1983, 1984) были собраны личинки III—IV—V возрастов вредителя в одних и тех же участках Западной (Орджоникидзевский лесхоз вблизи сел Баби и Молити) и Восточной (окрестности г. Тбилиси) Грузии.

В работе была использована методика приготовления мазков гемолимфы, описанная Сиротиной [5]. Личинке пилильщика препаравальной или энтомологической иглой наносился легкий укол. Выступившая капля крови помещалась на предметное стекло и растягивалась по его поверхности покровным стеклом, поставленным к предметному стеклу под углом 45°. Мазки высушивались на воздухе 5—10 мин в зависимости от температуры воздуха и фиксировались 96° спиртом в течение 15 мин. После фиксации они окрашивались

по Гимза-Романовскому в течение 30 мин.

Лейкоцитарная формула определялась из расчета количества каждого типа форменных элементов на 100 клеток крови.

Помимо изучения особенности структуры гемоцитов на разных стадиях развития пилильщика, определялся процентный состав форменных

элементов — гемограмма с использованием специальной камеры подсчета клеток крови.

Мы изучали количественный и качественный состав гемоцитов пилильщика у особей здоровых и с различными отклонениями от нормы, чтобы выяснить возможность использования гематологического метода для прогноза численности вредителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования состава форменных элементов гемолимфы рыжего пилильщика показали, что среди них обнаруживаются пролейкоциты, макронуклеоциты, микронуклеоциты, фагоциты, базофилы, эноцитойды и мертвые клетки. К существенным особенностям форменного состава гемолимфы личинок пилильщика следует отметить отсутствие в цитоплазме эозинофилов и жировых включений.

Выявленные типы гемоцитов находятся в динамичном количественном соотношении. В зависимости от возраста личинок пилильщика и многих других причин это соотношение является нестабильным.

Гемограмма здоровых особей пилильщика приведена в табл. 1.

цитойдов и базофилов). В гемолимфе здоровых личинок пилильщика отмирающие клетки немногочисленны.

При сравнении составов гемолимфы популяций 1982 г., обитающих в Западной и Восточной Грузии, выявляется преимущественное увеличение числа мертвых клеток в популяциях, характерных для Восточной Грузии — от 2,1 до 16,3% (табл. 2). Можно предположить, что это увеличение связано с малым накоплением питательных веществ в жировом теле пилильщика, что снижает жизнеспособность насекомого [6, 7].

Основным характерным признаком гемограмм популяций Восточной Грузии является также очень низкий темп кроветворения, о чем свидетельствует малый процент родоначальных

Таблица 1

Гемограмма здоровых личинок III—IV—V возрастов рыжего соснового пилильщика

Соотношение гемоцитов в %

Возраст	Пролейкоциты	Макронуклеоциты	Микронуклеоциты	Фагоциты	Эноцитойды	Базофилы	Мертвые клетки
Личинки III возраста	12,6	36,0	26,2	13,4	4,2	5,1	2,5
Личинки IV возраста	8,5	25,1	37,6	14,5	6,2	5,3	1,8
Личинки V возраста	6,1	20,2	40,4	19,2	8,00	7,2	0,9

Из таблицы видно, что процентное соотношение числа форменных элементов меняется в зависимости от возраста личинок пилильщика. В процессе развития отмечается уменьшение числа молодых гемоцитов (пролейкоцитов и макронуклеоцитов) и увеличение числа зрелых клеток (микронуклеоцитов, фагоцитов, эно-

клеток — пролейкоцитов — 5,9% в Восточной Грузии и 10,2% в Западной Грузии. Заметно снижена защитная способность организма пилильщика. Число фагоцитов составляет 10,3 и 18,0% соответственно (табл. 2).

На основании гематологического анализа 1982 г. в окрестностях горо-



1619353000  
08-0000

да Тбилиси была установлена слабая жизнеспособность вредителя.

Эти данные позволили сделать вывод о депрессивном состоянии популяции вредителя в Восточной Грузии. Прогноз оправдался. В 1983—1984 гг. очаг пилильщика в Восточной Грузии почти полностью затух.

В связи с тем, что в 1983—1984 гг. в Западной Грузии вблизи селений Баби и Молити отмечалось массовое размножение пилильщика, было продолжено гематологическое исследова-

ские изменения в гемолимфе вредителя вызваны паразитами.

Результаты последующих двухлетних исследований гемолимфы популяций вредителя Западной Грузии показали общую тенденцию к снижению числа незрелых и трофического характера гемоцитов и, наоборот, увеличению числа мертвых и защитных клеток.

Вышеперечисленные результаты исследований свидетельствуют о том, что у личинок пилильщика сокраща-

Таблица 2

Гемограмма личинок III—IV—V возрастов рыжего соснового пилильщика на 1982 г.

Место взятия материала	Соотношение гемоцитов в %							
	Возраст	Пролейкоциты	Макронуклеоциты	Микронуклеоциты	Фагоциты	Эноциты	Базофилы	Мертвые клетки
Западная Грузия	личинки							
	III	25,1	13,3	30,1	18,0	7,2	4,2	2,1
Восточная Грузия	возраста	17,5	16,1	28,2	10,3	8,5	3,1	16,3
Западная Грузия	личинки							
	IV	10,2	12,2	36,1	20,1	8,1	8,2	5,1
Восточная Грузия	возраста	5,9	14,1	30,7	17,1	12,1	5,2	15,9
Западная Грузия	личинки							
	V	8,1	10,8	40,9	23,2	9,2	5,9	1,9
Восточная Грузия	возраста	4,8	7,9	34,1	19,2	12,5	4,5	14,9

ние для установления физиологического состояния популяций вредителя, обитающего в этих местностях.

Несмотря на высокую численность вредителя и отсутствие внешних изменений, в гемолимфе всех личинок наблюдались патологические изменения, выраженные в той или иной степени: среди фагоцитов преобладали активные формы; микронуклеоциты измельченные, постоянно встречались кучки клеток, чаще всего макронуклеоциты. Несмотря на сильную защитную реакцию организма, в гемолимфе не удалось обнаружить каких-либо признаков вирусного, бактериального или грибного заболевания. Только замедленный рост личинок в очаге и обнаружение в мазках гемолимфы измельченных микронуклеоцитов дали возможность предположить, что в некоторой степени патологиче-

ется темп кроветворения, интенсифицируется защитная реакция организма, а затем наступает неминуемая гибель клеток. Подобное состояние гемолимфы подтверждает сильное ухудшение физиологического состояния рыжего пилильщика и депрессию.

На основании гематологических исследований, проведенных 1982—1984 гг., несмотря на высокую численность вредителя, мы считали целесообразным проводить химическую борьбу против рыжего соснового пилильщика, обитающего вблизи селений Баби и Молити (Западная Грузия). Прогноз в последующие годы подтвердился.

Таким образом, гематологический метод вполне может быть применен с целью прогнозирования численности рыжего соснового пилильщика.



ЛИТЕРАТУРА

1. Зелинская Л. М. Вестник зоол., I, 38—42, 1973.
2. Козловская В. И. Зап. Ленинградского с/х ин-та, 212, 52—55, 1981.
3. Лаппа Н. В. Защита растений, 4, 4, 22—28, 1949.
4. Сиротина М. И. В кн.: Надзор, учет и прогноз массовых размножений хвой и листогрызущих насекомых, М., 1965, 137—170.
5. Сиротина М. И. Доклады ВАСХНИЛ, 4, 22—28, 1949.
6. Чкоидзе М. С. Изв. АН ГССР, сер. биол., 3, 252—258, 1977.
7. Чкоидзе М. С. Сообщения АН ГССР, 61, I, 457—462, 1971.
8. Barracco Margherita Anna, Netto Cestari Antonio. Rev. Bras. Genet., 7, 3, 477—495, 1984.

ფიჭვის ქარცი ხერხიას კოპულაციების მდგომარეობის  
შეფასება ჰემოლიმფის მიხედვით

მ. ჭკოიძე

საქართველოს სსრ სატყეო მეურნეობის სამინისტროს ვ. გულისაშვილის სახელობის სამთო მეტყევეობის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

შესწავლილ იქნა ფიჭვის ქარცი ხერხიას ჰემოლიმფის უჯრედული შემადგენლობა ნორმასა და პათოლოგიაში. ჰემოლიმფის მორფოლოგიური სურათით დადგენილია დასავლეთ და აღმოსავლეთ სა-

ქართველოში გავრცელებული პოპულაციების ფიზიოლოგიური მდგომარეობა.

ჰემატოლოგიური მეთოდის გამოყენება პერსპექტიულია მავნებლის მასობრივი გამრავლების პროგნოზირებასთან დაკავშირებით.

STUDY OF NEODIPRION SERTIFER GLOFER POPULATION  
CONDITION ACCORDING TO HEMOLYMPH

M. S. CHKOIDZE

V. Z. Gulisashvili Institute of Mountain Forestry, Georgian Ministry of Forestry,  
Tbilisi, USSR

S u m m a r y

The hemolymph cellular content was studied in Neodiprion sertifer Glofer in norm and pathology and by hemolymph analysis the physiological condition of populations in Western and Eastern Ge-

orgia was determined. It is proposed that the hematological method be used for the prognostics of dynamics of the pest population.

УДК 616.831/32—002.5—097.3:616—002.155—097.3

ИММУНОЛОГИЯ

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНРЕАКТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ В ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОМ МЕНИНГИТЕ

Н. В. Гогбашвили, И. Г. Гветадзе

*Республиканский НИИ туберкулеза МЗ ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 24.12.1986

Изучены основные показатели Т- и В-систем иммунитета и субпопуляции антигенреактивных («иммунных») лимфоцитов в цереброспинальной жидкости у больных туберкулезным (60) и серозным (35) менингитом нетуберкулезной этиологии.

Установлен количественный дефицит Т-лимфоцитов и увеличение показателей клеток, ответственных за антителообразование. При этом раскрыт специфический характер нарастания субпопуляции лимфоцитов с рецепторами к микобактериям в цереброспинальной жидкости при туберкулезном менингите. Представлены закономерности изменения антигенреактивных лимфоцитов в цереброспинальной жидкости при туберкулезном менингите в зависимости от течения процесса при лечении и исходе заболевания.

Туберкулез мозговых оболочек и мозга до сего времени остается грозным заболеванием нервной системы, которое нередко сопровождается тяжелыми осложнениями, особенно при поздно начатом лечении. Многообразие клинических и морфологических изменений при туберкулезном менингите, частота атипичных случаев осложняют своевременную диагностику и прогнозирование заболевания.

Применяемые методы дифференциальной диагностики туберкулезного менингита имеют недостатки (низкая информативность, длительность получения результатов, сложность воспроизведения и т. д.), и их использование в практике является вынужденным ввиду отсутствия равных по простоте и информативности или даже превосходящих альтернативных методов [3, 5, 10, 11].

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лимфоциты выделяют из ЦСЖ. 5—6 мл ЦСЖ центрифугируют при 200 g в течение 10 мин, верхний слой удаляется и остается 1,0 мл

Поэтому изыскание высокоинформативных специфических иммунологических тестов диагностики этого заболевания, доступных для широкого практического применения, представляет важнейшую задачу практической медицины.

В Республиканском НИИ туберкулеза МЗ ГССР разработан способ иммунодиагностики туберкулезного менингита, коренным образом отличающийся от наиболее широко используемых в настоящее время бактериологических, биологических и иммунологических методов.

Способ основан на установленной авторами закономерности изменения антигенреактивных («иммунных») лимфоцитов в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при менингитах специфической и неспецифической этиологии.

В оставшейся жидкости определяется количество лимфоцитов, которое обычно превышает 600—1500 в 1 мкл (т. е.  $6—15 \times 10^5$  кле-

ток в 1 мл). Параллельно готовится 4%-ная суспензия бараньих эритроцитов; эритроциты смешивают (в равных объемах) с раствором танина (1:30 000) и инкубируют 30 мин при 37°C. После отмывания эритроциты ресуспендируются в фосфатном буфере рН 6,4 и конъюгируются с антигеном в соотношении 1:2. Смесь инкубируется при температуре 37°C 45 мин (сенсibilизация), затем эритроциты отмываются дважды и готовится 0,5%-ная суспензия на среде 199.

Равные объемы (по 0,1 мл) лимфоцитов и 0,5% танинообработанных эритроцитов, нагруженных антигеном, инкубируют 30 мин при 37°C, а затем центрифугируют при 200 г 5 мин. Надосадочная жидкость удаляется; наслаивается 0,05 мл 0,6%-ного охлажденного раствора глютарового альдегида и выдерживается при комнатной температуре. Через 20 мин добавляется 1,0 мл дистиллированной воды, раствор центрифугируется при 200 г 5 мин и из осадка готовят мазки, которые после фиксации метиловым спиртом окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Уровень Т-лимфоцитов определяли методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) по Джондаллу [12], В-лимфоцитов — методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами мыши (мЕ-РОК) по Купку и Греко [8].

Предметом наших иммунологиче-

ских исследований являлась ЦСЖ, так как при менингитах туберкулезной и нетуберкулезной этиологии изменения показателей Т- и В-систем иммунитета в ЦСЖ не зависят от изменения уровня указанных показателей в крови [4, 7, 9].

Иммунологические исследования проводились всем больным при поступлении, через 1—1,5 месяца и после окончания лечения (2,5—3,5 месяца). Всего было исследовано 60 больных туберкулезным менингитом и, для контроля, 35 больных серозным менингитом.

В зависимости от клинического проявления процесса больные туберкулезным менингитом были разделены на 3 группы.

В первую группу вошли больные (14 случаев) с относительно легким течением болезни (средней тяжести).

Вторую группу составили больные (35 случаев) с тяжелым клиническим течением заболевания и с благоприятным исходом.

А в третью группу были включены больные (11 случаев) с тяжелым течением болезни и летальным исходом. У этих больных отмечалась картина тяжелого менингоэнцефалита (диэнцефальный синдром). Лечение не дало терапевтического эффекта и все больные погибли при явлениях прогрессивно нарастающей вегетативной дисфункции, достигшей максимальной выраженности в терминальной стадии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение уровня Т- и В-лимфоцитов в ЦСЖ у исследованных больных показало, что при менингитах туберкулезной и нетуберкулезной этиологии при поступлении в клинику развиваются вторичные иммунологические нарушения, связанные с Т- и В-лимфоцитами. В частности, выявляется количественный дефицит Т-лимфоцитов и увеличение показателей систем клеток, ответственных за антителообразование. Следует отметить, что более резкое понижение Е-РОК проявляется у больных туберкулезным менингитом. Так, относительно число Е-РОК у больных туберкулезным менингитом в среднем составляло  $32,8 \pm 0,7$ , про-

тив  $40,2 \pm 1,21$  у больных серозным менингитом ( $P < 0,001$ , табл. 1).

При указанных заболеваниях имело место увеличение показателей систем клеток при антителообразовании. Однако количество В-лимфоцитов более интенсивно нарастало у больных серозным менингитом нетуберкулезной этиологии ( $19,8 \pm 0,73$  против  $14,9 \pm 0,64$   $P < 0,001$ ).

Изучение в ЦСЖ особенностей изменения лимфоцитов с рецепторами к антигенам микобактерий («иммунные» лимфоциты — иМ-РОК) позволило установить, что у больных туберкулезным менингитом повышена указанная субпопуляция лимфоцитов, тогда как у больных серозным

менингитом количество иммунных лимфоцитов не подвергается существенным изменениям ( $10,1 \pm 0,67$  против  $2,4 \pm 0,12$ ;  $P < 0,001$ , табл. 1).

Сопоставление уровня изучаемых параметров в зависимости от тяжести процесса показало, что при поступлении в стационар у больных туберкулезным менингитом (I, II, III группы) дефицит Т-лимфоцитов в ЦСЖ был выражен в одинаковой степени, несмотря на различную тяжесть процесса (табл. 1). Тогда как количество мЕ-РОК и антигенреактивных лимфоцитов в ЦСЖ значительно нарастало у больных с летальным исходом туберкулезного менингита (III — группа; в обеих случаях по сравнению с другими группами  $P < 0,001$ ; табл. 1).

менингитом, у больных серозным менингитом к моменту клинического выздоровления дефицит Т-лимфоцитов восстанавливается ( $P < 0,001$ ). У больных туберкулезным менингитом к моменту клинического выздоровления (через 3—4 месяца после лечения) дефицит указанных клеток все еще сохраняется (табл. 1).

При благоприятной динамике в процессе лечения у больных туберкулезным менингитом отмечается нарастание относительного количества мЕ-РОК в ЦСЖ, тогда как у больных серозным менингитом в процессе лечения уровень В-лимфоцитов в ЦСЖ не подвергается существенным изменениям (табл. 1).

Субпопуляция антигенспецифических лимфоцитов у больных тубер-

Таблица 1

Относительное содержание Т-, В- и антигенреактивных лимфоцитов в ЦСЖ при менингитах туберкулезной и нетуберкулезной этиологии

РОК	Туберкулезный менингит										
	I группа		II группа		III группа		Всего		Серозный менингит		
	п	средняя тяжесть	п	тяжелое течение	п	летальный исход	п		п		
Е-РОК %	до лечения	14	$34,8 \pm 1,02$	35	$32,4 \pm 1,03$	11	$31,5 \pm 1,42$	60	$32,8 \pm 0,70$	35	$40,2 \pm 1,21$
	через 1—1,5м*	14	$36,7 \pm 1,61$	34	$34,98 \pm 1,29$		—	50	$35,4 \pm 0,99$	30	$50,2 \pm 1,17$
	через 2,5—3,5м	12	$45,6 \pm 1,64$	33	$42,3 \pm 1,22$		—	46	$43,1 \pm 1,02$		
мЕ-РОК %	до лечения	14	$14,2 \pm 1,02$	35	$14,1 \pm 0,89$	11	$18,3 \pm 1,26$	60	$14,9 \pm 0,64$	35	$19,8 \pm 0,73$
	через 1—1,5м	14	$16,6 \pm 1,17$	34	$15,7 \pm 0,83$		—	50	$17,4 \pm 0,68$	30	$20,8 \pm 0,79$
	через 2,5—3,5м	12	$18,4 \pm 0,91$	33	$18,3 \pm 0,63$		—	46	$18,3 \pm 0,63$		
иМ-РОК %	до лечения	14	$8,5 \pm 1,01$	35	$9,6 \pm 0,91$	11	$13,5 \pm 1,39$	60	$10,1 \pm 0,67$	35	$2,4 \pm 0,12$
	через 1—1,5м	14	$6,3 \pm 0,67$	34	$8,7 \pm 0,67$			50	$8,2 \pm 0,53$	30	$2,1 \pm 0,1$
	через 2,5—3,5м	12	$5,3 \pm 0,25$	33	$6,2 \pm 0,37$			46	$6,2 \pm 0,37$		

\* Примечание: \* М—месяц

К моменту клинического выздоровления у больных туберкулезным менингитом наблюдается нарастание в ЦСЖ относительного содержания Т-лимфоцитов (от  $32,8 \pm 0,70$  до  $43,1 \pm 1,02$ ,  $P < 0,001$ ; табл. 1).

Аналогичная динамика изменения Е-РОК в ЦСЖ выявляется и у больных серозным менингитом. Однако, в отличие от больных туберкулезным

менингитом к моменту клинического выздоровления значительно снижалась, однако ее уровень в ЦСЖ через 3—4 месяца после лечения все еще оставался повышенным. У больных серозным менингитом число антигенспецифических лимфоцитов в ЦСЖ в процессе лечения не подвергалось существенным изменениям (табл. 1).

В литературе имеются сведения лишь об определении в ЦСЖ уровня Т- и В-лимфоцитов [2, 14, 15, 16] и интенсивности реакции бласттрансформации со специфическим и неспецифическим митогеном при менингитах специфической и неспецифической [1, 13] этиологий. В силу этого полученные нами данные о характере изменения в ЦСЖ антигенреактивных («иммунных» к микобактериям) субпопуляций лимфоцитов в зависимости от характера процесса и эффективности проводимого лечения являются принципиально новыми и открывают широкую перспективу их дальнейшего практического использования.

Эти данные вызывают интерес, прежде всего с точки зрения ранней диагностики туберкулезного менингита, так как при различных клинических проявлениях менингита вопрос о туберкулезном характере поражения мозговых оболочек решается на основе результатов бактериологических и биологических исследований ЦСЖ. Однако малая надежность (11—15%) и длительность получения результатов (45—60 суток) ограничивают диагностическую ценность этого метода [5, 6].

Что касается иммунологических исследований, направленных на выявление общего числа Т- и В-лимфоцитов, они не позволяют решать вопрос о специфическом характере поражения мозговых оболочек, так как динамика изменения Т- и В-лимфоцитов в ЦСЖ при туберкулезном и серозном менингитах, хотя и отличается, однако, как было указано выше, изменение указанных клеток отражают лишь степень вторичных иммунодефицитов. Поэтому исполь-

зование указанных параметров для дифференциальной диагностики туберкулезного менингита может иметь только второстепенное значение.

Более информативным и специфическим тестом является реакция бласттрансформации лимфоцитов в ЦСЖ с туберкулином [1, 13]. Однако воспроизводимость данной реакции с лимфоцитами ЦСЖ во многом зависит от общего количества клеточных элементов и уровня жизнеспособных лимфоцитов в ЦСЖ [1]. Поэтому применение реакции бласттрансформации не всегда представляется возможным. Вместе с тем в ряде случаев туберкулезного поражения мозговых оболочек, при развитии анергии с летальным исходом, реакция бласттрансформации отрицательная, что в значительной степени ограничивает диагностическую ценность этой реакции при туберкулезном менингите.

В этом аспекте значительно более информативным тестом является определение количества антигенреактивных — «иммунных» лимфоцитов в ЦСЖ. Предлагаемый метод определения антигенреактивных лимфоцитов в ЦСЖ ликвидирует существующий пробел в диагностике туберкулезного менингита, так как по сравнению с применяемыми методами является высокоинформативным, специфическим и требует несопоставимо меньше затрат времени и труда, позволяет достоверно диагностировать туберкулезный менингит в течение 8 часов. Благодаря раннему выявлению болезни появляется возможность проведения лечения на ранних этапах заболевания, а также возможность оценки эффективности и своевременной коррекции лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малашхия Ю. А., Геладзе М. Г. Невропатология и психиатрия, 11, 1646—1650, 1976.
2. Малашхия Ю. А., Дугладзе Н. А., Ратиани Л. Н. Сабчота медицина, 2, 3—7, 1977.
3. Манелис З. С., Кибрик Б. С., Буков Г. Н., Сонжаренко С. И. Сборник научных трудов Московского НИИ туберкулеза, 81, 1977, 39—44.
4. Манько В. М. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР, серия «Общие вопросы патологии», М., 4, 1976, 46—89.
5. Тарасова Е. Ф., Гринчар А. Н., Боброва Т. И., Выренкова Т. Е., Марьясова М. Я. Сборник научных



трудов Московского НИИ туберкулеза, 81, 1977, 27—34.

6. Лебедева Л. В., Сыроечковская М. Е. Сборник научных трудов Московского НИИ туберкулеза, 81, 1977, 158—167.

7. Brikman C. I., Millesen W. M., Hommes O. R. Clin. Immunol., Immunopath., 23, 3, 341—348, 1983.

8. Gupta S., Grieco M. N. Ant. Arch. Allergy, 49, 6, 734—742, 1975.

9. Farrant G., Newton C. A., North M. E. J. Immunol. Methods, 68, 1/2, 25—34, 1984.

10. Geren T., Beus I. Acta Cytol. (Philad.), 26, 5, 678—680, 1982.

11. Goldma K. P. Tubercle, 3, 157—158, 1985.

12. Gømdal M., Holin G., Wigzell H. J. Exp. Med., 136, 2, 207—215, 1972.

13. Kinnman G., Fruden A., Eriksson S., Møller E., Link H. Scand. J. Immunol., 13, 3, 289—296, 1981.

14. Mer R. B. Med. Clin., 71, 13, 523—530, 1976.

15. Mc Connell L. Immune System Course Molecular and Cellular Basis of Immunity, Oxford, 1975, 98—119.

16. Viggo G. Scand. J. Haematol., 13, 5, 361—369, 1974.

თავზურგტვინის სითხეში ანტიგენრეაქტიული ლიმფოციტების  
გამოვლენების დიაგნოსტიკური მნიშვნელობა ტუბერკულოზური  
მენინგიტის დროს

ბ. გოგებაშვილი, ი. გვეტაძე

საქართველოს სსრ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს ტუბერკულოზის სამეცნიერო  
კვლევითი რესპუბლიკური ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ტუბერკულოზური (60) მენინგიტით და არატუბერკულოზური ეთიოლოგიის სეროზული (35) მენინგიტით დაავადებული ავადმყოფების თავზურგტვინის სითხეში შესწავლილია T- და B-სისტემების მთავარი მაჩვენებლები და ანტიგენრეაქტიული („იმუნური“) ლიმფოციტების სუბპოპულაციის რაოდენობრივი ცვლილებები.

დადგენილია ტუბერკულოზური მენინგიტის და არატუბერკულოზური ეთიოლოგიის სეროზული მენინგიტის დროს თავზურგტვინის სითხეში T-ლიმფოცი-

ტების დეფიციტი და იმ უჯრედების რაოდენობის მომატება, რომლებიც მონაწილეობენ ანტისხეულების წარმოქმნის პროცესში.

თავზურგტვინის სითხეში ტუბერკულოზური მენინგიტის დროს გამოვლენილია ლიმფოციტები, რომელთაც აქვთ რეცეპტორები მიკობაქტერიებისადმი. დადგენილია აღნიშნული ლიმფოციტების სპეციფიური ხასიათი და მათი ცვლილებათა კანონზომიერებანი ტუბერკულოზური მენინგიტის მიმდინარეობის პროცესში.

ANTIGENREACTIVE LYMPHOCYTES IN THE CEREBROSPINAL FLUID  
IN TUBERCULOUS MENINGITIS

N. V. GOGEBASHVILI, I. G. GVETADZE

Institute of Tuberculosis, Georgian Ministry of Health, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

Main indices of T-and B-systems of immunity and subpopulations of antigenreactive (immune) lymphocytes in the cerebrospinal fluid (CBF) were studied in the patients with tuberculous (60 cases) and serous (35) meningitis of nontuberculous etiology.

Deficit of T-lymphocytes and an increase in the number of cells responsible for the antibody formation were

found. Specific character of the increase of lymphocyte subpopulation with receptors of microbacteria in CBF was revealed in tuberculous meningitis. Consistent changes of antigenreactive lymphocytes in CBF were observed in tuberculous and serous meningitis of nontuberculous etiology depending on the course of the process during treatment.

УДК 576.007.3 : 615.384 : 616-089

ИММУНОЛОГИЯ

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФТОРУГЛЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ХИРУРГИИ

Э. Я. Нациашвили, Е. Н. Ахвледиани, А. И. Хирсели,  
М. О. Вазагашвили

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

Поступила в редакцию 9.04.1986

Показано, что перфузия сердца собаки фторуглеродной эмульсией обеспечивает снижение уровня общего белка в ткани и упрощение ее антигенной структуры. Обработка лимфоцитов фторуглеродной эмульсией ингибирует функциональную активность клеток и усиливает процесс их лизиса, возможно, за счет образования надклеточных пленок и экранирования поверхностных антигенных детерминант.

В современной трансплантологии преодоление барьера гистосовместимости реализуется за счет тщательного типирования пар донор — реципиент и применения иммунодепрессивной терапии. Общеизвестны трудности точного подбора пар донор — реципиент, а также осложнения иммунодепрессивной терапии. Поэтому понятны поиски нетрадиционных путей снижения антигенности трансплантируемых органов. Так, применение фторуглеродных соединений для противоیشемической защиты почек в организме потенциального донора обеспечивало

достоверное увеличение выживаемости почечных трансплантатов по сравнению с контролем при моделировании терминальных состояний, наиболее приближающих условия эксперимента к клиническим [2, 3].

В настоящем сообщении представлены данные по изучению влияния фторуглеродных соединений на антигенные свойства сердца и верификации возможности экранирования мембранных рецепторов клеток, контактирующих со фторуглеродными соединениями.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служил экстракт гомогенизированной ткани перфузированного фторуглеродной эмульсией и интактного (контроль) сердца беспородных половозрелых собак.

Фторуглеродную эмульсию (ФУЭ) получали из Института биологической физики АН СССР (Пушино). Характеристика использованной нами фторуглеродной эмульсии представлена в табл. 1.

Экстракт гомогенизированной ткани сердца (антиген) готовили на трис-глициновом буфере с добавлением детергента тритона X-100.

В 1 серии экспериментов проводили сравнительную оценку гипериммунных противотканевых сывороток, для чего кроликов (самцы породы шиншилла, масса тела  $2250 \pm$

Таблица 1  
Характеристика фторуглеродной эмульсии

Компоненты	Концентрация
Перфтордекалин (ПФД)	12 об. %
Перфторпараметилциклогексиллеридин (ПМЦП)	12 об. %
Проксанол-268	3 вес. %
NaCl	5,97 г
KCl	0,387 г
MgCl <sub>2</sub>	0,19 г
CaCl <sub>2</sub>	0,28 г
Глюкоза	2,0 г
NaHCO <sub>3</sub>	1,5 г
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14 г
Пенициллин	1·10 <sup>6</sup> Е/Д
H <sub>2</sub> O	ад 1·10 <sup>3</sup> мл
I F-1	2,5·10 <sup>-6</sup> мм
pH	7,5
Ф	0,11—0,12 мкм
Осмолярность	380 мосм
Вязкость	2—4 сП

250,0 г) иммунизировали возрастающими дозами антигена по схеме П. Бартин с соавторами [14]. Всего на иммунизацию одного кролика уходило 400 мг белка. Причем 5 кроликов 1 группы (опытной) иммунизировали антигеном перфузированного, а 5 кроликов 2 группы (контрольной) — интактного сердца собаки.

Гипериммунные противотканевые сыворотки исследовали в реакциях связывания комплемента [10], двойной диффузии в агаре [17] и иммуноэлектрофореза [15].

Во II серии экспериментов изучали реакцию организма крыс на иммунизацию антигеном. При этом крыс (линия Вистар, масса тела  $225,0 \pm 25,0$  г) разделили на 3 группы по 75 животных в каждой. Крыс I группы (опытной) иммунизировали антигеном перфузированного, 2 группы (контрольной, А) — интактного сердца. 3 группа (контрольная, Б) была представлена неиммунизированными животными.

Крыс иммунизировали внутривенно двукратно с недельным перерывом. На иммунизацию каждой крысы уходило 18 мг белка.

У крыс определяли альбумин-глобулиновый коэффициент [7], уровень преципитинов [16] и гемагглютининов в сыворотке [13], относительное содержание Е- и ЕАС-розеткообразующих клеток в периферической крови [12] и их удельную цитотропность [9], а также мигрирующую способность лейкоцитов периферической крови в присутствии тканевого антигена [1].

Исследования проводили на 7, 14, 21-й дни после реиммунизации.

В III серии экспериментов на мо-

дели спонтанного розеткообразования (СРО) между лимфоцитами периферической крови здоровых доноров и эритроцитами барана [12] проверяли возможность образования ФУЭ надклеточных пленок и экранирования антигенных структур. При этом предполагалось, что образование надклеточных пленок и экранирование мембранных рецепторов должно привести к уменьшению числа розеткообразующих клеток в суспензии лимфоцитов и снижению их удельной цитотропности (УЦТ).

Эритроциты или лимфоциты обрабатывали ФУЭ *ex tempore*. В центрифужных пробирках отмытые клетки смешивали с ФУЭ в соотношении 1:5. Пробирки покачивали в течение 10 мин и оставляли в вертикальном положении при комнатной температуре для расслоения смеси (вариант нагрузочного теста). На дно оседал слой ФУЭ, над ним располагались клетки, которые и вводили в реакцию СРО. В ряде случаев реакцию ставили с эритроцитами и лимфоцитами, обработанными ФУЭ. Контролем служила реакция СРО между интактными эритроцитами и лимфоцитами.

Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом избирательного окрашивания живых и мертвых клеток трипановым синим.

Полученный цифровой материал проанализирован математически. При этом определяли средне-статистическое значение параметра ( $M$ ), ошибку его измерения ( $\pm m$ ), средне-квадратичное отклонение ( $\pm \lambda$ ). Достоверность различий показателей оценивали с учетом критерия Стьюдента [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В антигене перфузированной сердечной мышцы собаки уровень общего белка составлял в среднем  $15,7 \pm 1,3$  мг/мл и колебался в пределах 12,8—18,6 мг/мл, в антигене интактной

сердечной мышцы —  $32,5 \pm 2,9$  и  $26,2 \pm 3,8$  мг/мл соответственно.

Сыворотка кроликов опытной группы в реакциях со специфическим антигеном фиксировала комплемент в



разведении 1:40—1:80, в реакции по Оухтерлони давала 2 полосы преципитации: одна проходила через весь ряд разведений (1:64), а вторая — обрывалась в титре 1:8. Иммуноэлектрофоретический анализ выявлял 7 дуг преципитации, электрофоретическая подвижность трех из них соответствовала подвижности  $\gamma$ -глобулинов.

Сыворотка кроликов контрольной группы в присутствии гомологичного антигена связывала комплемент в разведении 1:160—1:320, в реакции по Оухтерлони формировала 3 линии преципитации, одна из которых проходила через весь ряд разведений (1:64), вторая обрывалась в титре 1:16, а третья — в титре 1:4. При иммуноэлектрофоретическом анализе выявлялось 9 дуг, 5 из них располагались в зоне подвижности  $\gamma$ -глобулинов.

У крыс опытной группы регистрировались уменьшение альбуминглобулинового коэффициента за счет повышения уровня глобулинов, накопление противотканевых преципитинов и гемагглютининов, увеличение числа Е- и ЕАС-РОК и усиление их цитотропности (табл. 2). Интенсивность накопления противотканевых антител и РОК зависела от сроков наблюдения: так на 7-й день отмечалась лишь тенденция к накоплению, с пиком на 14-й день. К 21-му дню указанные показатели почти возвращались к исходному уровню. На 14-й день у животных опытной группы происходило достоверное падение индекса миграции лейкоцитов (рисунок); интенсивность падения продолжала нарастать до конца наблюдения.

У крыс контрольной (А) группы показатели исследуемых параметров изменялись более существенно.

Как видно из табл. 3, предварительная обработка эритроцитов или лимфоцитов ФУЭ приводила к достоверному снижению числа РОК в суспензии, но УЦТ лимфоцитов при этом практически не изменялась. К еще большему уменьшению числа РОК в суспензии приводила одновременная обработка эритроцитов и лейкоцитов ФУЭ. В этих случаях отмечалось и снижение среднестатистического значения УЦТ лимфоцитов, хотя разность показателей в опыте и контроле не-

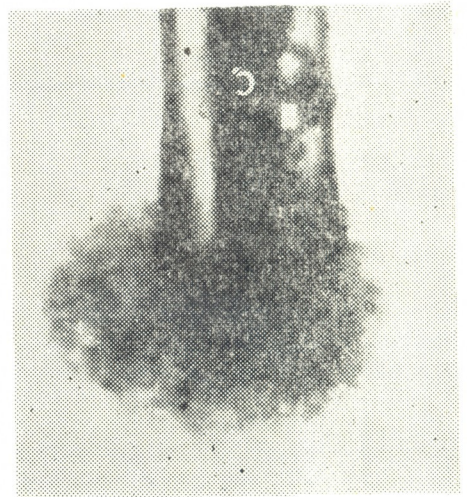
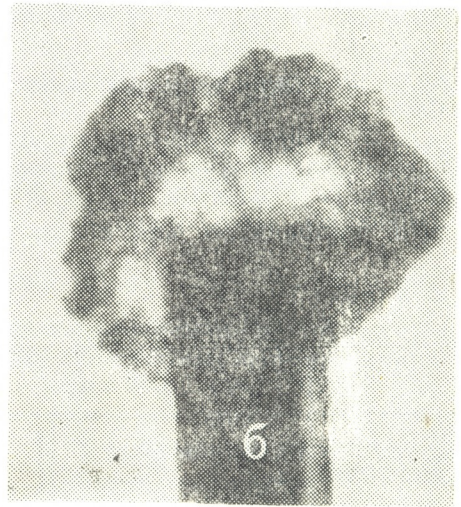


Рис. Мигрирующая способность лейкоцитов периферической крови у intactных (а), опытных (б) и контрольных (с) крыс

Результаты исследования крыс, иммунизированных антигеном перфузированной интактной сердечной мышцы собаки

Группа крыс	П а р а м е т р ы					
	Альбумин-глобулиновый коэффициент	У р о в е н ь		Относительное содержание лимфоцитов, %		Индекс миграции лейкоцитов
		микропреципитины в „+„	гемагглютинины, титр	Т—	В—	
Опытная	1,3±0,04*	„+„	1:32—1:64	7,3±2,6	7,0±1,6	0,65±0,04*
Контрольная (А)	1,0±0,02*	„3+„	1:64—1:128	18,9±3,0	16,0±4,5*	0,21±0,1*
Контрольная (Б)	1,6±0,03	„—„	1:2—1:8	5,9±1,4	4,9±1,2	1,0±0,15

Примечание: достоверность различий показателей у иммунизированных и неиммунизированных крыс  $\leq 0,05$

сила недостоверный характер ( $P \geq 0,05$ ).

В процессе обработки оксигенированной или неоксигенированной ФУЭ плотность суспензии эритроцитов не изменялась. При обработке лимфоци-

на 13,7%, относительное содержание жизнеспособных клеток — на 7,9%, число РОК — на 5,3%. Изменение УЦТ клеток носило недостоверный характер (табл. 4).

Учитывая существенность различий

Таблица 3

Влияние обработки клеток ФУЭ на процесс спонтанного розеткообразования

Параметры	С п о н т а н н о е р о з е т к о о б р а з о в а н и е							
	Интактные и лимфоциты (контроль)		О б р а б о т а н н ы е Ф У Э					
			Ег		лимфоциты		Ег и лимфоциты	
	%	УЦТ	%	УЦТ	%	УЦТ	%	УЦТ
п	29		23		31		11	
М	44,5	5,5	35,5*	5,0	31,6*	5,2	28,5*	4,4
± m	3,4	0,6	2,9	0,55	2,1	0,5	2,2	0,46
± λ	18,0	3,1	13,9	2,6	11,5	2,7	7,2	1,5

Примечание: \* — достоверность различий показателей опытных и контрольных экспериментов  $\leq 0,05$

тов неоксигенированной ФУЭ плотность суспензии падала более чем на 80,0%, содержание жизнеспособных клеток в ней — на 21,5%, а число РОК — на 12,9%. При обработке лимфоцитов оксигенированной ФУЭ плотность суспензии снижалась всего

по жизнеспособности интактных, обработанных неоксигенированной или оксигенированной ФУЭ лимфоцитов, в последующих тестах содержание РОК в суспензиях относили к числу жизнеспособных клеток в них. Указанный интегральный критерий, по-

Плотность, жизнеспособность и относительное содержание РОК в суспензии лимфоцитов, обработанной ФУЭ

ФУЭ	Параметры	Количество лимфоцитов, <i>тысячи/мл</i>		Жизнеспособность лимфоцитов, %		Спонтанное розеткообразование			
		до обработки	после обработки	до обработки	после обработки	интактные клетки		лимфоциты обработанные	
						%	УЦТ	%	УЦТ
оксигенированная	п	9	9	9	9	29		9	
	М	3660	3160	94,6	86,7	44,5	5,5	39,2	5,4
	$\pm m$	312	276	7,3	6,4	3,4	0,6	2,3	0,4
	$\pm \lambda$	936	828	21,9	19,2	18,0	3,1	2,5	0,7
неоксигенированная	п		9		9				31
	М		732*		73,1*			31,6*	5,2
	$\pm m$		65		5,1			2,1	0,5
	$\pm \lambda$		195		15,3			11,5	2,7

Примечание: \* — достоверность различий показателей экспериментов  $\leq 0,05$

зволнший провести сравнительную оценку полученных данных, показал, что при обработке суспензии лимфоцитов неоксигенированной ФУЭ относительное содержание РОК в ней снижалось на 9,3%, в условиях обработки оксигенированной ФУЭ — на 11,3% ( $P \geq 0,05$ ).

Подводя итог проделанной работе, следует отметить, что перфузия сердца собаки ФУЭ обеспечивает снижение уровня общего белка в ткани и изменение ее антигенной структуры, о чем свидетельствует уменьшение, по сравнению с контролем, числа линий преципитации в реакции двойной диффузии. Однако количество оставшегося в ткани белка оказалось достаточным для индукции иммунного ответа у опытных животных, хотя и сила реакции на иммунизацию в этих случаях была несколько слабее таковой контрольных животных. Снижение уровня общего белка в ткани перфузированного ФУЭ органа, видимо, обусловлено удалением растворимых тканевых белков.

Предварительная обработка эритроцитов барана и лимфоцитов периферической крови человека ФУЭ отражалась на количественной стороне процесса СРО, что подчеркивалось уменьшением числа РОК как в общей популяции, так и среди жизнеспособных лимфоцитов.

3. Серия биологическая, т. 14, № 1

Уменьшение числа РОК в суспензии после обработки ФУЭ не может быть связано с усилением процессов сбрасывания или блокировкой Е-ре-

Таблица 5

Относительное содержание РОК в суспензии жизнеспособных лимфоцитов (жизнеспособность =  $99,7 \pm 0,1\%$ )

Параметры	Относительное содержание РОК, %		
	до обработки	после обработки ФУЭ	
		оксигенированной	неоксигенированной
п	11	36,9	35,6
М	48,5	1,6	1,3
$\pm m$	2,7	5,2	4,2
$\pm \lambda$	8,9	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
Р			

цепторов лимфоцитов теми или иными компонентами субституционной среды, что прежде всего должно было бы отразиться на УЦТ клеток. В наших же случаях УЦТ лимфоцитов в процессе обработки практически не изменялось. Возможно, уменьшение числа РОК в суспензии (после обработки ФУЭ) связано с образованием надклеточных пленок и экранированием антигенных рецепторов. Обще-



известна способность полностью фторированных органических соединений к образованию жидких мембран вокруг пузырьков газа, например кислорода [8]. Именно поэтому и относительное содержание РОК в суспензии было однозначным при обработке оксигенированной или неоксигенированной ФУЭ.

Обработка суспензии лимфоцитов ФУЭ приводила к снижению жизнеспособности клеток. Хотя литературные данные последних лет и опровергают мнение о биологической инертности полностью фторированных органических соединений [4, 11], качественные показатели использованной нами эмульсии (концентрация F<sup>-</sup> и введение проксанола-268) исключают

возможность токсического эффекта [2, 3]. Можно предположить, задержка и распад лимфоцитов, обработанных ФУЭ, обусловлены физиологическими особенностями иммунокомпетентных клеток, характеризующихся интенсивными обменными процессами, постоянным синтезом белка, экспрессией, сбрасыванием и реабсорбцией различных поверхностных структур, способностью к бласттрансформации [6]. В условиях же обработки ФУЭ и изоляции надклеточными пленками происходит нарушение обменных процессов в клетке, что и приводит к их гибели и распаду. Обработка оксигенированной ФУЭ обеспечивает более щадящий режим.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блум Б., Глэйд Ф. Методы изучения *in vitro* клеточного иммунитета, «Мир», М., 1974.
2. Вазагашвили М. О., Эквтимшвили Т. В. Сб. научных трудов НИИ экспер. и клин. хирургии МЗ ГССР, 1984, 228—232.
3. Вазагашвили М. О., Эквтимшвили Т. В., Ломидзе Н. О. Тез. докл. XI съезда хирургов Закавказья, Тбилиси, 1984, 195.
4. Васильев А. Э., Голубев А. М. В кн.: Фторуглеродные газопереносящие среды, Пушино, 1984, 130—134.
5. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов, «Медицина», Л., 1978.
6. Кожевников В. С. Изучение зависимости рецепции эритроцитов барана Т-лимфоцитами от их дифференцировки и функционального состояния. Автореф. канд. дисс., Новосибирск, 1983.
7. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия, Минск, 1976.
8. Крылов Н. Л., Белоярцев Ф. Ф., Мороз В. В., Бобровский Р. В., Симоненко В. С., Макаров К. Н., Книуняц И. Л. В кн.: Фторуглеродные газопереносящие среды, Пушино, 1984, 5—17.
9. Матвейков Г. П., Кошелев В. К., Назаров Ю. М., Калия Е. С., Досин Ю. М., Петрович Э. И. Тер. архив, 5, 87—98, 1981.
10. Мурашова А. И. В кн.: Руководство по иммунологии, «Медицина», М., 1973, 293—302.
11. Чрочкина В. С., Козинер В. Б. Пат. физиол. и экс. тер., 3, 78—87, 1981.
12. Aiuti F., Cerottini J. C., Coombs R. R. A., Cooper M., Dickler H. B., Froland S. Clin. Immun. and Immunopathol., 3, 4, 584—597, 1975.
13. Boyden St. V. J. Exp. Med. 93, 107—112, 1951.
14. Burtin P., von Kleist S., Buree D. Soc. Chim. Biol., 43, 1389—1395, 1967.
15. Grabar P., Williams C. A. Biochim. Biophys. Acta, 10, 193—199, 1953.
16. Hougne R. Schweiz. med. Wschr., 85, 1272—1277, 1955.
17. Ouchterlony O. Acta Path. Microbiol., Scand., 32, 231—239, 1953.

მ. ნაციაშვილი, ე. ახვლედიანი, ა. ხირსელი, მ. ვაზაგაშვილი

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

რ ე ზ ი უ მ ე

ნაშრომში წარმოდგენილია ექსპერი-  
მენტული გამოკვლევების შედეგები, რომ-  
ლებიც ჩატარებული იყო ქსოვილთა შეუ-  
თავსებლობის ბარიერის გადალახვის არა-  
ტრადიციული გზების გამოსანახავად. ნა-  
ჩვენებია, რომ ძალღის გულის პერფუზია  
ფტორნახშირბადის ემულსიით უზრუნ-  
ველყოფს ქსოვილში საერთო ცილის დო-  
ზის შემცირებას და მისი ანტიგენური შე-

მადგენლობის გამარტივებას; ლიმფოცი-  
ტების ფტორნახშირბადის ემულსიით და-  
მუშავება იწვევს უჯრედთა ფუნქციური  
აქტივობის ინჰიბიციას და აძლიერებს  
მათი ლიზისის პროცესს, რაც შესაძლოა  
ხდება უჯრედზედა ფენის წარმოქმნისა და  
ზედაპირული ანტიგენური დეტერმინან-  
ტების ეკრანირების ხარჯზე.

## IMMUNOLOGIC ASPECTS OF THE USE OF FLUOROCARBON COMPOUNDS IN SURGERY

E. Y. NATSIASHVILI, E. N. AKHVLEDIANI, A. I. KHIRSELI, M. O. VAZAGASHVIL

Institute of Experimental and Clinical Surgery, Georgian Ministry of Health, Tbilisi, <sup>†</sup>  
USSR

### S u m m a r y

The results of experimental studies  
to find the untraditional ways for over-  
coming the histoincompatibility barrier  
are presented.

Perfusion of the dog's heart with  
fluorocarbon emulsion results in a de-  
crease of global protein level in tissue and  
simplification of its antigenic structure;

the treatment of lymphocytes by fluoro-  
carbon emulsion inhibits the functional  
activity of cells and increases the pro-  
cess of lysis, probably, due to the for-  
mation of supracellular films and the  
screening of superficial antigenic deter-  
minants.

УДК 547.962 : 541.63

БИОФИЗИКА

## КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЦИКЛИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА ИЗ ШАРНИРНОГО УЧАСТКА ИММУНОГЛОБУЛИНА G1

Б. М. Вишнепольский, М. К. Пирцхалава

*Институт молекулярной биологии и биологической физики АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 26.12.1986

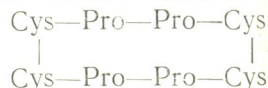
Проведен конформационный анализ циклического фрагмента из шарнирного участка иммуноглобулина G1 в приближении регулярных конформаций. Исследованиями В и R области конформационной карты [11] показана предпочтительность левоспиральной конформации ppII (В область). Поскольку расчеты не позволяют полностью исключить возможность образования витка правой  $3_{10}$  спирали (R область), предполагается, что циклический фрагмент, наряду с остальной частью шарнира может вносить свой вклад в гибкость шарнирного участка, которая играет важную роль в функционировании иммуноглобулинов.

Необходимой чертой структуры иммуноглобулинов является наличие у них так называемого шарнирного участка. В ряде работ [4, 5, 6, 9] показано, что некоторая лабильность структуры позволяет молекуле антигена взаимодействовать с различными антигенами, но в то же время для осуществления эффекторных функций необходимо определенное ограничение конформационной подвижности молекулы. Предполагается, что именно шарнирный участок обеспечивает гибкость молекулы и способствует выполнению эффекторных функций.

Из сказанного понятен интерес к исследованию конформационных возможностей шарнирных участков разных иммуноглобулинов, в частности IgG1 (например работы [7, 8]).

Макуорт и др. [8], анализируя методом рентгеноструктурного анализа пространственное строение иммуноглобулина Ko1 IgG1, попытались установить структуру шарнирного участка. Однако, так как картина электронной плотности, полученная с помощью рентгеновской дифракции для шарнирного участка указанного им-

муноглобулина, была нечеткой, то они смогли охарактеризовать конформацию участка только с помощью средних значений двугранных углов остова. Конкретно, средние значения двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$ , определяющих конформацию остова циклического фрагмента

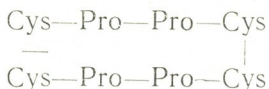


предполагались равными  $-60^\circ$  и  $125^\circ$  соответственно. Такая структура соответствует спирали поли-L-пролин II (ppII). Учитывая все вышесказанное, предложенную авторами модель шарнирного участка можно считать гипотетической. Согласно этой модели циклический участок имеет конформацию ppII и является жестким, а лабильность шарнирного участка целиком обеспечивается двумя соседними фрагментами.

Приняв во внимание важность гибкости шарнирного участка и учитывая характер рентгеновского спектра, позволяющего получить исключительно статическую картину, мы сочли целесообразным провести конформа-

ционный анализ с целью уточнить гипотетическую модель шарнирного участка и выявить природу его динамики.

Циклический фрагмент



из шарнира IgG1 представляет собой случай с осью симметрии второго порядка, проходящей через центры дисульфидных связей перпендикулярно к ним. Наличие в полипептидной цепи двух пролинов и сам фибриллярный характер всего шарнирного участка являются доводом в

пользу регулярной спиральной конформации обеих цепей циклического фрагмента из шарнира IgG1. Геометрический анализ структур, имеющих ось симметрии второго порядка, был проведен в работах [2, 3]. Было показано, что геометрически возможны левоспиральная конформация типа  $\rho r11$  и правоспиральная конформация типа  $\Sigma_{10}$ .

В данной работе рассматриваются две геометрически состоятельные конформации циклического фрагмента и делается попытка их сравнения на основе энергетических критериев.

### МЕТОДИКА

На рис. 1 схематически изображена одна из двух цепей цикла, для которого проводился конформационный анализ. Координаты атомов этой цепи определялись в XOY коорди-

ней точки M дисульфидной связи. Координаты атомов одной полипептидной цепи рассчитывали по методу, описанному в работе [12]. Координаты атомов другой цепи получали с

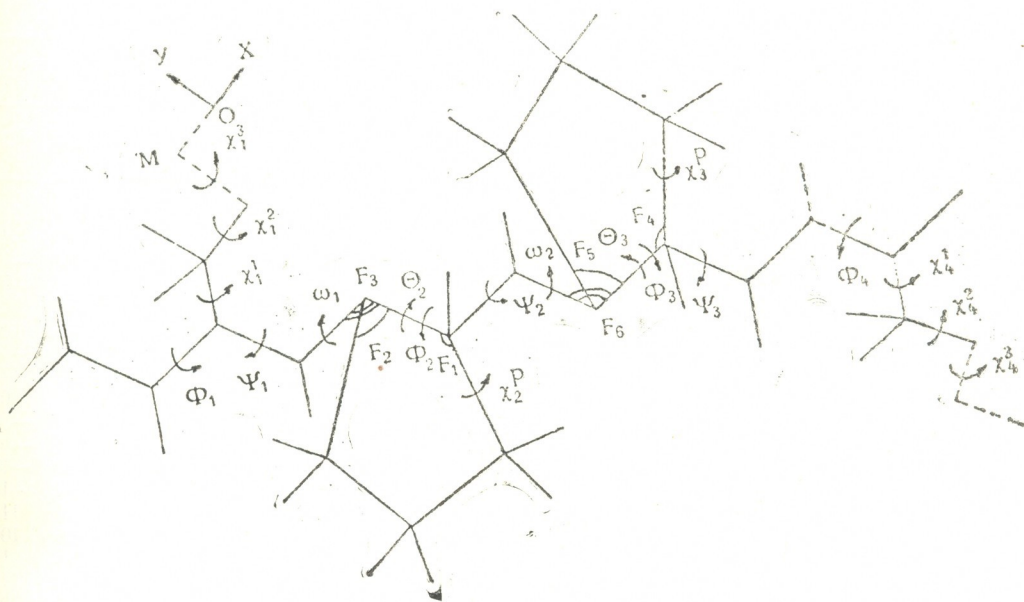
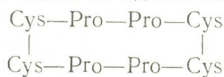


Рис. 1. Схематическое изображение одной из идентичных единиц циклического фрагмента



натной системе, которая приведена на рисунке. Ось X этой системы направлена вдоль оси симметрии второго порядка, плоскость XOY является биссекториальной для двугранного угла вращения вокруг дисульфидной связи, а начало координат находится на расстоянии 0,1 нм от сред-

помощью матрицы поворота вокруг оси симметрии второго порядка.

Расчеты конформационной энергии проводились в рамках попарного аддитивного приближения. Минимизацию энергии выполняли по методу Давидона. Учитывали невалентную,



электростатическую и торсионную составляющие.

Принимая во внимание, что рассматриваемая структура имеет ось симметрии второго порядка, число независимых переменных при минимизации для каждой цепи уменьшается на 4 [2]. В качестве зависимых брались углы  $\chi_1^3, \chi_1^4, \chi_2^4, \chi_3^4$  (рис. 1). Расчет проводился с учетом гибкости пирролидинового кольца и «расторжения» углов вращения вокруг пептидных связей, предшествующих пролинам.

Учитывая вышесказанное, независимыми переменными считались дву-

гранные углы вращения  $\psi_i, \phi_j, \omega_k$ , где  $i=1, 2, 3, 4, j=1, 2, 3, k=1, 2$ , углы вращения вокруг боковых связей  $\chi_1^1, \chi_1^2, \chi_2^2, \chi_3^2$  и валентные углы в пролине  $F_1$ , где  $i=1, 2, \dots, 6$ .

Стартовые точки минимизации в каждой области (ppII и  $Z_{10}$ ) получались путем комбинации низкоэнергетических конформаций дипептидных единиц [1]. Начальные значения переменных брались из работы [10].

Все расчеты проводились на ЭВМ БЭСМ-6. Программа составлялась на языке фортран.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты минимизации конформационной энергии приведены в табл. 1. Исходя из этих данных можно сделать вывод, что конформация типа

Используя результаты минимизации, мы сравнивали вклады разных членов в энергию конформаций из областей ppII и  $Z_{10}$ . Результаты срав-

Таблица 1

Параметры, определяющие конформации локальных минимумов из областей ppII и  $Z_{10}$

Параметры	Минимумы из ppII								Минимумы из $Z_{10}$		
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3
$\chi_{1^2}$	178	176	163	169	168	156	171	175	286	248	241
$\chi_{1^1}$	186	189	186	-63	-60	-61	55	56	193	-42	-43
$\Phi_1$	-82	-84	-82	-82	-82	-83	-81	-81	-74	-73	-76
$\psi_1$	130	126	129	127	126	127	125	125	-49	-51	-50
$\omega_1$	183	188	171	179	180	168	176	175	192	193	191
$\Theta_2$	-14	-14	1	-17	-17	-3	-19	-20	1	2	0
$\psi_2$	151	159	147	154	158	151	158	159	-57	-62	-58
$\omega_2$	179	167	178	175	165	174	168	161	180	192	179
$\Theta_3$	-16	-1	-17	-16	-2	-17	-15	-1	-2	-12	0
$\psi_3$	155	152	156	154	153	155	151	150	-61	-47	-59
$\Phi_4$	-74	-83	-77	-75	-76	-77	-101	-98	-40	-57	-60
$\chi_{2^P}$	30	30	-19	31	32	-16	33	33	-18	-19	-16
$\chi_{3^P}$	31	-18	32	31	-17	31	30	-18	-17	25	-19
$F_1$	110	110	111	110	110	111	109	109	115	115	115
$F_2$	107	107	107	107	107	107	107	107	104	104	104
$F_3$	118	118	118	118	118	118	118	118	119	119	119
$F_4$	110	111	110	110	111	110	110	111	113	112	113
$E_5$	107	107	107	107	107	107	107	107	105	106	105
$F_6$	119	119	119	119	119	119	119	119	118	117	118
Относительная энергия, ккал/моль	0	5,0	4,5	0,1	4,9	4,8	0,8	4,4	29,8	26,8	27,3

Примечания: 1. Энергия рассматривается относительно 1-го минимума из области ppII (0 соответствует 613,4 ккал/моль). 2. В таблице приведены минимумы, энергия которых не превышает 5 ккал/моль для области ppII и 30 ккал/моль для области  $Z_{10}$ . 3. Обозначения параметров соответствуют рис. 1

ppII более стабильная по сравнению с конформацией типа  $Z_{10}$  на 26,8 ккал/моль.

Результаты показывают, что проигрыш стабильности конформации типа  $Z_{10}$  в основном обусловлен невалентными





взаимодействиями между аминокислотными остатками и внутренней энергией остатков. В свою очередь самый большой вклад в проигрыш стабильности конформации типа  $3_{10}$ , обусловленный невалентными взаимодействиями, вносят взаимодействия между соседними остатками в одиночной цепи, в особенности между остатками  $^{226}\text{Cys}-\text{Pro}$  и  $\text{Pro}-\text{Pro}$ , что составляет примерно 19,3 ккал/моль.

С другой стороны, невалентные взаимодействия между несоседними остатками одной цепи, а также между остатками разных цепей вносят вклад в стабильность конформации типа  $3_{10}$ , по сравнению с  $\text{ppII}$ , примерно равный 6 ккал/моль.

Таким образом, наличие такого стабилизирующего  $3_{10}$  спираль эффекта делает уже для всего шарнирного участка конформацию указанного типа менее проигрывающей в стабильности конформации типа  $\text{ppII}$ . В это явление может внести свой

вклад и гидрофобный эффект. Здесь имеется в виду тот факт, что одинаково ориентированные дисульфидные мостики, а также  $^{232}\text{Pro}$  и  $^{235}\text{Leu}$  в случае конформации  $3_{10}$  спирали могут образовывать более плотный гидрофобный ствол.

Следовательно, несмотря на неоспоримую предпочтительность конформации типа  $\text{ppII}$  для циклического фрагмента из шарнирного участка IgG1, нельзя исключить при определенных условиях конформационный переход в этой части шарнира путем реализации витка  $3_{10}$  спирали. Это явление не позволяет нам разделить точку зрения Макуорта и др., приписывающих этому фрагменту абсолютно жесткий характер. Мы считаем, что этот фрагмент, наряду с остальной частью шарнира, может вносить свой вклад в гибкость шарнирного участка, которая играет важную роль в комплементсвязывающей способности иммуноглобулина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пирцхалава М. К. Конформационные возможности пептидных фрагментов, содержащих дисульфидные мостики, Канд. дисс., Тбилиси, 1985.
2. Пирцхалава М. К., Поройков В. В., Туманян В. Г. Мол. биол., 19, 479—482, 1985.
3. Пирцхалава М. К., Поройков В. В., Туманян В. Г. Биоорганическая химия, 9, 1220—1230, 1983.
4. Cirollo A., Borsos T. J. Immunology, 128, 1118—1121, 1982.
5. Hanson D. C., Ygnerabide J., Schumaker V. Biochemistry, 20, 6842—6852, 1981.
6. Hyslop N. E., Dourmashkin R. R., Green N. M., Porter R. J. Exp. Med., 131, 783—802, 1970.
7. Ito W., Arata Y. Biochemistry, 24, 6467—6474, 1985.
8. Marqart M., Deisenhofer J., Huber R., Palm W. J. Mol. Biol., 141, 369—391, 1980.
9. McCammon J. A., Karplus M. Nature, 268, 765—766, 1977.
10. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. J. Phys. Chem., 79, 2361—2380, 1975.
11. Ramachandran G. N., Sasisekharan V. Adv. Prot. Chem., 23, 283, 1968.
12. Туманян В. Г., Есипова Н. Г. Биополимеры, 21, 475—497, 1982.

#### იმუნოგლობულინ G1 „სახსარ“-უბნის ციკლური ფრაგმენტის კონფორმაციული ანალიზი

ბ. შინავაძე, ა. ფიცხალავა

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

რეზიუმე

რეგულარულ კონფორმაციათა მიახლოებაში ჩატარებულ იქნა იმუნოგლობულინ G1-ის „სახსარ“-უბნის ციკლური ფრაგმენტის კონფორმაციული ანალიზი. კვლე-

ვა ჩატარდა რამაჩანდრანის კონფორმაციული რუქის B და R არეებში და დადგინდა, რომ ყველაზე ალბათურია სპირალური კონფორმაცია პოლი-L-პროლინის II ტი-



პისა ( B არიდან). ის გარემოება, რომ ჩატარებული გამოთვლების შედეგები მთლიანად არ გამოორიცხავენ მარჯვენა  $3_{10}$  ტიპის სპირალის (R არიდან) წარმოქმნის შესაძლებლობას, საშუალებას გვაძლევს და-

ვუშვათ, რომ ციკლური ფრაგმენტის სარ“-უბნის სხვა ნაწილებთან განაპირობებს უკანასკნელი უბნის დრეკად ბუნებას.

## A CONFORMATIONAL ANALYSIS OF CYCLIC FRAGMENT OF THE HINGE REGION OF IMMUNOGLOBULIN G1

B. M. VISHNEPOLSKI, M. K. PIRTSKHALAVA

Institute of Molecular Biology and Biological Physics, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

### S u m m a r y

A theoretical conformational analysis of a cyclic fragment of hinge region of immunoglobulin G1 (IgG1) in approximation of backbone regular conformation was performed. Investigating B and R areas of the Ramachandran's conformational map the preference of left helical conformations of poly-L-prolin II (pp II)

type has been shown. Since computations prevented us from excluding the possibility of forming of the coil of  $3_{10}$  helix it is supposed that the cyclic fragment together with the rest of the hinge may contribute to the flexibility of the hinge region.

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ $\alpha$ - И $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦ ГЕМОГЛОБИНА МЕТОДОМ ВОДОРОДНОГО ОБМЕНА ( $^1\text{H}$ — $^2\text{H}$ )

К. Ш. Джинория

*Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси*

Поступила в редакцию 5.11.1986

С помощью метода водородного обмена (ВО) исследовано конформационное состояние  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц гемоглобина (Hb) человека.

Показано, что в интервале рН 6—8 внутримолекулярная подвижность изолированных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц при лигандировании заметно не изменяется.

Структура изолированных субъединиц гемоглобина человека практически не исследована. По аналогии с миоглобином можно предположить, что лигандирование субъединиц будет сопровождаться такой же пертурбацией третичной структуры, как и оксигенация миоглобина [10]. Теоретические расчеты Желина и Карплюса [8] подтверждают предположение о том, что для переведения гема  $\alpha$ -цепи из нелигандной дезокси- в лигандную окси-конформацию необходимо немного сместить большую часть атомов и остов белка.

Приводимые в данной работе результаты, показывают, что лигандирование субъединиц (кроме  $\beta$ -субъединиц при рН 8), так же как и оксигенация миоглобина [6], не сопровождается изменением скорости ВО в пептидных NH группах белка. Следовательно, наличие тонких изменений третичной структуры не является обязательным условием изменения скорости ВО, а следовательно, и конформационной стабильности белка, регистрируемой этим методом.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конформационное состояние  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц исследовано с помощью ВО ( $^1\text{H}$ — $^2\text{H}$ ) на ИК-спектрофотометре UR-10.

$\text{HbO}_2$  получали по модифицированному методу Антониони и Брунори [4], а  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи — согласно [7, 9].

Выделенные таким образом субъединицы проверяли на полноту снятия пХМБ спектрофотометрическим титрованием свободных SH групп при

250 нм по методу Бойера [5], а для определения гомогенности и чистоты полученных препаратов проводили электрофорез на крахмальном геле при рН 8,6. Нативность субъединиц проверяли по способности к ресинтезу с образованием тетрамерного белка. Все лигандные формы субъединиц получали так же, как и в случае с  $\text{HbO}_2$  [1, 2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

$^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  обмен различных лигандных форм субъединиц исследовали в интервале рН 6—8. На рис. 1 приведены кинетические кривые ВО субъеди-

ниц, а на рис. 2 — обобщенные кривые в координатах  $X=f(\lg k_0 t)$ . При построении обобщенных кривых величину  $k_0$  рассчитывали по урав-

нению (5) из работы [3], а отношение  $A_{\text{амид II}}/A_{\text{амид I}}$  для недегидрированного белка приняты равным 0,500.

На рис. 3 приведены результаты детального анализа различий между кинетическими кривыми одной и той же формы субъединиц, полученными при различных значениях pH и построенными в координатах  $X=f(\lg k_{\text{от}})$

основании определенных таким образом величин рассчитывали среднюю арифметическую величину смещения  $\Delta \lg(k_{\text{от}})$  и среднее квадратичное отклонение (рис. 3). Детальное рассмотрение значения такого анализа приведено в работе [1].

При всех исследованных значениях pH скорость ВО в карбокси и дезокси-

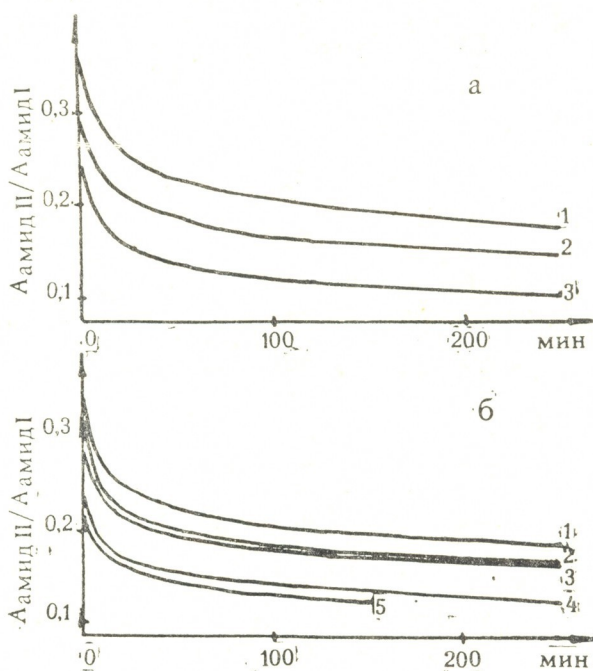


Рис. 1.  $\text{H-N}$  обмен пептидных H-атомов карбокси и дезокси форм  $\alpha$ -и  $\beta$ -субъединиц при  $20^\circ\text{C}$ . При исследовании дезокси форм присутствовал дитионит в концентрации 2 мг/мл, а в белке — 5 мг/мл; а— $\alpha$ -субъединицы карбокси и дезокси формы при pH 6, 0,2М бис-трис (1), pH 7, 0,2М бис-трис (2) и pH 8, 0,2М трис (3); б— $\beta$ -субъединицы карбокси и дезокси формы при pH 6, 0,2М бис-трис (1), pH 6,6, 0,2М бис-трис (2) и pH 7, 0,2М бис-трис (3); карбокси форма при pH 8, 0,2М трис HCl (4), дезокси форма при pH 8, 0,2М трис HCl (5)

(рис. 2). В качестве исходной использована кривая обмена при pH 6. В единицах  $\lg k_{\text{от}}$  рассчитано расстояние, на которое смещена вдоль оси абсцисс относительно этой кривой другая, ближайшая к ней по величине pH кривая. Затем эта кривая использована как исходная для следующей, сопоставляемой кривой и т. д. Расчеты проведены для одинаковых значений X двух сравниваемых кривых в точках, располагающихся с интервалом в 0,005 единиц X. Для каждой пары сравниваемых кривых использовали от 5 до 16 точек. На

си формах  $\alpha$ -субъединиц оказалась одинаковой. Для  $\beta$ -субъединиц обнаружены небольшие различия при pH 8, где скорость обмена в дезокси субъединице оказалась выше, чем у карбокси производной (рис. 2).

В результате сопоставления кинетических кривых для каждой субъединицы выявлено, что, начиная с pH 6, с увеличением pH происходит плавное уменьшение  $\rho$ . При pH 8 в дезокси  $\beta$ -субъединицах величина  $\lg \rho$  увеличивается по сравнению с карбокси на  $0,18 \pm 0,09$ , т. е.  $\rho$  возрастает в  $1,5 \pm 0,8$  раз, а величина  $\Delta G$

уменьшается на 0,24 ккал/М. Эти различия невелики и лежат в пределах экспериментальной ошибки.

Возрастание величины  $\lg(k_0t)$  при

увеличении рН от 5 до 6,5—7, а следовательно, уменьшение величины т. е. увеличение стабильности необменноспособных состояний макромоле-

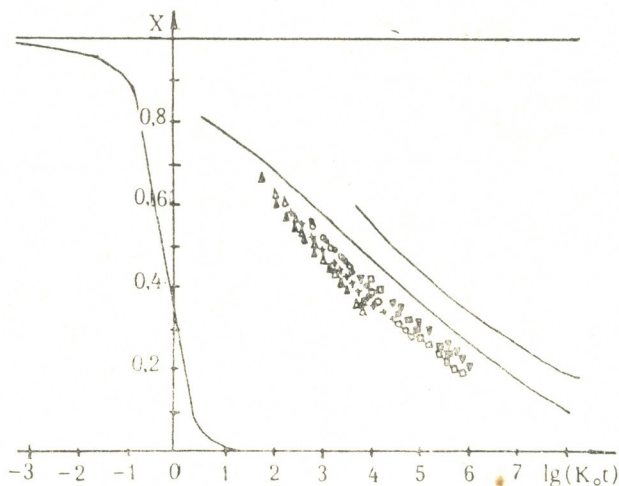


Рис. 2. Обобщенные кинетические кривые ВО при 20°C карбокси и дезокси форм  $\alpha$ -субъединиц (полюе) и  $\beta$ -субъединиц (сплошные). Карбокси и дезокси формы обеих субъединиц при рН 6 ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) и рН 7 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ). Карбокси и дезокси формы  $\alpha$ -субъединиц при рН 8 ( $\square$ ), карбокси  $\beta$ -субъединиц при рН 6,6 ( $+$ ) и рН 8 ( $\blacktriangledown$ ) и дезокси  $\beta$ -субъединицы при рН 8 ( $\blacksquare$ ). Сплошные тонкие линии — обобщенные кривые ВО для кислого и щелочного конформера лигандного низкоспиритового Нв. Крайняя левая сплошная кривая — обмен в PDLA в условиях полной доступности

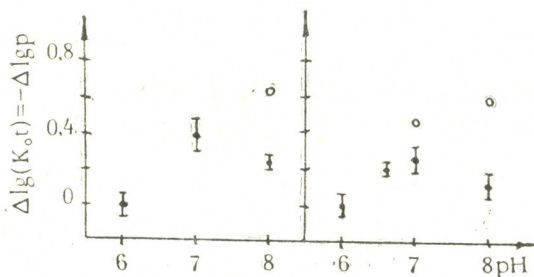


Рис. 3. Среднеарифметические величины смещений (в единицах  $\lg(k_0t)$  соседних (по величинам рН) кинетических кривых ВО относительно друг друга при 20°C в координатах  $X=f(\lg k_0t)$  — сплошные кружки. Вертикальные черточки — интервалы среднеквадратичных отклонений. Для рН 6 указан среднеквадратичный разброс экспериментальных точек в параллельных опытах. Полюе кружки — условные суммарные среднеквадратичные величины смещений (в единицах  $\lg(k_0t)$  кинетических кривых относительно кривой при рН6: а — карбокси и дезокси формы  $\alpha$ -субъединиц, б — карбокси и дезокси формы  $\beta$ -субъединиц (кроме рН 8, для которого приведены данные карбокси формы)

кулы, характерно как для различных форм Hb, так и для субъединиц. Поэтому можно предположить, что в Hb и его субъединицах отклонение рН-зависимости скорости ВО от предсказываемой ЕХ2 механизмом обусловлено рН-зависимыми, часто очень тонкими и непрерывно протекающими изменениями конформационного состояния белковой глобулы в области сохранения ее функционально активной (нативной) структуры. Эти изменения могут быть очень малы по абсолютной величине и поэтому не улавливаются физическими методами, обычно используемыми для

оценки конформационного состояния белка. Но их можно зарегистрировать при помощи методов, позволяющих получать информацию о динамической структуре белка или о его стабильности. Например, дестабилизация структуры лигандного Hb при рН < 7, регистрируемая методом ВО, коррелирует с увеличением степени диссоциации белка на мономеры, фиксируемой по увеличению реакционной способности SH групп Цис104  $\alpha$  и 112  $\beta$ , замаскированных в контактах между субъединицами тетрамера [11].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Джинория К. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., 4, 264—269, 1986.
2. Джинория К. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., 2, 125—130, 1987.
3. Джинория К. Ш. Изв. АН ГССР, сер. биол., II, 213—216, 1985.
4. Antonini F., Brunori M. Haemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, London, 1971, 21—37.
5. Benesch R. E., Benesch T. M. Methods Biochem. Anal., 1962, 10, 43.
6. Benson E. S., Rossi Fanelli M. R., Giacometti G. M., Rosenberg A., Antonini E. Biochemistry, 1973, 12, 2699—2706.
7. Bucci E., Frontichelli C. J. Biol. Chem., 1965, 240, 551—552.
8. Gelin B. R., Karplus M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 71, 801—805.
9. Geraci G., Parkhust L. I., Gibson Q. H. J. Biol. Chem., 1969, 244, 4664—4667.
10. Takano T. J. Mol. Biol., 1977, 110, 569—584.
11. Jothavong J., Ruenwongsa P. BBA, 303. 44—51, 1973.

ჰემოგლობინის  $\alpha$ -და  $\beta$ -სუბერთეულების კონფორმაციული მდგომარეობის შესწავლა წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდით ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ )

ა. ჯინორია

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის მეცნარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

წყალბადის ჩანაცვლების მეთოდის ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ ) გამოყენებით შესწავლილ იქნა ჰემოგლობინის  $\alpha$ -და  $\beta$ -სუბერთეულების კონფორმაციული მდგომარეობა.

ნაჩვენებია, რომ pH6—8 ინტერვალში ლიგანდის შეცვლისას ჰემოგლობინის  $\alpha$ -და  $\beta$ -სუბერთეულების შიდა მოლეკულური მოძრაობა სავარძნობლად არ იცვლება.

INVESTIGATION OF ISOLATED  $\alpha$ - AND  $\beta$ -HEMOGLOBIN SUBUNITS  
CONFORMATIONAL STATES USING THE METHOD OF HYDROGEN  
EXCHANGE ( $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ )



K. Sh. JINORIA

Institute of Plant Biochemistry, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR

S u m m a r y

By means of hydrogen exchange method hemoglobins  $\alpha$ -and  $\beta$ -subunits conformational states were studied. terval replacement of one ligand doesn't markedly increases the intramolecular mobility of isolated  $\alpha$ -and  $\beta$ -hemoglobin subunits.

It is concluded that in pH6 — 8 in-

УДК 616:127—008.64.577.353

БИОФИЗИКА

## КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ МИОФИБРИЛЛ НОРМАЛЬНОГО МИОКАРДА

Н. В. Карсанов, Б. Г. Джинчвелашвили

Республиканский научно-исследовательский центр медицинской биофизики МЗ ГССР,  
Тбилиси

Поступила в редакцию 11.11.1985

Установлено, что вторичные структуры Г- и Ф-актинов Штрауба миокарда человека достоверно не отличаются друг от друга и от Г- и Ф-актинов Штрауба и Спудича—Ват миокарда и скелетных мышц животных.

При полимеризации актина оптическая активность ароматических аминокислотных остатков резко изменяется (выраженные положительные эллиптичности в области 255—278 нм приобретают резко отрицательные значения, а отрицательные при 287 и 292 нм усиливаются в интенсивности). Развивается предположение, что полимеризация актина — процесс, включающий конформационную перестройку глобул актина, необходимую для образования (самосборки) и функционирования тонкой миофиламенты.

Оптическая активность Ф-актина Штрауба миокарда человека в ближней УФ области достоверно не отличается от активности Ф-актинов Штрауба миокарда собаки и кролика, а также тонкой миофиламенты и Ф-актина Спудича—Ват собаки.

Показано, что актин миокарда человека не подвергается посмертным конформационным изменениям на протяжении по крайней мере 20 часов (крайний срок исследования) после смерти.

Опыты с гибридными актомиозинами, содержащими нормальный миозин и патологический актин Штрауба, полученный из сердец человека [6] и экспериментальных животных при целом ряде заболеваний [7, 8, 9, 39], убедительно подтвердили не только важную роль актина в понижении сократительной способности пучков глицеринизированных волокон миокарда, но и вывод, что свойства актина изменяются раньше изменения свойств миозина [5, 39].

Одновременно с этими исследованиями нами проводились исследования по изучению конформационного состояния актина и других миофибриллярных белков миокарда методом

определения их оптической активности при острой и хронической (застойной) недостаточности сердца человека, а также недостаточности сократительной функции миокарда животных при различных экспериментальных поражениях мышцы сердца.

Результаты этих [2, 3, 4] и других наших исследований в обобщенном виде приводятся в этой работе. При этом в настоящей статье рассматривается оптическая активность белков нормального миокарда, тем более что такие данные по миокарду, а некоторые и по поперечно-полосатой мышце отсутствуют в литературе и имеют самостоятельное значение.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белки миофибрилл получали из миокарда практически здоровых людей, погибших от тяжелой физиче-

ской травмы, сердца собаки и кролика и поперечно-полосатой мышцы последнего.



В случае секционного материала мышца сердца бралась в период от 10 до 20 ч после смерти.

Актин получали по методам Спудича и Ват [61] и Штрауба [63] — в последнем случае в отличие от оригинального метода экстрагировали его в продолжение 2 ч при 0°C. Миозин извлекали по методу Шиверик и соавт. [60], тропомиозин — по Бейли [12], нативный тропомиозин и  $\alpha$ -актинин — по Эбаши [25], а тонкую миофилламенту — по методике, основанной на методах Дриска с соавт. [23] и Обината с соавт. [52].

Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрополяриметре «Кери-60» (фирмы «Вариан») с приставкой для КД. Показания прибора калибровали по значению эллиптичности 0,1%-ного раствора d-10-камфоросульфоновой кислоты при 290 нм. Спектры записывали в дальней (200—250 нм) и ближней (250—300 нм) ультрафиолетовой (УФ) областях. При исследовании спектров в дальней УФ области использовали кювету с длиной оптического пути, равной 0,5 мм, и концентрацию белка 1—1,5 мг/мл, а в ближней — соответственно 1 см и 1—2 мг белка/мл.

Удельную эллиптичность рассчитывали по формуле  $[\theta] = \frac{M \cdot \theta^\circ}{100 \cdot l \cdot C}$

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры КД Г-актинов, полученных как по методу Спудича и Ват, так и по методу Штрауба, в дальней УФ области оказались практически идентичными. Они имеют отрицательный максимум при 208 и плечо при 220 нм. Расчет кривых указывает, что содержание  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуры и неупорядоченной конформации в очищенном актине миокарда и актине Штрауба, содержащем минорные белки практически здорового человека и животных, а также тонкой миофилламенте миокарда собаки, фактически во всех случаях равно и совпадает с их содержанием в актине поперечно-полосатой мышцы кролика, полученном нами и приводимом в литературе [44, 48, 50, 54, 57] (таблица).

[14], где  $\theta^0$  — эллиптичность в градусах,  $l$  — оптическая длина кюветы в см,  $C$  — концентрация белка в г/мл,  $M$  — молекулярный вес, который в случае дальней УФ области брали равным 115 (средний молекулярный вес аминокислотного остатка в белке), а ближней — молекулярному весу исследуемого белка. Расчет вторичной структуры производили по Чен [21].

УФ спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре «Кери-118», позволяющем записывать как спектр поглощения, так и его первую производную. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента поглощения — в случае чистого актина  $A_{290}^{0,1\%} = 0,63$  [34], миозина —  $A_{280}^{1\%} = 5,6$  [60]. Контролировали ее методом биуретовой реакции [11].

Кривые КД подвергли статистической обработке по точкам. Достоверность различий средних точек (P) оценивали с использованием критерия Стьюдента [13].

Таким образом, более высокое содержание  $\alpha$ -спирали в тропомиозин-тропоминовом комплексе увеличивает содержание  $\alpha$ -спирали в актине Штрауба миокарда человека, собаки и кролика, а также тонкой миофилламенте миокарда собаки по сравнению с актином Спудича—Ват лишь незначительно недостоверно — на 1—3%, что связано со значительно меньшим содержанием его по сравнению с актином в этих белках и тонкой миофилламенте.

В ближней УФ области спектры КД, обусловленные оптической активностью ароматических аминокислотных остатков, имеют сложный вид. В частности, спектр КД Г-актина Спудича—Ват миокарда собаки характеризуется положительными фенилала-



ниловыми и тирозиловыми и отрицательными тирозиловыми, а также триптофаниловыми полосами (рис. 1А).

Оказалось, что спектры КД Г-актина Штрауба миокарда человека и животных (собака, кролик), а также Спудича и Ватт миокарда собаки и *m. psoas* кролика в ближней УФ об-

ласти при 287 и 292 *нм* (тирозиновые [51] и триптофановые [64] соответственно) увеличиваются в интенсивности (рис. 1Б). Разностные спектры Ф- и Г-актинов (рис. 1С) наглядно демонстрируют, что наибольшие отклонения при этом происходят в эллиптичности при 285 и 272 *нм* (рис. 1С). Одновременно наблюдается ко-

Таблица 6

Содержание  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуры и неупорядоченной конформации ( $\rho$ ) в Г-актине Спудича-Ватт и Г-актине Штрауба, а также в тонкой миофиламенте миокарда человека и животных (в %)

Актин	Ткань	Вид	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура	Неупорядоченная конформация
Спудича—Ватт	Миокард	Собака (n*=4)	29±4	18±5	53±5
	поперечно-полосатая мышца	(кролик n=5)	28±3	22±5	50±5
		кролик [48]	26(25÷30)	26(20÷30)	48
		кролик [50]	30	10	—
	кролик [51]	30	—	—	
		кролик (расчитанное из первичной структуры актина) [57]	25	14	—
Штрауба	миокард	человек (n=5)	32±3	20±4	48±5
		собака (n=11)	30±4	20±5	50±5
		кролик (n=9)	30±5	19±5	51±5
		кролик [54]	35 (31 для K1 актина)	—	—
Тонкая миофиламент	миокард	собака (n=4)	32±6	18±5	50±5

\* n — число исследованных случаев

ласти одинаковы и заметно не отличаются, если не придавать значение различиям в полосе при 255 *нм* (из-за значительных шумов в этой области и затруднительности определения местоположения точек спектральной линии), которые обнаружили между актином Спудича—Ватт и актином Штрауба миокарда собаки, где эллиптичность в первом случае была определена как нулевая, а во втором — отрицательная (рис. 1А).

Процесс полимеризации Г-актина ведет к резкому изменению спектра в области 250—300 *нм*: положительные полосы при 255—265 *нм* (принадлежащие фенилаланинам [33]) и 272—278 *нм* (обусловленные тирозинами [51]), становятся резко отрицательными, а отрицательные

ротковолновый сдвиг положения пиков на 1,5—2 *нм* (голубой сдвиг).

Сравнение спектра Ф-актина Спудича—Ватт миокарда собаки в ближней УФ области со спектром Ф-актина Спудича—Ватт *m. psoas* кролика не выявляет достоверных различий (рис. 1В).

Оптические активности Ф-актинов Штрауба миокарда человека, собаки и кролика в этой области ни в одной из точек спектральных кривых достоверно не отличаются друг от друга. Однако оптическая активность Ф-актина Штрауба миокарда собаки и кролика по сравнению с оптической активностью Ф-актина Спудича—Ватт собаки в полосе при 285 *нм* имеет меньшую отрицательность ( $P < 0,05$  и  $0,01$  соответственно). При этом спек-

тры КД Ф-актина Штрауба миокарда кролика достоверно отличаются от спектров КД Ф-актина Спудича—Ват

В полосе при 272 нм наблюдаются достоверные различия и между Ф-актином Штрауба миокарда и Ф-акти-

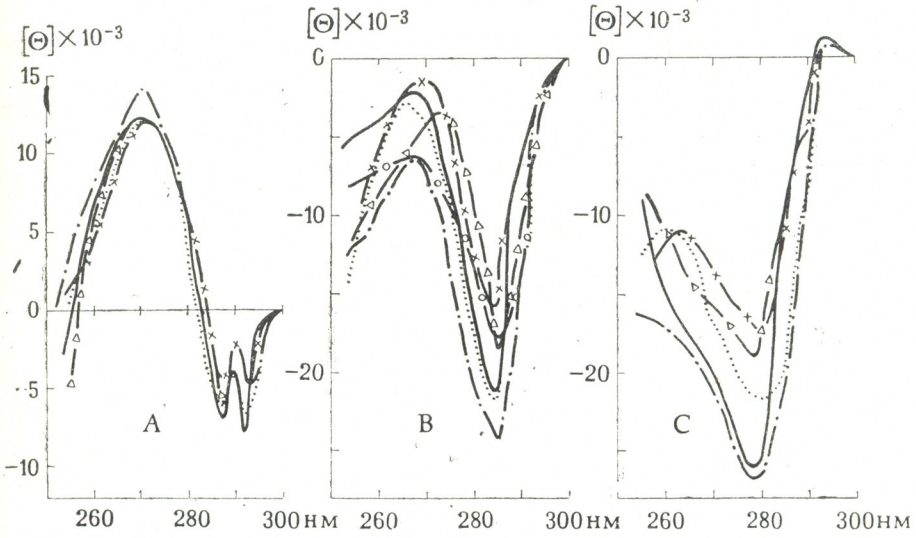


Рис. 1. Спектры КД в ближней УФ области: актина Штрауба миокарда человека (—), собаки (— — —), кролика (— × —), актина Спудича—Ват миокарда собаки (— · —), п. psoas кролика (· · ·), тонкой нит миокарда собаки (— о —); А — Г-актин, В — Ф-актин, С — разностный спектр между ними

миокарда собаки не только в полосе при 285, но и при 272 нм ( $P < 0,05$ ).

ном Спудича—Ват п. psoas кролика ( $P < 0,02$ ) — рис. 1В.

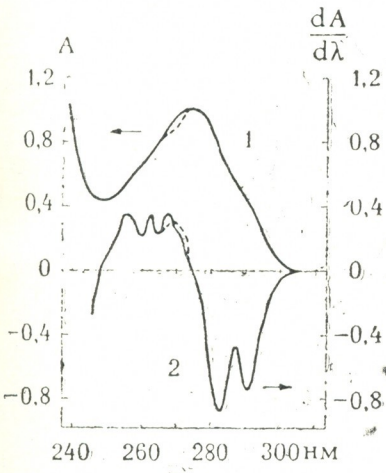


Рис. 2. УФ спектры поглощения (1) и их первые производные (2): — актин Спудича—Ват и — — — актин Штрауба миокарда собаки

Спектр КД тонкой миофиламенты миокарда собаки и в дальней УФ области и в области 250—300 нм практически повторяет спектры Ф-актинов Штрауба человека, собаки и кролика, и так же, как спектры этих актинов, отличается от спектра Ф-актина Спудича—Ват миокарда собаки лишь меньшей отрицательностью эллиптичности полосы при 285 нм (рис. 1).

УФ-спектры поглощения и их первые производные актинов Спудича—Ват и Штрауба животных тоже оказались идентичными. Все отличие спектра актина Штрауба от актина Спудича—Ват сводится к небольшому дополнительному пику при 265 нм. Однако это отличие оказалось столь несущественным, что спектры первых производных этих актинов совпадают (рис. 2).

Спектры КД миозинов миокарда собаки и кролика в дальней и ближ-

ней УФ-областях, также как и соответствующие спектры актинов, не отличаются друг от друга и от спектра КД миозина поперечно-полосатой мышцы, приводимого в литературе [49]. Содержание  $\alpha$ -спирали как в миоине миокарда собаки, так и миозине миокарда кролика равняется  $65 \pm 5\%$  (рис. 3), что совпадает с содержанием его в миозине поперечно-полосатой мышцы [49, 58].

УФ спектры поглощения этих миозин и их первые производные тоже оказались одинаковыми (рис. 3). Это

мышцы) отсутствует триптофаниловый аминокислотный остаток, в спектре КД в области 200—300 нм нет полосы при 292 нм. Присоединение тропонина (нативный тропомиозин — рис. 4) приводит к уменьшению степени отрицательности полос и появлению полосы при 292—295 нм.

Спектр КД нативного тропомиозина миокарда оказался идентичным спектру КД нативного тропомиозина скелетной мышцы кролика [62].

Отсутствие триптофана в тропо-

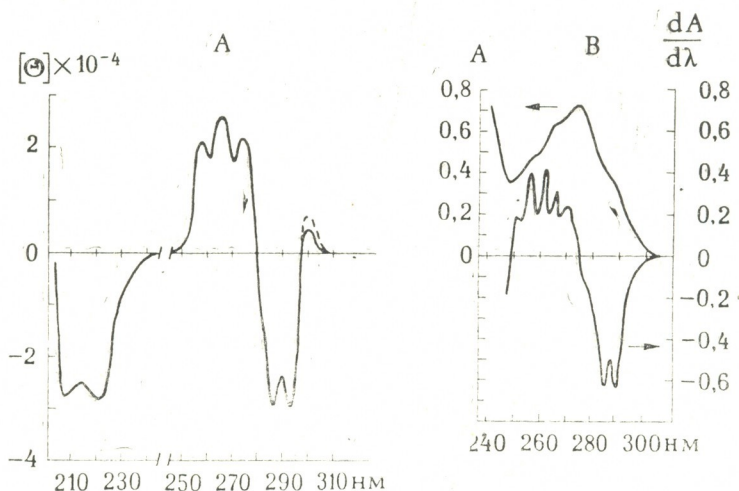


Рис. 3. Спектр КД (А) и УФ спектр (В) миозина миокарда собаки

дает основание заключить, что состав ароматических аминокислотных остатков миозина миокарда собаки и кролика идентичен.

Содержание  $\alpha$ -спирали в тропомиозине миокарда собаки, как и ожидалось, оказалось равным 95%, а нативного тропомиозина — 76%. Следовательно, эти данные тоже совпадают с результатами, полученными для тропомиозина и нативного тропомиозина скелетной мышцы кролика — 90—100% [51, 58, 62] и 75% [62] соответственно.

Все полосы спектра КД тропомиозина в области 250—300 нм оказались расположенными в отрицательной области (рис. 4), как и в случае скелетной мышцы [62].

Так как в тропомиозине миокарда (как и в тропомиозине скелетной

миозине особенно ярко проявилось на первой производной УФ спектра поглощения — полоса триптофана при 295 нм полностью отсутствует (рис. 4). Отсутствие этой полосы как в спектрах КД, так и в УФ спектрах поглощения и в их первых производных расценивается нами как показатель чистоты препаратов тропомиозина.

Для выяснения вклада минорных белков в спектр Г-актина Штрауба миокарда мы использовали метод tandem. Результаты этих исследований показали, что добавление к раствору Г-актина Спудича—Ват (1,5 мг/мл), нативного тропомиозина (0,35 мг/мл) в одном опыте и  $\alpha$ -актинина (0,25 мг/мл) в другом не ведет к существенному изменению спектров ак-

тина Спудича—Ват — имеет место лишь некоторое недостоверное уменьшение эллиптичности полос спектра. Это явление можно объяснить лишь

значительно меньшей удельной оптической активностью нативного тропомиозина и  $\alpha$ -актина по сравнению с активностью актина.

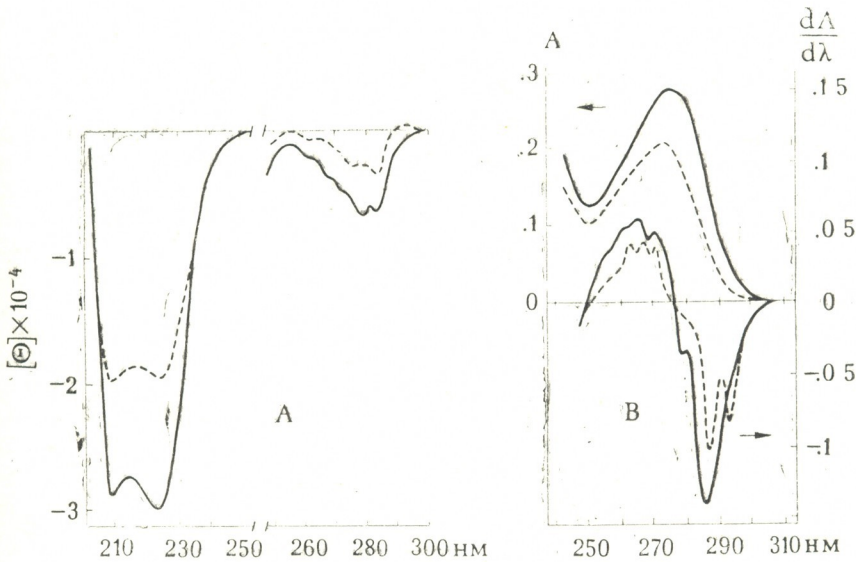


Рис. 4. Спектры КД (А) и УФ спектры (В) тропомиозина (—) и нативного тропомиозина (— —) миокарда собаки

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты дают основание заключить, что все исследованные белки миофибрилл миокарда (актин мономерный и полимерный), миозин, тропомиозин, а также его комплекс с тропонином (нативный тропомиозин), имеют специфичные, присущие только им спектры КД в области 200—300 нм.

Сравнительный анализ спектральных кривых актинов Спудича—Ват миокарда и *m. psoas* кролика, а также актинов Штрауба миокарда человека, собаки и кролика и тонкой миофиламенты миокарда собаки, дает основание считать, что как мономер, так и нить актина независимо от того, получены ли они из миокарда человека, собаки и кролика или же поперечно-полосатой мышцы (и даже немышечной клетки, хотя и содержат не  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -формы актина [43, 55]), имеют одинаковую оптическую активность.

Иначе говоря, вторичная структура и конформация микроокружения аминокислотных остатков актина лише-

ны видовой и тканевой специфичности, так как достоверные различия между спектрами актинов Спудича—Ват и Штрауба, а также тонкой миофиламенты, наблюдаемые в полосе при 285 (в некоторых случаях) и реже при 272 нм, обусловлены присутствием регуляторных белков, обладающих значительно меньшей удельной оптической активностью, чем актин, а не различиями в структурах актинов. Это обусловлено, нужно считать, тем, что в процессе эволюционного развития видов и дифференцировки тканей вторичная структура актина и конформация участков расположения ароматических аминокислотных остатков существенно не изменялись или изменялись столь незначительно, что эти изменения не могут быть зарегистрированы методом определения оптической активности белков.

Правомерность распространения подобного заключения на миозин, тропомиозин и его комплекс с тропонином (нативный тропомиозин) пока-

жут будущие исследования. Пока же можно констатировать, что полные спектры КД миозина, тропомиозина и его комплекса с тропомином (нативного тропомиозина) миокарда собаки, полученные нами, не отличаются от таковых скелетной мышцы кролика, приводимых в литературе [49, 51, 58, 62].

Нет различий и в УФ спектрах поглощения и их первых производных соответствующих белков, и все это несмотря на то, что АТФазная активность [15, 41] миозинов скелетных мышц и миокарда, например, а также их иммунологические свойства [29] существенно отличаются. При этом в АТФазе миокарда имеют место не только межвидовые [40], но и внутриорганные различия.

По нашим данным, полимеризация актина Спудича—Ват миокарда (как и полимеризация актина поперечно-полосатой мышцы кролика) протекает без изменения вторичной структуры мономера [32, 48, 50], однако микроокружение ароматических аминокислотных остатков и в случае миокарда изменяется настолько, что спектры Ф-актина в области 250—300 *нм* становятся неузнаваемыми, как и в случае поперечно-полосатой мышцы [48] — формируется спектр, характерный для конформации микроокружения ароматических аминокислотных остатков полимеризованного актина (рис. 1В). В процессе формирования этой конформации происходит перемещение ароматических аминокислотных остатков в условия, отличающиеся гидрофобностью — меньшей доступностью для воды [1, 30, 31, 48].

Может возникнуть мысль, что резкое изменение спектра Г-актина при его полимеризации происходит в связи с тем, что резко возрастает отрицательность тирозиловой полосы при 285 *нм*, что и тянет за собой все остальные полосы. Однако такую мысль отвергает анализ разностных спектров КД (рис. 1С), полученных вычитанием спектров Г-актина из спектров Ф-актинов — как правило, получаются сложные, а не гаусовские кривые. Следовательно, имеет место изменение оптической активности не только тирозилов, но и других ароматических аминокислотных остатков.

За полимеризацию актина ответственные Гис-40 [31], область аминокислотных остатков 51—62 [16, 18], Тир-69 [20] и 3-метГист-73 [37] — изолированная химическая модификация Тир-53 и Лиз-61 [16, 18] полностью блокирует полимеризацию, а Гис-40 и Тир-69 замедляет ее.

Модификация Цис-373 [17, 56] и Лиз-372 [22] не препятствует полимеризации, но «чувствует» ее. Можно полагать, «чувствует» полимеризацию и Цис-217 — аминокислотный остаток, присоединяющий АТФ [29, 46], — при полимеризации происходит гидролиз АТФ и это, нужно считать, сопровождается конформационными изменениями указанной области [19].

Установлено, что тяжелая цепь скелетного миозина прикрепляется к N-концу полипептидной цепи актина — в районе первых одиннадцати аминокислотных остатков [24]. Легкая щелочная цепь же  $LC_1$  миозина присоединяется к актину в С-концевой его части, к 360 и 363 аминокислотным остаткам.

В сократительном акте взаимодействию миозина с N-концевой частью предположительно приписывается активизирующее действие на АТФазу, а с С-концевой — регулирующая роль.

В полном согласии с описанными явлениями находятся результаты опытов с фрагментированными молекулами актина — отщепление малого домена [35, 45, 47] и даже части его [20] — до 62 аминокислотного остатка включительно — ведет к утере способности актина полимеризоваться [20, 35], активировать АТФазу [20, 35] и образовывать с миозином комплекс, способный суперпреципитировать, хотя способность связываться с миозином при этом сохраняется [20].

Тропомиозин присоединяется к актину: одним участком к Арт-95 [36], другим к Лиз-237 [26] и третьим к С-концевому, общему с миозином, участку актина.

Приведенные данные дают основание считать, что за полимеризацию актина и присоединение миозина ответственен малый, протеолитически неустойчивый домен актина, содержащий 1—68 аминокислотных остатков [35] и, по-видимому, область со-

единения малого домена с большим. Как уже отмечалось, модификация Тир-69 замедляет полимеризацию, а фотоокисление 3-метГист-73 полностью исключает ее [37], правда, в причастности к последнему явлению только 3-метГист-73 можно усомниться, так как при фотоокислении изменяется оптическая активность не только триптофанила (к 3-метГист-73 прикреплен Трип-74), но и всех остальных ароматических аминокислотных остатков. Это свидетельствует о разлитых структурных перестройках в обширной части, если не во всей молекуле актина. Следовательно, при фотоокислении, возможно, страдают и другие ответственные за полимеризацию участки актина.

То, что С-концевая часть полипептидной цепи молекулы актина (третий домен [38, 60]) «чувствует» процесс полимеризации, нужно считать, связано с одновременно происходящей перестройкой структуры этой части его молекулы.

Средняя часть молекулы при полимеризации (судя по тому, что тропомиозин не способен соединиться с Г-актином [42]), также подвергается перестройкам, причем не только в перноре, предшествующем полимеризации (тропомиозин не присоединяется не только к Г-актину, но и к мономеру актина, находящегося в Ф-конформации), но, очевидно, и в процессе полимеризации [53].

Анализ первичной структуры актина миокарда и поперечно-полосатых мышц [27] свидетельствует, что в малом домене из ароматических аминокислотных остатков расположены Фен-21 и Тир-53, в области соединения малого с большим (или средним) доменом — Тир-69 и Трип-74, а в С-концевой части молекулы, в области второго места взаимодействия с миозином, общего с тропомиозином, — Тир-361 и в некотором отдалении — Фен-374. Последний, подоб-

но Лиз-372 и Цис-373, по-видимому, также может «чувствовать» процесс полимеризации, так как присоединен к Цис-373. Наконец, в средней части полипептидной цепи (среднем домене), вблизи от места прикрепления тропомиозина расположены Тир-91 и Фен-90, а также Тир-218, присоединенный к Цис-217.

Этот углубленный анализ дает основание считать, что изменение оптической активности тирозинов, триптофанов и фенилаланинов должно отражать конформационные перестройки областей актина, ответственных за взаимодействие актин-актин, актин-миозин и, возможно, актин-тропомиозин.

Тождество спектров КД Г- и Ф-актинов Штрауба миокарда человека и Г- и Ф-актинов Штрауба миокарда животных дает основание считать, что структура актина человека в отрезке времени по крайней мере до 20 часов после смерти не претерпевает уловимых оптическими методами посмертных конформационных изменений. Это согласуется с данными, свидетельствующими о неподверженности или весьма низкой подверженности фибриллярного актина явлениям протеолиза [60].

В свою очередь то, что спектры КД Ф-актина Штрауба человека и животных в области 200—300 нм не отличаются и от спектров тонкой миофиламенты миокарда и что они практически не отличаются от спектра Ф-актина Спудича—Ват (как уже отмечалось, небольшие принципиальные различия между спектрами актина Штрауба и актина Спудича—Ват оказались обусловленными присутствием минорных белков) дает основание данным, полученные по актину Штрауба *in vitro*, экстраполировать *in vivo* на тонкую миофиламенту миокарда человека и ее основной блок — актин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Веденкина Н. С., Ивкова М. Н., Бурштейн Э. А. Мол. биол., 6, 467—470, 1972.
2. Джинчвелашвили Б. Г. Биофизика, 27, 587—589, 1982.
3. Карсанов Н. В., Джинчвелашвили Б. Г. Сообщения АН ГССР, 103, 169—172, 1981.
4. Карсанов Н. В., Джинчвелашвили Б. Г. Сообщения АН ГССР, 103, 461—464, 1981.



5. Карсанов Н. В., Мелашвили Н. О., Хаиндрава Н. К., Мамулашвили Л. Д., Демурия Е. Д. В сб.: Артериальная гипертония и недостаточность сердца (Инст. клин. и эксп. кардиологии им. М. Д. Цинаидзе-Гришвили), Тбилиси, 1971, 115—117.
6. Карсанов Н. В., Нижарадзе Г. И., Пирцхалаишвили М. П., Эристави Д. Д., Хундадзе О. Ш., Кучава Л. Е., Павленишвили И. В. Изв. АН ГССР, сер. биол., 11, 351—356, 1985.
7. Карсанов Н. В., Эристави Д. Д. Биофизика. 28, 748—751, 1983.
8. Карсанов Н. В., Эристави Д. Д., Джинчвелашвили Б. Г. Изв. АН ГССР, сер. биол., 7, 561—568, 1981.
9. Карсанов Н. В., Эристави Д. Д., Пирцхалаишвили М. П. Теоретические и методические проблемы молекулярной кардиологии, МЗ СССР, ВКНЦ АМН СССР, М., 1978, 37—38.
10. Мантуленко В. Б., Хайтлина С. Ю., Шелудько Н. С. Биохимия, 48, 69—74, 1983.
11. Bailey J. L. Techniques in Protein Chemistry, „Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London—New York, 1962.
12. Bailey K. Biochem. J. 43, 271—279, 1948.
13. Bailey N. T. J. Statistical Methods in Biology. The English Universities Press Ltd, University of Oxford, 1959.
14. Balasubramanian D., Kumar C. Appl. Spectroscopy Rev., 11, 223—286, 1976.
15. Barany M., Gaetjens E., Barany March K., Karp E. Arch. Biochem., 106, 280—293, 1964.
16. Bender N., Fasold H., Kenmoky A., Middelhoff G., Volk K., Eur. J. Biochem., 64, 215—218, 1976.
17. Brauer M., Sukes B. D. Biochemistry, 25, 2187—2191, 1986.
18. Burtnick L. O. Biochim. Biophys. Acta., 791, 57—62, 1984.
19. Carlier M. F., Pantaloni D., Korn E. D. J. Biol. Chem., 259, 9983—9986, 1984.
20. Chantler P. D., Gratzer W. B. Eur. J. Biochem., 60, 67—72, 1975.
21. Chen Y—H., Yang J. T., Chau K. H. Biochemistry, 13, 3350—3359, 1974.
22. Detmers P., Weber A., Elzinga M., Stephens R. E. J. Biol. Chem., 256, 99—105, 1981.
23. Driska S., Hartshorne D. J. Arch. Biochem., 167 203—212, 1975.
24. Duke J., Takashi R., Ue K., Morales M. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 302—306, 1976.
25. Ebashi S., Iwakura H., Nakamura H., Nakamura R., Ooi Y. Biochem. J. 345, 201—211, 1966.
26. El-Saleh S. C., Thieret R., Johnson P., Potter J. D. J. Biol. Chem., 259, 11014—11021, 1984.
27. Elzinga M., Collins J. H., Kuehl W. M., Adelstein R. S. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, 2687—2691, 1973.
28. Faust U., Fasold H., Ortanderl F. Eur. J. Biochem., 43, 273—279, 1974.
29. Finck H. Biochim. Biophys. Acta, 111 231—238, 1965.
30. Hegyi G., Cséke Cs., Fabian F. Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hungaricae, 11, 221—222, 1976.
31. Hegyi G., Premecz G., Sain B., Mühlrad A. Eur. J. Biochem., 44, 7—12, 1974.
32. Hegyi G., Venyaminov S. Y. FEBS Lett., 109, 134—136, 1980.
33. Horwitz J., Strickland F. H., Billups C. J. Amer. Chem. Soc., 91. 184—190. 1969.
34. Houk T. W., Ue K. Anal. Biochem., 62, 66—74, 1974.
35. Jacobson G. R., Rosenbusch J. P. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 73. 2742—2746, 1976.
36. Johnson P., Blazyk J. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 1013—1018, 1978.
37. Johnson P., Perry S. V. Biochem. J., 119, 293—298, 1970.
38. Kabsch W., Suck D. Abstract of EMBO-MDA Alpbach Wortshop on Muscle 21—25, Alpbach, Austria, 1983.
39. Karsanov N. V., Eristavi G. G. Studia Biophysica, 85, 29—30, 1981.
40. Katz A. M., Repke D. I., Rubin B. B. Circulat. Res., 19, 611—621, 1966.
41. Klotz C., Leger J. J. Marotte F. A. Eur. J. Biochem., 65, 607—611, 1976.
42. Lal A. A., Korn E. D. Biochemistry, 25, 1154—1158, 1986.
43. Landon F., Huc C., Thome F., Oriol C., Olomucki A. Eur. J. Biochem., 81, 571—577, 1977.
44. McCubbin W. D., Kay C. M. Biochim. Biophys. Acta, 214, 272—281, 1970.
45. Mendelson R., Gebhard W., Holmes K., Kabsch W., Suck D., Couch J., Morris E., O'Brien E. Biophys. J., 45, 391a, 1984.
46. Miki M., Mihashi K. Biochim. Biophys., Acta, 533, 163—172, 1978.
47. Mornet D., Ue K. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 81, 3680—3684, 1984.
48. Murphy A. J. Biochemistry, 10, 3723—3728, 1971.





49. Murphy A. J. Arch. Biochem., 163, 290—296, 1974.
50. Nagy B. Arch. Biochem., 150, 428—435, 1972.
51. Nagy B. J. Biol. Chem., 252, 4557—4563, 1977.
52. Obinata T., Hayashi I., Fischman D. A. Develop. Growth. Differ., 16, 105—121, 1974.
53. Ohara O., Takahashi S., Ooi T., Fujiyoshi E. Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 988—994, 1981
54. Oriol C., Landon M. F., Hildebrand H. F. Cytobiology, 14, 350—361, 1977.
55. Pardee J. D., Bamburg J. R. Biochemistry, 18, 2245—2252, 1979.
56. Porter M., Weber A. FEBS. Lett., 105, 259—262, 1979.
57. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V., Lim V. I. In: Proteins of Contractile Systems, 31, «Akademia Kiado», Budapest, 1975, 145—160.
58. Rainford P., Rice R. V. Biopolymers, 9, 1—10, 1970.
59. Sakabe N., Sakabe K., Sasaki K., Kondo H., Ema T., Kamiya N., Matsushima M. J. Biochem., 93, 299—302, 1983.
60. Shiverick K. T., Thomas L. L., Alpert N. R. Biochim. Biophys. Acta, 393, 124—133, 1975.
61. Spudich J. A., Watt S. J. Biol. Chem., 246, 4866—4871, 1971.
62. Staprans I., Watanabe S. J. Biol. Chem., 245, 5962—5966, 1970.
63. Straub F. B. Actin. II Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, 3, 1943, 23—37.
64. Strickland E. H., Horwitz J., Kay E., Shannon L. M., Wilchek M., Bil-lups C. Biochemistry, 10, 2631—2638, 1971.

ნორმალური მიოკარდიუმის მიოფიბრილების ცილების კონფორმაციული მდგომარეობა

ნ. კარსანოვი, ბ. ჯინჩველავილი

საქართველოს ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს რესპუბლიკური სამეცნიერო კვლევითი სამედიცინო ბიოფიზიკის ცენტრი, თბილისი

რეზიუმე

დადგენილია, რომ ადამიანის მიოკარდიუმის შტრაუმის გ-და ფ- აქტინისა მეორადი სტრუქტურები სარწმუნოდ არ განსხვავდებიან ურთიერთისაგან და აგრეთვე ცხოველების მიოკარდიუმის და ჩონჩხის კუნთის შტრაუმისა და სპუდინი-ვატის გ-და ფ- აქტინისაგან.

ნაჩვენებია, რომ ადამიანის მიოკარდიუმის აქტინი სიკვდილის შემდეგ 20 საათის განმავლობაში არ განიცდის სიკვდილის შემდეგისეულ კონფორმაციულ ცვლილებებს.

აქტინის პოლიმერიზაციის დროს მკვეთრად იცვლება არომატული ამინომჟავების ოპტიკური აქტივობა (გამოხატული დადებითი ელიფსურობა 255—278 ნმ

არეში დებულობს უარყოფით მნიშვნელობას, ხოლო ძლიერდება ინტენსივობა უარყოფით 287 და 292 ნმ-ზე). იქმნება წარმოდგენა, რომ აქტინის პოლიმერიზაცია ისეთი პროცესია, რომელიც შეიცავს გლობულარული აქტინის ისეთ კონფორმაციულ გარდაქმნას, რაც საჭიროა წვრილი მიოფილამენტის წარმოქმნისას (თვით-ასხმისა) და ფუნქციონირებისათვის.

ახლო ულტრაიისფერ არეში ადამიანის მიოკარდიუმის შტრაუმის ფ- აქტინის ოპტიკური აქტივობა სარწმუნოდ არ განსხვავდება ბოცვერისა და ძალის მიოკარდიუმის შტრაუმის (ფ-აქტინის და წვრილი მიოფილამენტისა და სპუდინი-ვატის ფ-აქტინის აქტივობისაგან.

CONFORMATIONAL STATE OF NORMAL MYOCARDIUM MYOFIBRIL PROTEINS

N. V. KARSANOV, B. G. JINCHVELASHVILI

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

Summary

It has been established that the secondary structures of Straub G-and F-actin of human myocardium do not differ significantly from each other, from

myocardial Straub, Spudich and Watt G-and F-actin and from those of animal skeletal muscles.



In G-actin polymerization the optical activity of aromatic acid residues is sharply changed (marked ellipticity of positive bands at the 255—278 nm region acquire sharply negative meanings and negative ones at 287 and 292 nm increase in intensity). It is believed, that actin polymerization is a process including a conformational reconstruction of actin globules which is necessary for the formation (selfassembly) and functioning of thin myofilament.

The optical activity of human myocardial Straub F-actin in near-UV region does not differ significantly from that of rabbit and canine myocardial Straub F-actin and also of canine thin myofilament and from that of Spudich and Watt F-actin.

The actin of human myocardium was shown, not to be subjected to postmortem conformational changes during at least 20 hours (the longest period studied) after death.

УДК 612.11:577.3

БИОФИЗИКА

## ВЛИЯНИЕ pH И КОНЦЕНТРАЦИИ БУФЕРНОГО РАСТВОРА НА ТЕПЛОВУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Ц. Х. Салия, Г. Г. Жадан, Е. А. Пермяков, В. Л. Шныров

*Тбилисский государственный институт усовершенствования врачей МЗ СССР  
Институт биологической физики АН СССР, Пущино*

Поступила в редакцию 3.06.1986

Методами сканирующей микрокалориметрии и собственной белковой флуоресценции изучены термоиндуцированные переходы в эритроцитарных мембранах крыс. Показано наличие по меньшей мере четырех термодинамически необратимых переходов, каждый из которых соответствует структурному превращению в определенных мембранных компонентах. Изучено влияние pH и концентрации буферного раствора на тепловые переходы в тенях эритроцитов крыс.

Известно, что некоторые заболевания, например, спонтанная гипертензия, сопровождаются изменением ряда свойств плазматических мембран (теней) эритроцитов [11, 4]. Эти изменения можно регистрировать различными методами, в частности, исследуя индуцированные теплом структурные превращения в эритроцитарных тенях [1, 6, 2]. Очевидно, что для изучения патологических изменений в мембранах, необходимо знать их свойства в норме. Многие физико-химические свойства теней эритроцитов человека хорошо изучены [7, 8, 3, 12, 9, 13, 5], но это-

го нельзя сказать о свойствах теней эритроцитов крысы. Несмотря на это, мембраны эритроцитов крысы часто служат лабораторной моделью теней эритроцитов человека, хотя некоторые наблюдения показывают, что говорить о подобии свойств этих мембран надо с осторожностью [1, 6, 2].

В настоящей работе изложены результаты микрокалориметрического и флуоресцентного изучения влияния pH и концентрации буферного раствора на термоиндуцированные превращения в тенях эритроцитов крыс.

### МЕТОДИКА

В опытах использовали препараты крови 10—12-недельных нормотензивных крыс линии Wistar. Тени эритроцитов получали по методу, описанному ранее [1]. Температурную зависимость избыточной теплоемкости суспензии теней эритроцитов измеряли на микрокалориметре ДАСМ-4 с объемом измерительной ячейки — 0,5 мл при скорости прогрева 1 градус в минуту. Спектры

флуоресценции суспензии теней эритроцитов регистрировали с передней поверхности измерительной кюветы спектрофлуориметра, конструкция которого описана ранее [10]. Во все спектры вводили поправку на спектральную чувствительность установки. Флуоресценция возбуждалась излучением ртутной линии при 280,4 нм.

На рис. 1 приведены термограммы теней эритроцитов крыс в 5 мМ натрий-фосфатном буфере при различных рН в диапазоне от 6 до 10. Из рисунка видно, что изменение рН довольно сильно меняет профиль термограммы. По аналогии с тепловыми переходами в тенях эритроцитов

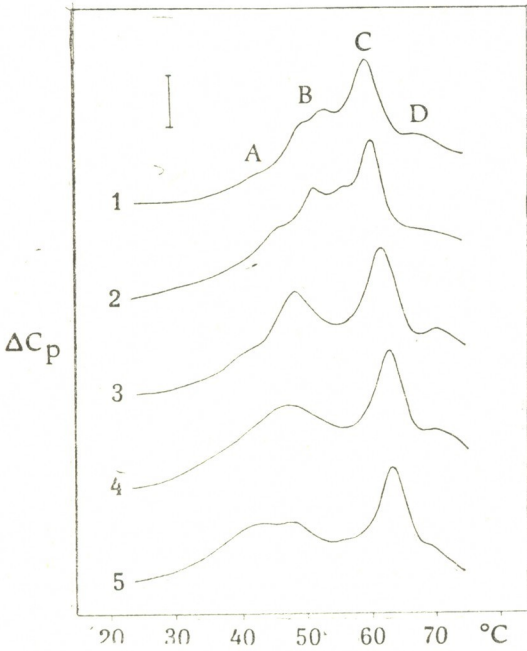


Рис. 1. Зависимость избыточной удельной теплоемкости для суспензии теней эритроцитов крыс в 5 мМ натрий-фосфате от температуры при рН 6,6 (1), 6,94 (2), 8,0 (3), 8,5 (4), 9,75 (5). Вертикальная отметка: 100 Дж·К<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>. Концентрация мембран по сухому весу во всех экспериментах была 5—8 мг/мл

человека латинскими буквами А, В, С и D мы обозначили основные пики теплопоглощения теней эритроцитов крыс [3]. Хорошо известно (для теней эритроцитов человека), что пик А определяется денатурацией спектрина. В полосы В и С значительный вклад вносят денатурационные процессы в различных доменах белка электрофоретической полосы 3 [9, 5], при этом в С-переходе происходит денатурация системы анионного транспорта эритроцитов [12, 13]. рН-зависимость положения максимумов индивидуальных полос теплопо-

глощения А, В и С приведена на рис. 2В. На рис. 2А и 2Б приведены рН-зависимости параметров флуоресценции в 5 мМ натрий-фосфатном буфере (положение спектра и относительный квантовый выход). В зоне рН от 7 до 8 положение пиков в термограмме существенно изменяет-

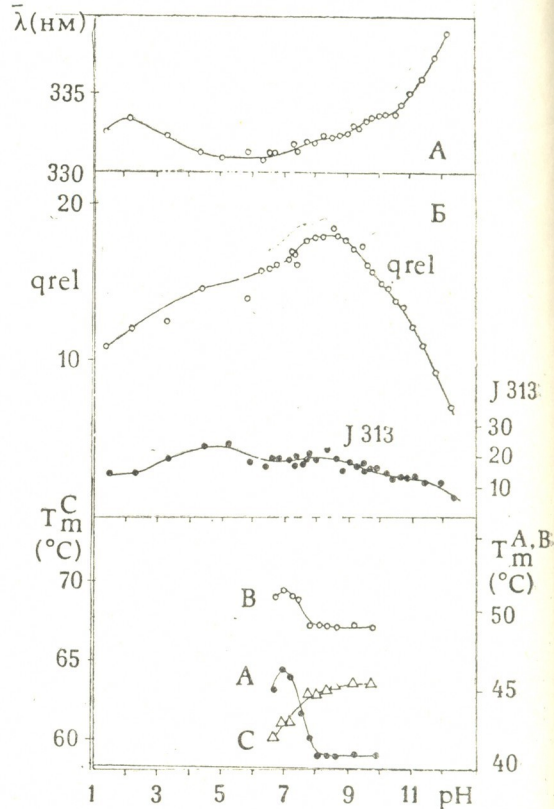


Рис. 2. рН-зависимость параметров собственной триптофановой флуоресценции и положения calorиметрических пиков А, В и С для теней эритроцитов крыс в 5 мМ натрий-фосфате. А — положение спектра, Б — относительный квантовый выход флуоресценции (qrel) и интенсивность рассеянного света ртутной линии при 313 нм, В — положение максимума calorиметрических пиков

ся, причем максимум пика С сдвигается в сторону более высоких температур, а максимумы пиков А и В — более низких температур. В той же зоне рН наблюдается небольшой сдвиг в длинноволновую сторону спектра триптофановой флуоресценции и рост выхода излучения, что

свидетельствует о наличии в этой зоне рН конформационных изменений в белках эритроцитарных мембран. Длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции теней эритроцитов при рН

фосфате при различных значениях рН. На рис. 5В показана рН-зависимость положения пиков А, В и С в термограммах, измеренных в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, а на рис.

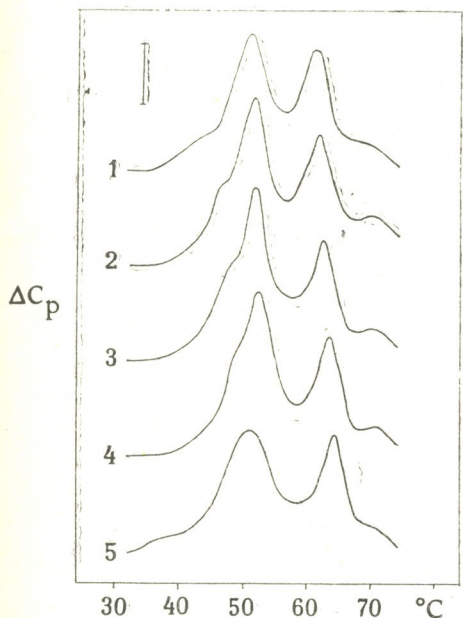


Рис. 3. Зависимость избыточной удельной теплоемкости от температуры для суспензии теней эритроцитов крыс в натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) различной концентрации (в мМ): 5 (1), 9 (2), 13,3 (3), 21,5 (4) и 30 (5)

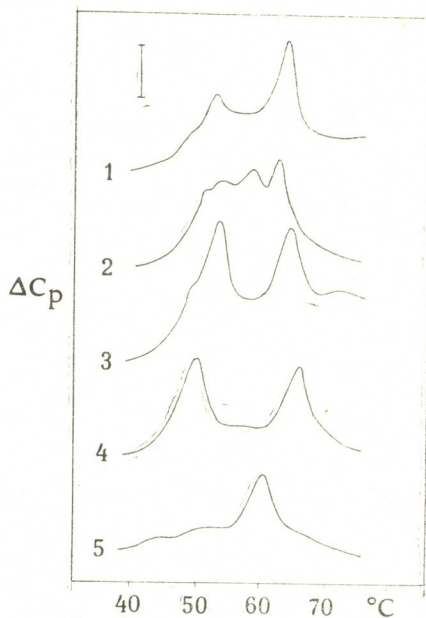


Рис. 4. Зависимость избыточной удельной теплоемкости для суспензии теней эритроцитов крыс в 20 мМ натрий-фосфатном буфере от температуры при рН 6,24 (1), 6,85 (2), 7,46 (3), 7,98 (4) и 10,22 (5)

меньше 4,5 и больше 9, сопровождающийся падением выхода флуоресценции, отвечает, по-видимому, кислотной и щелочной денатурацией белков.

На рис. 3 приведены термограммы для теней эритроцитов крысы, измеренные при рН 7,4 в натрий-фосфатном буфере различной концентрации. Изменение концентрации буфера от 5 до 30 мМ вызывает довольно сильную трансформацию термограмм.

рН-зависимость калориметрических и флуоресцентных параметров, измеренная в 20 мМ натрий-фосфате, несколько отличается от измеренной в 5 мМ буфере. На рис. 4 приведены термограммы для теней эритроцитов крыс, суспендированных в 20 мМ

5А и 5Б — рН-зависимость параметров триптофановой флуоресценции в этом же буфере. Приведенные кривые отличаются от соответствующих кривых, полученных в 5 мМ натрий-фосфате. Хотя и в 20 мМ натрий-фосфате в белках теней эритроцитов происходят конформационные изменения в зоне нейтральных рН, зона этого перехода сдвинута, по сравнению с зоной для 5 мМ фосфата, почти на одну единицу рН в щелочную сторону. По триптофановой флуоресценции этот переход проявляет себя лишь по длинноволновому сдвигу спектра. При этом квантовый выход излучения в зоне перехода не меняется, что контрастирует с данными, полученными при более низкой кон-

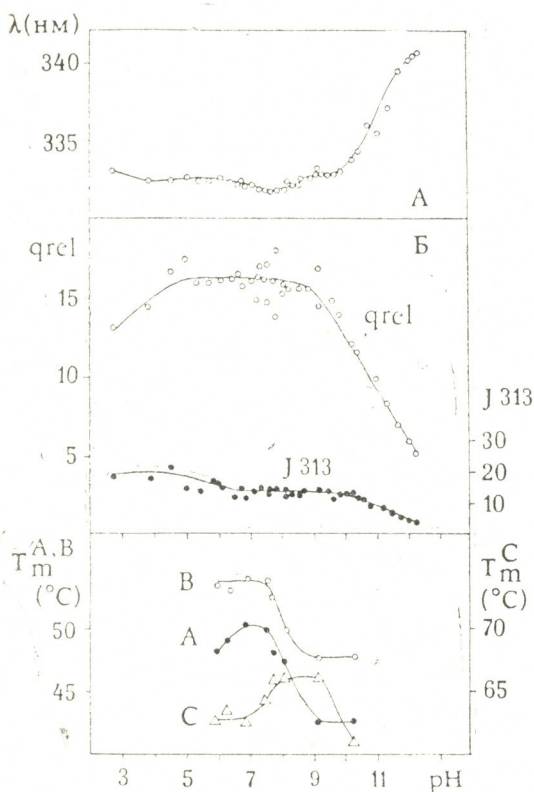


Рис. 5. pH-зависимость параметров триптофановой флуоресценции и положения калориметрических пиков А, В и С для теней эритроцитов крыс в 20 мМ натрий-фосфате: А — положение спектра; Б — относительный квантовый выход флуоресценции (qrel) и интенсивность рассеянного света ртутной линии при 313 нм; В — положение максимумов калориметрических пиков

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гулак П. В., Орлов С. Н., Шныров В. Л., Орлов Н. Я., Литвинов И. С., Покудин Н. И., Постнов Ю. В. Кардиология, 23, 43—48, 1983.
2. Орлов С. Н., Шныров В. Л., Жадан Г. Г., Литвинов И. С., Гулак П. В., Покудин Н. И., Постнов Ю. В. Бюлл. exper. биол. и мед., 46, 26—28, 1983.
3. Brandts J. F., Taverna R. D., Sadasivan E., Lysko K. Biochim. Biophys. Acta, 512, 566—578, 1978.
4. Canessa M., Adragna R., Solomon K. S., Connolly T. M., Tosteson D. N. Engl. J. Med., 302, 772—776, 1980.
5. Davio S. R., Low P. S. Biochemistry, 21, 3585—3593, 1982.
6. Gulak P. V., Orlov S. N., Pokudin N. J., Postnov W. V., Litvinov I. S., Orlov N. Ya., Shnyrov V. L. J. Hypertension, 2, 81—84, 1984.
7. Jackson W. M., Kostyla J., Nordin J. H., Brandts J. F. Biochemistry, 12, 3662—3666, 1973.
8. Low P. S., Brandts J. F. Arch. Biochem. Biophys., 190, 640—646, 1978.
9. Lysko K. A., Carlson R., Taverna R., Snow J., Brandts J. F. Biochemistry, 10, 5570—5576, 1981.
10. Permyakov E. A., Burstein E. A., Sawada Y., Yamazaki J. Biochim. Biophys. Acta, 491, 149—154, 1977.

центрации натрий-фосфата. Тем не менее, в целом, характер pH-зависимостей флуоресцентных и калориметрических параметров теней эритроцитов крыс в 5 и 20 мМ натрий-фосфате аналогичен.

Наиболее важной особенностью pH-зависимостей флуоресцентных и калориметрических параметров теней эритроцитов крыс является, по нашему мнению, изменение в зоне нейтральных pH, свидетельствующее о наличии в этой зоне pH конформационных изменений в белках эритроцитарных мембран. Изменение конформации белков запускается, по-видимому, изменением ионного состояния остатков гистидина или α-аминогрупп. При этом изменение затрагивает не один белок, а целый набор белков — изменяется положение всех пиков в термограмме. Пока неясно, сдвиг pH индуцирует изменения во всех белках одновременно или изменения происходят в одном из белков, а затем за счет взаимодействия распространяются и на другие. Поскольку наблюдаемые изменения структуры белков эритроцитарных мембран происходят в зоне физиологических значений pH, они могут иметь определенное функциональное значение.



11. Postnov Yu. V., Prlov S. N., Shevchenko A. S. Pflügers. Arch., 371, 263—270, 1977.  
 12. Snow J. W., Brandts J. F., Low P. S.

Biochim. Biophys. Acta, 512, 579—591, 1978.  
 13. Snow J.W., Vincentelli J., Brandts J. F. Biochim. Biophys. Acta, 642, 418—428, 1981.

გუფერული ხსნარების pH და კონცენტრაციით გავლენა ვირთაგვების ერითროციტულ მემბრანათა სითბურ დენატურაციაზე

ც. სალია, გ. ჯადანი, ე. პერმიაკოვი, ვ. შნიროვი

სსრკ ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს თბილისის ექიმა დახელოვნების სახელმწიფო ინსტიტუტი

სსრკ მეცნიერებათა აკადემიის ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი, ქ. პუშჩინო

რეზიუმე

ვირთაგვების ერითროციტულ მემბრანათა სუსპენზიაში სკენირებული მიკროკალორიმეტრული და ფლუორესცენტული მეთოდების გამოყენებით გამოკვლეულ იქნა თერმოდენატურაციის გარდაქმნები. თერმოდენატურაციის სითბური შთანთქმის ოთხი პიკი, რომელიც

მელთაგან თითოეული შეესაბამება ცალკეული მემბრანული კომპონენტის სტრუქტურულ გარდაქმნას. შესწავლილ იქნა ბუფერული ხსნარების pH და კონცენტრაციით გავლენა ვირთაგვების ერითროციტულ მემბრანებში სითბურ გარდაქმნებზე.

INFLUENCE OF pH BUFFER CONCENTRATION ON THE THERMAL DENATURATION OF RAT ERYTHROCYTE GHOSTS

Ts. Kh. SALIA, G. G. ZHADAN, E. A. PERMYAKOV, V. L. SHNYROV

Institute for Advanced Medical Training, USSR Ministry of Health, Tbilisi, USSR  
 Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

Summary

Thermal transitions in rat erythrocyte ghosts have been studied by means of scanning microcalorimetry and intrinsic fluorescence. Heating of the suspension of rat erythrocyte ghosts induced at least four thermodynamically irreversible transitions. Each of these transitions

is believed to be due to a localized structural transition induced by thermal stress. The influence of pH and buffer concentration on the thermal transitions in rat erythrocyte ghosts is demonstrated.

УДК 612.73:591.175

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

## ПРИЧИНЫ УГНЕТЕНИЯ ОДИНОЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЛЯГУШКИ В ГИПЕРТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

Н. Т. Ониани

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

Поступила в редакцию 1.07.1987

Известно, что повышение осмотического давления инкубационного раствора угнетает сокращения скелетной мышцы лягушки, инициируемые посредством деполяризации плазматической мембраны мышечного волокна [2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11]. В литературе предлагаются две противоположные гипотезы для объяснения угнетения сокращений мышцы в гипертонических растворах: 1. При дегидратации мышечных волокон в гипертоническом растворе в миоплазме возрастает ионная сила, что должно обуславливать снижение сократительной способности миофибриллярного аппарата и соответственно мышечных волокон [7, 8, 9, 11]. 2. Гипертонические растворы угнетают сокращения мышцы через нарушение электрохимического сопряжения (ЭМС) в мышечном волокне [2, 3, 4, 5, 8]. Для более детального изучения сущности механизма угнетения сокращений скелетных мышц лягушки в гипертонических растворах нами были проведены специальные опыты, результаты которых приводятся ниже.

Опыты на целой портняжной мышце лягушки *Rana ridibunda* проводились весной при комнатной температуре (18—22°C). Для раздражения и регистрации изотонического сокращения мышцы применялась ранее описанная методика [1]. В опытах использовались растворы, приведенные в табл. 1.

В растворе В (табл. 1), тоничность которого 1,48 раза превышает тонич-

ность раствора Рингера (раствор А), одиночные сокращения портняжной мышцы лягушки значительно угнетаются (рис. 1) [2, 4]. С другой стороны, перхлорат-анион ( $ClO_4^-$ ) потенцирует одиночные сокращения мышцы в растворе нормальной тоничности [6]. Если же  $ClO_4^-$  воздействует

Таблица 1

Характеристика инкубационных растворов

Раствор	Относительная тоничность	Содержание, мМ			
		NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	NaClO <sub>4</sub>
А	1	115	2,5	1,8	—
В	1,48	172,5	2,5	1,8	—
С	2,44	287,5	2,5	1,8	—
Д	1,48	152,5	2,5	1,8	20
Е	2,44	267,5	2,5	1,8	20

Для всех растворов рН=7,0—7,2

на мышцу одновременно с этим гипертоническим раствором (раствор Д), то одиночные сокращения потенцируются с сокращениями в растворе А, и эффект сохраняется в течение всего периода инкубации мышцы в растворе Д (рис. 1а). В гипертоническом растворе с относительной тоничностью 1,48 под воздействием  $ClO_4^-$  происходит также и восстановление предварительно угнетенных сокращений почти до нормального уровня (рис. 1б). В растворе с относительной тоничностью 2,44 (раствор



С) одиночные сокращения мышцы постепенно, но полностью угнетаются (рис. 2) [2]. Если раствор с этой тоничностью содержит  $\text{ClO}_4^-$  (раствор Е), то одиночные сокращения сначала потенцируются, а потом постепенно угнетаются по сравнению с сокращениями в растворе А (рис. 2). Нужно отметить, что одиночные сокращения мышцы в растворе Е потенцируются, по сравнению с сокращениями в растворе С, и их полное угнетение происходит сравнительно медленно (рис. 2).

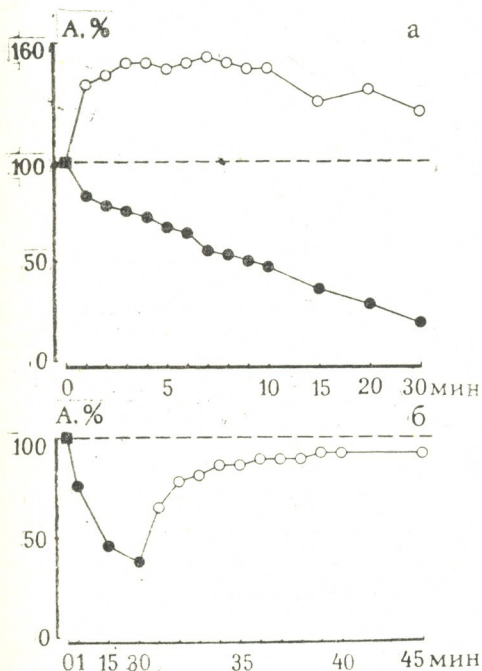


Рис. 1. Потенциация (а) и восстановление (б) одиночных сокращений портняжной мышцы лягушки в растворе с относительной тоничностью 1,48 под воздействием  $\text{ClO}_4^-$ : ■ — одиночные сокращения в растворе Рингера (раствор А); ●, ○ — одиночные сокращения в растворе В и D соответственно. По оси абсцисс — время инкубации мышцы в гипертоническом растворе, мин; по оси ординат — амплитуда сокращения, %

Предполагается, что частичное или полное угнетение одиночных сокращений скелетной мышцы лягушки в гипертонических растворах обусловлено нарушением ЭМС в мышечных волокнах [2, 3, 4, 5, 8]. Видимо, из-за нарушения ЭМС в гипертонических растворах происходит угнетение высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазма-

тического ретикулума (СР) во время электрического раздражения мышечного волокна [2, 4, 13]. Поэтому степень активации миофибрилярного аппарата мышечного волокна снижается и происходит уменьшение одиночных сокращений мышцы [2, 3, 4, 5]. Как было показано [6], при замене некоторого количества  $\text{Cl}^-$  в растворе Рингера эквивалентным количеством  $\text{ClO}_4^-$  одиночные сокращения скелетной мышцы лягушки потенцируются. Известно, что  $\text{ClO}_4^-$  модифицирует ассиметричное перемещение зарядов в мембранах Т-тубулы мышечного волокна, и это, видимо, обуславливает потенциацию одиночных сокращений мышцы [10]. Ассиметричное перемещение зарядов в мембране Т-тубулы является важным звеном в ЭМС, которое контролирует высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из СР мышечного волокна [12]. В конечном итоге

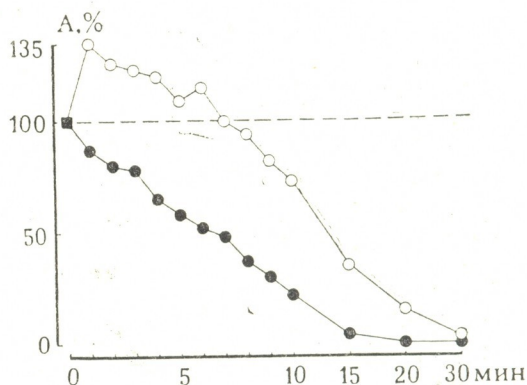


Рис. 2. Потенциация одиночных сокращений портняжной мышцы лягушки в растворе с относительной тоничностью 2,44 под воздействием  $\text{ClO}_4^-$ : ■ — сокращения в растворе А; ●, ○ — сокращения в растворе С и Е соответственно.

По оси ординат то же, что и на рис. 1

можно считать, что под влиянием  $\text{ClO}_4^-$  в изотоническом растворе в ответ на одиночное электрическое раздражение мышечного волокна из СР высвобождается большее количество  $\text{Ca}^{2+}$ , чем в нормальном растворе Рингера [10]. В результате этого миофибрилярный аппарат активируется более интенсивно и происходит потенциация одиночного сокращения. Таким образом, потенцирующий эффект  $\text{ClO}_4^-$  на одиночные сокращения



мышцы в гипертонических растворах D и E, вероятнее всего, обуславливается облегчением высвобождения  $Ca^{2+}$  из CP под воздействием  $ClO_4^-$  во время возбуждения мышечного волокна. Так как и в растворе C и в растворе E происходит полное угнетение одиночных сокращений мышцы (рис. 2), можно заключить, что в растворе с относительной тоничностью 2,44 механизм высвобождения  $Ca^{2+}$  из CP в значительной степени ингибируется [2], после чего потенцирующий эффект  $ClO_4^-$  на ЭМС не проявляется. Потенциация одиночных сокращений мышцы в растворах D и E (рис. 1 и 2) указывает на то, что в гипертонических растворах сократительная способность миофибриллярного аппарата мышечного волокна

не снижается, так как в противном случае интенсификация ЭМС, вызванная анионом не вызвала бы потенциацию сокращений мышцы. Нормальное функционирование миофибриллярного аппарата мышечных волокон подтверждается также данными о потенциации кофеиновой контрактуры мышцы в гипертонических растворах [2, 3, 5, 8]. Приведенные выше данные свидетельствуют в пользу того, что угнетение одиночных сокращений мышцы в гипертонических растворах является результатом нарушения нормального функционирования ЭМС в мышечных волокнах, а не результатом нарушения сократительного механизма мышечных волокон на уровне миофибриллярного аппарата [2, 3, 4, 5, 8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ониани Н. Т. Изв. АН ГССР, сер. биол., 10, 6, 424—426, 1984.
2. Ониани Н. Т. Изв. АН ГССР, сер. биол., 12, 6, 365—375, 1986.
3. Ониани Т. Н. Мембранно-миофибриллярные взаимоотношения, «Мецниереба», Тбилиси, 1970.
4. Anderson K. E. Acta Physiol Scand., 88, 149—159, 1973.
5. Caputo C. J. Gen. Physiol., 50, 129—139, 1966.
6. Gomolla M., Gottschalk G., Lüttgau H. Ch. J. Physiol., 343, 197—214, 1983.
7. Gordon A. M., Godt R. E. J. Gen. Physiol., 55, 254—275, 1970.
8. Homsher E., Briggs F. N., Wise R. M. Amer. J. Physiol., 226, 855—863, 1974.
9. Länergren J., Noth J. J. Gen. Physiol., 61, 158—175, 1973.
10. Lüttgau H. Ch., Kovács L., Gottschalk G., Fuxreiter M. Biophys. J., 43, 247—249, 1983.
11. Miamoto M., Hubbard J. I. J. Gen. Physiol., 59, 689—700, 1972.
12. Schneider M. F., Chandler W. K. Nature, 242, 244—246, 1973.
13. Shlevin H. H., Taylor S. R. Biophys. J., 25, 141a, 1979.

ჰიპერტონულ ხსნარებში ბაყაყის ჩონჩხის კუნთის ერთხელობრივი უეკუმშვების ინჰიბირების მიზეზები

ბ. ონიანი

საქართველოს სსრ მეცნიერებათა აკადემიის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ჰიპერტონულ ხსნარებში შეისწავლემოდა პერქლორატ ანიონის გავლენა ბაყაყის თერძის კუნთის ერთხელობრივ უეკუმშვებზე. ხსნარის ტონურობაზე არის დამოკიდებული პერქლორატ ანიონის მიერ კუნთის ერთხელობრივი უეკუმშვე-

ბის ინჰიბირების აცილება ჰიპერტონულ ხსნარებში. მიღებული შედეგების ანალიზის საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ჰიპერტონულ ხსნარებში ხდება კუნთოვან ბოჭკოში ელექტრო-მექანიკური კავშირის დარღვევა.

# THE REASONS FOR THE FROG SKELETAL MUSCLE TWITCH INHIBITION IN HYPERTONIC SOLUTIONS



N. T. ONIANI

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

## S u m m a r y

The effect of perchlorate anion ( $\text{ClO}_4^-$ ) on twitch of frog (*Rana ridibunda*) sartorius muscle in hypertonic solutions was studied. In relation to solution tonicity  $\text{ClO}_4^-$  as a potentiator of the excitation—contraction coupling (ECC) partially or completely prevents the inhibition of twitches in hypertonic solutions. On the basis of these findings it was concluded that in hypertonic solutions ECC is impaired in muscle fibers.

УДК 615.43

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТРАНКВИЛИЗИРУЮЩИХ И ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИКРОКОЛОНКИ

В. М. Окуджава, Б. Г. Чанкветадзе, М. Д. Рухадзе,  
М. М. Рогова

*Тбилисский государственный университет*

Поступила в редакцию 7.07.1987

В нашей ранее опубликованной работе была описана методика количественного определения некоторых транквилизирующих и противосудорожных лекарственных средств методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) [1]. С целью расширения аналитических возможностей ранее предложенных методов в настоящей работе предлагаются методики количественного определения содержания лекарственных препаратов в биологических объектах высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Выделение лекарственных средств из сыворотки крови (или из других физиологических жидкостей) проводили следующим образом: к 0,2 мл сыворотки крови добавляли 0,3 мл 0,25 N HCl, 0,2 мл раствора соответствующего внутреннего стандарта в хлороформе и 2 мл хлороформа. Экстракционную смесь перемешивали на электрической мешалке со скоростью 150 *цикл/мин* в течение 15 *мин* и в дальнейшем центрифугировали со скоростью 3000 *об/мин* в течение 15 *мин*. Нижний органический слой высушивали досуха на водяной бане при 40°C под потоком воздуха. Сухой остаток растворяли в 20 *мкл* элюента и 5—7 *мкл* этого раствора вводили в хроматограф.

Предложенные методики были реализованы на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром»

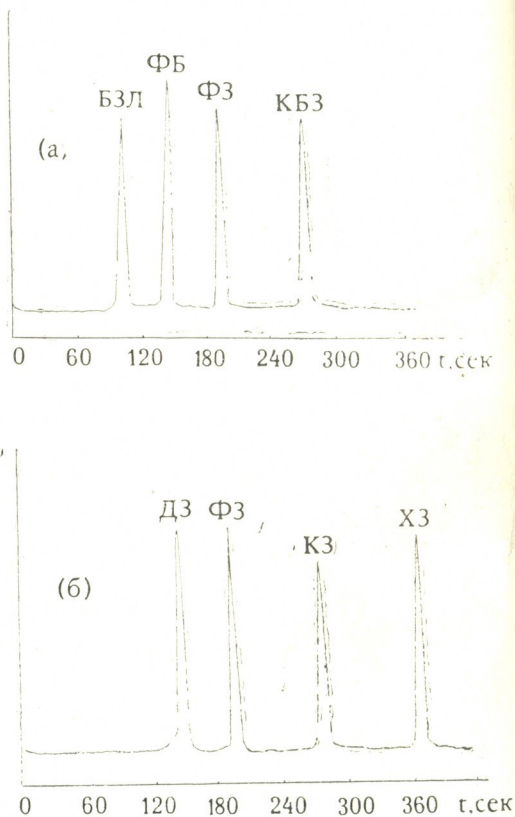


Рис. 1. Хроматограммы экстрактов плазмы крови, содержащей БЗЛ, ФБ, ФЗ, КБЗ (а) и ДЗ, ФЗ, КЗ, ХЗ (б)

(П/О «Научприбор», СССР) в варианте с нормальной фазой. Разделение транквилизирующих средств диазепаминового ряда — диазепам (ДЗ), феназепам (ФЗ), нозепам (НЗ), ок-

ратов — клоназепам (КЗ), карбамазепин (КБЗ), бензонал (БЗ), фенобарбитал (ФБ), дифенин (ДФ), этосукцимид (ЭТС) проводили на капиллярной микроколонке (2×64 мм),

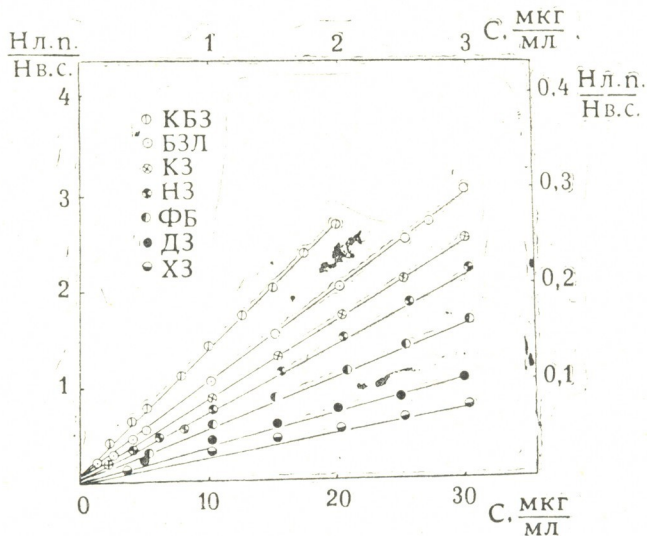


Рис. 2. Калибровочные кривые для количественного определения препаратов

Таблица 1

Время удерживания, чувствительность и воспроизводимость анализов для различных лекарственных препаратов

Препарат	Время удерживания, с	Чувствительность метода, мкг/мл	Воспроизводимость результатов, ср. квадрат. отклонение
БЗЛ	110	0,1	99±0,5
ФБ	145	0,1	99±0,8
БР*	145	0,1	98±2,0
ДФ	145	0,5	99±0,4
ДЗ	145	0,01	100±0,2
ЭТС	140	0,5	98±0,5
ТП*	95	0,1	99±0,7
МФГ*	200	0,3	99±0,2
ФЗ	195	0,01	100±0,6
НЗ	255	0,01	100±0,4
КБЗ	280	0,1	99±0,8
НЗП	280	0,01	99±1,0
КЗ	280	0,01	100±0,5
ХЗ	375	0,05	99±1,0
ДФК*	620	0,1	97±3,5

\* БР—барбитал

ТП—тиопентал натрия

МФГ—метилфенилметилгидантонин

ДФК—дифенилкарбазид

наполненной адсорбентом Силасорб-600 (Хемапол, ЧССР) размером частиц 5 мкм. В качестве элюента использовали смесь 70% гексана, 22% хлороформа, 8% изопропилового спирта со скоростью 100 мкл/мин. Детектирование всех перечисленных выше препаратов проводили с применением спектрофотометрического детектора при длине волны 240 нм. Время удерживания препаратов, чувствительность методик и воспроизводимость результатов приведены в табл. 1.

Приведенные на рис. 1 хроматограммы указывают на возможность одновременного количественного определения следующих комбинаций лекарственных препаратов: БЗЛ+ФБ+ФЗ+КБЗ и ДЗ+ФЗ+НЗ+КЗ+ХЗ в биологических объектах.

Приведенные на рис. 2 калибровочные кривые показывают линейную зависимость сигнала ультрафиолетового детектора от концентрации лекарственных препаратов в терапевтических интервалах концентраций каждого из них.

сазепам (ОЗ), хлосепид (ХЗ) и некоторых противоэпилептических препа-

В целом описанные здесь методики охватывают широкий спектр тран-



квилизирующих и противосудорожных лекарственных препаратов. Реализация указанных методик на капиллярных хроматографических колонках делает их легкодоступными, экономичными и экспрессными. Эти методики осуществляются при относи-

тельно низких давлениях и успешно могут быть применены как в клинической практике, так и в различных фармакологических, фармакокинетических и биохимических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Окуджава, Б. Г. Чанкветадзе, М. Д. Рухадзе. Изв. АН ГССР, сер. биол., 12, 6, 396—401, 1986.

ზოგიერთი ტრანკვილიზატორის და ანტიკონვულსანტის რადიონობრივი ანალიზი მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით

3. ოკუჯავა, ბ. ჭანკვეტაძე, მ. რუხაძე, მ. როგავა

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რ ე ზ ი უ მ ე

დამუშავებულია ბიოლოგიურ სითხეებში ზოგიერთი ტრანკვილიზატორის და ანტიკონვულსანტის რადიონობრივი ანალიზის მეთოდები მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით.

მოწოდებული მეთოდები გამოირჩე-

ვიან ექსპრესიულობით, მაღალი მგრძობელობით და შედეგების კარგი განმეორებადობით. ისინი შეიძლება გამოყენებულ იქნას კლინიკაში, ასევე ფარმაკოლოგიური, ფარმაკოკინეტიკური და ბიოქიმიური კვლევების დროს.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SOME TRANQUILIZERS AND ANTICONVULSANT DRUGS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

V. M. OKUJAVA, B. G. CHANKVETADZE, M. D. RUKHADZE, M. M. ROGAVA

Tbilisi State University, USSR

S u m m a r y

Using high performance liquid chromatography, methods of quantitative analysis for the determination of some anticonvulsant and tranquilizing drugs are proposed.

The proposed methods are characterized by high sensitivity and good reproducibility of results. They may be used in clinical, pharmacological and biochemical laboratories.

## РЕЦЕНЗИИ

М. Н. Гврйтишвили. Рецензия на книгу М. С. Мелиа, И. А. Шавлиашвили, Л. В. Мшеидобадзе, «Грибы деревьев и кустарников лесов Грузии», Каталог, «Сабчота Сакартвело», Тбилиси, 1987. 649 с.

Нет необходимости доказывать полезность упорядочения и систематизации разрозненных данных о грибах, которые как паразиты, симбионты, деструкторы и минерализаторы биомассы играют существенную роль в жизни лесных экосистем. Применительно к условиям Грузии такая работа завершена совсем недавно с выходом «Флоры споровых растений Грузии (конспект)» (Тбилиси, 1986), охватывающей и микро-, и макромицеты, в том числе обитающие на деревьях и кустарниках. Рецензируемый труд М. С. Мелиа, И. А. Шавлиашвили и Л. В. Мшеидобадзе, предназначенный, по мнению авторов, для лесоводов, микологов, фитопатологов, ботаников и специалистов, работающих в различных областях биологии, содержит сведения о 2309 грибах. Для каждого вида даны названия питающих растений, сведения о распространении в Грузии, ссылки на источники, откуда почерпнуты эти данные. Грибы располагаются в алфавитном порядке их родовых названий по родам питающих растений; последние сгруппированы по семействам. Книга снабжена указателем растений и грибов. Список использованной литературы насчитывает 114 названий.

Таково содержание этой книги, которая, к сожалению, представляет собой беспрецедентный научный брак, изобилующий невообразимо большим числом ошибок, упущений, недочетов, искажений, пропусков. Достаточно сказать, что число всех этих недостатков, допущенных по причине некомпетентности, безответственности и недобросовестности составителей каталога, превышает 4 тысячи! Трудно представить, что такая печатная продукция вообще возможна, однако

книга вышла из печати и стала печальной реальностью. Цель настоящей рецензии — содействовать тому, чтобы преградить путь такой псевдонаучной литературе.

Название книги не соответствует ее содержанию. Из названия, аннотации и предисловия видно, что каталог охватывает грибы деревьев и кустарников, произрастающих в лесах Грузии. Однако это не так: в нем приведены грибы, встречающиеся как на аборигенных лесных деревьях и кустарниках, так и на интродуцированных растениях ботанических садов, парков, других зеленых насаждений Грузии. Причем это не те случаи, когда одни и те же грибы обнаружены как на аборигенных, так и на интродуцированных деревьях и кустарниках. Так, в каталоге приведены грибы, выявленные на таких экзотах как *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba*, *Araucaria imbricata*, *Cinnamomum camphora*, *Eriobotrya japonica*, *Ficus elastica*, *Osmanthus fragrans* и на еще более чем ста видах деревьев и кустарников, которые не растут в лесах Грузии. Быть может, авторы каталога, несмотря на его название, все же имели в виду грибы всех без исключения (аборигенных и интродуцированных) деревьев и кустарников Грузии? Увы, и такая догадка не может объяснить недоразумений с подбором материала, так как в каталоге отсутствуют сведения о найденных в Грузии грибах на таких аборигенных деревьях и кустарниках как *Amygdalus georgica*, *Cerasus incana*, *C. mahaleb*, *Diospyros lotus*, *Hedera* spp., *Periploca graeca*, *Punica granatum*, *Smilax excelsa*, *Vitis sylvestris* и др., а также интродуцентах *Cryptomeria japonica*,

Koelreuteria paniculata, Eucalyptus spp., Wisteria sinensis и др. Ведь любое из этих растений встречается в Грузии значительно чаще, чем, скажем, Cuscuta revoluta, Ficus elastica, Ginkgo biloba и другие экзоты, представленные единичными экземплярами в немногих ботанических садах и парках республики.

Вызывает недоумение легкое отношение составителей каталога к номенклатуре высших растений. Из-за незнания правил ботанической номенклатуры и широко известных специалистам синонимов одни и те же растения приведены в каталоге как разные виды. Вот наиболее яркие примеры: Ailanthus altissima (с. 393—396) и A. glandulosa (с. 394—397); Castanea sativa (с. 129—134) и C. vesca (с. 130—134), а также C. vulgaris (с. 130—135); MacLura pomifera (с. 228—229) и M. aurantiaca (с. 229); Pinus kochiana (с. 24, 29, 35) и P. hamata (с. 23, 28, 29, 30, 35), а также P. sosnowskyi (с. 21, 24, 27, 29, 32, 33); Pterocarya pterocarpa (с. 76) и P. caucasica (с. 76), а также P. fraxinifolia (с. 75, 76). Число таких синонимов можно продолжить.

Недочетов, касающихся номенклатуры, приведенных в книге грибов, несоизмеримо больше. На страницах каталога синонимы (причем не только факультативные, но и обязательные) сплошь и рядом приводятся как названия самостоятельных видов. Укажу некоторые из них: Cerotelium fici (Cast.) Arth. (с. 232) и Uredo fici Cast. (с. 238); Coriolus versicolor (L.: Fr.) Quél. (с. 140, 166, 215) и Polystictus versicolor L.: Fr. (с. 188, 440, 494); Exoascus carpini Rostr. (с. 84) и Taphrina carpini Rostr. (с. 98); Exoascus crataegi Sadeb. (с. 305, 319) и Taphrina crataegi Sadeb. (с. 310); Exoascus rhizophorus Sadeb. (с. 58) и Taphrina rhizophora Johans. (с. 64); Exoascus pruni Fuckel (с. 335) и Taphrina pruni Tul. (с. 338); Ganoderma lucidum (Leyss.: Fr.) Karst. (с. 86, 146, 173, 200, 456) и Polyporus lucidus Fr. (с. 134), а также Fomes lucidus (Leyss.) Fr. (с. 85,

145, 172); Phellinus igniarius (L.: Fr.) Quél. (с. 183) и Polyporus igniarius Fr. (с. 74), а также Fomes igniarius (L.) Fr. (с. 85, 145, 172, 431); Puccinia graminis Pers. (с. 247) и Aecidium berberidis Gmel. (с. 242) и т. д. Такие элементарные недочеты непростительны даже студентам.

В каталоге приводится целый ряд несуществующих названий, например (привожу их так, как они напечатаны на страницах каталога) Botryosphaeria officinalis M. K. (с. 355), Cytophthora castanicolum Berl. (с. 130), Cytophthora amygdali Gr. (с. 341), Cytospora caespitulosus Grove (с. 24, 393), C. heterocantha Sacc. (с. 68), C. laurea Roll. (с. 258), C. betulae Tul. (с. 111), C. pendula (с. 37) и др. При этом следует подчеркнуть, что как в этих случаях, так и во многих других (привести их не позволяет объем рецензии) составители ссылаются на работу и на страницу, где приведены эти названия, однако в действительности их там либо нет, либо это другие родовые названия. Так, в каталоге приводится гриб Dendrographa necatrix P. Hrt. (с. 16, 25, 82, 142) и делается ссылка на работу Н. Спешневой (1897, с. 41). В ней однако приведен вид Dematophora (Rhizophora) necatrix Hartig. В каталоге приводится название Melampsora chionea (Fr.) Cda (с. 29) для обитающего „на гниющей хвое сосны“ гриба и делается ссылка на работу Ю. Воронова (1922—1923, с. 123), но там указывается сумчатый гриб Melanospora chionea (Fr.) Cda. Любопытный фитопатолог знает, что облигатные паразиты, какими являются ржавчинные грибы, не могут развиваться на гниющем субстрате. Одно это обстоятельство должно было насторожить составителей, если бы они проявили должную внимательность. А какая путаница произошла в названиях родов из-за их кажущегося созвучия или близкого написания: Phoma и Fomes (с. 12, 622), Cytospora и Cytophthora (с. 24, 275, 393), Cytospora и



Cryptospora (с. 111), *Cylindrocarpon* и *Cylindrosporium* (с. 130). В результате на страницах каталога появились такие химеры и названия грибов, что и вообразить трудно. Кроме того, вызывают удивление и недоумение ссылки на сомнительные материалы, якобы имеющиеся в так называемой „частной гербарной коллекции“ М. Мелиа и Л. Мшвидобадзе. Это особенно касается представителей родов *Cephalosporium*, *Graphium* и *Verticillium* „из гербария Мшвидобадзе Л.“

Безответственность авторов привела к тому, что в каталоге появились названия грибов, не существующих в литературе; не обнаруживали их, естественно, и на деревьях и кустарниках лесов Грузии. В то же время в каталог не вошли грибы, описанные из Грузии именно на рассматриваемых в списке растений. Это *Camarosporium phyllostachydis* Siem., *Macrophoma evonymi-japonicae* Siem., *Phomopsis zerkovae* Ratiani, *Actidium mirabilis* Svanidze, *Cytospora kantschavelii* Gvrit., *Cylindrocarpon cedri* Mamukaschvili, *C. schischkinae* Mamukaschvili, *Macrophoma georgica* Ketshekmadze.

Как уже было отмечено, список использованной литературы содержит 114 названий. К нему авторы рецензируемой книги обязаны были добавить еще более 50 публикаций, содержащих сведения о грибах деревьев и кустарников Грузии (Васильевский, Каракулин, 1937, 1950; Шишкина, 1952; Бондарцев, 1953; Кавкасидзе, 1953; Такаишвили, 1955; Николаева, 1961; Пармасто, 1965; Райтвийр, 1967; Гулмагарашвили, 1974, 1975, 1978; Цанава, 1974; Нахуцришвили, 1975; Мельник, 1977; Томили, 1979; Джалагония, 1981; Гвритишвили, 1982; Тавадзе, 1982; Ратиани, 1984; Ратиани, Гвритишвили, Декаоидзе, 1985; Ульянищев, Бабаян, Мелиа, 1985 и др.). Кроме того, в списке литературы, приведенной в каталоге, отсутствует свыше 60 источников, на которые делается ссылка при названиях грибов.

В каталог не вошло свыше 500 видов грибов, отмеченных на деревьях и кустарниках лесов Грузии, в том числе 120 видов ксилофилов из порядка агарикальных, встречающихся

в лесах Грузии на буке, осине, клене, ели, сосне и других породах. Пропущен даже ряд видов из рода *Sphaeropsis* (специально изучавшихся в Грузии) (*Sphaeropsis*, *Phomopsis*, *Macrophoma*). Не упоминаются такие широко распространенные грибы, как *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., его анаморфа *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuckel, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. и его телеоморфа *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk, *Fusicladium eriobotryae* (Cav.) Cav., *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke et Harkn.) Wollenw. И наряду с этим в списке грибов значатся вирус „*Ficus virus* Condit.“ на инжире (с. 233), бактерии „*Bacterium ficci* Cavara“ на инжире (с. 231) и „*Bacterium mori* Boyer“ на шелковице (с. 212). Комментарии, как говорится, излишни.

Еще один пример ошибки, не поддающейся объяснению. На странице 232 в каталоге помещено название гриба „*Colletotrichum caricae* Stov. forma pflanzenkrankheit“ (sic!). Надо ли объяснить, что немецкое слово „*Pflanzenkrankheit*“ обозначает „болезнь растений“. Можно предположить, что это техническая ошибка: пропущено латинское название формы *C. caricae*, вместо него вписано первое слово названия той работы (книги, журнала), где описана эта форма. Увы, составители идут дальше. В указателе каталога (с. 574) напечатан уже „исправленный“ вариант: „*Colletotrichum caricae* Stov. forma pflanzenkrankheit“. Таким образом, „*Krankheit*“ стал автором формы „*pflanzen*“! Что это: невежество? Неграмотность?

Нет числа ошибкам в написании родовых и видовых названий грибов, в цитировании авторов видов, литературных источников... Их сотни и сотни. Фамилии авторов таксонов приводятся в самых различных вариантах сокращений (нередко до 4—5 вариантов для одной и той же фамилии). Привести эти ошибки здесь невозможно, рецензия превысит все разумные пределы.

Такова часть грустного перечня того, что не позволяет оценить выход

этого каталога как положительный факт. Как сказано, он, по замыслу составителей, предназначен для самого широкого круга научных и практических работников. Естественно, что им будут пользоваться при составлении сводок по тем или иным вопросам микологии и фитопатологии. Например, при написании работ по грибным болезням отдельных пород деревьев и кустарников, при изучении видового состава отдельных родов грибов, обитающих в Грузии, и т. д. И все эти ошибки, недочеты, искажения, ляпсусы, допущенные в каталоге, войдут в такие работы и будут в дальнейшем тиражироваться уже ими, если авторы не будут знать об этих изъянах рецензируемого каталога и не перепроверят каждое название гриба, каждую ссылку на источник и сам этот источник. Читатели, доверившиеся со-

ставителям каталога, так и не узнают, что на деревьях и кустарниках лесов Грузии известно еще свыше 500 видов грибов, если не смогут сами просмотреть всю литературу по этому вопросу. И при этом они должны будут учесть, что список приведенных в каталоге работ содержит лишь две трети публикаций, которые необходимо просмотреть, чтобы составить более или менее полный список известных сейчас грибов на деревьях и кустарниках лесов Грузии.

Любая научная работа должна выполняться добросовестно, грамотно, квалифицированно, на уровне современных достижений науки. М. С. Мелиа, И. А. Шавлиашвили и Л. В. Мшвидобадзе, составляя рецензируемый каталог, не выполнили эти необходимые требования. В результате издана книга, которая не может выполнить функции каталога и фактически не пригодна для пользования.

მ. გვრიტიშვილი. რეცენზია მ. მელიას, ი. შავლიაშვილის, ლ. მშვიდობაძის წიგნზე „საქართველოს ტყის ხემცენარებსა და ბუჩქებზე გავრცელებული სოკოები“, კატალოგი, „საბჭოთა საქართველო“, თბილისი, 1987, 649, გვ.

M. S. Gvritishvili. Review by M. S. Melia, I. A. Shavliashvili, L. V. Mshvidobadze's book „On Fungi of trees and shrubs in the forests of Georgia“, Catalogue, „Sabchota Sakartvelo“, Tbilisi, 1987, 649 p.

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

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

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

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

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

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

4. Введение должно содержать краткое изложение сути рассматриваемой проблемы и задачи исследования. Описание методики должно быть кратким, но позволяющим читателю самостоятельно оценить соответствие техники и методических приемов, использованных при выполнении работы. Описание результатов и их обсуждение должны ограничиваться рассмотрением и оценкой важнейших фактов, полученных в экспериментах. В конце статьи 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 глянцевой бумаге и рисованные графики на кальке или белой чертежной бумаге — следует представлять в двух экземплярах (в надписанном конверте). Надписи на иллюстрациях должны быть выполнены тушью. На обороте иллюстрации следует обозначить карандашом ее номер, фамилию автора и сокращенное название статьи, а в случае необходимости отметить верхний и нижний край.

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

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

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

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

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

12. Авторы получают бесплатно 12 отдельных оттисков.

6 81/65



Цена 85 коп.

Индекс 76204