

784-8
1991



საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИИ

PROCEEDINGS OF THE ACADEMY OF SCIENCES

OF GEORGIA

99
784-9

ბიოლოგიის

სერია

СЕРИЯ


БИОЛОГИЧЕСКАЯ

1991 N1

თბილისი - თბილისი
TBILISI - TOM
VOL.

17

BIOLOGICAL SERIES

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე 
(Сакартвелოს მეцნიერებათა აკადემიის მაცნე) საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ГРУЗИИ

ბიოლოგიის სერია СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ

ტომი 17, № 1
Том

ჟურნალი დაარსებულია 1975 წლის იანვარში
Журнал основан в январе 1975 года
გამოდის წელიწადში 6-ჯერ
Выходит 6 раз в год

თბილისი
ТБИЛИСИ

• „მეცნიერება“
«МЕЦНИЕРЕБА» •

1991



სარედაქციო კოლეგია:

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

ლ. გაბუნია, მ. ზაალიშვილი, გ. თუმანიშვილი, გ. კანდელაკი, გ. კვესიტაძე,
კ. ნადარეიშვილი, ბ. ნანეიშვილი, გ. ნახუტრიშვილი, გ. სანაძე, ბ. ყურაშვილი,
თ. ჭანიშვილი, ნ. ჭავჭავიშვილი, ი. ელიავა
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, М. М. Заалишвили, Г. В. Канделаки,
Г. И. Квеситадзе, Б. Е. Курашвили, К. Ш. Надарейшвили, Б. Р. Нанейшвили,
Г. Ш. Нахуцришвили, Г. А. Санадзе, Г. Д. Туманишвили, Т. Г. Чанишвили,
И. Я. Элиава

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, L. K. Gabunia, G. V. Kandelaki,
G. I. Kvesitadze, B. E. Kurashvili, K. Sh. Nadareishvili, B. R. Naneishvili,
G. Sh. Nakhutsrishvili, G. A. Sanadze, G. D. Tumanishvili,
M. M. Zaalishvili, I., I. Eliava
Executive Secretary **S. R. La b'a d z e**

© Известия АН Грузии
Серия биологическая, 1991

რედაქციის მისამართი:
380060, თბილისი-60, კუტუზოვის ქ. 19,
ტელ. 37-86-78

Адрес редакции:
380060, Тбилиси-60, ул. Кутузова, 19,
тел. 37-86-78





СОДЕРЖАНИЕ—შობასისი—CONTENTS

Н. А. Ахобадзе, В. М. Окуджава, Б. Г. Чапкветадзе. Развитие синдрома отмены барбитала у кроликов	5
ნ ა ხ ო ბ ა ძ ე, ვ. ო კ უ ჯ ა ვ ა, ბ. ქ ა ნ კ ვ ე ტ ა ძ ე. ბარბიტალის მოხსნის სინდრომი ბოცრებში	
N. A. Akhobadze, V. M. Okujava, B. G. Chan'kvetadze. The development of barbitol withdrawal syndrome in rabbits	
Р. П. Кашакашвили. Длительная потенциация прямых ответов коры	12
რ. ქ ა შ ა კ ა შ ვ ი ლ ი. ქ ე რ ქ ის პირდაპირი პასუხების ხანგრძლივი პოტენციატა	
R. P. Kashakashvili. Long-term potentiation of the direct cortical responses	
Л. В. Лапанашвили, А. А. Можина, В. П. Замостьян, А. Н. Янина, О. Г. Чиковани. Морфологические особенности перемещенных на ножке скелетных мышц, подвергшихся электростимуляции в режиме сердечных сокращений	16
ლ. ლ ა პ ა ნ ა შ ვ ი ლ ი, ა. მ ო ჯ ი ნ ა, ვ. ზ ა მ ო ს ტ ი ა ნ ი, ა. ი ა ნ ი ნ ა, ო. ჩ ი კ ო ვ ა ნ ი. ფეხზე გადაწევილი და შემდგომ გულის შეკუმშვათა რეცივის შესაბამისად ელექტროსტიმულირებული ჩონჩხის კუნთის მორფოლოგიური თავისებურებანი	
L. V. Lapanashvili, A. A. Mozhina, V. P. Zamostian, A. N. Iani-na, O. G. Chikovani. Morphological peculiarities of transplanted pedicled skeletal grafts paced with cardiac rate.	
А. И. Бузукашвили. Определение момента овуляции у морских свинок с целью получения ооцитов для оплодотворения in vitro	23
ა. ი. ბ უ ზ უ კ ა შ ვ ი ლ ი. ოვულაციის დროის განსაზღვრა ზღვის გოჭში in vitro განაყოფიერებისათვის ოოციტების მისაღებად	
A. I. Buzukashvili. Ovulation definition and oocytes recovery for in vitro fertilization in the guinea pig	
З. В. Дарахвелдзе, П. Я. Кинтрая, И. Д. Мамамтавршвили, Д. Г. Микеладзе. Изменение функциональных характеристик рецепторных систем эстрадиола в миометрии и тромбоцитах млекопитающих в динамике беременности и родах	27
ზ. ვ. დ ა რ ა ხ ვ ე ლ დ ზ ე, პ. ი. კ ი ნ ტ რ ა ი ა, ი. დ. მ ა მ ა მ ტ ა ვ რ შ ვ ი ლ ი, დ. გ. მ ი კ ე ლ ა დ ზ ე. ესტრადიოლის რეცეპტორული სისტემის ფუნქციური ცვლილების დინამიკაში მსობიარობის დროს	
Z. V. Darakhvelidze, P. I. Kintraia, I. D. Mamamtavrishvili, D. G. Mikeladze. Change of functional characteristics of estradiol receptor system in mammalian myometrium and thrombocytes during pregnancy and labor	
Л. Г. Цакадзе, М. Л. Дзеконская, З. П. Кометнани. Зависимость действия стимулируемого нейротрансмиттерами синапсомального фактора на Na,K-АТФазу от pH	34
ლ. წ ა კ ა ძ ე, მ. დ ე კ ო ნ ს კ ა ი ა, ზ. ქ ო მ ე თ ი ა ნ ი, Na, K-ატფაზზე ნეიროტრანსმიტერებით მასტიმულირებული სინაფტოსომალური ფაქტორის მოქმედებაზე pH გავლენა	
L. G. Tsakadze, M. L. Dzekonskaya, Z. P. Kometiani. Dependence on pH of the effect stimulated by the neurotransmitters of synaptosomal factor on Na, K-ATPase	

19795





A. J. Isakadze. Влияние комбинированной терапии пропранололом и нифедипином на систему кровообращения в покое и ортостатическом положении у больных хронической ишемической болезнью сердца 45

ა. ისაკაძე. პროპრანოლოლი და ნიფედინით კომბინირებული მკურნალობის გავლენა სისხლის მიმოქცევის სისტემაზე მოხვედრისა და ორთოსტატიკურ მდგომარეობაში გულის ქრონიკული იშემიური დაავადებისას

A. L. Isakadze. The influence of combined therapy with propranolol and nifedipin on blood circulation system at rest and orthostatic state among patients with chronic ischemic disease of heart

Ә. Л. Бузукашвили, А. В. Гордецкый. Ионный гомеостаз растений. Граденты распределения элементов и активности их ионов в органах и тканях растений в зависимости от возраста 45

ე. ზუკაშვილი, ა. გორდეცი. ელემენტთა განაწილების კრადიენტა და მათი იონების აქტიობა მცენარეთა ორგანოებში და ქსოვილებში ასაკთან დამოკიდებულობით.

E. L. Vuzukashvili. Ionic homeostasis of plants: Gradients of distribution of elements and activity of their ions in plant organs, depending on the age

Г. Г. Джапаридзе, Т. Г. Чанишвили. Характеристика и биологические свойства бактериофага *Klebsiella pneumoniae* 50

გ. ჯაპარიძე, თ. ჭანიშვილი. ბაქტერიოფაგ *Klebsiella pneumoniae*-ს დაბასათება და ბიოლოგიური თვისებები

G. G. Japaridze, T. G. Chanishvili. Characteristics and some biological peculiarities of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage

Е. Б. Хатиашвили, Н. Н. Лапиашвили, Г. Г. Хачапуридзе. Влияние низкоинтенсивного лазерного света на показатели цитогенетического и функционального состояния лимфоцитов человека *in vitro* 54

ე. ხატიაშვილი, ნ. ლაპიაშვილი, გ. ხაჩაპურიძე. დაბალიტენსაური ლაზერის სხივის გავლენა ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების ციტოგენეტიკურ და ფუნქციურ მაჩვენებლებზე *in vitro*

E. B. Khatiashvili, N. N. Lapiashvili, G. G. Khachapuridze. Influence of low-intensity laser light on cytogenetic and functional indices of human blood lymphocytes *in vitro*

Т. Т. Ториашвили, Н. А. Гачечиладзе, И. Ш. Мегрелишвили, Л. Г. Ломидзе, М. М. Заалишвили. Влияние температуры на функциональные и структурные свойства α -актинина поперечнополосатой мышцы карпа 60

თ. ტორიაშვილი, ნ. გაჩეჩილაძე, ი. შ. მგრელიშვილი, ლ. გ. ლომიძე, მ. ზაალიშვილი. ტემპერატურის გავლენა კობრის განივზოლიანი კუნთის α -აქტინინის ფუნქციონალურ და სტრუქტურულ თვისებებზე

T. T. Toriashvili, N. A. Gachechiladze, I. Sh. Megrelishvili, L. G. Lomidze, M. M. Zaalishvili. Temperature effect on functional and structural properties of α -actinin in cross-striated muscle of the carp

И. М. Ермак, С. И. Баходдина, В. А. Хоменко, Т. Ф. Соловьева, В. Я. Фурман, М. Г. Стуря, Г. И. Гедеванишвили. Физико-химическая характеристика эндотоксина из *Yersinia Pseudotuberculosis* и его компонентов 65

ი. ერმაკი, ს. ბახოლდინა, ვ. ხომენკო, ტ. სოლოვიევა, ვ. ფურმანი, მ. სტურია, გ. გედევანიშვილი. *Yersinia Pseudotuberculosis*-ს ენდოტოქსინის და მისი კომპონენტების ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები

I. M. Yermak, S. I. Bakholdina, V. A. Khomenko, T. F. Solovyeva, V. Ya. Furman, M. G. Sturua, G. I. Gedevanishvili. Physical-chemical characteristic of endotoxin from *Yersinia Pseudotuberculosis* and its components



УДК 615.216.5.015:156

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

РАЗВИТИЕ СИНДРОМА ОТМЕНЫ БАРБИТАЛА У КРОЛИКОВ

Н. А. Ахобадзе, В. М. Окуджава, Б. Г. Чанкветадзе

Тбилисский государственный университет

Поступила в редакцию 26.06.90

Исследуется развитие синдрома отмены (СО) барбитала (Б) у кроликов. Установлено, что длительное применение Б у кроликов вызывает постепенное развитие физической зависимости, которая сопровождалась СО после резкого прекращения введения Б. СО характеризуется усилением судорожной готовности животных и повышенном летальности.

Синдром обусловлен скоростью спада концентрации, которая меняется в следующем ряду: I < II < III. Глубина СО хорошо коррелируется со скоростью спада концентрации и тоже меняется в ряду I < II < III.

При концентрациях 8–12 мкг/мл у животных СО уже не наблюдается. СО тесно связан с $K_{уд}$; с уменьшением его тяжесть синдрома увеличивается.

Барбитал (Б) относится к барбитуратам длительного действия. Он оказывает тормозящее влияние на центральную нервную систему и используется в медицинской практике в качестве успокаивающего, снотворного и противосудорожного средства [1].

При длительном систематическом приеме Б могут развиваться явления физической и психологической зависимости [1, 2, 18, 19].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на кроликах породы шиншила весом 2,3–3,6 кг; их оперировали под нембуталовым наркозом (40 мг/кг в/в), и в разные участки коры (сенсомоторная, слуховая и зрительная) вживляли серебряные электроды для ЭЭГ записи.

Раздражающими электродами служили хлорированные серебряные провода с плексигласовой изоляцией, которые плотно вставлялись в кость. Силу, частоту и длительность стимуляции можно было варьировать. Обычно применяли частоту 25–35 с, продолжительность 0,5–1 мс. Частр-

Прекращение приема Б следует производить постепенно, так как внезапная отмена может вызвать развитие судорожного припадка и даже эпилептического статуса [3,17].

В настоящее время вкратце установить взаимосвязь между тяжестью синдрома отмены (СО) и концентрацией лекарственных средств в плазме крови. Этому вопросу и посвящается данная работа.

та и длительность раздражения были постоянными, меняли лишь силу раздражения. Оперированным животным в течение первых трех дней внутримышечно вводили антибиотики. После их выздоровления (10 дней) определяли судорожный порог к коразолу (1%-ный раствор вводили в/в) и электрошоку (20 Гц, 1 мс): взвешивали и записывали вес животных.

До начала эксперимента, в период дачи Б и после отмены осуществляли отбор крови из ушной вены. Количественное определение Б проводили с применением ВЭЖХ. Чувствительность метода — 1 мкг/мл [2].



Животным давали Б перорально, один раз в день. В течение эксперимента меняли суточную дозу (постепенно увеличивая) — до достижения высокой финальной дозы (180 мг/кг) и продолжительность лечения (7—14 дней) и распределяли животных по группам: I группа — получала Б в течение одной недели (финальная доза 140 мг/кг), II группа — в течение 2 недель (финальная доза 140 мг/кг). Сравнивая эти группы, можно судить о роли продолжительности лечения в развитии синдрома. Животных III группы лечили Б в течение двух недель, но финальная доза достигала 180 мг/кг. С этой группой можно сопоставить животных из группы II и судить о значении финальной дозы в возникновении синдрома. В период лечения определяли судорожный порог к коразолу и электрошоку, следили за изменением веса. Затем производилось резкое прекращение Б и строгое наблюдение за животными.

С целью расчета фармакокинетических параметров строили кривые зави-

симости концентрации Б от времени. Период полувыведения рассчитывали графическим способом после построения кривой в полулогарифмических координатах. Удельный клиренс ($K_{L_{уд}}$), объем распределения (V) и коэффициент элиминации ($K_{эл}$) рассчитывали по формулам:

$$K_{эл} = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}; \quad (1) \quad \frac{K_{L_{уд}}}{f^*} = \frac{D}{ППК}; \quad (2)$$

$$\frac{V}{f} = \frac{D \cdot T_{1/2}}{0,693 \cdot ППК}; \quad (3)$$

$$ППК = ПГК(O-t) + \frac{C_t \cdot T_{1/2}}{0,693}, \quad (4)$$

где D — доза Б, C — концентрация Б в момент времени t, ППК — площадь под кривой C—t в интервале времени (O—t). Расчет фармакокинетических параметров осуществляли с применением типичной фармакокинетической программы, составленной на языке «Бейсик» и реализуемой на ЭВМ МС 1840.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После резкой отмены Б у кроликов развивается т. н. синдром отмены в виде повышенной готовности к судорогам. Гиперчувствительность достигает максимума на 4—5 день. В течение первых 72 ч животные гиперактивны, проявляется повышенный ответ на испуг, на хлопанье рук дилатация зрачков, ринорея, лакримация, анорексия, гусинья кожа или пилоэрекция и диарея. Нем удалось выявить спонтанные судороги, естественно, на ЭЭГ не наблюдалась явная разница в картинах до и после отмены Б. Во время лечения судорожный порог как к коразолу, так и электрошоку возрастал (табл. 1,2). Повышались и уровни концентрации лекарств в плазме крови, а после отмены они уменьшались. После отмены Б в течение 6 дней (I группа) и 8 дней (II и III группы) подпороговые значения коразола и электрошока вызывали спайк-волновую активность, что и служит доказательством их гиперчувствительности. Максимальное уменьшение порогов к коразолу и электрошоку происходит на 4—5-й день после отмены. Соответ-

ственно, для группы I пороги к коразолу и электрошоку составляют 73—82 и 79—81% исходного уровня, а для группы II 50—51% и 54—56%, т. е. в последней группе изменение порогов более глубокое и увеличение чувствительности здесь проявляется больше, чем в группе I. На седьмой день отмены пороги составляют 89—87% для группы I и 78—85% исходного уровня для группы II. Восстановление исходных порогов осуществляется на 8-й (группа I), 9—10 (группа II) день после отмены. Глубина максимальных изменений порогов и более длительное, чем в группе I, сохранение их подпороговых значений в группе II дает основание приписать важную роль продолжительности лечения в развитии СО. Более наглядные изменения выявляются после сравнений результатов, полученных во II и III группах. Для группы II пороги на 4-й и 5-й день после отмены составляли соответственно 50—51 и 54—56% к коразолу и электрошоку, а в группе III на 4-й день после отмены они составляли 44—47%, а на 5-й день — 33—42%, т. е. в те-

чение этих двух суток в группе II пороги становятся постоянными, в группе III они продолжают уменьшаться. Таким образом, в последней группе изменения порогов более глубокие и, следовательно, животные этой группы в большей степени проявляют гиперчувствительность.

Восстановление исходного значения порогов для обеих (II—III) групп происходит на 8—9 день после отме-

СО, весьма важным является связь синдрома отмены с концентрациями Б в плазме крови и в лучшем случае с фармакокинетикой Б. Максимум концентрации Б после последней дозы составляет в среднем 259 (группа I), 442 (группа II) и 683 мкг/мл (группа III) (табл. 3). Это объясняется тем, что в группе I увеличение суточных доз происходит быстро, концентрация не достигает равновесных

Таблица 1

Изменение порога к коразолу

Группа	№ животного	Значение порога, мг/кг									Время начала подпороговых изменений, ч	Время максимальных изменений порогов, ч
		до начала лечения	во время лечения	на 2-й день СО	на 4-й день СО	на 5-й день СО	на 7-й день СО	на 8-й день СО	на 9-й день СО			
I	1	20	20	85	8	9	10	11			54	90
	2	10	18	16	7	8	9	10			77	86
	3	11	18	15	8	9	10	11			74	86
	4	10	20	15	7	8	9	10			72	89
	5	12	18	18	9	10	11	12			70	92
	6	11	18	16	8	8	8	10	11			75
		11 ± 0,7	18 ± 1,03	16 ± 1,2	8 ± 0,7	9 ± 0,5	9,8 ± 0,6	11 ± 0,7			70,5 ± 4,9	88 ± 2,0
II	7	11	20	15	6	6	9			11	58	112
	8	10	18	14	5	5	8			10	62	110
	9	10	20	15	5	5	9			10	72	105
	10	12	20	15	66	6	9			12	52	108
	11	11	25	20	5	6	8			11	67	105
	12	12	25	16	6	6	9			12	64	105
		11 ± 0,7	21 ± 2,3	16 ± 1,5	5,5 ± 0,5	5,6 ± 0,4	8,6 ± 0,5			11 ± 0,7	62,5 ± 4,0	106 ± 2,5
III	13	11	35	14	5	3	9			11	52	115
	14	10	40	15	4	3	8			10	62	116
	15	10	95	18	4	3	8			10	67	115
	16	10	14	15	5	4	8			10	67	118
	17	12	15	20	6	5	10			12	72	117
	18	12	16	18	5	4	10			12	68	116
		11 ± 0,8	26 ± 10,8	17 ± 2	4,8 ± 0,6	3,6 ± 0,7	8,8 ± 0,8			11 ± 0,8	65 ± 5,0	116 ± 0,9

ны. Глубина и длительность изменений порогов — еще одно доказательство того, какую важную роль играют длительность лечения и уровень финальной дозы в развитии СО. Но и здесь выявляется, что более значительна, чем длительность, высокая финальная доза.

Хотя с клинической точки зрения установление взаимосвязи доза — СО является более полезным, с целью выяснения механизма возникновения

значений и через 7—10 ч после последней дозы уровень ее — 259 мкг/мл. В группе II концентрация также не принимает равновесного значения, так как для этого животным следует вводить одинаковые дозы препарата в течение пятикратного периода полувыведения, что не осуществлялось в нашем эксперименте. Животным из II группы давали Б в течение двух недель постепенно нарастающими дозами: максимум концентрации через

Изменение порога к электрошоку

Группа	№ животного	Значение порога, V								Время начала подпороговых изменений, ч	Время максимальных изменений порогов, ч
		до начала лечения	во время лечения	на 2-ой день СО	на 4-й день СО	на 5-й день СО	на 7-й день СО	на 8-й день СО	на 9-й день СО		
I	1	15	35	20	12	12	13	15		52	85
	2	10	25	18	7	8	9		79	90	
	3	15	30	20	12	12	13	10	76	82	
	4	14	35	20	11	11	12	14	70	84	
	5	12	20	22	11	11	11	12	68	92	
	6	14	30	20	10	11	12	14	77	90	
		13,3±1,6			10,5±1,1	10,8±0,9	11,6±0,9	13,3±1,6		70,5±4,9	87±2,0
II	7	12	25	17	6	6	10		12	52	110
	8	10	20	15	5	6	9		10	65	120
	9	10	25	16	5	6	8		10	70	115
	10	14	25	18	8	8	12		14	55	104
	11	15	35	25	9	9	12		15	65	100
	12	14	35	18	8	8	12		14	67	120
		12,5±1,9			6,8±1,5	7±1,1	10,6±1,3		12,5±0,4	62,3±4,0	111,5±2,5
III	13	12	35	16	5	4	10		12	52	116
	14	10	40	15	4	4	7		10	67	115
	15	10	35	16	4	3	8		10	62	115
	16	14	30	18	7	6	11		14	67	118
	17	15	40	20	8	7	12		15	68	116
	18	16	35	20	9	8	14		16	72	117
		12,8±2,1			6±1,9	5,3±1,9	10,3±0,2		12,8±2,1	65±5,0	116±0,9

7—10 ч после последней дозы составляет 442 мкг/мл, т. е. больше, чем в I группе. Такой высокий уровень концентрации, по сравнению с группой I, наверное, обусловлен длительностью лечения. У животных из группы III также не появляются равновесные концентрации, но в виду того, что в этой группе высока финальная доза, естественно, что через 7—10 ч после последней дозы уровень концентрации здесь более высокий (683 мкг/мл), чем в группе II.

При пиковых значениях концентрации (через 7—10 ч после последней дозы) СО не выявляются. Для начала абстиненции концентрации по группам составляют 67, 109 и 108

мкг/мл. Видимо, синдром обусловлен скоростью спада концентрации, которая меняется в следующем ряду I (2,7) < II (5,3) < III (8,8). Хотя симптомы отмены проявляются примерно одновременно во всех трех группах, глубина СО хорошо коррелирует со скоростью спада концентрации и тоже меняется в ряду I < II < III.

Таким образом, отмена Б у кроликов вызывает хорошо проявленный СО, тяжесть которого связана со скоростью спада концентрации после отмены препарата.

При концентрациях Б 13, 18 и 30 мкг/мл во всех трех группах животных еще наблюдается СО (пороги ко коразолу и электрошоку являются

Изменение уровней концентрации и скорости ее спада после прекращения Б у кроликов

Группа	№ животного	Пиковая концентрация до начала СО, $\mu\text{кг/мл}$	Концентрация для начала СО, $\mu\text{кг/мл}$	Концентрация пика СО, $\mu\text{кг/мл}$	Концентрация во время выздоровления, $\mu\text{кг/мл}$	Спад концентрации ΔC от пика до и после начала СО, $\mu\text{кг/мл}$	Время Δt от пика концентрации до и после начала СО, ч	$\frac{\Delta C}{\Delta t}$, $\mu\text{кг/мл ч}$
I	1	190	78	50	7	112	54	2,1
	2	295	70	58	6	225	72	3,1
	3	280	74	60	7,5	206	74	2,8
	4	260	63	50	7	197	73	2,7
	5	280	66	50	8	214	70	3,2
	6	250	50	40	5	200	75	2,7
		$295 \pm 22,5$	$67 \pm 7,1$	$51 \pm 5,0$	$6 \pm 1,2$	192 ± 26	$70.5 \pm 4,7$	$2,7 \pm 0,3$
II	7	470	118	46	7,5	352	58	6,1
	8	420	100	50	5	320	62	5,2
	9	460	112	60	15	348	72	4,8
	10	470	108	50	7	362	52	6,9
	11	410	415	65	6	295	67	4,4
	12	420	102	60	7	318	70	4,5
		$442 \pm 2,5$	$109 \pm 5,9$	$55 \pm 5,7$	$8 \pm 2,4$	332 ± 23	$65 \pm 6,2$	$5,3 \pm 0,1$
III	13	685	110	30	15	575	52	11,1
	14	600	118	55	13	482	62	7,7
	15	700	103	37	12	597	67	8,9
	16	756	100	45	10	656	67	9,8
	17	680	96	46	10	584	76	8,3
	18	680	122	60	10	558	62	9,0
		$683 \pm 24,5$	$108 \pm 8,4$	$46 \pm 6,6$	$12 \pm 1,7$	575 ± 37	$62 \pm 4,7$	$8,8 \pm 0,3$

подпороговыми), а при концентрациях 6, 8 и 12 $\mu\text{кг/мл}$, соответственно, СО уже не наблюдается.

Таким образом, можно заключить, что при фоновых концентрациях Б, составляющих 6—12 $\mu\text{кг/мл}$, СО у животных уже не наблюдается.

Сопоставление фармакокинетических данных (табл. 4) с глубиной СО (табл. 1—2) показывает, что $T_{1/2}$ Б в прямой корреляции с глубиной СО не находится, в то время как с уменьшением $K_{уд}$ тяжесть СО увеличивается. Последнее можно объяснить насыщением возможности организма животных выделять сверх дозы Б при больших финальных дозах (группа III) или при длительном приеме препарата (группа II).

Значения концентрации, соответствующие пику проявления СО ($50,6 \pm 3,1$), во всех трех группах животных указывают на то, что это состояние достигается при тех значениях концентрации, когда она достаточно высока для инициирования конвульсий и недостаточно высока для их подавления. Значение это мало зависит от длительности обработки, финальной дозы, а также от максимальной концентрации при отмене препарата.

Таким образом, после резкой отмены Б у кроликов проявляется т. н. синдром отмены в виде повышенной готовности к судорогам. Развитие и тяжесть синдрома обусловлены скоростью спада концентрации, которая меняется в ряду I < II < III. При фо-

Фармакокинетические параметры барбитала у кроликов

Группа	№ животного	Вес, кг	Доза Б, мг	T _{макс} , ч	C _{макс} , мг/мл	K _{эл} , ч ⁻¹	T _{1/2} , ч	Объем распределения (V), мл/ч	Кл _{уд} , мл/ч. г
I	1	3,2	448000	20	120	0,02	40,2	2185	37,7
	2	3,3	462000	20,5	156	0,02	35,4	1550	30,3
	3	3,0	420000	21	140	0,02	39,4	1750	30,8
	4	3,3	420000	22	160	0,02	34,9	1570	31,1
	5	3,0	462000	22,5	140	0,02	40,5	2076	35,6
	6	3,2	448000	23	150	0,02	33,8	1825	37,4
		3,2 ± 0,1	444000 ±	21 ± 0,8	144 ± 0	0,02 ± 0	37,3 ± 2,9	1826 ± 260	22,8 ± 3,4
II	7	3,3	462000	22	280	0,02	34,5	1097	22,1
	8	3,5	490000	22,5	225	0,02	30,9	1160	25,9
	9	3,0	420000	23	230	0,02	38,8	963	17,2
	10	3,4	476000	20	176	0,02	35,4	1454	24,5
	11	3,2	448000	20,5	200	0,02	30,9	1076	24,1
	12	3,0	420000	21	200	0,02	34,0	1082	21,9
		3,2 ± 0,1	453000 ±	21 ± 0,8	218 ± 24	0,02 ± 0	34,1 ± 2,9	1138 ± 167	23,1 ± 3,9
III	13	3,3	594000	20	350	0,02	41,4	1837	30,7
	14	3,4	612000	20,5	320	0,02	39,9	1478	25,7
	15	3,2	576000	21	470	0,02	34,2	1185	23,9
	16	3,2	576000	22	470	0,02	32,8	1121	23,7
	17	3,4	612000	22,5	420	0,02	34,2	1117	22,6
	18	3,3	594000	23	470	0,02	32,2	928	19,9
		3,3 ± 0,1	594000 ±	21 ± 0,8	417 ± 54	0,02 ± 0	35,7 ± 3,8	1277 ± 326	24,4 ± 3,6

новых концентрациях Б, составляющих 6—12 мг/мл, СО у животных уже не наблюдаются. T_{1/2} Б в прямой

корреляция с глубиной СО не находится, в то время как с уменьшением Кл_{уд}, тяжесть СО увеличивается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства, «Медицина», М., 1987.
2. Belknap J. K., Mitchell M. A. J. *o Pharm. and Exp. Ther.*, 3, 647—670, 1981.
3. Essig C. F. *J. Pharm.*, 2, 496—503, 1963.
4. Essig C. F., Flanary H. E. *Exp. Neurol.*, 1, 529—540, 1959.
5. Essig C. F. *National Institute of Mental Health, PHS Hospital*, 8, 199—209, 1963.
6. Essig C. F., Carter W. W. *J. Neurol.*, 12, 481—490, 1962.
7. Essig C. F. *J. Pharm. and Exp. Ther.*, 175, 88—93, 1970.
8. Essig C. F. *Arch. of Neurol.*, 80, 414—417, 1958.
9. Essig C. F. *Psychopharm.*, 3, 432—437, 1962.
10. Essig C. F. *Am. J. of Psych.*, 119, 119—193, 1963.
11. Okamoto M., Rosenberg H. G., Boise N. R. *J. of Pharm. and Exp. Ther.*, 2, 453—456, 1977.
12. Palermo-Neto J., De Lima T. C. M. *Neuropharm.*, 8, 277—281, 1982.
13. Saban G., Cadaz F. R., Moraes S. D. *J. of Pharm.*, 82, 37—44, 1982.
14. Tagashira E., Iozumi Tomoko, Saizo Januara, *Psychopharm.*, 57, 137—144, 1978.
15. Tagashira E., Hiramori T., Umano T., Nakao K., Januara S. *Japan J. Pharm.*, 31, 689—699, 1981.
16. Tagashira E. *Japan J. Pharm.*, 60, 111—116, 1979.
17. Wikler A., Fraser H. F., Isabel H. *J. Pharm.*, 8, 109—180, 1953.
18. Wulff M. H. *EEG Clin. Neurophysiol. (Suppl.)*, 1—173, 1959.
19. Yanagita T. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 172, 163—169, 1970.

ბარბიტალის მოხსნის სინდრომი ბოცვრებში

ნ. ახოვაძე, მ. ოკუჯავა, ბ. ხანკვეთაძე

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რეზიუმე

შესწავლილია ბარბიტალის მოხსნის სინდრომი ბოცვრებში, დადგენილ იქნა, რომ ბარბიტალის ხანგრძლივი მიღება აყალიბებს მათზე ფიზიკურ დამოკიდებულებას, რაც პრეპარატის მკვეთრი შეწყვეტის შემდეგ იწვევს მოხსნის სინდრომს.

მოხსნის სინდრომი ხასიათდება ცხოველთა მომატებული მგრძობელობით კრუნხვებისადმი და მაღალი ლეტალობით.

სინდრომი განპირობებულია ბარბიტალის კონცენტრაციის დაცემის სიჩქარით,

რომელიც ხორციელდება შემდეგნაირად: $I < II < III$. სინდრომის სიღრმე კარგ კორელაციაშია კონცენტრაციის დაცემის სიჩქარესთან და ასევე იცვლება: $I < II < III$.

8—12 მკგ/მლ კონცენტრაციის მნიშვნელობებზე სინდრომი უკვე აღარ აღინიშნება.

სინდრომი მკიდრო კავშირშია $K_{1/2}$ რომლის შემცირებით სინდრომის სიღრმე მატულობს.

THE DEVELOPMENT OF BARBITAL WITHDRAWAL SYNDROME IN RABBITS

N. A. AKHOBADZE, V. M. OKUJAVA, B. G. CHANKVETADZE

I. Javakishvili State University, Tbilisi

S u m m a r y

The study of withdrawal syndrome (WS) development in rabbits was carried out. It was established, that the long-term administration of barbital provided the gradual development of drug dependence in rabbits, accompanied by WS after the abrupt interruption of barbital injections.

WS was characterized by the strengthening of spastic readiness of animals and an increase of lethality.

WS is due to the rate of concentration decrease, which varies in following order: $I < II < III$. The WS intensity is in a good correlation with the rate of concentration decrease and varies in the same order: $I < II < III$.

Within the range of 8—12, $\mu\text{g/ml}$ the drug does not elicit WS in animals. WS is associated with $\text{Clearance}_{\text{spec}}$; its decrease provides the WS intensity elevation.

УДК 612.822.3

ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

ДЛИТЕЛЬНАЯ ПОТЕНЦИАЦИЯ ПРЯМЫХ ОТВЕТОВ КОРЫ

Р. П. Кашакашвили

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

Поступила в редакцию 13.07.89

В острых опытах на кошках при глубоком нембуталовом наркозе прямые ответные потенциалы коры — дендритный потенциал и медленный отрицательный потенциал, вызываемые ее локальным электрическим раздражением, увеличиваются по амплитуде на несколько часов после короткого тетанического раздражения через те же электроды. Высказывается соображение о постсинаптическом механизме этой длительной потенциации.

Явление посттетанической потенциации характерно для всех синапсов с химической передачей, однако продолжительность ее сильно варьирует на разных уровнях нервной системы. Потенциация после тетанического раздражения короткая в нервно-мышечном препарате и спинном мозге — длительность ее не превышает нескольких минут; однако в головном мозгу потенциация может длиться несколько часов в острых опытах и несколько недель в хронических препаратах. Необычайная по длительности потенциация впервые была обнаружена в гиппокампе в 1973 г. [6, 7]. Так как за тетанизацией следуют длительные изменения в синаптическом аппарате, то с этим феноменом связывают такие длительно протекающие процессы в головном мозгу, как обучение и память [8, 9]. Исходя из этого, понятен и тот интерес, который проявляется к этому феномену.

МЕТОДИКА

Острые опыты проводились на взрослых кошках при глубоком нембуталовом наркозе (80—100 мг/кг подкожно). Раздражающие и отводящие электроды помещались на поверхность супрасильвиевой извилины; расстояние между ними составляло

В новой коре нами была зарегистрирована посттетаническая потенциация длительностью около часа [5]. В настоящей статье будет идти речь о более длительных потенциациях прямых корковых ответов коры — дендритных потенциалов (ДП) и медленных отрицательных потенциалов (МОП).

В новой коре находятся синаптические связи, которые по исключительной простоте своей дают возможность детального аналитического исследования. К таким связям относятся аксо-дендритные связи, возбуждение которых приводит к возникновению дендритного потенциала, который, подобно фокальному потенциалу гиппокампа, является превосходной моделью для исследования посттетанической потенциации.

1—2,5 мм; отводили серебряным пуговчатым электродом диаметром торца 0,5 мм. «ИнDIFFерентный» электрод в виде серебряной пластины помещался под кожей, в область отсеченных шейных мышц. Для раздражения служили биполярные электро-

ды диаметром 0,1 мм с межполюсным расстоянием 0,2 мм. Продолжительность стимулов была 0,05 мс, интенсивность их — околопороговая при вызове ДП и на порядок больше при вызове МОП. 1 раз в 30 с вызывались одиночные или парные (с интервалом 80 мс) ДП, а в случае МОП — одиночные 1 раз в 1 мин. Затем через те же электроды производилось

тетаническое раздражение — в течение 20 с, после чего наносились пробные — одиночные или парные стимулы (подробно методика описана в [5]). Для усиления потенциалов использовался усилитель переменного тока с постоянной времени 2,2 с; регистрация велась на катодном осциллографе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При глубоком наркозе ДП, возникающий при прямом околопороговом раздражении волокон I слоя коры, представляет собой суммарный моносинаптический ВПСП верхушечных дендритов поверхностных слоев коры. МОП отражает в основном глиальную деполяризацию [3].

Как видно из рис. 1, потенциация в наших экспериментах могла наступать сразу после тетанизации, однако она могла проявиться и после на-

увеличилась на 20%; затем она нарастает (например на 75 мин амплитуда увеличена на 60%, притом, характер ДП не меняется (осцил. 2), а на 300 мин еще нет даже тенденции к ослаблению).

Длительная потенциация МОП начинается также сразу после тетанизации; на 40 мин амплитуда МОП увеличена на 70% и долго держится на таком уровне. Затем потенциал постепенно ослабевает и на 250 мин

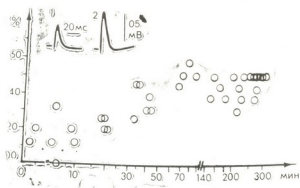


Рис. 1. Длительная потенциация ДП. Кошка, нембутал 80 мг/кг. Расстояние между раздражающими и отводящим электродами на супрасильвиевой извилине 1 мм. ДП вызываются стимулами 12 В (0,05 мс). По оси абсцисс — время в мин; по оси ординат — амплитуда ДП в процентах (средняя фоновая амплитуда дендритных потенциалов до тетанизации (усреднение 10 ответов) принимается за 100%). Кружками обозначены ДП, вызываемые одиночными стимулами после тетанизации. 1, 2 — осциллограммы дендритных потенциалов до тетанизации и через 75 мин после нее

чальной депрессии, длящейся несколько минут. В некоторых опытах бывали случаи, когда она выявлялась спустя 10 мин после тетанизации. Как видно из рис. 1, амплитуда ДП уже с первых минут после тетанизации

почти возвращается к фоновой величине (рис. 2). Как видно из осциллограммы 2, резко увеличивается также ДП, следующая за ним положительная фаза и, одновременно с увеличением амплитуды МОП, также увеличивается его продолжительность.

Можно было думать, что столь длительная потенциация указанных потенциалов вызвана стойким изменением общего функционального состояния препарата, вследствие, например, изменения уровня наркоза. Однако можно с уверенностью исключить вышесказанное, так как регистрация длительной потенциации ДП и МОП в данном случае (рис. 1, 2) происходила на одном препарате. Четко видно, что на 250 мин МОП почти восстанавливается, тогда как амплитуда ДП на 300 мин не обнаруживает даже тенденции к ослабле-

же учитывая данные из литературы нами было высказано предположение о том, что в основе посттетанической потенциации ДП прямого ответа коры лежат пресинаптические изменения в аксо-дендритных синапсах коры и увеличение, вследствие этого, выброса медиатора из пресинаптических терминалей [5, 1, 2, 4]. Однако при столь длительной потенциации, показанной в настоящей статье, очевидно, включаются и постсинаптические процессы — вплоть до синтеза новых белков [9, 12]. Введение блокаторов синтеза протеина, например

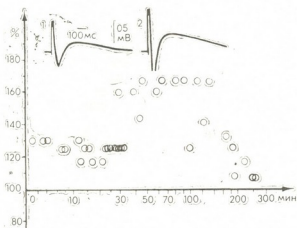


Рис. 2. Длительная потенциация медленного отрицательного потенциала (тот же препарат, что на рис. 1). Кружками обозначены медленные отрицательные потенциалы, вызываемые одиночными стимулами (50 В, 0,05 мс) после тетанизации. 1, 2—осциллограммы прямых ответов коры до тетанизации и через 60 мин после нее. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

нию. Эти факты, а также контрольный опыт, проведенный нами специально с наблюдением за изменениями амплитуды ДП в течение 5 ч (она оставалась в пределах нормы за весь период наблюдения), говорят в пользу наличия феномена истинной длительной потенциации вышеуказанных потенциалов.

В ранних работах, на основе анализа полученных нами фактов, а так-

пуромидина, устраняет длительную потенциацию [13], а анисомидин блокирует позднюю фазу длительной потенциации, не действуя на начальную [11, 10].

Таким образом, аксо-дендритные синапсы поверхностных слоев новой коры после однократного тетанического раздражения коры также обнаруживают удивительное свойство длительного изменения своей эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кашакашвили Р. П. Сообщения АН ГССР, 112, 397—400, 1983.
2. Кашакашвили Р. П. Сообщения АН ГССР, 114, 387—388, 1984.
3. Ройтбак А. И. Нейрофизиология, 2, 339—348, 1970.
4. Ройтбак А. И., Кашакашвили Р. П., Гогодзе И. К., Кутхашви-



ლი კ. ვ. Физиолог. Ж. СССР, 70, 1108—1115, 1984.

5. Ройтбак А. И., Кашакашвили Р. П., Лабахуа Т. Ш. В кн.: Современные проблемы деятельности и строения центральной нервной системы, «Мечниереба», Тбилиси, 4, 107—116, 1976.

6. Bliss T. V. P., Lomo T. J. *Physiol.*, 232, 331—356, 1973.

7. Bliss T. V. P., Gardner-Medwin A. R. J. *Physiol.*, 232, 357—375, 1973.

8. Eccles J. C. J. *Naturwissenschaften*, 66, 147—153, 1979.

9. Eccles J. C. J. *Neuroscience*, 10, 1071—1081, 1983.

10. Frey U., Krug M., Reymann R. G., Matthievs H. *Brain Res.*, 452, 57—65, 1988.

11. Krug M., Lössner B., Ott T. *Brain Res., Bull.*, 13, 39—42, 1984.

12. Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G., Schottler F. *Nature*, 305, 719—721, 1983.

13. Stanton P. K., Sarvey J. M. J. *Neurosci.*, 4, 3080—3088, 1984.

ქირქის პირდაპირი პასუხების ხანგრძლივი პოტენციაცი

რეზიუმე

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

მწვავე ცდებში კატებზე ღრმა ნემბუტალის ნარკოზის პირობებში ქერქის ლოკალური ელექტრული გაღიზიანებით ეიწვევდით ქერქის პირდაპირ პასუხებს — დენდრიტულ და ნელ უარყოფით პოტენციალებს. იმავე ელექტროდებით ხანმოკლე ტეტანური გაღიზიანება იწვევდა ზემოაღ-

ნიშნული პოტენციალების ამპლიტუდის გაზრდას ხანგრძლივად (რამოდენიმე საათის განმავლობაში). გამოთქმულია მოსაზრება აღნიშნული ხანგრძლივი პოტენციაციის პოსტსინაფსური მექანიზმის თაობაზე.

LONG-TERM POTENTIATION OF THE DIRECT CORTICAL RESPONSES

R. P. KASHAKASHVILI

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

S u m m a r y

In acute experiments on cats under deep nembutal anaesthesia the direct cortical responses — dendritic potential and slow negative potential—evoked by local electrical stimulation of the cortex

increase in the amplitude for some hours after short tetanic stimulation through the same electrodes. Postsynaptic mechanism of this long-term potentiation is suggested.

УДК 616.12—089.843:611.12

МОРФОЛОГИЯ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕМЕЩЕННЫХ НА НОЖКЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ В РЕЖИМЕ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Л. В. Лапанашвили, А. А. Можина, В. П. Замостьян, А. Н. Янина,
О. Г. Чиковани

Тбилисский институт усовершенствования врачей

*Институт сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева АМН СССР, Москва
Всесоюзный научный центр радиационной медицины АМН СССР, Киев.*

Поступила в редакцию 26.10.89

С целью определения характера влияния электростимуляции в раннем послеоперационном периоде на перемещенный несвободный мышечный лоскут и установления оптимальных сроков начала работы его в режиме сердечных сокращений при функциональной аутомио-вентрокулопластике было поставлено 72 хронических эксперимента на беспородных белых крысах.

В различные сроки (1—20 день) после ортотопической транспозиции прямой мышцы бедра на проксимальной ножке и 3-часовой напряженной работы трансплантатов изучены морфологические особенности мышц, подвергшихся электростимуляции.

Установлено, что длительное применение надпороговой тетанизирующей электростимуляции мышечного трансплантата в режиме сердечных сокращений возможно только после его спонтанной стабилизации. Это время для несвободного мышечного лоскута с сохраненным осевым кровоснабжением составляет 15—20 суток после операции.

Применение сократительной аутокани (ирригуемый лоскут, резистентный к утомлению скелетной мышцы) в реконструктивной хирургии сердца имеет исключительный практический интерес. Чтобы оказать эффективную хирургическую помощь больным с истинной миокардиальной недостаточностью надо решить проблему адекватной электростимуляции (ЭС) трансплантата, зависящей от порога возбуждения, силы и скорости сокращения, выносливости перемещенного

мышечного лоскута в послеоперационном периоде. Динамика названных показателей обусловлена морфологическими особенностями процесса стабилизации трансплантата на нервно-сосудистой ножке.

Исходя из вышесказанного целью нашего исследования было определение оптимальных сроков адекватного функционирования мышечного лоскута после операции и возможности выполнения ЭС в напряженном режиме именно в эти сроки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

На беспородных белых крысах обоего пола массой 290—300 г произведено 72 хронических опыта. Транспозиция мышечного лоскута на ножке моделировалась следующим образом:

под общей анестезией (кеталар; 1,5 мг/кг в/м) обнажали 4-главую мышцу бедра: отслаивали переднюю группу мышц по мышечной борозде от подлежащих тканей, оставляя ин-

тактными точки фиксации, доминантные сосуды и нерв. После гемостаза кожную рану ушивали двухрядным швом наглухо. Операцию производили на обеих задних конечностях для исследования работоспособности и контроля. Работоспособность оценивалась по изменениям тензограммы до и после 3-часовой напряженной стандартной нагрузки (НСН). НСН — интенсивное функционирование скелетной мышцы в режиме изометрического сокращения синхронно с ритмом сердца под влиянием прямой ЭС двумя вкалывающимися электродами. Для электрораздражения использовались короткие (50 мс) тетанизирующие пачки прямоугольных бифазных импульсов длительностью 1 мс, амплитудой до 10 порогов и частотой 100 Гц.

Для раздражения использован оригинальный электростимулятор, синхронизированный с ритмом сердца по R-зубцу.

Сразу после НСН, которую производили под общей анестезией (уртан; 100 мг/кг внутривенно), жи-

вотное забивали, вырезали кусочки мышц (работавшей и контрольной), фиксировали в формалине и заливали в парафиновые блоки. Гистологическое исследование 41-й мышцы произведено при помощи следующих методов: гематоксилином и эозином, на эластину — по методу Вейгерта, на коллагеновые волокна — по ван Гизону, на белковые массы — по Массону. Морфологические изменения мышечного лоскута оценивались по четырехбальной шкале: нет отека (0), отек выражен слабо (1), умеренно (2), сильно (3).

Все наблюдения подразделены на 3 группы: 1 группа — контроль I, представлена скелетной (интактной) мышцей, подвергнутой НСН (n=9); 2 группа — контроль II, представлена мышечными трансплантатами в различные сроки после операции на 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20 сутки (n=11); 3 группа (основная) представлена мышечными трансплантатами после НСН, произведенной на 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20-е сутки после операции (n=21).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании произведенного гистологического исследования интактной мышцы, подвергнутой НСН, обнаружены изменения в виде умерен-

ные сокращения скелетной мышцы (рис. 2). Минимальные нарушения микроциркуляции, по-видимому, обусловлены повышенным артериальным

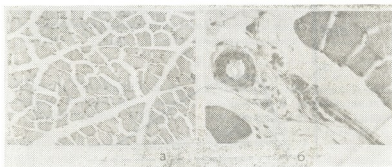


Рис. 1. Состояние микроциркуляции неоперированной скелетной мышцы после надпороговой электростимуляции (контроль I): умеренный отек интерстиция без диapedеза и полнокровия, окр. гематоксилин-эозином, \times : а — 60, б — 120

ного интерстициального отека, полнокровия сосудов и очагового разволокнения отдельных мышечных пучков (рис. 1). Тензометрией установлено, что эти изменения не отражаются на

притоком в результате воздействия ЭС (контроль I). Это соответствует данным других исследователей, изучающих воздействие ЭС на скелетную мышцу [1, 2, 6].

При сопоставлении морфологических изменений мышечного лоскута на ножке *in situ* в различные сроки после операции выявлена положительная динамика изменений (рис. 3).

В 1-е сутки после операции обнаружен интерстициальный отек, кото-

рый постепенно увеличивается и достигает максимума на 3—5-е сутки (рис. 4 а, б). В эти сроки выявляются очаговый отек внутри отдельных мышечных пучков. Параллельно увеличению отека выявлены стаз, дилатация сосудов и выход форменных элементов крови в результате нарушения проницаемости. Установлено, что стаз на 2-е сутки после операции преобладает в венозной системе и постепенно уменьшается по мере нарастания проницаемости сосудов. Она появляется на 2-е сутки, достигает максимума к 5-му дню после операции. К 10—15 суткам микроциркуляция нормализуется, что проявляется в значительном уменьшении отека, отсутствии стаза и гиперемии (рис. 4 в, г).

Дополнительно к этим повреждениям присоединяются дистрофические изменения (в виде фрагментации и зернистого распада) отдельных мышечных клеток внутри ряда волокон.

В области механического повреждения, начиная со 2-х суток после операции обнаружена воспалительная клеточная инфильтрация с разволокнением мышечных пучков. С 3-го дня начинается постоянно прогрессирующий процесс организации (рис. 4 д). К 5-му дню исследования в области механического повреждения мышцы обнаружены островки отдельных мышечных клеток, замурованные в рыхлую, волокнистую соединительную

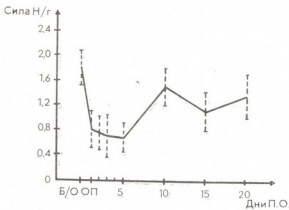


Рис. 2. Динамика изменений силы сокращения мышечного лоскута в послеоперационный период по данным тензометрии: по оси абсцисс — время исследования, по оси ординат — сила нормированная по массе животного в Н

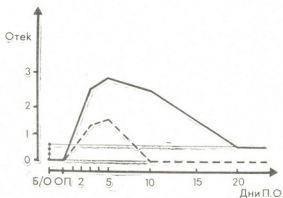


Рис. 3. Состояние микроциркуляции (по оси абсцисс — время исследования, по оси ординат — степень отека в баллах): 1 — неоперированной скелетной мышцы после надпороговой электростимуляции (точечная линия — контроль I); 2 — мышечного лоскута на ножке в послеоперационный период (а — во время естественной стабилизации (пунктирная линия — контроль II), б — после надпороговой электростимуляции (сплошная линия — основная группа)

ткань с большим количеством клеток, число которых постепенно уменьшается к 10-му дню с параллельным увеличением волокнистой ткани (рис. 4е). К 15—20 суткам морфологические изменения скелетной мышцы минимальны и представлены очаговым

ная дегенерация поврежденных мышечных волокон и замена их соединительной тканью, в которойжены миобласты. К концу 2-й недели область бывших поврежденных мышечных волокон занята регенерирующими волокнами. К этому же сроку

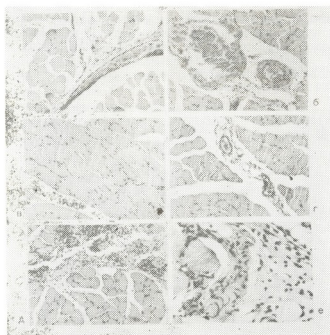


Рис. 4. Егестазинез (бз: электростимулции) течение после операционного периода: а, б — нарушение микроциркуляции в первые 3-е суток—отек, разволоknение мышечных пучков, стаз, дилатация вен; в, г — нормализация микроциркуляции к 10—15 суткам; д — воспалительная реакция на 2-сутки; е — организация очагов повреждения к 5 суткам. Скрапка гематоксилин-эозинном; а, б, в, г, д — $\times 60$; е — $\times 120$

фиброзом в области операционной раны и умеренным интерстициальным склерозом в прилежащих участках ткани.

На основании данных произведенного исследования (контроль II) подтверждено, что формирование мышечного лоскута (трансплантата) сопровождается морфологическими изменениями, соответствующими всем стадиям компенсаторно-приспособительной реакции на операционную травму.

Это совпадает с мнением других исследователей [2, 3, 4, 5, 7, 8], изучавших эффект механического повреждения скелетной мышцы крысы. По их данным на 5-й день происходит пол-

происходит образование венозных коллатералей и формирование анастомозов между прорастающими из окружающих тканей в мышцу и из мышцы в окружающие ткани сосудов. Полное восстановление адекватного кровообращения и, следовательно, ликвидация лимфостаза наступает не ранее 15 дня после операции.

Таким образом, выполнение операции (трансплантация) неизбежно приводит к травматическому повреждению части мышечных волокон, нарушению микроциркуляции и развитию воспалительной реакции, достигающих максимума к 5 дню, с последующим постепенным исчезновением

за счет развития репаративных процессов к 15—20 дню.

При исследовании несвободного мышечного лоскута, подвергнутого НСН в различные сроки его транспозиции, выявлены морфо-функциональные особенности, динамика которых представлена на рис. 2 и 3. Выявлено, что воздействие ЭС на мышечный лоскут в первые сутки после операции вызывает более выраженное по интенсивности и продолжительности нарушение проницаемости по сравне-

ниям интактной мышцы, подвергнутой НСН (рис. 5 в, г).

Таким образом, при НСН усиление и пролонгирование нарушения микроциркуляции обусловлено исходными изменениями микроциркуляции в оперированной мышце, соответствующими естественному течению процессов стабилизации трансплантата. Рабочая гиперемия, возникающая при ЭС, имеет отрицательные и положительные стороны. Максимальный отек тканей до 5-х суток приводит к очагово-

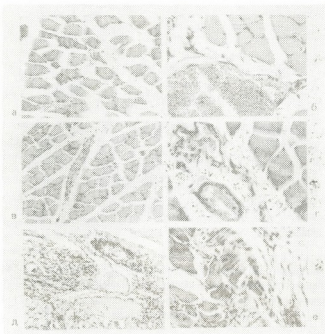


Рис. 5. Состояние мышечного лоскута, подвергнутого надпороговой электростимуляции в различные сроки после операции: а, б—выраженные нарушения микроциркуляции в первые 5 суток после операции: отек, гиперемия, стаз, дилатация венозной и артериальной систем, разволокнение ткани; окраска гематоксилин-эозином, $\times 120$; в, г — уменьшение признаков нарушения микроциркуляции к 15—20 суткам; окраска гематоксилин-эозином, $\times 60$ и 120 ; д—воспалительная реакция с организацией; окраска гематоксилин-эозином, $\times 120$; е—организация поврежденной; окраска гематоксилин-эозином, $\times 120$

нию со 2-й группой (рис. 3). Оно представлено отеком, не только интерстициальной ткани, но и внутриклеточным, очаговым кровоизлиянием (рис. 5 а, б). Интенсивность этих изменений сохраняется до 5 суток с последующим постепенным уменьшением к 15 суткам. К 20-м суткам они минимальны и приближаются к изме-

му сдавлению отдельных мышечных волокон и их атрофии.

В то же время, дополнительных очаговых дистрофических повреждений мышечных волокон не выявлено, что, по-видимому, обусловлено улучшением кровоснабжения мышечного лоскута за счет прорастания капилляров к 5 суткам после операции,

усилением притока крови по ним и восстановлением венозной системы (улучшение дренажа).

Положительным влиянием рабочей гиперемии является усиление релативного процесса в очагах повреждения. По сравнению со 2-й группой на 3 сутки выявлен лизис отдельных поврежденных волокон с последующей организацией этого участка ткани (рис. 5д). К 5 суткам в области операционной раны образуется молодой соединительнотканый рубец с мелкими очагами мышечных волокон (рис. 5е). К 10 суткам рубец представлен плотной фиброзной тканью с единичными замурованными в нем мышечными волокнами.

Морфологические изменения мышеч-

ного лоскута в этой серии являются с одной стороны, результатом импленсаторно-приспособительных изменений ткани на операционную рану с другой — отражением воздействия ЭС.

Значительное уменьшение изменений нарушения микроциркуляции и формирование плотной рубцовой ткани в области операционных ран к 15—20 суткам позволяют сделать вывод, что эти сроки являются оптимальными для адекватного воздействия ЭС. Это подтверждено отсутствием электролиза раздражаемой мышечной ткани и прогрессирующим нарастанием силы мышечного сокращения, начиная с 10 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселова Е. С., Мещерский Е. Л., Хаютин В. М. В кн.: Регуляция кровообращения в скелетных мышцах, «Медицина», Рига, 1980, 23—29.
2. Евдошенко М. П., Санин В. Г., Иванов А. М. Методические рекомендации ЦОТКЗ НИИ протезирования и протезостроения, М., 1981.
3. Свириновская Э. Л. В кн.: Проблемы органа- и ганглиopleksии, «Медицина», Минск, 1974, 23—36.
4. Carlson B. M. In: The biology of muscle transplantation. Muscle transplantation, Springer-Verlag, Wien—New York, 1981, 3—18.
5. Chachques J. C., Mitz V., Fontaliran F., Vilain R. Ann. Chir. Plast. Estet., 28, 2, 191—194, 1983.
6. Cotter M., Hudlicka O., Vrbova G. Eile Aret., 11, 395—398, 1973.
7. Najamunnisa G., Rauf S., Shahzod M. Pakistan J. Zool., 13, 1—2, 51—62, 1981.
8. Orticochea M. Ann. Plast. Surg., 11, 1, 63—67, 1983.

ფეხზე გადაწმობილი და შემდგომ გულის შეკუმშვამთა რეჟიმის შესაბამისად ელექტროსტიმულირებაული ჩონჩხის კუნთის მოვლოლოგიური თავისებურებანი

ლ. ლაფანაშვილი, ა. მთელია, ვ. ზავოსტიანი, ა. იანიშა, ო. ჩიქოვანი

თბილისის ექიმთა და ექსპერტების ინსტიტუტი

ა. ბაკუღევის სახელობის გულ-სისხლძარღვთა ქირურგიის ინსტიტუტი, მოსკოვი რადიციული მედიცინის საკავშირო-სამეცნიერო ცენტრი, კიევი

რეზიუმე

ჩატარებულ იქნა გამოკვლევა ცდის ქრონიკულ პირობებში ვირთაგვებზე. ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა ელექტროსტიმულაციის გავლენის შესწავლა ადრულთა ოვარაციის შემდგომ პერიოდში ართავისუფალ დაღანერგილ კუნთოვან ნაჭერზე და მისი გულის შეკუმშვამთა რე-

ჟიმში მუშაობის დაწყების ოპტიმალური ვადების დადგენა ფუნქციური აუტო-მოვენტრიკულოპლასტიკის განხორციელებისას.

სხვადასხვა ვადებში ბარძაყის სწორი კუნთის პროქსიმალურ ფეხზე ტრანსპლანტიის შემდგომ (1—20 დღე) ტრანსპლან-



ტატის 3-საათიანი დაძაბული მუშაობის პირობებში შეისწავლებოდა კუნთში ელექტროსტიმულაციით წარმოქმნილი მორფოლოგიური ცვლილებები.

დადგენილ იქნა, რომ ზეზღვრული ხანგრძლივი ელექტროსტიმულაცია გულის შეკუმშვის რეჟიმში შესაძლებელია მხო-

ლოდ მისი სპონტანური სტაბილური ფუნქციონირების შენარჩუნება. არათავისუფალი სისხლის მიმოქცევით ეს ვადა განისაზღვრება 15—20 დღით ოპერაციის შემდგომ.

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF TRANSPLANTED PEDICLED SKELETAL GRAFTS PACED WITH CARDIAC RATE

L. V. LAPANASHVILI, A. A. MOZHINA, V. P. ZAMOSTIAN, A. N. IANINA, O. G. CHIKOVANI

Institute for Medical Postgraduate Training, Tbilisi
All-Union Centre of Radiation Medicine, Kiev, USSR
A. N. Baculev Institute of Cardiovascular Surgery Moscow, USSR

S u m m a r y

72 chronic experiments were carried out on white rats with a view to defining the optimal period of cardiac rate paced functioning of transplanted pedicled grafts in automyoventricular plastics surgery.

Morphological features of the paced grafts were studied in different (1—20 days) periods after orthotopic transplantation of the m-rectus femoris on a pro-

ximal pedicle and its intensive functioning during 3 hours.

It has been established that the suprathreshold tetanizing paced graft working in the cardiac rate can be used only in the case of spontaneous stability. For a pedicled muscular graft with axial blood supply this optimal period is 15—20 days after operation.

УДК 591.3:636 91:612.63

ЭМБРИОЛОГИЯ И ГИСТОЛОГИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОМЕНТА ОВУЛЯЦИИ У МОРСКИХ СВИНОК С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТОВ ДЛЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ IN VITRO

А. И. Бузукашвили

Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Натишвили АН Грузии, Тбилиси

Поступила в редакцию 13.07.89

Смена стадий эстрального цикла у самок морской свинки определялась по наличию вагинальной мембраны, картине влагалищных мазков и поведению животных. На основании критического анализа данных литературы и собственных наблюдений описаны признаки различных стадий эстрального цикла, позволяющие прогнозировать и определять наступление овуляции. В качестве прогностического критерия овуляции выбрано половое поведение. Спустя 10—12 часов после появления признаков половой охоты наступает овуляция и могут быть получены постовуляторные ооциты.

В последние годы морские свинки привлекают все большее внимание как удобный объект эмбриологических исследований в до- и в постимплантационном периоде [3, 23]. В частности, целый ряд особенностей генеративной функции морских свинок — стабильность момента овуляции в конце эструса [6], отсутствие прегравидных изменений в матке под влиянием желтого тела [6], простой морфологический критерий определения акросомной реакции сперматозоидов [24] — делает весьма привлекательным их использование для исследований с применением метода оплодотворения in vitro. Для получения ооцитов лабораторных грызунов и других млекопитающих, в том числе и человека, в настоящее время используется метод гормональной стимуляции роста фолликулов и последующей овуляции [5, 11, 12, 19]. Однако гормональные препараты не всегда бывают доступны. Кроме того, ооциты, полученные таким способом, могут оказаться менее способными к оплодотворению [19]. Поэтому получение трубных ооцитов после естественной овуляции сохраняет свою актуальность. В особенности это касается

морских свинок, поскольку до настоящего времени попытки получить суперовуляцию у этих животных не принесли успеха [21]. В то же время в отечественной и зарубежной литературе мало освещаются особенности эстрального цикла морских свинок; приводимые данные носят разрозненный характер, имеют место противоречия и неточности. На основании имеющихся в литературе данных, а также собственных наблюдений, нами предпринята попытка в краткой форме суммировать сведения об эстральном цикле морских свинок и выделить наиболее надежные критерии, необходимые для определения момента овуляции и получения достаточно свежих постовуляторных ооцитов.

Исследования проводились в период с февраля по июнь на популяции, состоящей из 22-х половозрелых самок морской свинки весом 350—400 г, содержащихся в изоляции от самцов. Дважды в день проверялось наличие вагинальной мембраны. После открытия последней систематически исследовались влагалищные мазки и поведение животных.

По данным Западнюк с соавт. [1] и Розен [4] открытие влагалища происходит лишь в период течки, а на остальных стадиях цикла влагалище закрыто. По нашим наблюдениям к моменту исчезновения вагинальной мембраны на влагалищных мазках соответствует цитологическая картина проэструса. Следующая за этим корнификация влагалищного эпителия сменяется картиной метаэструса и иногда диэструса и лишь за этим происходит закрытие. То же следует и из данных, приводимых другими авторами [9, 10, 16, 17]. Период открытия мембраны совпадает с течкой лишь у линейных морских свинок [20, 22]. По утверждению Ковалевского [2] признаками эструса являются открытие влагалища и обильное выделение слизи из него. Нами же максимальное ослизнение отмечалось в диэструсе при открытом влагалище, что соответствует времени интенсивной секрции желтым телом прогестерона. Специфическим эффектом последнего и является муцификация поверхностного слоя эпителиальных клеток [6].

Для определения различных стадий эстрального цикла и момента овуляции в разнообразных исследованиях на морских свинках применяют именно метод вагинальных мазков [9, 10]. Его же используют и для получения трубных ооцитов после естественной овуляции у лабораторных грызунов [5, 19]. В качестве временного ориентира при определении момента овуляции с целью получения трубных ооцитов морской свинки принимают также время суток в условиях контролируемого режима освещения [15, 18], либо начало активного полового поведения, т. е. поведенческого эструса [24]. В течение десяти часов после начала эструса (по данным одних авторов [7, 8]) и двенадцати часов после появления признаков половой охоты (по другим сведениям [13]) происходит овуляция. Наконец Янагимачи [24] получал трубные ооциты в 9—12 ч утра, следующего за вечером половой активности. Цитологическим признаком наступления ову-

ляции является появление лейкоцитов во влагалищном мазке [9, 10], что одновременно означает конец эструса [14]. Поэтому альтернативным способом может стать систематическое с небольшими интервалами исследование влагалищных мазков животных на стадии эструса до появления лейкоцитов. Однако это создаст определенные трудности, поскольку цитологическая картина эструса может наблюдаться от 10—12 до 40 ч в отдельных случаях. Следует отметить, что корнификация влагалищного эпителия не всегда совпадает с началом половой активности. Поведенческий эструс может начаться одновременно со сменой картины мазков с проэструса на эструс, в некоторых случаях половая охота начиналась со значительным опозданием (до 17-ти часов и более), но всегда отмечалась на фоне цитологической картины ороговевших чешуек во влагалищном мазке.

По нашим наблюдениям поведенческий эструс представлен рядом признаков — самка бросается на других самок, нередко имитируя садку, проявляет повышенный интерес к самцу, подсаженному в клетку, иногда наблюдается реакция лордоза при поглаживании по спине. Однако эти признаки бывают выражены в разной степени и присутствуют далеко не всегда. Окончательным критерием может служить лишь покрытие. В условиях естественного освещения течка у морских свинок начинается обычно по ночам, поэтому наблюдения за самцами, у которых было зарегистрировано открытие влагалища, следует вести в течение периода темноты. Спустя 10—12 ч после начала поведенческого эструса половое поведение не регистрируется — самка уже не позволяет себя покрыть, а в мазке появляются лейкоциты, что является признаком наступившей овуляции. В четырех случаях наличие постовуляторных ооцитов было проверено непосредственно промыванием яйцеводов.



1. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте, «Госмедиздат», Киев, 1962.
2. Ковалевский К. А. Морская свинка, М., 1948.
3. Надирашвили С. А., Гришнина А. А. Искусственное плацентарное кровообращение плода, «Мешинереба», Тбилиси, 1986.
4. В. Б. Розен. Основы эндокринологии, «Высшая школа», М., 1984.
5. Чеботарь Н. А. Цитология, 16, 10, 1318—1320, 1974.
6. Эслин И. А. Основы физиологии эндокринных желез, «Высшая школа», М., 1968.
7. Asdell S. A., Second Ed. Comstock Publishing Associates, Itaca, New-York, 1964, 386—400.
8. Blandau R. J., Yong W. C. Am. J. Anat., 64, 303—329, 1939.
9. Blatchley F. R., Donovan B. T., J. Endocrinol., 53, 3, 493—501, 1972.
10. Blatchley F. R., Donovan B. T., Ter Haar M. B. Biol. Reprod., 15, 1, 29—38, 1976.
11. Brackett B. G. Fertil. Steril., 20, 1, 127—142, 1939.
12. Gasper R. F., Erskine D., Brown S. E., Daniel S. A., Graves G. R., Yuzpe A. A., Fertil. Steril., 49, 4, 644—648, 1988.
13. Deansley R. J. Reprod. Fertil., 11, 429—431, 1966.
14. Donovan B. T., Lockhart A. N. J. Reprod. Fertil., 30, 2, 207—211, 1972.
15. Hunt D. M., Chang M. C. Anat. Rec., 148, 2, 378, 1964.
16. Likar Y. N., Likar L. J., Taylor H. E. Nature, 190, 4781, 1118—1119, 1961.
17. Malven P. V., Ruiz-Diaz R. J. Anim. Science, 32, 5, 919—921, 1971.
18. Myers H. Y., Young W. C., Dempsey E. W. Anat. Rec., 65, 381—401, 1936.
19. Myamoto H., Chang M. C. Nature, 241, 5384, 50—52, 1973.
20. Reed M., Burton F. A., Van Diest P. A. J. Anat., 128, 1, 195—206, 1979.
21. Rogers B. J., Ueno M., Yanagimachi R. Biol. Repro., 25, 1981.
22. Tengku Y. A., Jeremy D. O., Neville W. B., Raymond J. B. Anat. Res., 210, 1, 33—40.
23. Schwartze H., Schwartze P., Schonfelder J. Biol. Neonat., 17, 34, 238—248, 1971.
24. Yanagimachi R. Anat. Rec., 174, 1, 9—13, 1972.

ოვულაციის დროის განსაზღვრა ზღვის გოჭში IN VITRO
განაყოფინებებისათვის ოოციტების მისაღებად

ა. ბუზუაშვილი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ა. ნათიშვილის სახელობის
ექსპერიმენტული შორფოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ოვულაციის მომენტის დასადგენად გამოკვლევულ იქნა ესტრალური ციკლის თავისებურებანი ზრდასრულ ზღვის გოჭებში. ყოველდღიურად მოწმდებოდა ვაგინალური მემბრანა, ხოლო გახსნის შემდეგ — ვაგინალური ნაცხები და ცხოველების ქცევა. ლიტერატურაში არსებული მონაცემები კრიტიკულად არის განხილუ-

ლი და ჩატარებული დაკვირვებების შედეგებთან ერთად შეჯამებული. ოვულაციის პროგნოსტიკულ კრიტერიუმად სქესობრივი ქცევა არის მიჩნეული. ოვულაციას ადგილი აქვს და შესაძლებელი ხდება ოვულირებული კვარცხუჭრედების მიღება სექსუალური ქცევის დაწყებიდან 10—12 საათის შემდეგ.

OVULATION DEFINITION AND OOCYTES RECOVERY FOR IN VITRO FERTILIZATION IN THE GUINEA PIG



A. I. BUZUKASHVILI

Institute of Experimental Morphology Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

S u m m a r y

Adult female guinea pigs were used. Oestrous cycles were recorded by daily inspection of the vaginal membrane, with smears and behavioral activity being examined whenever vagina was open. Our results and other available data necessary for ovulation detection and oocytes recovery for in vitro fertilization were summarized and critically analyzed. Mating behavior was chosen as a predictive sign of ovulation. 10—12 hours after the onset of sexual receptivity ovulation occurs and postovulatory eggs may be recovered.

УДК 612.63.08 [612.621] 31.612.129

БИОХИМИЯ

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ ЭСТРАДИОЛА В МИОМЕТРИИ И ТРОМБОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДАХ

З. В. Дарахвелидзе, П. Я. Кинтрая, И. Д. Мамамтавршвили,
Д. Г. Микеладзе

*НИИ перинатальной медицины, акушерства и гинекологии им. акад. К. В. Чачава
МЗ Республики Грузия, Тбилиси*

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

Поступила в редакцию 22.06.89.

Изучено изменение сродства и плотности эстрогеновых рецепторов миометрия и тромбоцитов при различных сроках беременности и родах у экспериментальных животных, а также беременных женщин на последнем триместре. Показано, что чувствительность эстрогеновых рецепторов как миометрия, так и тромбоцитов изменяется на разных стадиях беременности и родах. Выяснено, что эти изменения лиганд-связывающих констант миометрия и тромбоцитов протекают по отличающемуся механизму. Предполагается существование автономной системы регуляции эстрогеновой рецепции в фето-плацентарном комплексе.

В настоящее время установлено, что ведущее значение в обеспечении и развитии гестационного процесса принадлежит гормонам функциональной системы мать—плацента—плод [3]. Именно в этой системе объединяется в единое функциональное целое организмы беременной женщины и развивающегося плода. Формирование плаценты обуславливает продукцию целого ряда гормональных веществ, осуществляющих нормальное прогрессирование беременности и подготовку организма к родам [5]. Пептидно-белковые, стероидные и другие типы гормонов, синтезирующиеся в фетоплацентарном комплексе, вызывают ряд биохимических изменений в половых органах матери, обуславливают рост миометрия и его готовность для осуществления плодотворной функции. В этих изменениях миометрия основная роль, по-видимому, принадлежит половым стероидам, которые непосредственно, в

обход системы вторичных посредников, воздействуют на генную активность хроматина [7].

Ключевым этапом физиологического действия гормона на клетку является его спонтанное и обратимое комплексообразование с биоспецифическим белком-рецептором. Если в клетке нет рецепторов, гормон не способен воздействовать на нее. Выяснено, что половые стероиды после воздействия соответствующим рецептором, локализованным в цитоплазме клетки, транслоцируются в ядро и вызывают экспрессию специфических генов. В результате этого процесса происходит усиленный синтез новых белков, стимулируется ряд анаболических и биосинтетических реакций в миометрии, вызывающих рост клеток и подготовку матки к контрактильной функции [5]. Учитывая универсальность регуляции клеточного аппарата в орга-

низме, мы поставили себе целью изучить функциональные характеристики эстрогеновых рецепторов в органах миометрия (миометрии) и в тромбоцитах периферической крови, которые,

по имеющимся данным [3], отвечают тканям-мишеням с установленными соотношениями между ними в динамике беременности и родах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы в качестве экспериментальной модели белые крысы, у которых на разных стадиях беременности (1—5-й день — доимплантационный период; 5—7-й день — имплантационный период; 8—14-й день — органогенез; 15—21-й день — фетогенез; 22—24-й день — роды (после рождения 1 плода) удаляли матку, не используя ее ткани для анализа. Первым днем беременности считали обнаружение спермиев во влагалищном содержимом. В эти же периоды у крыс бралась кровь из хвостовой вены для получения тромбоцитов. Для определения активности эстрогеновых рецепторов были использованы полоски миометрия, взятого из нижнего сегмента во время кесарева сечения у женщин в сроки 32—33 недель, 34—35, 39—40 недель беременности. Была выделена группа из 10 женщин, которым было произведено кесарево сечение по поводу упорной слабости родовой деятельности. У этих же женщин бралась венозная кровь в количестве 8—10 мл.

Выделение тромбоцитов проводили следующим образом: к 8—10 мл крови добавляли 1 мМ ЭДТА, эритроциты удаляли центрифугированием при 200xg в течение 10 мин и из надосадочной жидкости получали тромбоциты по методу Эгашира [11].

Ткань миометрия гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 10 объемах раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl, 0,32 М сахарозы и 1 мМ

MgCl₂ (pH 7,4). Гомогенат центрифугировали при 800xg в течение 10 мин; затем извлекался супернатант, который центрифугировался в течение 60 мин при 35000xg. Надосадочную жидкость использовали для определения рецепторов эстрогенов. Аналогичным методом получали растворимую фракцию тромбоцитов.

Количество (B_{max}) и константу диссоциации (K_d) эстрогенового рецептора определяли с помощью ³H-тамоксифена (Амершам, Англия; активность 83 Кюри/мМ). Инкубационная среда содержала 10 мМ трис-буфера (pH-7,4); 12 мМ теоглицерола; 1 мМ ЭДТА; 10 мМ Na₂MoO₄ (2,0 — 100 мМ); 2,5 мМ АТФ, 3,5 мМ MgCl₂; ³H-тамоксифен в концентрациях от 0,2 до 5 нМ; 100 мкг белка миометрия или тромбоцитов. Инкубация проводилась в течение 21 ч при T 30 и 4°C; смесь фильтровали на аппарате Миллипор-Уотерс (США) с помощью фильтров GF/C (Ватман, Англия), предварительно обработанных полиэтиленгликолем. Для определения неспецифических связываний использовали 100 мкМ диэтилстильбэстрола. Фильтры считали в толуольной сцинтилляционной смеси на приборе SL-4000 (Интертехник, Франция). Данные обрабатывали с помощью математической системы Скэтчарда по программе ЕВДА, предложенной Кембриджским университетом. Белок определяли по Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что плотность и средство эстрогенового рецептора колеблется в динамике беременности и зависит от гормонального статуса беременного организма. Причем эти изменения находятся в пропорциональной зависимости от двух факторов — увеличение (или снижение) средства рецептора к лиганду (тамоксифену) сочетается со снижением (или увеличени-

ем) количества самых рецепторов. В частности, найдено, что в доимплантационный период в матке крыс происходит снижение средства рецептора к лиганду (повышение значения K_d), которое затем, с прогрессированием беременности, начинает возрастать и достигает максимума к стадии органогенеза. С этого периода гестационное средство рецептора к лиганду вновь снижается и к родам значение этой

константы достигает максимума ($5,5 \times 10^{-9}$), что свидетельствует о понижении чувствительности рецептора к эстрогенам (эстрогеновый рецептор десенситизируется) в период родов. Изменению сродства рецептора сопутствует изменение количественного показателя плотности рецепторов в ткани матки (число связывающих эстрогены мест — V_{max}). В доимплантационный период и в родах, когда сродство рецептора к лиганду значительно снижено, происходит увеличение плотности связывающих мест (значение V_{max}), свидетельствующее о возрастании общего числа эстрогеновых рецепторов в ткани.

Аналогичным образом меняются кинетические характеристики рецепторов эстрогена миометрии женщины на последних стадиях беременности. На рис. 1 видно, что сродство рецеп-

тору вместо снижения повышается. Изучение тех же параметров в тромбоцитах выявило совершенно противоположные закономерности. У крыс снижение чувствительности рецептора к лиганду в тромбоцитах, в отличие от миометрии, происходит на стадии органогенеза (рис. 2). И, наоборот, на стадии фетогенеза и в родах эстрогеновый рецептор обладает наиболее высоким сродством к 3H -гаммоксифену. Противоположные в отношении миометрии данные были получены также при исследовании свойств эстрогеновых рецепторов в тромбоцитах женщин. В процессе прогрессирования беременности (32—33 недели, 34—35 недель, 39—40 недель) чувствительность рецепторов к лиганду возрастала с одновременным снижением их плотности. Интересно, что у женщины со слабостью сократительной

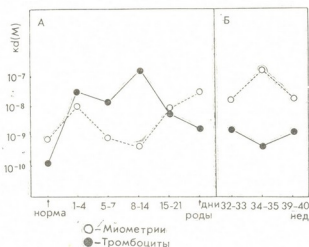


Рис. 1. Изменение K_d -связывания 3H -тамоксифена с мембранами миометрии (светлые кружки) и тромбоцитов (темные кружки) в разных сроках беременности и родах; А — эксперимент; Б — клинический материал

тора к лиганду снижается в срок 34—35 недель, по сравнению со сроком 32—33 недели беременности, почти десятикратно. Число связывающих мест в матке женщины в эти же периоды меняется не столь значительно (V_{max}). Такая десенситизация рецептора не происходит у женщин с выраженной слабостью родовой деятельности — в родах сродство эстрогеновых рецепторов миометрии к ли-

активности матки в родах сродство эстрогеновых рецепторов миометрии к лиганду вместо снижения повышается, тогда как в тромбоцитах вместо предполагаемого повышения — снижается. Эти данные свидетельствуют о том, что регуляция эстрогеновой рецепции в миометрии отличается от таковой в тромбоцитах.

Известно, что количество рецепторов половых гормонов изменяется при



различных физиологических и патологических состояниях отдельных тканей и органов. Так, например, выяснено, что в течение эстрального цикла у животных и менструального у женщины изменяется количество эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в матке [5]. Колебания их плотности в ткани зависят от изменения

пролиферативной фазы в перипартурный период [4].

При беременности уровень рецепторов в ткани матки закономерно меняется в соответствии с уровнем гормонов в крови и физиологическими изменениями миометрия на различных этапах беременности. Известно, что с прогрессированием беременности рез-

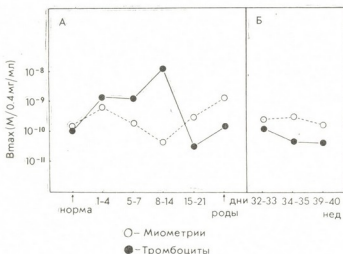


Рис. 2. Изменение V_{max} связывания 3H -тамоксифена с мембранами миометрия (светлые кружки) и тромбоцитов (темные кружки) в разные сроки беременности и родов: А — эксперимент; Б — клинический материал

уровня половых стероидов в крови. В матке крыс число рецепторов эстрогенов снижается в стадии проэструс и диэструс-2, а затем повышается в стадиях эструс и диэструс-1. Снижение связывающей способности рецепторов в стадии проэструс объясняется оккупацией рецепторных мест повышающимся уровнем эндогенного эстрадиола и последующей транслокацией образовавшегося комплекса в ядро, т.е. уровень циркулирующего в крови гормона в критические стадии эстрального цикла отражает перераспределение эстрогеновых рецепторов между цитоплазмой и ядром [9]. В матке женщины максимальное увеличение рецепторов эстрадиола достигается к середине пролиферативной фазы, параллельно начальному возрастанию секреции эстрадиола в крови. В дальнейшем происходит увеличение уровня рецепторов в ядерной фракции, достигающего максимума в конце

ко нарастает концентрация половых стероидов в периферической крови млекопитающих, достигающая максимума на 37—38-й неделе. Это повышение связано с усилением синтеза дегидроэпиандростерона надпочечниками матери и, особенно, плода, который затем метаболизируется плацентой в эстрогены [7]. К этому сроку беременности в крови значительно повышаются фракции эстрадиола и эстриола, оказывающих выраженное влияние на обмен веществ в организме, усиливая пролиферативные и дифференцирующие процессы не только в миометрии, но и во влагалище, молочных железах, печени, гипоталамусе и т. д. [2].

В последнее время выяснилось, что эстриол действует антагонистически в отношении эстрадиола на сократительную активность матки, возможно, путем конкуренции за эстрогеновые цитоплазматические рецепторы. Если

это так, то биологическая роль эстриола, совместно с прогестероном, по-видимому, заключается в сохранении беременности путем ограничения воздействий на матку активных фракций эстрогенов [1].

С приближением срока родов наблюдается уменьшение экскреции эстриола и увеличение выделений с мочой эстрадиола, что должно приводить к усилению контрактильной способности матки [10]. Изучению рецепторов половых стероидов при беременности посвящено большое количество работ, основная суть которых сводится к тому, что с прогрессированием беременности происходит перераспределение рецепторных белков с резким падением цитозольной и накоплением ядерной фракции, которая к концу беременности возрастает в 5 раз [8]. Увеличение ядерной фракции рецепторов эстрадиола, общее для человека и животных, имеющее место в предродовый период, вероятно, способствует усилению эстрогенового влияния на миометрий, необходимого для развязывания родовой деятельности. У животных к этому времени начинает снижаться содержание ядерных рецепторов прогестерона. В матке женщины концентрация ядерной формы остается высокой, однако в миометрии содержание общих рецепторов прогестерона падает более, чем в 20 раз, по сравнению с пиком их уровня в пролиферативную фазу цикла [6], что, по-видимому, способствует дестабилизации клеточных мембран миоцитов.

Таким образом, исследование эстрогеновых рецепторов в миометрии при беременности проводилось, в основном, путем подсчета плотности цитозольной и ядерной фракций рецепторов без учета особенностей их чувствительности к лиганду. Исследование рецепторов эстрогенов в периферической крови беременных, как выясняется при обзоре литературы, не проводилось вообще.

Поэтому в данной работе мы поставили себе целью изучить функциональные характеристики эстрогеновых рецепторов как в миометрии, так и тромбоцитах периферической крови. Логично было предположить, что функциональные характеристики рецепторов в крови и миометрии будут коррелировать как между собой, так и

с колебаниями гормональной ценности тканей организма во время беременности и родах.

В проведенных экспериментах нами определялся т. н. «нетрансформированный» цитоплазматический эстрогеновый рецептор, экстрагируемый из клетки при низкой ионной силе. При этом мы исходили из того факта, что этот рецептор, как и ядерный, содержит белок с константой седиментации 8S и несет основные функции рецептора, проявляя высокое сродство к эстрогенам. Плотность этих рецепторов (тип I) полностью регулируется уровнем циркулирующих в крови эстрогенов. После присоединения гормона к этому рецептору, комплекс гормон — рецептор транслоцируется из цитоплазмы в ядро, проявляя свое воздействие на клетку. Кроме того, в состав цитоплазматического рецептора входит эстрогеновый рецептор с низким сродством (тип II), функция которого до сих пор невыяснена [6]. Предполагается, что эстрогенсвязывающая способность рецептора в цитоплазме повышается после его фосфорилирования, и рецептор с низким сродством может переходить в активный — I тип рецептора. Таким образом, обнаружение в тканях рецептора с высоким сродством может указывать либо на снижение уровня эстрадиола на данном этапе беременности, либо на повышение в тканях концентрации эстриола, оккупирующего эти рецепторы и препятствующего транслокации комплекса в ядро. Однако в этих случаях в цитоплазме должно определяться большое число эстрогеновых рецепторов с низким сродством. Такого типа изменения нами были найдены в миометрии крыс в доимплантационный период, при фетогенезе и родах. Они свидетельствуют об увеличении концентрации эстрогена в клетках в эти периоды, что вызывает транслокацию активного рецептора к хроматину. И, наоборот, снижение уровня эстрогенов в клетке или увеличение содержания блокаторов эстрадиола типа эстриола или прогестерона, должно приводить к накоплению «цитоплазматического» рецептора с высоким сродством, что было найдено на стадии органогенеза у крыс и в миометрии женщин со слабой родовой деятельностью. Нами установлено также, что плотность и

სირებასთან ერთად იწყებს ზრდას და აღწევს მაქსიმუმს ორგანოგენეზის დროს. გესტაციის ამ პერიოდიდან რეცეპტორის მგრძობელობა ლიგანდის მიმართ კვლავ მცირდება და მშობიარობის დროს ამ კონსტანტის მნიშვნელობა აღწევს მაქსიმუმს, რაც ადასტურებს რეცეპტორის დესენსიბილიზაციას ესტროგენების მიმართ მშობიარობის პერიოდში. იგივე პარამეტრების შესწავლისას სრულიად საწინააღმდეგო კანონზომიერებანი იქნა მიღებული თრომბოციტებში.

რეცეპტორების მგრძობელობის და-

ქვეთება ლიგანდის მიმართ თრომბოციტებში, განსხვავებით მიომეტრიუმში, ხდება ორგანოგენეზის სტადიაში და მშობიარობის დროს ესტროგენის რეცეპტორი ამჟღავნებს უფრო მაღალ თვისობას ^3H -ტამოქსიფენის მიმართ.

აღნიშნული მონაცემები ადასტურებენ, რომ მიომეტრიუმის ესტროგენული რეცეპციის რეგულაცია განსხვავებულია თრომბოციტებში არსებული რეცეფციის რეგულაციის მექანიზმისაგან.

CHANGE OF FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ESTRADIOL RECEPTOR SYSTEM IN MAMMALIAN MYOMETRIUM AND THROMBOCYTES DURING PREGNANCY AND LABOR

Z. V. DARAKHVELIDZE, P. I. KINTRAIÄ, I. D. MAMAMTAVRISHVILI, D. G. MIKELADZE

K. Chachava Research Institute of Perinatal Medicine, Obstetrics and Gynecology, Tbilisi
I. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

S u m m a r y

It has been found that in the preimplantation period receptor affinity for ligand decreases in the rat uterus which, as pregnancy progresses, begins to increase and reaches its maximum during organogenesis. From the gestation period on the receptor sensitivity to ligand again decreases and at labor this constant attains its maximum indicating the receptor desensibilization to estrogen during labor. Study of the same parame-

ter in thrombocytes yielded quite contrary results. Decrease of receptor sensitivity to ligand in thrombocytes, in contrast to myometrium occurs in the stage of organogenesis and vice versa, in the stage of phenogenesis and at labor the estrogen receptor exhibits higher tolerance to ^3H -tamoxiphen.

The results suggest that the mechanisms of estrogen receptor regulation vary in myometrium and thrombocytes.

УДК 577.153.35

БИОХИМИЯ

ЗАВИСИМОСТЬ ДЕЙСТВИЯ СТИМУЛИРУЕМОГО НЕЙРОТРАНСМИТТЕРАМИ СИНАПСОСОМАЛЬНОГО ФАКТОРА НА Na, K-АТФазу ОТ рН

Л. Г. Цакадзе, М. Л. Дзеконская, З. П. Кометиани

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

Поступила в редакцию 19.03.89

Стимулируемый нейротрансмиттерами синаптосомальный фактор активирует Na, K-АТФазу при щелочных значениях рН 7,4—8,6. При понижении рН эффект исчезает. Та же закономерность наблюдается при непосредственном действии норадреналина и ингибирующего компонента синаптосомальных факторов.

Na, K-АТФаза синаптических мембран не чувствительна к фактору, полученному аналогичным методом из цитозоля почечной ткани.

Биологической ролью Na, K-АТФазной системы является создание градиента концентраций натрия и калия через плазматическую мембрану (показано наличие специальных механизмов, регулирующих активность этой системы) в зависимости от способа использования этого градиента и физиологических особенностей тканей. Установлено, что Na, K-АТФаза, локализованная в возбуждаемых мембранах, обладает чувствительностью к нейротрансмиттерам (НТ) и их эффект имеет функциональное значение, коррелируя с интегральной деятельностью мозга [5]. В настоящее время

в цитозоле нервных окончаний обнаружен эндогенный фактор $F_1(S)$, регулирующий Na, K-АТФазную реакцию и влияющий на характер эффекта НТ на ее активность [1].

Настоящая работа ставит целью изучение регуляторной способности $F_1(S)$ и НТ на Na, K-АТФазную систему в зависимости от рН и определение степени тканевой специфичности их действия. В статье использованы эксперименты с эффектом норадреналина (НА). Аналогичные по характеру данные получены при внесении в реакционную среду дофамина и 5-гидрокситриптамина.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служила фракция синаптических мембран, полученная из головного мозга крыс между слоями 0,9—1,2 М сахарозы [2]. Супернатант (S) после осмотического шока в течение 7 мин подвергался термической обработке при 82°C. Денатурированные белки удаляли центрифугированием при 12 000 g 30 мин. Для получения фактора из клеток почек, ткань гомогенизировали и подвергали осмотическому шоку

(9 мл H_2O на 1 мг ткани). Супернатант после отделения митохондрий осаждали при 20 000 g/45'. Клеточный сок из почек аналогично мозгу подвергался термической обработке с последующим центрифугированием. Количество фактора оценивали по концентрации белка (мг/мл) фракции, внесенной в реакционную среду.

Na, K-АТФазную активность определяли, как оубаинчувствительную часть суммарной АТФазы в реакци-



онной среде, содержащей 3 мМ АТФ, 3 мМ $MgCl_2$, 135 мМ $NaCl$, 15 мМ KCl , 0,2 мМ оубабина, 30 мМ буфера: имидазол- HCl (рН 6,2—7,4) и трис- HCl (рН 7,4—8,85); инкубацию проводили при 37°C, время инкубации 15 мин. Количество белка 0,04—0,05 мг/мл.

Na,K-АТФазную активность выражали в единицах $\mu\text{K моль } P_i/\text{ч}$ на мг белка, обозначая через V, а процент через Z (считая за 100% активность в стандартной реакционной сре-

де в отсутствие НТ или $F_1(S)$ в контрольной точке). В инкубационной среде концентрация $HA=0,1 \text{ мМ}$, $F_7(S)=0,074 \text{ мг/мл}$.

Результаты обработаны статистически с использованием законов распределения средних ошибок при косвенных измерениях для малых выборок. На графиках каждая точка представляет взвешенную среднюю от 2—4 средних арифметических для 6 идентичных образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая зависимость активности Na,K-АТФазной системы от рН хорошо изучена [6]. Для Na,K-АТФазы влияние рН может выражаться в изменениях кажущихся максимальной скорости и сродства к лигандам. При оптимальных условиях реакционной среды Na,K-АТФазная активность имеет максимальное значение при рН 7,6—7,8 (рис. 1). Для

мощью общей для обеих буферных систем точек (рН 7,4) и выражены в % относительно этой точки (кривая 3, рис. 3).

На рис. 2 приведены данные о влиянии $F_1(S)$ на Na,K-АТФазную активность при разных рН. $F_1(S)$ снижает активность при щелочных значениях (кривая 3, рис. 2). В кислой среде эффект не достоверен. При наличии

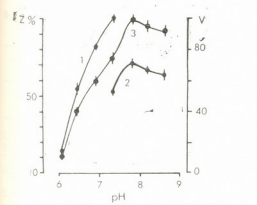


Рис. 1. Зависимость Na,K-АТФазной активности (V) от рН среды: кривая 1 — активность в имидазол- HCl буфере; кривая 2 — активность в трис- HCl буфере; кривая 3 — активность выражена в % (Z) относительно максимума

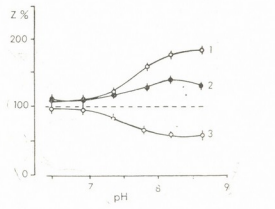


Рис. 2. Зависимость Na,K-АТФазной активности от рН в присутствии $F_1(S)$: кривая 1— $F_1(S)$ -вызываемые изменения в присутствии HA ; кривая 2—эффект совместного действия $F_1(S)$ и HA относительно контроля; кривая 3 — $F_1(S)$ -вызываемые изменения относительно контроля

кислых рН был использован имидазол- HCl буфер (кривая 1, рис. 1), а для щелочных рН трис- HCl буфер (кривая 2, рис. 1). Как видно из рисунка, наблюдается понижение активности, вызванное непосредственно трисом (трис-оксиметил-аминометан); поэтому обе кривые (кривые 1 и 2 на рис. 1) были объединены с по-

0,1 мМ HA вместе с $F_1(S)$ эффект приобретает противонаправленный характер — резко увеличивается АТФазная активность (кривая 1, рис. 2), повышение активности пропорционально повышению рН; (кривая 2 на рис. 2 выражает совместное воздействие $F_1(S)$ и HA относительно

контрольной зависимости, т. е. при их отсутствии).

На рис. 3 показано влияние НА на Na, K-ATФазу в зависимости от pH и эффект $F_T(S)$ на эту зависимость. НА, как неоднократно было показано, уменьшает активность фермента при оптимальных режимах его функцио-

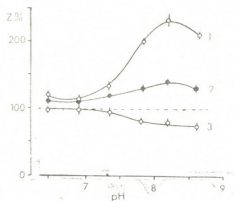


Рис. 3. Зависимость Na, K-ATФазной активности от pH в присутствии НА: кривая 1 — НА-вызванные изменения в присутствии $F_T(S)$; кривая 2 — эффект совместного действия $F_T(S)$ и НА относительно контроля; кривая 3 — НА-вызванные изменения относительно контроля

нирования. Однако с понижением pH ингибция исчезает, а с повышением — эффект углубляется (кривая 3, рис. 3). Изменения, вызванные НА в присутствии $F_T(S)$ приобретают противоположный характер также в области оптимальной нагрузки Na, K-ATФазы , еще более повышая ее активность (на 100% и более) относительно ингибирования, вызванного НА (кривая 1, рис. 3) и приблизительно на 25% относительно контрольной величины. При низких значениях pH как собственный эффект НА, так и совместный с $F_T(S)$ не выявляются, т. е. не проявляются в той области, где сама Na, K-ATФаза функционирует с минимальной скоростью. В связи с этим представляет интерес ранее полученный нами факт о регуляторной роли pH в работе Na-насоса . Было показано [3], что с изменением pH и ионной среды изменяется и оптимум реакции. Это явление, доказанное в настоящее время [5], вы-

звано внутримолекулярными перестройками системы таким образом, что она переходит в другое функциональное состояние, сохраняя оптимальный режим работы, благодаря накоплению водородных или гидроксильных ионов. Конкретно, при понижении pH Na, K-ATФаза переходит в K^+ - ATФазу , а при повышении pH в Na^+ - ATФазу . По-видимому, существует реальная возможность контролировать смену режима функционирования транспортной системы изменением pH. Та же закономерность наблюдается и в отношении совместных эффектов $F_T(S)$ и НА. Следовательно, следует думать, что фактор функционально связан с Na, K-ATФазой , регулируя эффект НТ, что со своей стороны имеет определенное физиологическое значение.

Ранее было показано [5], что Na, K-ATФаза синаптических мембран особо чувствительна к НТ; эффект имеет специфический характер и проявляется только в химически возбужденных мембранах. Далее оказалось, что $F_T(S)$ регулирующий эффект НТ на

Таблица

Влияние клеточного сока из клеток почечной ткани на Na, K-ATФазную активность

Добавления в инкубационную среду	Na, K-ATФазная активность синаптических мембран	
	моль Pi/ч мг.б. (V)	%
Контроль	64,49 ± 2,76(4)	100 ± 4,3
НА	46,29 ± 3,79(4)	71,8 ± 6,6
$F_T(\Pi)$	61,77 ± 1,50(4)	95,8 ± 4,7
$F_o(\Pi)$	64,58 ± 1,08(4)	100,1 ± 4,6
$F_T(\Pi) + \text{Ha}$	64,16 ± 4,7 (4)	99,5 ± 4,7
$F_o(\Pi) + \text{Ha}$	69,03 ± 2,68(4)	107,0 ± 6,2

В скобках указано число параллельных опытов; НА=1,1 мМ; $F_T(\Pi)$ =0,049 мг/мг; $F_o(\Pi)$ =0,046 мг/мг

Na, K-ATФазу , отсутствует в клеточном соке, получаемом при осаждении микросом. Исходя из этого, мы проверили тканевую принадлежность фактора, т. е. возможность существования $F_T(S)$ — подобного фактора в других клетках, помимо первых, к которому Na, K-ATФаза синаптических мембран была бы чувствительна. С



этой целью использовали клеточный сок после осмотического шока почечных клеток. Данные приведены в таблице: Na,K-АТФазная активность не меняется при добавлении как термообработанной $F_1(\pi)$, так и термообработанной — $F_0(\pi)$ фракции из почек. В обоих случаях добавление 0,1 мМ НА также оказалось неэффективным, хотя оно снимает ингибиционный эффект, вызванный НА. Аналогичные результаты получили и

на $F_1(S)$ -обработанных синаптических факторах, что указывает на специфичность синаптической мембран к синаптическому фактору. По-видимому, действие нервных факторов связано с процессами синаптической передачи, поэтому исследование молекулярного механизма их действия даст возможность понять функциональное значение эффекта НТ-регуляции активного транспорта ионов натрия и калия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кометиани З. П., Цакадзе Л. Г., Джариашвили Т. Я. Известия АН ГССР, сер. биол., 14, 355—356, 1988.
 2. Кометиани З. П., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Биохимия, 40, 1039—1043, 1975.
 3. Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П., Биохимия, 1989.

4. Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Сообщения АН ГССР, 60, 449—452, 1970.
 5. Kometiiani Z. P., Tsakadze L. G., Jariashvili T. J. J. Neurochemistry, 42, 1256—1259, 1984.
 6. Skou J. Ch. Biochim. Biophys. Acta, 688, 369—380, 1982.

Na, K-ატფაზაზე ნეიროტრანსმიტერებით მასტიმულირებალი სინაფტოსომალური ფაქტორის მოქმედებაზე pH ბავლეზა

ლ. წაჭამი, მ. ძეკონსკაია, ზ. კომეთიანი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ე. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი

რეზიუმე

ნეიროტრანსმიტერებით მასტიმულირებალი სინაფტოსომალური ფაქტორი აქტივებს Na,K-ატფაზას ტუტე pH დროს (pH 7,4—8,6), დაბალ pH-ზე ეფექტი არასარწმუნოა. იგივე კანონზომიერება შეინიშნება ნორადრენალინისა და სინაფტო-

სომალური ფაქტორების მაინჰიბირებელი ნაწილის უშუალო მოქმედებისას. სინაფსური მემბრანების Na,K-ატფაზა არ არის მგრძობიარე თირკმლის ქსოვილის ციტოზოლიდან მიღებული ფაქტორის მიმართ.

DEPENDENCE ON pH OF THE EFFECT STIMULATED BY THE NEUROTRANSMITTERS OF SYNAPTOSOMAL FACTOR ON Na,K-ATPase

L. G. TSAKADZE, M. L. DZEKONSKAYA, Z. P. KOMETIANI

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

S u m m a r y

Synaptosomal factor stimulated by the neurotransmitters activates Na,K-ATPase at alkaline values of pH (pH 7,4—8,6). The effect disappears when pH decreases. During the direct effect of noradrenaline and an inhibiting component of synap-

tosomal factors the same regularity has been observed. Na,K-ATPase of synaptosomal membrane is not sensitive to the factor obtained analogically from the cytosole of kidney tissue.

УДК 616.12—005.4+615.22+612.13—08.039.57

ФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПРОПРАНОЛОЛОМ И НИФЕДИПИНОМ НА СИСТЕМУ КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПОКОЕ И ОРТОСТАТИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

А. Л. Исакадзе

Тбилисский государственный медицинский институт

Поступила в редакцию 24.10.89

Комбинированная терапия пропранололом (П) и нифедипином (Н) проведена у 37 больных стабильной стенокардией, у которых монотерапия П и Н была неэффективной или сопровождалась неблагоприятными побочными действиями. У большинства больных достигнут отчетливый антиангинальный эффект с урежением числа приступов стенокардии более, чем в 2 раза, без развития побочных действий. При длительном курсе отмечено дальнейшее нарастание антиангинального эффекта. Отмечено несколько более значительное снижение артериального давления по сравнению с раздельным лечением. Частота сердечных сокращений (ЧСС) и сердечный индекс (СИ) становились меньшими, чем при монотерапии Н и незначительно выше, чем при монотерапии П. Удельное периферическое сопротивление (УПС) уменьшилось. Комбинированная терапия П и Н не вызывала ортостатических нарушений регуляции системы кровообращения и нарушений метаболизма.

Комбинированная лекарственная терапия хронической ишемической болезни сердца (ХИБС) широко применяется при отсутствии достаточного антиангинального эффекта от монотерапии. В последние годы наиболее широко используется комбинация β -блокатора с антагонистом кальция, в частности П и Н. В большинстве

исследований обычно анализируются результаты однократного приема или короткого курса лечения. Целью настоящей работы было изучение влияния комбинированной терапии П и Н на систему кровообращения в покое и при ортостатической пробе у больных ХИБС при коротком и длительном курсах лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В амбулаторных условиях исследовано 37 мужчин со стабильной стенокардией напряжения II и III функциональных классов в возрасте 38—56 лет (средний возраст 48,6 \pm 3,2 года). 16 больных в прошлом перенесли острый инфаркт миокарда. У всех больных отсутствовали признаки сердечной недостаточности. Артериальное давление (АД) было нормальным или периодически повышалось до 150/90—160/100 мм рт. ст. До начала лечения (за 7—10 дней) отмечались все лекарственные препараты, за исключением нитроглицерина при возникновении ангинозных приступов. Затем проводилась монотерапия П

или Н. П (обзидан фирмы «Germed», ГДР) применялся у 18 больных в суточной дозе 60—160 мг (средняя доза — 80 мг). Н (коринфар фирмы «Germed», ГДР) назначался 19 больным в суточной дозе 30—40 мг. Переход на комбинированную терапию осуществлялся через 2—3 недели от начала монотерапии одним из препаратов в связи с недостаточным антиангинальным эффектом или развитием неблагоприятных побочных действий. Комбинированная терапия проводилась с использованием П в суточной дозе 40—80 мг (средняя доза — 60 мг), Н в суточной дозе 20—30 мг (средняя доза — 20 мг).

До начала лечения, на фоне монотерапии каждым препаратом, через 2—3 недели и 4—6 месяцев комбинированной терапии проводились повторные исследования гемодинамики в покое, горизонтальном положении тела и на 10-й мин активной ортостатической пробы. Определялись высота АД — аускультативным методом по Короткову, величина сердечного выброса — методом тетраполярной трансторакальной реографии по Ку-

бичеку; УПС — по формуле Франка-Пуазейля; ЭКГ регистрировалась в 12 общепринятых отведениях; ЧСС определялась по ЭКГ. Антиангинальный эффект считался положительным, если частота приступов стенокардии уменьшилась не менее, чем в 2 раза. У 26 больных до лечения и через 4—6 месяцев комбинированной терапии определялись уровни общего холестерина в крови, триглицеридов, глюкозы и мочевой кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 2—3 недели монотерапии П у 12 человек был достигнут отчетливый антиангинальный эффект с урежением числа приступов стенокардии с $21,6 \pm 2,7$ до $11,0 \pm 1,8$ ($p < 0,001$) в неделю. Отмечено возникновение побочного действия в виде общей слабости (1 человек), повышенной утомляемости (2 человека), желудочно-кишечных расстройств, в виде изжоги, тошноты (5 человек), бронхоспазма (2 человека), похолодания конечностей (2 человека). У остальных (6 человек) уменьшение числа приступов стенокардии было незначительным (от $20,3 \pm 2,8$ до $17,9 \pm 2,6$ ($p > 0,1$) в неделю), несмотря на увеличение дозы П. Среди 19 больных, получавших монотерапию Н у 8 человек не отмечено существенного урежения числа приступов стенокардии (с $22,4 \pm 2,7$ до $18,2 \pm 1,9$ — $p < 0,1$) в неделю, при чем у 3 из них приступы стенокардии участились. У остальных на фоне достаточного антиангинозного эффекта (урежение числа приступов от $22,1 \pm 2,9$ до $11,2 \pm 1,4$ ($p < 0,05$) в неделю) возникли побочные явления: тахикардия (4 человека), гипотония (2 человека), желудочно-кишечные расстройства (2 человека). В среднем уменьшение числа приступов стенокардии было достоверным: при монотерапии П оно составило $6,2 \pm 2,9$, Н — $7,1 \pm 3,1$ в неделю.

При проведении комбинированной терапии П и Н у большинства больных (35 человек) развился быстрый и выраженный антиангинальный эффект: число приступов уменьшилось в среднем от $21,2 \pm 2,8$ до $8,9 \pm 1,4$ ($p < 0,001$) в неделю, причем у 7 больных приступы прекратились полностью. Положительный антиангинальный эффект не сопровождался побоч-

ными действиями и был достигнут при применении меньших доз обоих препаратов, чем при раздельном их применении. Аналогичные результаты были получены ранее и другими исследователями [1,4—10].

При длительной комбинированной терапии П и Н отмечено некоторое дальнейшее урежение (до $6,6 \pm 1,4$ ($p < 0,001$) в неделю) частоты приступов стенокардии; еще у 4 человек приступы прекратились полностью.

Таким образом, комбинация П и Н обладает высокой антиангинальной активностью, которая превышает таковую при раздельном применении каждого из препаратов и требует применения меньших доз. Важно, что при длительном применении антиангинальный эффект сохраняется и даже несколько нарастает, в том числе и у больных, резистентных к монотерапии; не наблюдаются и побочные действия.

Особенности гемодинамических сдвигов при монотерапии П и Н у больных ХИБС (короткий и длительный курс) подробно уже описаны нами [2, 3]. При сочетанной терапии П и Н (короткий курс лечения) отмечается более значительное снижение АД_с и АД_д, чем при раздельном их применении (табл. 1). У больных, получавших монотерапию Н, добавление П сопровождалось урежением ЧСС, достигавшей величины ЧСС у больных, получавших монотерапию П. У последних ЧСС при комбинированной терапии несколько нарастает. Добавление П к монотерапии Н приводит к уменьшению величины СИ₁, а добавление Н к монотерапии П незначительно повышает этот показатель. При монотерапии П, как это



Влияние комбинированной терапии пропранололом и нифедипином на гемодинамические показатели у больных ХИБС в горизонтальном и ортостатическом положении (короткий курс)

Показатели гемодинамики	Положение	До лечения			Лечение			Δ%		
		П	Н	П+Н	П	Н	П+Н	П	Н	П+Н
АД _с мм рт. ст.	Г	128 ± 1,8	125 ± 1,8	129 ± 1,7	121 ± 1,7*	121 ± 1,6	116 ± 1,2*	- 6,2 ± 0,1	- 4,1 ± 0,2	- 7,9 ± 0,21
	О	124 ± 1,8	122 ± 1,7	127 ± 1,4	119 ± 1,6	119 ± 1,5	115 ± 1,4			
	Δ %	- 3,2 ± 0,7	- 3,0 ± 0,8	- 2,8 ± 0,6	- 0,1 ± 0,1	- 0,5 ± 0,8	- 0,4 ± 0,6			
АД _д мм рт. ст.	Г	83 ± 1,8	82,7 ± 1,7	82 ± 1,6	78 ± 1,4*	74 ± 1,1*	72 ± 1,0*	- 6,0 ± 0,5	- 9,0 ± 1,2	- 11,2 ± 1,2
	О	88 ± 1,7	89 ± 1,8	88 ± 1,7	89 ± 1,7	82 ± 1,4	81 ± 1,2			
	Δ %	6,9 ± 1,7	7,2 ± 1,8	7,8 ± 1,62	14,2 ± 1,9	10,8 ± 2,9	11,8 ± 2,1*			
ЧСС в мин	Г	77 ± 2,1	68 ± 1,8	76 ± 2,4	62 ± 1,9*	74 ± 1,2	65 ± 1,9*	- 19,5 ± 2,9	6,9 ± 0,8	- 14,9 ± 1,3
	О	88 ± 2,0	78 ± 1,9	86 ± 2,1	68 ± 1,7	86 ± 2,2	76 ± 2,1			
	Δ %	14,2 ± 1,9	15,2 ± 2,1	14,8 ± 1,7	9,2 ± 1,1*	18,3 ± 3,4	11,2 ± 1,8*			
СИ л/мин·м ²	Г	2,69 ± 0,2	2,58 ± 0,2	2,71 ± 0,2	2,21 ± 0,1*	3,12 ± 0,2*	2,45 ± 0,1*	- 17,8 ± 2,1	19,8 ± 2,2	- 12,3 ± 2,2
	О	2,54 ± 0,18	2,39 ± 0,19	2,52 ± 0,7	2,15 ± 0,1	2,90 ± 0,11	2,31 ± 0,1			
	Δ %	- 8,1 ± 1,3	- 7,8 ± 1,4	- 8,0 ± 1,4	- 3,2 ± 0,1*	- 6,9 ± 1,9	- 4,1 ± 1,1*			
УИ мл/мин	Г	36,8 ± 1,7	40,4 ± 1,8	36,8 ± 1,7	37,1 ± 1,5	43,4 ± 1,3	37,6 ± 1,8	2,8 ± 0,1	7,5 ± 1,9	1,9 ± 0,2
	О	29,4 ± 1,6	30,8 ± 1,7	30,2 ± 1,8	32,8 ± 1,3	33,8 ± 1,8	31,9 ± 1,2*			
	Δ %	- 20,1 ± 2,2	- 21,4 ± 2,3	- 19,2 ± 2,1	- 11,2 ± 1,8*	- 23,9 ± 2,1	- 12,1 ± 1,7			
УПС дин. с см ⁻³ ·м ²	Г	2610 ± 175	2720 ± 181	2608 ± 190	2750 ± 149	2400 ± 112*	2320 ± 108*	5,4 ± 1,6	- 11,2 ± 1,8	- 12,8 ± 1,7
	О	3400 ± 182	3310 ± 202	3410 ± 192	3410 ± 151	3090 ± 210	2780 ± 101			
	Δ %	23,2 ± 1,5	22,3 ± 1,6	21,8 ± 1,7	27,2 ± 1,8	29,2 ± 5,4	26,2 ± 1,7			

Условные обозначения: АД_с — систолическое артериальное давление, АД_д — диастолическое; ЧСС — частота сердечных сокращений, СИ — сердечный индекс, УИ — ударный индекс, УПС — удельное периферическое сопротивление. * — различие статистически достоверно (p < 0,05) относительно показателей до лечения. П — монотерапия пропранололом, Н — нифедипином, П+Н — комбинированная терапия пропранололом и нифедипином; Δ% — средняя от индивидуальных процентных сдвигов



Влияние комбинированной терапии пропранололом и нифедипином на гемодинамические показатели у больных ХИБС в горизонтальном и ортостатическом положении (длительное лечение)

საქართველოს
ეროვნული ცენტრი
გულ-სისხლძარღვოვანი და სისხლწარმოქმნითი
სისტემების დაავადებების მკურნალობის მიზნით

Показатели гемодинамики	Положение	До лечения			Лечение			Δ%		
		П	Н	П+Н	П	Н	П+Н	П	Н	П+Н
АД _с мм рт. ст.	Г	128 ± 1,9	125 ± 1,8	129 ± 1,7	124 ± 1,6	123 ± 2,1	117 ± 0,2*	- 3,2 ± 0,1	- 0,2 ± 0,1	- 8,1 ± 0,24*
	О	124 ± 1,8	122 ± 1,7	127 ± 1,4	122 ± 1,7	122 ± 2,1	116 ± 1,2			
	Δ %	- 3,2 ± 0,7	- 3,2 ± 0,8	- 2,8 ± 0,6	- 0,8 ± 0,1	- 0,4 ± 0,2	- 0,2 ± 0,1			
АД _д мм рт. ст.	Г	83 ± 1,8	82,7 ± 1,7	82 ± 1,6	74 ± 1,1*	80,2 ± 1,9	70 ± 1,4*	- 8,8 ± 1,8	- 3,0 ± 0,8	- 12,4 ± 1,4*
	О	88 ± 1,7	88 ± 1,8	88 ± 1,7	82 ± 1,6	89 ± 2,1	80 ± 1,2			
	Δ %	6,9 ± 1,7	7,2 ± 1,8	7,8 ± 1,62	11,2 ± 1,7	11,8 ± 2,1	11,1 ± 1,9			
ЧСС в мин	Г	77 ± 2,1	68 ± 1,8	76 ± 2,4	64 ± 1,8*	70 ± 1,4	68 ± 1,6*	- 16,8 ± 2,8	2,8 ± 0,6	- 15,1 ± 1,4
	О	88 ± 2,0	78 ± 1,9	80 ± 2,1	70 ± 1,6	84 ± 2,8	75 ± 2,0			
	Δ %	14,2 ± 1,9	15,2 ± 2,1	14,8 ± 1,7	9,0 ± 1,1	17,9 ± 2,4	11,9 ± 2,2			
СИ, л/мин	Г	2,69 ± 0,2	2,58 ± 0,2	2,71 ± 0,2	2,41 ± 0,1*	2,60 ± 0,2	2,57 ± 0,1	- 10,4 ± 1,4	4,1 ± 1,8	- 8,2 ± 1,2
	О	2,54 ± 0,18	2,39 ± 0,19	2,52 ± 0,17	2,41 ± 0,1	2,41 ± 0,2	2,41 ± 0,1			
	Δ %	- 8,1 ± 1,3	- 7,8 ± 1,4	- 8,0 ± 1,4	- 3,4 ± 0,1*	- 7,9 ± 1,8	- 3,9 ± 1,2*			
УИ, мл/мин	Г	36,8 ± 1,7	40,4 ± 1,8	36,8 ± 1,7	38,8 ± 1,6	39,6 ± 1,21	39,1 ± 1,5	2,7 ± 0,4	- 1,4 ± 0,9	3,1 ± 0,2
	О	29,4 ± 1,6	30,8 ± 1,7	30,2 ± 1,8	33,4 ± 1,3	30,8 ± 1,8	33,1 ± 1,3			
	Δ %	- 20,1 ± 2,2	- 21,4 ± 2,3	- 19,2 ± 2,1	- 10,2 ± 1,7*	- 21,1 ± 2,7	- 11,2 ± 1,6*			
УПС, ды. с. см ⁻³ ·м ²	Г	2610 ± 175	2720 ± 181	2608 ± 190	2548 ± 125	2610 ± 149	2252 ± 121*	- 2,3 ± 0,1	- 5,2 ± 0,7	- 11,6 ± 1,8
	О	3400 ± 182	3310 ± 202	3410 ± 192	3310 ± 118	3198 ± 2,8	2680 ± 102			
	Δ %	23,2 ± 1,5	22,3 ± 1,6	21,8 ± 1,7	24,8 ± 1,9	19,9 ± 3,8	18,2 ± 2,7			

Условные обозначения те же, что в табл. 1

пказано нами ранее (2, 3) ударный индекс (УИ) повышается, а при Н — уменьшается. Можно полагать, что это обусловлено не снижением сократимости миокарда, а уменьшением периода кровенаполнения (диастолы). Комбинация Н и П устраняет эти разнонаправленные изменения, и величина УИ не отличается от величины до лечения. УПС при монотерапии П повышается, а при лечении Н — снижается. При их комбинации отмечается некоторое снижение УПС, более выраженное при длительном курсе.

Усиление благоприятного эффекта при сочетании П и Н обусловлено суммированием положительного влияния на кровообращение и ослаблением нежелательных побочных эффектов каждого из них. Так, основным механизмом антиангинального действия П является снижение потребности миокарда в кислороде за счет урежения ЧСС и снижения сократимости миокарда, что может ухудшить кровоснабжение ряда органов, а у части больных может снижать антиангинальное действие П [11, 13]. При монотерапии Н ослабление антиангинального действия обусловлено нарастанием ЧСС и сердечного выброса (СВ), вследствие расширения сосудов, снижением УПС и постнагрузки [6, 8]. При сочетании П и Н негативное влияние каждого из них на сосуды и сердце устраняется или ослабляется, а антиангинальное действие отчетливо возрастает.

Как показано нами ранее [2, 3], при длительной монотерапии П или Н выраженность гемодинамических сдвигов становится меньшей, однако антиангинальная активность может нарастать. Можно полагать, что в механизме последнего при длительном лечении основную роль играют не гемодинамические, а другие факторы. Например, при монотерапии П — преимущественно снижение потребности миокарда в кислороде, а при монотерапии Н — также и коронарорасширяющее действие. При длительном применении сочетанной терапии выраженность гемодинамических сдвигов сохраняется, а антиангинальное действие нарастает. Эти данные указывают на роль нескольких механизмов (метаболических, коронарорасширяющих, гемодинамических) в под-

держании и нарастании антиангинального эффекта при длительном наблюдении (табл. 2).

Как показано в ряде исследований [15], в том числе и наших, при коротком и длительном курсе монотерапии П ортостатическая реакция АД и СИ не меняется, ЧСС нарастает в меньшей, а УПС несколько в большей степени, чем до лечения П. Последнее связывают с активацией α -адренорецепторов в ортостатическом положении при β -блокаде. При монотерапии Н в ряде случаев (короткий курс) отмечается возникновение ортостатической тахикардии [14]. При длительной монотерапии Н характер гемодинамических ортостатических сдвигов не меняется.

Имеются лишь единичные сообщения о том, что комбинация П и Н не вызывает ортостатической гипотонии или тахикардии [10, 16]. Нами замечено (табл. 1,2), что комбинированная терапия П и Н не сопровождалась ортостатическими нарушениями регуляции системы кровообращения, а характер гемодинамических сдвигов при ортостатической пробе (короткое и длительное лечение) был одинаковым и практически не отличался от сдвигов до лечения. При этом характер ортостатических сдвигов приближался к таковому при монотерапии П, однако УПС нарастало несколько в меньшей степени, что, по-видимому, обусловлено влиянием Н при комбинированной терапии. Отрицательная динамика ЭКГ, как отражение метаболических нарушений, на фоне комбинированной терапии наблюдалась гораздо реже, чем до лечения, это указывает на повышение толерантности миокарда к стрессовым воздействиям.

В отличие от наблюдавшегося при длительной монотерапии П некоторого повышения уровня холестерина, триглицеридов и мочевой кислоты в крови, при комбинированной терапии таких сдвигов метаболизма мы не наблюдали; это может быть отражением влияния Н, антиатерогенные свойства которого обсуждаются в литературе [12].

Таким образом, комбинация П и Н обладает высоким антиангинальным эффектом, превышающим таковой при раздельном их применении. Комбинация П и Н высокоэффективна в случаях, резистентных к монотерапии од-



ним из этих препаратов, и применение ее не сопровождается побочными действиями. Гемодинамические сдвиги при комбинированной терапии П и Н характеризуются несколько большим, чем при раздельном лечении, снижением высоты АД, несколько

большой, чем при монотерапии П ЧСС, величиной СИ и ~~сигнализацией~~ УПС. Комбинированная терапия П и Н не сопровождается ортостатическими нарушениями в системе кровообращения и неблагоприятными метаболическими сдвигами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абасова Л. И., Гельфгат Е. Б. Клин. мед., II, 44—46, 1985.
2. Исакадзе А. Л. Материалы 7-й респ. научн. конф. физиологов вузов Грузии, 30.09. — 4.10.1989, г. Цхалтубо, 1989, г. Тбилиси, с. 232—236.
3. Исакадзе А. Л., там же, с. 237—240.
4. Кацаневич Р. А., Костко С. З., Кожанский В. М., Кученкова М. А. Тер. архив, 9, 51—53, 1984.
5. Кукес В. Г., Румянцев А. С., Шохор В. Я., Ибадова Д. Н. В кн.: Значение антагонистов кальция сегодня, «Медицина», М., 1985, 52—56.
6. Кукес В. Г., Альперович Б. Р., Румянцев А. С. Сов. мед., I, 65—68, 1985.
7. Findlay I. N., Mac-leod K., Ford M., Gilles G., Elliot A. T., Daegil H. J. Br. Heart J., 55, 240—245, 1986.

8. Fox K. M., Jonathan A., Selwin A. P. Clin. Cardiol., 4, 3, 125—129, 1981.
9. Jenkins R. M., Nagle K. E., Postgrad. Med. J., 58, 685, 697—700, 1982.
10. Jonston D. L., Lesoway R., Humen D. P., Kostuk W. J. Amer. J. Cardiol., 55, 6, 680—687, 1985.
11. Orlik A. E., Ricci D. R., Alderman A. L., Stinson E. B., Harrison D. C. J. Clin. Invest., 62, 2, 459 — 466, 1978.
12. Parmbley W. W., Amer. J. Med., 82, 3, 3—8, 1987.
13. Robertson R. M., Wood A. J. J., Vaughen W. K., Robertson D. Circulation, 65, 2, 281—285, 1982.
14. Seisseger L. Therapiewoche, 36, 26, 2830—2835, 1986.
15. Thadani U., Parker Y. O. Amer. J. Cardiol., 46, 117—123, 1980.
16. Winniford M. D., Fulton K. L., Corbett J. R., Croft Ch. H., Hillisi D. Amer. J Cardiol., 55, 4, 281—285, 1985.

პროპრანოლოლით და ნიფედინით კომბინირებულ მკურნალობის გავლენა სისხლის მიმოქცევის სისტემაზე მოსვენებისა და ორთოსტატიკურ მდგომარეობაში გულის ქრონიკული იშემიური დაავადებისა

ა. ინაბაშვილი

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი

რ ე ზ ი უ მ ე

სტაბილური სტენოკარდიით ავადმყოფთა პროპრანოლოლით და ნიფედინით კომბინირებული მკურნალობისას, როცა მათი მონოთერაპია უეფექტო იყო ან გვერდითი მოვლენები ახლდა, მიღებული იქნა მნიშვნელოვანი ანტიანგიუნური ეფექტი. ეფექტი მატულობდა მკურნალობის კურსის ხანგრძლივობასთან ერთად. ჰემოდინამიკური ძვრები ხასიათდებოდა არტე-

რიული წნევის უფრო მეტად დაკლებით, ვიდრე მონოთერაპიისა. გულის შეკუმშვათა სიხშირე და გულის ინდექსი ნაკლები იყო, ვიდრე ნიფედინით მონოთერაპიისას და ოდნავ მეტი, ვიდრე პროპრანოლოლით მონოთერაპიისა. არ გამოვლინდა სისხლის მიმოქცევის სისტემის ორთოსტატიკური დარღვევა და არასასურველი მეტაბოლური ძვრები.

THE INFLUENCE OF COMBINED THERAPY WITH PROPRANOLOL AND NIFEDIPIN ON BLOOD CIRCULATION SYSTEM AT REST AND ORTHOSTATIC STATE AMONG PATIENTS WITH CHRONIC ISCHEMIC DISEASE OF HEART



A. L. ISAKADZE

Tbilisi State Medical Institute

Summary

Due to a combined therapy a marked antianginal effect was achieved in patients with stable stenocardia in whom monotherapy with propranolol (P) or nifedipin (N) was ineffective or attended with side effects. This effect was enhanced under the prolonged course of treatment. In the case of a combined therapy hemodynamic shifts were character-

ized by still more decrease of arterial pressure than with monotherapy. Heart rate and cardiac index were lower than in the case of monotherapy with P and slightly higher than with N. No orthostatic disturbance of the blood circulation system and metabolic shifts have been revealed.

УДК 581.1:581.131:581.142

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ РАСТЕНИЙ. ГРАДИЕНТЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ И АКТИВНОСТИ ИХ ИОНОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Э. Л. Бузукашвили, А. В. Гордецкий

Тбилисский государственный университет

Поступила в редакцию 26.10.89

Изучались особенности параметров ионного гомеостаза в растениях, различающихся типом роста стебля — интеркалярный (кукуруза) и апикальный (яблоня).

Сравнительной оценкой градиентов общего содержания элементов и активности их ионов установлены градиенты акропетального и базипетального распределения элементов минерального питания в органах и тканях изученных растений.

Существующие в настоящее время методы диагностики минерального питания растений основаны, главным образом, на определении общего содержания минеральных элементов без оценки градиентов активности их ионов.

В литературе мы не встречали [1] исследований стационарных уровней и особенностей сопоставления гради-

ентов общего содержания элементов и активности их ионов в одних и тех же органах и тканях растений. В этом аспекте нас прежде всего интересовали градиенты распределения ионов (азота, фосфора, калия, кальция, магния, натрия, хлора) на фоне градиентов общего содержания соответствующих им элементов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В полевых, вегетационных и лабораторных опытах исследовались растения кукурузы сорта «Днепропетровская 247» и яблони сорта «Макintosh» и «Слава победителям».

Отбор образцов кукурузы приурочивали к характерным периодам формирования ростовых зон междоузлий стебля в условиях интеркалярного роста, а яблони — в период весеннего пробуждения почек, интенсивного роста побегов и окончания их роста.

Анализ общего содержания и активности ионов элементов минерального питания в растительных образцах проводили современными методами атомно-адсорбционной спектроскопии, ионно-селективной ионометрии, а также методом ядрено-магнитного ре-

зонанса для исследования состояния воды в тканях растений [2—4].

Учитывая специфику настоящей работы, имеющей целью доказательство достоверности гомеостатируемых уровней общего содержания и активности ионов элементов в определенных органах и тканях растений, особое внимание было уделено математической обработке и оценке ошибки среднего арифметического ($\bar{\sigma}$) стандартного отклонения (σ) и расчета, на их основе, коэффициентов вариации (Cv) и показателя точности оценки параметров (Cs) с помощью критериев Фишера и Стьюдента [5]. Обработка цифровой информации производилась с помощью программы Scientific plotter на персональном компьютере Apple II-e (Sanio).



Анализируя полученный материал (табл. 1,2), необходимо сразу же отметить, что мы не обнаружили прямых корреляций между общим содержанием элементов и активностью их ионов как в различных органах, так и в зависимости от их возраста и видовой принадлежности. Исключение составляет калий, что, по-видимому, можно объяснить меньшей степенью связывания этого иона с органическими веществами, ограниченном образованием труднорастворимых соединений и полным отсутствием его в составе органических соединений как исходного или структурного компонента.

Результаты наших исследований отчетливо показывают, что для каждого органа характерна своя специфи-

лизе только лишь общего содержания элементов определяемых ионов.

Характерно также, что общие закономерности формирования градиентов ионного состава одинаковых органов сохраняются независимо от вида растений, т. е. каждому органу присущ определенный уровень ионного статуса, который, однако, не всегда сохраняется в органах, различающихся по возрасту в пределах своего вида.

Сопоставляя градиенты распределения общего содержания органических (N, P) и неорганических (K, Na, Ca, Mg, Cl) элементов в кукурузе и яблоне (табл. 1,2), можно отметить, что для кукурузы, в отличие от яблони, характерна четкая картина базипетального градиента в наземных органах для азота. При этом самый вы-

Таблица 1

Содержание и активность ионов элементов минерального питания в органах растений кукурузы в зависимости от возраста (мг/100 г сухого вещества)

Органы и их возрастное состояние	Азот		Фосфор		Калий		Натрий		Кальций		Магний		Хлор		
	общее содержание	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	общее содержание	PO ₄ ⁻³	общее содержание	K ⁺	общее содержание	Na ⁺	общее содержание	Ca ⁺²	общее содержание	Mg ⁺²	общее содержание	Cl ⁻
Стебель															
молодые участки	2360	412	570	232	135	442	390	87	75	125	80	127	95	130	115
среднего возраста	2050	319	410	263	100	534	320	124	64	214	68	152	76	240	97
старые	1720	250	296	142	65	560	280	153	50	252	46	334	52	350	85
Листья (пластинки)															
молодые	2850	580	490	280	146	434	470	93	85	242	95	125	112	110	98
среднего возраста	2652	457	325	452	110	632	450	172	70	223	80	157	93	185	67
старые	2031	350	380	322	70	861	460	205	165	325	52	358	65	297	60
Влагалища листа															
молодые	2532	970	215	292	140	392	380	85	75	195	93	27	118	98	85
среднего возраста	2312	380	310	380	120	607	354	120	90	214	76	144	80	175	80
старые	1683	120	345	260	65	725	300	193	157	282	30	263	57	237	70
Метелка	2735	670	525	495	221	927	870	219	195	373	126	295	195	180	120
Корни	1827	170	610	546	225	102	65	57	50	864	230	652	437	329	165

ка ионного состава, соотношения одно- и двухвалентных ионов, которая не могла бы быть вскрытой при ана-

сокий уровень азота отмечен для верхушки стебля, заканчивающегося цветущей метелкой (Cv=6%, Cs=3%).



4,2%). Падение содержания общего азота отмечено для тканей основного и обрастающих корней. Наиболее четко этот градиент выражен в различающихся по возрасту участках стебля и влагалищах листьев, сопряженных по размещению с соответствующими по возрасту участками стеблей ($C_v=7,0\%$, $C_s=3,0\%$). Что касается яблони, то базипетальный градиент распределения общего азота был четко зафиксирован только для молодых побегов в возрасте от одного до трех лет ($C_v=6\%$, $C_s=3\%$).

Относительно фосфора установлена органичная специфичность его содержания (преимущественно локализован в корнях и цветущей метелке), но,

В отношении калия можно отметить, что как для яблони, так и для кукурузы установлено концентрирование этого элемента в генеративной части растений (почки яблони — $C_v=5\%$, $C_s=1\%$ и цветущие метелки кукурузы — $C_v=2,5\%$, $C_s=1,3\%$). Кроме того, можно отметить его резкое падение в основных и обрастающих корнях по сравнению с надземной частью растений ($C_v=5\%$, $C_s=3\%$). Устойчивый базипетальный градиент распределения калия в различных органах в зависимости от возраста установлен только для яблони. Для кукурузы, вопреки сложившимся и ставшим почти классическими представлениям о базипетальном ха-

Таблица 2

Градиенты распределения общего содержания и активности ионов элементов минерального питания в органах и тканях яблони в зависимости от возраста в период весеннего пробуждения почек (мг/100 г сухого вещества)

Органы и ткани, их возрастное состояние	Азот			Фосфор		Калий		Натрий		Кальций		Магний		Хлор Cl ⁻
	общее содержание	NH_4^+	NO_3^-	общее содержание	PO_4^-	общее содержание	K^+	общее содержание	Na^+	общее содержание	Ca^{+2}	общее содержание	Mg^{+2}	
Почки	2628	275	320	257	79	875	796	85	76	1400	620	310	209	125
Побеги однолетние														
кора	1592	415	—	212	92	725	697	145	129	882	592	269	150	75
древесина	636	275	115	172	75	527	420	134	112	1372	427	286	127	97
трехлетние														
кора	1295	365	278	210	75	340	332	105	98	957	525	240	147	85
древесина	565	224	137	184	69	312	305	97	85	1342	397	269	112	127
Ствол верхушка														
кора	1498	264	298	197	65	412	340	97	75	540	321	198	115	90
древесина	540	174	165	182	57	397	265	110	63	1672	240	375	84	125
Основание														
кора	1483	205	389	170	65	710	542	137	97	330	197	196	75	85
древесина	540	147	193	164	45	510	235	112	52	1952	150	542	52	197
Корень														
основной	1127	54	75	135	87	625	247	135	65	2126	425	625	157	145
обрастающий	1225	78	124	148	92	743	260	147	92	2325	542	640	205	158

вопреки сложившимся представлениям, не отмечен четкий градиент, его распределения в органах в зависимости от возраста.

Не выявлены также ярко выраженные градиенты распределения общего фосфора в органах яблони в зависимости от возраста.

рактуре распределения калия в органах растений в зависимости от возраста, данные, полученные нами, свидетельствуют о градиенте, близком к акропетальному. Это может быть связано с тем, что для однолетних культур календарный и физиологический возраст органов растений в зрелом со-

стоянии не столь сильно различается, как это наблюдается для многолетних растений; не исключается также и то, что на фоне высокой обеспеченности питания растений калием, как это наблюдалось во всех наших многолетних полевых опытах с кукурузой, идет слабая его реутилизация в процессе круговорота веществ в растении с нижних более старых органов.

Градиенты распределения общего содержания кальция и магния, в зависимости от возраста кукурузы и яблони (табл. 1,2), оказались акропетальными.

Результаты исследований активности ионов в разнокачественных органах и тканях яблони и кукурузы показали (табл. 1,2), что градиенты распределения общего содержания и активности ионов элементов не совпадают; не существует строгой зависимости уровня активности от общего содержания элемента в ткани. Почти во всех случаях определения активности ионов мы встречаемся с противоположными по знаку градиентами распределения активности ионов — по сравнению с градиентом распределения общего содержания этих элементов.

Особый интерес представляет, на наш взгляд, то обстоятельство, что, независимо от градиентов распределения общего содержания элементов, градиент активности их ионов хоть и характеризуется значительно меньшей величиной, но в большинстве случаев является базипетальным. Это, прежде всего, касается градиентов активности Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ и меньше — градиентов активности ионов NO_3^- , Na^+ , направленность которых в разных органах яблони и кукурузы существенно отличается. Исследование градиентов активностей Ca^{+2} и Mg^{+2} на фоне градиентов распределения их общего содержания показывает, что у этих элементов четко выраженный базипетальный градиент активности ($Cs=0,8\%$, $Cv=4-6\%$), который характеризуется значительными величинами и является универсальным для различных органов, имеющих одинаковый характер в таких разных видах растений, как кукуруза и яблоня.

Это обстоятельство позволяет усомниться (по крайней мере для Ca^{+2})

в традиционно сложившемся представлении как об элементе с очень низкой степенью реутилизации. За счет каких резервов и механизмов происходит переборс и перераспределение довольно ощутимых количеств ионов Ca^{+2} на значительные расстояния, особенно у высокорослых растений — это вопрос дальнейших исследований, но уже на этом этапе исследований не вызывает сомнения, что мобилизация его ресурсов из тканей организма может быть и без дополнительных поступлений этого элемента в растение.

Главным существенным выводом, на наш взгляд, является то, что преимущественно локализация ионов идет в интенсивно растущих и генеративных органах ($Cv=3,5-5\%$, $Cs=1-1,3\%$). Это обстоятельство, возможно, связано с ранее высказанной гипотезой о том, что резкое изменение параметров ионного гомеостаза предшествует процессам, связанным с переходом клеток к делению. Можно было бы также думать, что их приток в эти органы связан с активацией ростовых процессов, сопровождающихся повышенным потреблением элементов на образование новых структур и синтез биополимеров. Такое заключение было бы справедливо для ионов азота, фосфора, которые являются структурными компонентами этих новообразований, но вряд ли это может быть приложимо к таким ионам, как Na , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , которые не являются таковыми. Больше того, данные наших исследований (табл. 2) показывают, что самый высокий уровень стабильной активности ионов наблюдается у вегетативных и генеративных почек яблони ($Cv=5\%$, $Cs=1\%$) в период, предшествующий их выходу из покоя (весеннее пробуждение почек), где расходы на активный рост, связанные с использованием материальных ресурсов, еще настолько незначительны, что вряд ли могли бы быть зарегистрированы существующими методами.



1. Бузукашвили Э. Л. Ионный гомеостаз растущего стебля, Автореф. канд. дисс., Киев, 1988.
2. Зыкина Г. К., Снакин В. В., Быстрицкая Т. Л., Матерова Е. А. В кн.: Почвенно-биологические исследования в Приазовье, М., «Наука», 1975, 102—113.
3. Маклочлан К. А. Магнитный анализ, М., «Наука», 1976.
4. Петербургский А. В. Практикум по агрохимии, М., 1963.
5. Афифи А., Эйзен С. Систематический анализ с использованием ЭВМ, «Мир», М., 1982.

ელემენტთა განაწილების გრადიენტი და მათი იონების აქტივობა მცენარეთა ორგანოებში და ქსოვილებში ასაკთან დამოკიდებულებით

მ. ბუზუკაშვილი, ა. გორდავაძე

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
უკრაინის მეცნიერებათა აკადემიის ბოტანიკის ინსტიტუტი, კიევი

რ ე ზ ი უ მ ე

გამოკვლევული იქნა იონური ჰომეოსტაზის პარამეტრების თავისებურებანი მცენარეებში, რომლებიც განსხვავდებიან ღეროს ზრდის ტიპით (ინტერკალური — სიმინდი და აპიკალური — ვაშლი). დადგენილ იქნა, რომ მინერალური კვე-

ბის ელემენტთა აკროპეტალური და ბაზიპეტალური განაწილება მცენარეთა ქსოვილებსა და ორგანოებში ემყარება არა მარტო ელემენტთა საერთო შემცველობის გრადიენტს, არამედ მათი იონების აქტივობას.

IONIC HOMEOSTASIS OF PLANTS. GRADIENTS OF DISTRIBUTION OF ELEMENTS AND ACTIVITY OF THEIR IONS IN PLANT ORGANS, DEPENDING ON THE AGE

E. L. BUZUKASHVILI

Tbilisi I. Javakhishvili State University
Institute of Botany, Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

S u m m a r y

Peculiarities of parameters of ionic homeostasis in plants differing by the types of intercolar (maize) and apical (apple) stem growth have been studied. Acropetal and basipetal gradients of distribution of mineral nutrition elements

in the studied plant tissues and organs, which are based not only on comparative appreciation of gradients of total content of elements, but also on the study of the ionic activity, have been determined.

შპპ 576.858.9.(088.8)

მიკრობიოლოგია

ბაქტერიოზაზ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*-ს ღახასიათება და ბიოლოგიური თვისებები

ბ. ჯაფარიძე, თ. ჩანუჭვილი

სამეცნიერო-საწარმოო გაერთიანება „ბაქტერიოფაგი“, თბილისი
თბილისის ვაქცინებისა და შრატების სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი

შემოსული რედაქციაში 13.06.90

გამოყოფილია და შესწავლილია სპეციფიური და პოლივალენტური კლონები ბაქტერიოფაგის *Klebsiella pneumoniae*. გამოყოფილი ფაგი იწვევს 92,5% შემთხვევაში პოპოლოგიური ბაქტერიის შტამების სრულ ლიზისა. აღნიშნული ფაგის საშუალებით შესაძლებელია შეიქმნას დიაგნოსტიკური და სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატები.

უკანასკნელი ათწლეულის განმავლობაში გაიზარდა ინტერესი პირობით-პათოგენური მიკროორგანიზმების მიმართ, მათ შორის კლებსიელას გვარის ბაქტერიების მიმართ.

პირობით-პათოგენური ბაქტერიების მრავალრიცხოვანი წარმომადგენლები, როგორებიც არიან კლებსიელა, ენტერობაქტერი, სერაცია, ციტრობაქტერი, იერსინია და სხვა, განიხილებიან როგორც ეთიოლოგიური ფაქტორი მრავალი ინფექციური დაავადებებისას: მწვავე ნაწლავური ინფექციები [2], ჩირქოვანი და სეფსისური პროცესები [4], უროინფექციები [7, 11], ოპერაციის შემდგომი ინფექციური გართულებები [10], დისბაქტერიოზები [8] და სხვა. რამოდენიმე ავტორის ცნობით [9] კლებსიელები ხასიათდებიან პირველად პათოგენურ მიკროორგანიზმებად.

მიუხედავად იმისა, რომ მთელ რიგ ავტორთა მიერ აღწერილია კლებსიელების გამოყოფის მრავალრიცხოვანი შემთხვევები, კლებსიელოზური ინფექციების მკურ-

ნალობისა და პროფილაქტიკის, ასევე დიაგნოსტიკისა და ეპიდემიოლოგიის მრავალი საკითხი არასაკმარისად არის შესწავლილი.

ანტიმიკრობული პრეპარატების მიმართ რეზისტენტული კლებსიელების შტამების გამოყოფა სერიოზულ პრობლემას ქმნის როგორც ინფექციის მკურნალობის მეთოდებში, ასევე ამ შტამების სამკურნალო დაწესებულებებში გავრცელებისა და კონტროლის საკითხებში (პოსპიტალური ინფექციები), უნდა აღინიშნოს, რომ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ავლენენ აქტივობას იმ შტამების მიმართ, რომლებიც რეზისტენტული არიან ანტიმიკრობული პრეპარატებისადმი. ამიტომ მიზანშეწონილად მიგვაჩნია მოიძებნოს და შეიქმნას ახალი ბაქტერიული პრეპარატები, კერძოდ ბაქტერიოფაგები, კლებსიელებით გამოწვეული ინფექციების დიაგნოსტიკის, პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის.



ბაქტერიოფაგის რასების გამოყოფის-
მიზნით გამოყენებულია ბაქტერია *Kleb-
siella pneumonia*-ს ახლადგამოყოფილი
შტამები. ისინი მიღებულია ავადმყოფთა
ფეკალური მასებიდან, ჩირქიდან, სისხ-
ლიდან და სხვა ბიოლოგიური სითხეები-
დან. მიკრობული პრეპარატები იღებებო-
და გრამის წესით, ხოლო ბაქტერიული
კაფსულის აღმოჩენისათვის გამოყენებულ
იქნა ბურის მეთოდი. მასალა ითესებოდა
გამამდიდრებელ საყვებ ნიადაგებზე: ენ-
დოს, პლოსკირევისა და ვორფელის არე-
ებზე. შტამების ბიოქიმიური იდენტიფიკა-
ციისათვის გამოყენებულ იქნა ქაღალდის
ინდიკატორული დისკები. შესწავლილ იქ-
ნა ლაქტოზას, გლუკოზას, მანიტის, მალ-
ტოზას, საქაროზას, ქსილოზას, რამნოზას,
არაბინოზას, აღონიტის, ინოზიტის, სორ-
ბიტის, დულციტის, სალიცილის, ნატრი-
უმის ციტრატის, სიმონსის ციტრატის და
ნატრიუმის მალონატის უტილიზაცია, ფე-
ნილალანინის, შარდოვანას და B-გალაქ-
ტოზიდაზას დეჰამინირება, ორნიტინის და
ლიზინის დეკარბოქსილირება, ინდოლისა
და გოჯირდწყალბადის წარმოქმნა, დაიდგა
მეთილ-როტისა და ფოფეს-პროსკაუერის
რეაქცია. კომერციული სააგლუტინაციო
შრატების უქონლობის გამო შტამების ან-
ტიგენური სტრუქტურის შესწავლა არ მო-
ხერხდა.

Klebsiella pneumonia-ს ბაქტერიო-
ფაგის რასები გამოყოფილ იქნა საყოფა-

კვლევის შედეგები და განხილვა

თბილისის ვაქცინებისა და შრატების
ს/კ ინსტიტუტის მიკრობთა ფიზიოლოგიის
ლბორატორიაში მიღებული იყო პირო-
ბით-პათოგენური ბაქტერიების შტამებუ
სხვადასხვა კლინიკებიდან (თბილისის ბავ-
შეთა რესპუბლიკური საავადმყოფო, თბი-
ლისის ბავშვთა ინფექციური საავადმყო-
ფო, საქართველოს შავი ჭირის სადგური,
მოსკოვის ქირურგიული ცენტრი, მოსკო-
ვის I ბავშვთა საავადმყოფო).

ცხოვრებო ჩამრეცი წყლებიდან გამოყოფილ ბაქტერიულ შტამებზე. მე-
თოდია: 900 მლ წყალს უმატებენ 100 მლ
კონცენტრირებულ ბულიონს და 0,5 მლ
24 სთ-იან აგარიანი კულტურის ჩამონა-
რეცხს. ნარევეს ათავსებენ 37 ტემპერატურა-
რაზე 18—24 სთ-ის განმავლობაში და
ფილტრავენ ჯერ ქაღალდის ფილტრში,
შემდეგ კი შამპერლანის (L₁—L₂) კერამი-
კულ ფილტრში. ფაგის მგრძობელობის
მეთოდით ფილტრატს ამოწმებენ ლიტურ
აქტივობაზე. ფილტრატში აქტიური ბაქ-
ტერიოფაგების აღმოჩენის შემდეგ აწარ-
მოებენ ფაგის ტიტრაციას აპელმანის მე-
თოდით მგრძობიარე ბაქტერიულ შტა-
მებზე. გატიტრული მასალის ინკუბაცია
მიმდინარეობდა შემდეგი რეჟიმით: 6 სთ
37° და 18 სთ 4—8° ტემპერატურაზე (სულ
24 სთ). გამოყოფილი ფაგის სტაბილიზა-
ციის მიზნით აწარმოებენ 9—10 ასეთ პა-
სირებას. ფაგის სუფთა ხაზის მისაღებად
გამოყენებულია გრაციას აგაროვანი ფე-
ნების მეთოდი, რომლის საშუალებითაც
მიღებულ იქნა ბაქტერიოფაგის სხვადასხვა
კლონები ცალკეული ნეგატიური კოლო-
ნიებიდან.

მიღებული ბაქტერიოფაგის ლიზისური
აქტივობის შესასწავლად გამოყენებულ
იქნა ფაგის ტიტრის განმსაზღვრელი აპელ-
მანისა და გრაციას მეთოდები.

კლებსიელას ბაქტერიოფაგის დია-
გნოსტიკური ეფექტის შესწავლის მიზნით
ჩატარებულ იქნა ფაგის ტიტრის ზრდის
რეაქცია.

1987—89 წ.წ. შესწავლილი და გამო-
კვლეულია 562 ბაქტერიული შტამი *Kleb-
siella pneumonia*. ის ბაქტერიული შტა-
მები, რომლებიც თავისი მორფოლოგი-
ური, კულტურალური და ბიოქიმიური
თვისებების მიხედვით მივაკუთვნეთ სახე-
ობას *Klebsiella pneumonia*, შემდგომში
გამოყენებულ იქნენ ცდაში სპეცეფიური
ფაგების გამოსაყოფად. შტამები შესწავ-
ლილ იქნა როგორც კულტურალური, ასევე

26 ბიოქიმიური ტესტის მიხედვით. უნდა აღინიშნოს, რომ საქართველოში არსებული ფაგების ბანკის ვერცერთმა ბაქტერიოფაგმა ვერ შესძლო შესწავლილი ბაქტერიული შტამების ლიზისი.

Klebsiella pneumoniae-ს ახლადგამოყოფილ ბაქტერიულ შტამებზე 1987—89 წ.წ. ჩამრეცი წყლებიდან გამოყოფილ იქნა პომოლოგიური ბაქტერიოფაგის ოცამდე რასა. ყველა გამოყოფილი რასა დაიყო ფაგის ცალკეულ კლონებად და შესწავლილ იქნა მათი აქტივობა, სპეციფურობა და მოქმედების დიაპაზონი (იხ. ცხრილი 1). ბაქტერიოფაგ *Klebsiella pneumoniae*-ს 52 კლონი ზემოთ აღნიშნული

ცხრილი 1

შტამი	ფაგი, %		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	92,3	85,2	79,9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	12	—
<i>Serratia marcescens</i>	—	63	12
<i>Salmonella</i>	—	—	—
<i>Shyella</i>	—	—	—
<i>Citrobacter</i>	—	—	—
<i>Yersinia</i>	—	—	—
<i>Proteus</i>	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—

თვისებების მიხედვით დაიყო სამ ძირითად ჯგუფად:

1) მკაცრადსპეციფიური ბაქტერიოფაგი *Klebsiella pneumoniae*-1, რომელიც იწვევს პომოლოგიური ბაქტერიული შტამების ლიზისს 92,3% შემთხვევაში და არ მოქმედებს ბაქტერიოფაგის პეტეროლოგიურ სახეობებზე.

2) აქტიური ბაქტერიოფაგი *Klebsiella pneumoniae* 2, რომელიც იწვევს პომოლოგიური ბაქტერიული შტამების ლიზისს 85,2% შემთხვევაში და მოქმედებს აგრეთვე პეტეროლოგიური სახეობის ბაქტერიებზე — *Serratia marcescens* 63% შემთხვევაში და *Enterobacter aerogenes* 12% შემთხვევაში.

3) აქტიური ბაქტერიოფაგი *Klebsiella*

Pneumonia—3, რომელიც ხასიათდება პეტეროლოგიური სახეობის ბაქტერიული შტამების მიმართ 79,9% შემთხვევაში და მოქმედებს აგრეთვე პეტეროლოგიურ სახეობაზე — *Serratia marcescens* 12,7% შემთხვევაში.

ფაგის კლონების აქტივობა განისაზღვრება თხიერ და მყარ საკვებ ნიადაგებზე. აპელმანის მეთოდით ფაგის ტიტრი ტოლია 10^6 1 მლ-ში, ხოლო გრაციას მეთოდით 10^8 .

იმდენად, რამდენადაც ბაქტერიოფაგი *Klebsiella pneumoniae*—1 აღმოჩნდა მკაცრადსპეციფიური, მისი დიაგნოსტიკური ეფექტის გამოსავლენად დიდგა ფაგის ტიტრის ზრდის რეაქცია. ცდაში გამოყენებულ იქნა ბაქტერიული შტამი № 1967. რეაქციის შედეგად აღმოჩნდა, რომ საკონტროლო სინჯარაში ფაგის კორპუსკულების რაოდენობა იყო $131 \cdot 10^2$, ხოლო საცდელ სინჯარაში $419 \cdot 10^4$, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ბაქტერიოფაგს აქვს ტიტრის ზრდის თვისება და იგი შეიძლება გამოყენებულ იქნას გამოსაკვლევ მასალაში (სისხლი, განავალი და სხვა) კვებისელებას ბაქტერიების გამოსავლენად.

ელექტრომიკროსკოპიულმა გამოკვლევებმა გვიჩვენა, რომ კვებისელებას ბაქტერიოფაგის ზემოთ აღნიშნული სამივე ჯგუფის კლონები მორფოლოგიურად არ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. ფაგის კორპუსკულს აქვს შემდეგი ზომები: ჰექსოგენალური ფორმის თავი $100 \cdot 80$ ნმ და გამონაზარდი კუმშვადი შალითით, რომლის სიგრძეა 120 ნმ. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაციის (ტიხონენკოს სქემა) მიხედვით კვებისელებას ფაგი მიეკუთვნება მე-5 მორფოლოგიურ ტიპს. ფაგის ნეგატიური კოლონიების დიამეტრია 2—3 მმ.

ამრიგად, ბაქტერიოფაგი *Klebsiella pneumoniae*, რომელიც გამოყოფილია თბილისში, წარმოადგენს მალაქტიურ და ფართო მოქმედების დიაპაზონის ფაგს. ასეთი ბაქტერიოფაგის საშუალებით შესაძლებელია როგორც დიაგნოსტიკური ასევე სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატების კონსტრუირება კვებისელოზური ინფექციის თავიდან აცილების მიზნით.



1. Адаме Ф. Бактериофаги, ИЛ, М., 1961.
2. Газиев Г. М., Батуро А. П. Журн. микробиол., эпидем., иммунобиол., 5, 32—34, 1986.
3. Гольдфарб Д. М. Бактериофагия, Медгиз, М., 1961.
4. Киселева Б. С., Красноголовец В. Н. Журн. микробиол., эпидем., иммунобиол., 2, 20—25, 1983.
5. Киселева Б. С., Солодова Т. А., Шляпников В. Д. Журн. микробиол., эпидем., иммунобиол., 9, 34—42, 1982.
6. Красноголовец В. Н., Киселева Б. С., Клини. мед., 2, 88—90, 1982.
7. Петровская В. Г., Бондаренко В. М., Маринова Р., Корягина И. П., Афанасьева С. М. Журн.

- микробиол., эпидем., иммунобиол., 2, 25—31, 1983.
8. Смолянская А. З., Дронова О. М., Солодовник Ф. И. В сб.: Актуальные вопросы клинической микробиологии, М., 1985, 122—126.
9. Mesta A. M., Avalos C., Barbachano J., Carmona M., Garsa A., Lales F., Salazar G., Valejo O., Ortigoza J. Rev. Latinoameric. Microbiol., 1, 27, 1—6, 1985.
10. Mollitt Daniel L. Pediat. Infect. Disease, 3, 4, 326—329, 1985.
11. Sewell Mack, Koza Mauree A., Luchi Robert J., Joung Edward J. Amer. J. Infec. Contr., 2, 16, 66—71, 1978.

ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГА KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Г. Г. Джапаридзе, Т. Г. Чанишвили

НПО „Бактериофаг“ им. Г. Г. Элиава, Тбилиси
Тбилисский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток

Резюме

Выделены и обнаружены строго-специфические и поливалентные клоны бактериофага *Klebsiella pneumoniae*. Фаг лизирует гомологичные

штаммы бактерий в 92,3% случаев. С его помощью возможно создание как диагностических, так и лечебно-профилактических препаратов.

CHARACTERISTICS AND SOME BIOLOGICAL PECULIARITIES OF KLEBSIELLA PNEUMONIA BACTERIOPHAGE

G. G. JAPARIDZE, T. G. CHANISHVILI

G. G. Eliava Scientific Research Institute of Industrial Almagamation of Bacteriophage, Tbilisi
Tbilisi Institute of Vaccines and Sera

Summary

Strictly specific and polyvalent clones of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages were isolated and identified. The phage provides lysis of homologous strains of *Klebsiella pneumoniae* bacteria in 92.3%

of cases. *Klebsiella pneumoniae* phage makes it possible to produce preparations for diagnostic, prophylactic and treatment purposes.

УДК 616. 001.36.576.247

ГЕНЕТИКА

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СВЕТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Е. Б. Хатишвили, Н. Н. Лапишвили, Г. Г. Хачапуридзе

НИИ информатики и комплексной автоматизации в здравоохранении, Тбилиси

Поступила в редакцию 01.03.89.

Исследовалось влияние излучения He-Ne лазера на частоту aberrаций хромосом (АХ), сестринских хроматидных обменов (СХО) и кривую репликативного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro*. Показано, что в результате облучения имело место повышение уровня АХ, тенденция к повышению СХО, задержка наступления и укорочение фазы синтеза ДНК.

Низкоинтенсивное (некоагулирующее) излучение He-Ne лазера получило широкое применение в клинической практике и, несомненно, является успешным в лечении ряда заболеваний, где традиционные медикаментозные методы часто малоэффективны [10, 11, 13]. Однако механизм лечебного и биологического действия лазерного излучения малой мощности все еще недостаточно ясен. Поэтому в последние годы проводятся систематические исследования по изучению воздействия низкоинтенсивного видимого света на рост культур, синтез ДНК и РНК, активность различных ферментов и т. д. [3, 4, 9, 12, 21—23]. Так, в литературе [11, 20] высказано предположение, что облучение низкоинтенсивным лазерным светом может выступить в роли регулятора пролиферативной активности клеток, которая, в конечном счете и обуславливает лечебный эффект, например при лечении трофических язв и длительно незаживающих ран [11, 20]. В работах с цитогенетическими оценками последствий излучения He-Ne лазера [2, 15, 16] отмечается повышение частоты хромосомных перестроек в костном мозге крыс, культуре фиб-

робластов, лимфоцитов человека и др. Предполагается, что этот эффект имеет гуморальное происхождение [2], либо связан с характером влияния света на процессы репликации ДНК [15]. Существует также мнение, что повышение частоты АХ, вызвано создаваемой низкоинтенсивным лазерным излучением гипертермией [16]. Целью исследований было изучение влияния He-Ne лазера на частоту АХ, СХО, репликативный цикл ДНК и митотический индекс (МИ) лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*. Такой выбор исследуемых показателей обусловлен тем, что, с одной стороны, сопоставление характеров изменения частот АХ и СХО позволит продвинуться в суждении о том, является ли лазерный эффект мутагенным и каковы механизмы его возникновения. С другой стороны, есть возможность выявления связи цитогенетических изменений (АХ и СХО) с функциональным состоянием клеток через формы репликативной кривой МИ и СХО, которые по высказанному предположению [7, 8] связаны с репликацией ДНК. При

таким подходе важно выбрать объект исследований, обладающий высокой степенью синхронизации и допускающий осуществление необходимых ме-

тодик. В цитогенетических исследованиях этим требованиям удовлетворяет культура лимфоцитов периферической крови человека [14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Как отмечалось, материалом для исследования служили культуры лимфоцитов крови, которую получали от группы 10 здоровых доноров. В начале культивирования образцы облучали расфокусированным пучком света от He-Ne лазера ЛГ-75 с длиной волны 633 нм и мощностью 20 мвт/см² в дозах 10, 20, и 30 Дж/см². Контрольные образцы облучению не под-

Для мечения сестринских хроматид в культуре лимфоцитов через 20—22 ч добавляли 5-БДУ в конечной концентрации 7,7 мкг/мл, который находился в культуре до фиксации, производившейся на 72 ч. Колхицизацию, гипотоническую обработку и фиксацию проводили так же, как и для препаратов, по которым оценива-

Таблица 1

Частота хромосомных нарушений в культуре лимфоцитов человека при действии излучения He-Ne лазера

Тип опыта и доза облучения	Количество проанализированных метафаз		% клеток с АХ		Нарушение на 100 кл		МИ, %
	I митоз	II митоз	I митоз X±m	II митоз X±m	I митоз X±m	II митоз X±m	
Контроль	1500	1500	3,0±0,8	3,0±0,8	3,0±0,8	3,0±0,8	305
Лазер 10 Дж	1500	1500	4,2±0,92	3,3±0,84	4,2±0,92	3,3±0,84	330
Лазер 20 Дж	1500	1500	5,2±1,1	3,5±0,87	5,2±1,1	3,5±0,87	315
Лазер 30 Дж	1500	1500	7,3±1,3	3,2±0,8	7,3±1,3	3,2±0,8	300

вергались. Культивирование проводилось по методу Хангерфорда [18] с незначительной модификацией, принятой в лаборатории медико-генетических исследований НИИИКАЗ МЗ ГССР: к 0,4 мл цельной крови добавляли питательную среду (1/4 ин-активированной сыворотки крупного рогатого скота и 3/4 культуральной среды Игла) и 0,02 мл ФГА (Difco) спустя 52 или 70 ч (за 2 ч до снятия культуры) в культуры вводили колхицин. После снятия культуры суспензию клеток подвергали обработке в гипотоническом растворе; фиксировали стандартным способом в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты, разбрызгивали на стекла и красили красителем Романовского-Гимзы. При регистрации АХ учитывали все типы аберраций, идентифицируемые без кариотипирования. Показателями цитогенетической эффективности служили процент клеток с АХ и число аберраций на 100 изученных клеток.

лись АХ. В течение нескольких суток препараты выдерживались в темноте. Затем дифференциальное окрашивание сестринских хроматид проводили по методу М. М. Антошиной и Н. А. Порядковой [1]. При количественном учете СХО терминальные обмены, вовлекшие теломерные участки хрома-

Таблица 2

Изменение частоты спонтанных СХО в лимфоцитах крови человека при облучении светом от He-Ne лазера

Доноры	Контроль	Лазерное облучение в дозе		
		10 Дж	20 Дж	30 Дж
1	5,5±0,4	6,0±0,4	5,9±0,4	5,8±0,4
2	6,2±0,4	6,1±0,4	6,1±0,4	5,7±0,4
3	5,8±0,3	3,9±0,3	2,7±0,2	2,7±0,2
4	5,7±0,3	5,5±0,3	4,3±0,3	4,3±0,3

Примечание: каждая цифра результат анализа 50 метафазных пластинок

тид, считали за один обмен, а интракалярные обмены, вовлекшие внутренние участки хроматид, — за два. СХО в области центромеры не учитывали, так как они не отличимы от переверта хромосомных плеч. Показателем эффекта служил средний уровень СХО на метафазу.

Для изучения характера репликативного цикла использовали радиоактивную метку. Для этого, начиная с 27 ч культивации, каждые 3 ч в течение 30 мин клетки импульсно метили H^3 -тимедином (1 мкКюри/мл) с последующей отмывкой в среде Игла и культивированием в обычной

культуральной среде с добавлением немеченного тимедина (5×10^{-6} М). Препараты покрывали ядерной эмалью, экспонировали 3 недели при температуре $+4^\circ\text{C}$, проявляли амидольным проявителем, окрашивали обычным способом. Для построения кривых репликативного синтеза подсчитывали на световом микроскопе количество меченых метафаз на 1000 проанализированных. Строили отдельные кривые для «сильно меченых» клеток, т. е. клеток, в которых практически все хромосомы имели несколько радиоактивных включений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1,2 приведены результаты исследования влияния излучения He—Ne лазера на перестройки хромосом в лимфоцитах. Видно, что частота АХ

параллелизма между частотами АХ и СХО (частота СХО несколько понижалась в препаратах облученных культур — табл. 1,2).

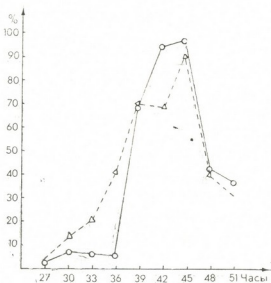


Рис. 1. Кинетика реплицирующих клеток: по оси абсцисс — время включения радиоактивной метки; по оси ординат — процент меченых клеток; сплошная линия — облученные культуры, пунктирная — контрольные

повышается с увеличением дозы лазерного облучения. Причем повышение имеет место только в клетках первого митоза (фиксация на 54 ч). В клетках второго митоза (фиксация на 72 ч) разницы в облученных и контрольных образцах не было. Нет

При построении кривой репликативного синтеза ДНК было выявлено запаздывание и уменьшение продолжительности фазы синтеза (S-фазы) в результате воздействия низкоинтенсивным лазерным светом (рис. 1). Между кривыми сильно меченых кле-

ток в облученных и контрольных культурах различие состояло в задержке пика синтеза. Так, в препаратах облученных образцов пик при-

ходился на 45 ч (76% от общего числа клеток), а в контрольных — на более низких пика на 39 и 45 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные показывают, что излучение He-Ne лазера модифицируют и цитогенетические и функциональные показатели лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*. Так, увеличение частоты АХ в первом митозе и возвращение в последующем к контрольному уровню, говорит о наличии нестойкого цитогенетического эффекта, стимулированного низкоинтенсивным лазерным излучением, что согласуется с литературными данными [15]. Долговечность хромосомных пе-

вероятной представляется гипотеза о наличии связи частоты хромосомных нарушений с характером влияния света на процессы репликации ДНК. Последнее не исключает, в частности, стимуляцию репликативных процессов в спонтанно поврежденных клетках, которые без этого не дошли бы до стадии митоза. Тенденция к понижению частоты СХО в результате воздействия лазером также говорит о каких-то «нормализующих» изменениях в репликации.

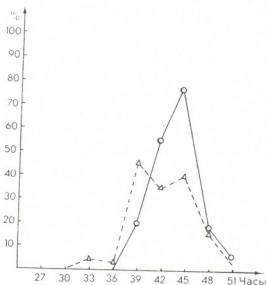


Рис. 2. Кинетика активнореплицирующих клеток: по оси абсцисс — время включения радиоактивной метки, ординат — процент меченых клеток; сплошная линия — облученные культуры, пунктирная — контрольные

реструк определяется природой нарушений и репарационными свойствами системы [6], поэтому пока трудно что-либо утверждать относительно природы наблюдаемого в первом митозе повышения частоты АХ. Однако, исключив в эксперименте фактор гипертермии (при котором, наряду с увеличением АХ следовало ожидать не уменьшение, а параллельное возрастание СХО [19, 20]), более

В настоящее время выявлено, что эндоредуплицироваться могут только клетки с пониженным уровнем СХО. Таким образом, можно предположить, что лазерное излучение способствует редупликации лимфоцитов. Кроме того, из множества гипотез относительно формирования СХО в последнее время привлекают внимание те, что объясняют этот феномен несинхронной репликацией в разных реплика-

нах [7]. С этой гипотезой можно связать и наши данные, полученные с помощью автордиографии, относительно формирования репликативных кривых. Похоже, что лазерное излучение способствует синхронизации процесса репликации. Так, мы не наблюдали задержку наступления и сужения S-фазы, т. е. сокращения продолжительности синтеза и, возможно, времени жизни частично реплицированных кластеров репликаонов. Кроме того, анализ распределения радиоактивных меток позволил выявить, что на 45 ч не только максимум клеток находится в фазе синтеза, но и сам синтез внутри каждой клетки активизирован, о чем говорит большое число включений радиоактивных предшественников и реплицирующие хромосомы. В литературе нет сведений о влиянии He—Ne лазера на репликативные кривые и СХО. Имеют-

ся лишь сообщения об аналогичной задержке наступления S-фазы и некотором понижении частоты видимого света (длина волны более 400 нм) в растительных клетках [20]. Можно предположить, что наблюдавшиеся нами процессы относятся к достаточно общим для большинства клеток явлениям функциональной реакции на видимый свет вне зависимости от его когерентности. Основываясь на гипотезе зависимости процесса формирования СХО от синхронности репликаций [7, 8], можно утверждать, что излучение на длине волны 633 нм способствует синхронизации процесса репликации ДНК, в частности в лимфоцитах человека и повышает способность клеток к редупликации. Возможно цитогенетические изменения, вызываемые He—Ne лазером, тоже связаны с функциональными изменениями системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антошина М. М., Порядкова Н. А. Цитология и генетика, 12, 4, 349—352, 1978.
2. Барияк К. В., Лопушан И. В. Пат. физиол. и эксп. тер., 3, 50—53, 1981.
3. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д., Яниш Ю. В. ДАН СССР, 273, 1, 224—227, 1983.
4. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д., Яниш Ю. В. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения, «Наука», М., 1988.
5. Енифанова О. И., Терских В. В., Полуновский В. А. Покоящиеся клетки, «Наука», М., 1983.
6. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение, «Наука», Л., 1979.
7. Жестяников В. Д. Информационный бюллетень Научного совета АН СССР по проблемам радиобиологии, 32, 107—112.
8. Жлоба А. А. Информационный бюллетень научного совета АН СССР по проблемам радиобиологии, 104—106.
9. Кару Т. И. ДАН СССР, 291, 5, 1245—1249, 1986.
10. Кару Т. И., Летохов В. С., Лобко В. В. Вопр. курортол., физиотер. и лечфизкультуры, 1984, 1, 36—39.
11. Лобанов В. В. Изучение лечебного действия низкоинтенсивного лазерного излучения на гнойные раны и трофические язвы, Канд. дисс., Минск, 1984.
12. Лобанов В. В., Мурзенко П. П. Здравоохранение Белоруссии, 3, 32—35, 1984.
13. Сазонов А. М. Советская медицина, 12, 42—46, 1985.
14. Севаньякаев А. В. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле, «Энергоатомиздат», М., 1987.
15. Хохлов И. В. Генетическая эффективность лазерного излучения различных длин волн, Канд. дисс., Минск, 1982.
16. Berki T., Nemeti P. Hege-dues J. Kizerel Orvosium, 36, 1, 96—101, 1984.
17. Hungerfocht D. A. Stain. Techn., 40, 33—338, 1965.
18. Joyce I., Meyers A., Cohen J. Lasers in Surgery and Medicine, 6, 2, 171, 1986.
19. Kato H. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2, 61—67, 1980.
20. Maldonado A., Pardo E., Gutierrez Mut. Res., 197, 117—125, 1988.
21. Mester E., Mester A. F., Mester A. Lasers in Surgery and Medicine, 5, 31—39, 1985.
22. Nakajama M. Radiation Res., 93, 598—608, 1983.
23. Sanderson B. J. Mutagenesis, 1, 2, 131—133, 1986.

ბ. ხატიაშვილი, ნ. ლაპიაშვილი, გ. ხაჩაპურიძე

საქართველოს ჯანდაცვის სამინისტროს ინფორმატიკისა და ჯანდაცვის კომპლექსური
ფორმატიზაციის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

ადამიანის პერიფერიული სისხლის
ლიმფოციტებში in vitro შესწავლილია
He-Ne ლაზერის სხივის გავლენა მიტოგე-
ნურ აქტივობაზე, ქრომოსომული აბერა-
ციების და შვილეულ ქრომატიდთა შორის
გაცვლების სიხშირეზე და დნმ-ის რეპლი-

კაციური სინთეზის მრუდზე. შედეგები
მიუთითებს, რომ He-Ne ლაზერის სხივის
მოქმედება არამუტაგენური ხასიათისაა და
ხელს უწყობს დნმ-ის რეპლიკაციის სინ-
ქრონიზაციის პროცესს.

INFLUENCE OF LOW-INTENSITY LASER LIGHT ON CYTOGENETIC AND FUNCTIONAL INDICES OF HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES IN VITRO

E. B. KHATIASHVILI, N. N. LAPIASHVILI, G. G. KHACHAPURIDZE

Institute of Informatics and Complex Automatization in Health Care, Tbilisi

S u m m a r y

The influence of He-Ne laser irra-
diation on the frequency of chromosomal
aberrations, mitotic activity and for the
first time, on the sister chromatid ex-
change and on the curve of DNA repli-
cation synthesis in lymphocytes of human

peripheral blood was investigated. The
conclusion is made that He-Ne laser
action has not a mutagenic character and
promotes synchronizatin of DNA repli-
cation.

УДК 547.96

БИОФИЗИКА

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА α -АКТИНИНА ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ КАРПА

Т. Т. Ториашвили, Н. А. Гачечиладзе, И. Ш. Мегрелишвили,
Л. Г. Ломидзе, М. М. Заалишвили

Институт молекулярной биологии и биологической физики АН Грузии, Тбилиси

Поступила в редакцию 16.06.89

Изучалась зависимость скоростей суперпреципитации и АТФазной реакции реконструированных комплексов актин-миозин и α -актинин—актин—миозин поперечнополосатой мышцы карпа от температуры. Показано, что присутствие α -актинина в актомиозиновом комплексе значительно увеличивает скорости суперпреципитации и АТФазной реакции актомиозина в интервале 10—25°C. В том же температурном интервале наблюдается максимальное влияние α -актинина на скорость роста полимеров актина. С помощью сочетания методов кинетических исследований и калориметрии выявлена определенная корреляция между функциональной активностью α -актинина карпа и структурными изменениями, происходящими в молекуле с повышением температуры.

α -актинин — минорный белок двигательной системы животных клеток. В настоящее время установлено, что α -актинин существует не только в скелетной мышце, но и в сердечной и гладкой мышцах, а также в мозгу, мембранах и в других немышечных системах, где он участвует в образовании изотропной сетки актина в кортикальной области цитоплазмы немышечных клеток [13, 14, 18, 19]. В скелетной мышце α -актинин локализован в области Z-диска и, по-видимому, имеет непосредственное отношение к структуре и функции актиновых протофибрилл. Полагают, что α -актинин способствует боковому соединению актинсодержащих нитей, в результате чего *in vitro* в присутствии α -актинина наблюдается увеличение вязкости Ф-актина, а также скорости АТФазной реакции и суперпреципитации (СПП) актомиозина [11, 15, 17]. Надо отметить, что температура среды в значительной степени влияет на акти-

вирующее действие α -актинина и на количественное соотношение α -актинина с Ф-актином в комплексе [8, 12]. В связи с этим исследование зависимости биологической активности и структурных изменений α -актинина из мышц хладнокровных от температуры может иметь определенное значение для выяснения биологической роли этого белка в подвижности.

В наших работах по сравнительному исследованию гидродинамических и некоторых биологических свойств α -актинина карпа показано, что по своим молекулярным параметрам, аминокислотному составу и биологической активности он несколько отличается от α -актинина кролика и других теплокровных [2—4].

Цель данной работы изучить зависимость взаимодействия α -актинина карпа с актомиозином от температуры и проследить структурные изменения, происходящие в его молекуле с повышением температуры.

Актин из мышц карпа получали по методу Спудича [16], миозин — по методу Ватанабе [20], α -актинина — по методу Голла и др. [11]. Вязкость измеряли в капиллярном вискозиметре (время истечения растворителя при 20°C равнялось 102 с). Скорость суперпреципитации (СПП) и АТФазной активности регистрировалась на специальной установке [1]. Для получения реконструированного актомиозина миозин и полимеризованный Ф-актин смешивали в соотношении 3:1 при

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показано изменение Mg^{2+} -активируемой АТФазной активности и скорости СПП реконструированных комплексов актин—миозин и α -актинин—актин—миозин поперечнополоса-

ционной силе 0,6. В опытах использовалась динатриевая соль АТФ. Концентрация миозина, актина и α -актинина измерялась по поглощению на 280 нм по стандартным формулам $E_{280}^{1\%} = 5,30$; $E_{280}^{1\%} = 10,97$; $E_{280}^{1\%} = 13,5$ для каждого белка соответственно.

Калориметрические измерения производились на микрокалориметре ДАСМ-4 при скорости прогрева 0,25 к/мин и концентрации белка порядка 1,5—3 мг/мл.

Однако на рисунке видно, что при добавлении к актомиозину карпа 30% α -актинина (от полного веса актомиозина) происходит значительное увеличение скорости и степени СПП и сравнительно слабое возрастание АТФаз-

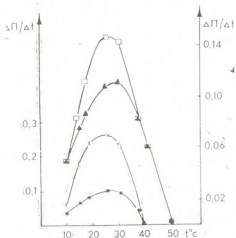


Рис. 1. Зависимость скоростей АТФазной реакции (▲, □) и СП (●, ×) актомиозина (●, ▲) и комплекса АМ + 30% α -актинина (×, □) от температуры (0,07 М КСl, рН 7,5, $5 \cdot 10^{-4}$ М Mg^{2+} АТФ)

той мышцы карпа при различных температурах в присутствии ионов калия. Как видно из рисунка, скорости СПП и АТФазной активности обоих комплексов возрастают с увеличением температуры до определенного значения и достигают оптимума в области 25—30°C. Надо отметить, что присутствие α -актинина в актомиозиновом комплексе не меняет характер зависимости скоростей АТФазной реакции и СПП актомиозина от температуры.

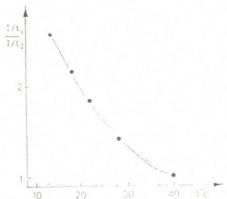


Рис. 2. Температурная зависимость отношения средних скоростей Г-Ф превращения актина в присутствии α -актинина и без него (0,5 мг/мл Г-актина, 0,025 мг/мл α -актинина, 0,1 М КСl, 0,05 М трис-НСl, буфер рН 7,5)

ной активности актомиозина. Увеличение оптической плотности актомиозиновой суспензии в присутствии α -актинина начинается с 10°C. Максимальное активирующее действие α -актинина наблюдается в области 10—25°C. С дальнейшим повышением температуры эффект α -актинина уменьшается и при 37°C исчезает вовсе. Так как α -актинин не взаимодействует с миозином и не меняет Ca^{2+} -АТФазную активность миозина, то температурная зависимость его влияния

должна быть обусловлена активным компонентом. Действительно, если сравнить температурную зависимость отношения средней скорости Г-Ф перехода актина карпа в присутствии α -актинина и без него (рис. 2), то можно убедиться, что так же, как в случае α -актинина кролика, влияние α -актинина карпа на скорость роста полимеров актина сильно зависит от температуры. Если при 15—20°C α -актинин явно увеличивает скорость полимеризации Г-актина, то при 40°C эффект его полностью исчезает [4]. Учитывая то, что с повышением температуры до определенного значения (30—35°C) вязкость актина и α -актинина карпа практически не меняется (рис. 3), можно предположить, что сильная температурная зависимость α -актинин — Ф-актин взаимодействия обусловлена не существенными структурными перестройками в молекулах этих белков, а самим процессом комплексообразования. Это предположение хорошо согласуется с результатами других работ, в которых рассматривается влияние температуры на взаимодействие α -актинина с актином из мышц кролика и других теплокровных [9, 12, 14].

Однако, возможно, вискозиметрический метод в данном случае оказался недостаточно чувствительным для выявления локальных структурных изменений, происходящих в молекулах α -актинина и актина с повышением температуры.

Некоторые авторы температурную зависимость процесса комплексообразования α -актинина с актином объясняют экзотермическим характером реакции, в случае которого повышение температуры уменьшает вероятность межмолекулярного взаимодействия. В результате количество присоединяемого α -актинина ограничивается [7].

Нам кажется более вероятным, что причину сильной температурной зависимости комплексообразования надо искать в структурных изменениях в молекулах актина и α -актинина, если они происходят с повышением температуры. И действительно, при исследовании изменения относительной теплоемкости α -актинина карпа оказалось, что при 1 мМ NaHCO_3

теплоемкость белка плавно уменьшается с 17°C и достигает минимального значения при 34°C — в этой области теплоемкость понижается на 0,015 Дж/г.К и составляет 3 кДж/моль.К (для сравнения отметим, что теплоемкости глобулярных белков порядка $1,2 \pm 0,1$ Дж/г.К). В дальнейшем теплоемкость раствора растет и после 40°C начинается кооперативное плавление белка (пик теплопоглощения с характеристической температурой 53°C), заканчивающееся к 60°C.

Добавление ионов калия до физиологической концентрации (100 мМ) не влияет на общую картину изменения

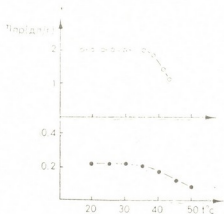


Рис. 3. Зависимость приведенной вязкости актина (0—0) и α -актинина (●—●) от температуры

относительной теплоемкости. Несколько раздвигаются области агрегации 15—38°C, но максимум теплопоглощения и конец плавления остаются неизменными. Эти результаты хорошо коррелируют с данными по α -актинину поперечнополосатых мышц кролика (показано, что добавление до 2 мМ ионов кальция и от 1 до 100 мМ калия незначительно меняет профиль кривых плавления) [5].

В результате измерения относительной теплоемкости α -актинина в буферированной системе (5 мМ трис-НСl буфер, pH 7,5) оказалось, что относительная теплоемкость раствора практически линейно уменьшается с 18 до 32°C на 0,004 Дж/г.К или 12,8 кДж/моль.К. Такое уменьшение теплоемкости наблюдается в том случае, когда белок переводится путем диализа в буферный раствор из исходного 1 мМ NaHCO_3 . Но при непосред-



ственным смещении исходного препарата с буферной смесью теплоемкости полученного раствора вплоть до денатурационной области практически не меняется. Следует указать, что для α -актинина из поперечнополосатых мышц кролика также обнаружен переход в интервале 17—30°C, по увеличению коэффициента седиментации и степени перевариваемости протеолитическими ферментами [12], увеличению числа доступных SH-групп [10] и по изменению в спектре флуоресценции остатков триптофана [6].

Приведенные данные показывают достаточно хорошее совпадение изменений в функциональной активности α -актинина и его теплоемкости в физиологической области температур. И так как глубина структурных перестроек в буферной смеси больше, чем в 1 мМ NaHCO₃ (уменьшение теплоемкости на 3 и 12,8 кДж/моль.К),

то можно предположить, что эти перестройки (величина которых при приближении к физиологической среде и ионной силе увеличивается) и играют значительную роль в функционировании α -актинина.

В заключение надо отметить, что означенный температурный интервал (10—25°C), в котором проявляется максимальная активность α -актинина карпа является физиологической температурой многих видов рыб. Вероятно, хладнокровные являются тем звеном в эволюционном развитии, в котором α -актинин играет важную роль для нормального функционирования менее упорядоченной в структурном отношении актомиозиновой системы.

Для подтверждения правильности такого вывода нужны дальнейшие структурные исследования этих белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гачечиладзе А. Н., Заалишвили М. М. Сообщения АН ГССР, 59, 3, 693—696, 1970.
2. Гедеваняшвили Г. И., Ломидзе Л. Г., Фурман В. Я., Стуруа М. Г., Шрайбман Ф. О., Заалишвили М. М. Молекулярная биология, 36, 1—88, 12—15, 1984.
3. Куридзе К. Ш., Ломидзе Л. Г., Симонидзе М. Ш., Шрайбман Ф. О. Тезисы докладов VIII Всесоюзного симпозиума «Биофизика и биохимия биологической подвижности», Тбилиси, 1987.
4. Ломидзе Л. Г., Заалишвили М. М. Сообщения АН ГССР, 101, 3, 682—686, 1981.
5. Мегрелишвили И. Ш., Куридзе К. Ш., Герасимов В. В., Симонидзе М. Ш. Тезисы VIII Всесоюзного симпозиума «Биофизика и биохимия биологической подвижности», Мещинереба, Тбилиси, 1987, 22.
6. Пермяков Е. А., Цховребова Л. А. Биофизика, XXXIII, 5, 754—757, 1988.
7. Стефаненко Г. А., Симонидзе М. Ш., Заалишвили М. М. Сообщения АН ГССР, 68, 713—716, 1972.
8. Стефаненко Г. А., Сванидзе Э. С., Заалишвили М. М. Сообщения АН ГССР, 72, 1, 169—172, 1973.
9. Стефаненко Г. А., Сванидзе Э. С., Заалишвили М. М. Сообщения АН ГССР, 72, 169—173, 1975.
10. Симонидзе М. Ш., Надирашвили Н. Ш., Заалишвили М. М., Шрайбман Ф. О. Сообщения АН ГССР, 104, 2, 453—456, 1981.
11. Arakava N., Robson M. R., Goll D. E. Biochim. Biophys. Acta, 200, 284—295, 1970.
12. Goll D. E., Suzuki A., Temple J., Holmes G. R. J. Mol. Biol., 67, 3, 469—488, 1972.
13. Jellman D. R., Jung G., Garraway K. L. Biochim. Biophys. Acta, 668, 201—208, 1981.
14. Landon F., Ojomuchi A. Biophys. Biochim. Acta, 742, 129—134, 1983.
15. Robson R. M., Goll D. E., Arakawa N., Stromer M. H. Biochim. Biophys. Acta, 200, 296—318, 1970.
16. Spudich Y. A., Watt S. J. J. Biol. Chem., 246, 15, 4866—4871, 1971.
17. Suzuki A., Goll D. E., Allen E. R., Robson R. M., Stromer J. Biol. Chem., 251, 21, 6860—6870, 1976.
18. Singh J., Goll D. E., Robson R. M., Stromer M. H. Biochim. Biophys. Acta, 491, 29—45, 1977.
19. Schook W., Oresend G., Puszkin S. Biochem. J., 175, 63—72, 1978.
20. Watanabe S., Hashimoto K. J. Biochem., 87, 1491—1499, 1980.

თ. ტორიშვილი, ნ. აკაჩილაძე, ი. მებრეღვიანი, ლ. ლომიძე, მ. ჯაალიშვილი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიისა
და ბიოფიზიკის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი მ ე

შეისწავლებოდა კობრის განივჭილიანი კუნთებიდან რეკონსტრუირებული აქტინ-მიოზინისა და α -აქტინინ-აქტინ-მიოზინის სუპერპრეციპიტაციისა და ატფ-აზური რეაქციების სიჩქარეთა დამოკიდებულება ტემპერატურაზე. ნაჩვენებია, რომ α -აქტინინის არსებობა აქტომიოზინის კომპლექსში მნიშვნელოვნად ზრდის აქტომიოზინის სუპერპრეციპიტაციისა და ატფ-აზური რეაქციების სიჩქარეებს 10—25°C ინტერვალში. ამავე ტემპერატურულ ინტერვალში

ში შეინიშნება α -აქტინინის მაქსიმალური მოქმედება აქტინის პოლიმერების ზრდის სიჩქარეზე. კვლევის კინეტიკური და კალორიმეტრული მეთოდების ერთობლივი გამოყენების საშუალებით გამომქდავდა განსაზღვრული კორელაცია კობრის α -აქტინინის ფუნქციონალურ აქტიობასა და იმ სტრუქტურულ ცვლილებებს შორის, რომელსაც ადგილი აქვს მოლეკულაში ტემპერატურის მომატებისას.

TEMPERATURE EFFECT ON FUNCTIONAL* AND STRUCTURAL PROPERTIES OF α -ACTININ IN CROSS-STRIATED MUSCLE OF THE CARP

T. T. TORIASHVILI, N. A. GACHECHILADZE, I. Sh. MEGRELISHVILI,
L. G. LOMIDZE, M. M. ZAALISHVILI

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

S u m m a r y

The dependence of superprecipitation and ATPase reaction velocities of actin-myosin and α -actinin-actin-myosin reconstructed complexes upon temperature was studied in cross-striated muscle of the carp. The presence of α -actinin in the actomyosin complex was shown to produce a significant increase of superprecipitation and ATPase reaction velocities of actomyosin at 10—25°C temperature range.

At the same temperature range the maximum effect of α -actinin on the growth velocity of actin polymers was also observed. A combination of kinetic and calorimetric research methods enabled to reveal a definite correlation between the functional activity of carp's α -actinin and the structural changes observed in the molecule after the rise of temperature.

УДК 579.842.23 : 577.112/314.6

БИОФИЗИКА

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТОКСИНА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И ЕГО КОМПОНЕНТОВ

И. М. Ермак, С. И. Бахолдина, В. А. Хоменко, Т. Ф. Соловьева,
В. Я. Фурман, М. Г. Стуруа, Г. И. Гедеванишвили

Тихоокеанский институт биоорганической химии, ДВО АН СССР, Владивосток

Институт молекулярной биологии и биологической физики АН Грузии, Тбилиси

Поступила в редакцию 04.10.89

Методами седиментационного анализа определены константы седиментации, оценены форма и молекулярные массы липополисахаридного (ЛПС) и липополисахарид-белкового (ЛПБК) комплексов очищенного эндотоксина из *Yersinia pseudotuberculosis* в растворе при 20 и 45°C.

Определены седиментационные свойства белкового 40 кДа (по ДДС-гельэлектрофорезу) компонента, выделенного из ЛПБК в присутствии 0,25% ДДС—Na на колонке сефадекса G-200. Показано сходство физико-химических характеристик 40 кДа белка и белка-порина иерсинии.

При изменении температуры от 20 до 45°C наблюдается диссоциация агрегатов как ЛПС, так и ЛПБК с образованием монодисперсных частиц с молекулярной массой 290 и 150 кДа соответственно. Белковый компонент вносит существенный вклад в надмолекулярную организацию эндотоксина как при низких, так и при высоких температурах.

Эндотоксины грамотрицательных бактерий представляют собой макромолекулярные комплексы ЛПС и белка — ЛПБК [15]. ЛПБК являются О-антигенами и выполняют важные структурные и рецепторные функции в бактериальной клетке [18]. Исследование молекулярных основ функциональной и биологической активности ЛПБК тесно связано с изучением их надмолекулярной организации, что в свою очередь определяется как физико-химическими свойствами отдельных компонентов — ЛПС и белка, так и их взаимным влиянием.

ЛПС, вероятно, определяет основные свойства комплекса. Однако, можно предположить, что белковый компонент способствует проявлению

специфических характеристик эндотоксина. Если ЛПС составляющая эндотоксинов исследуется чрезвычайно активно на протяжении нескольких лет, изучению белкового компонента и макромолекулярной организации комплекса в целом посвящено немного работ.

Практически отсутствуют данные о структуре эндотоксина и составляющих его компонентов в растворе. Методические подходы к изучению таких сложных комплексов, как ЛПБК являются малоразработанными.

Настоящая работа посвящена выделению ЛПБК и изучению физико-химических характеристик комплекса и его составных компонентов — ЛПС и белка.



Микроорганизмы *Yersinia Pseudotuberculosis* 598 (серovar IV) выращивали в течение 18 ч при 4°C как описано нами ранее [2].

Выделение ЛПС и ЛПБК. Высушенную ацетоном микробную массу обрабатывали 5%-ной трихлоруксусной кислотой по методу Буавена [9]. Полученный эндотоксин очищали от сопутствующих примесей гель-фильтрацией на сефарозе 2В и изоплотностным центрифугированием [2]. В результате получали очищенный эндотоксин с соотношением компонентов — полисахарид:белок:липид 10:5:2,5 (по массе). ЛПС экстрагировали из микробной массы 45%-ным водным фенолом по методу Вестфала [20] и очищали от нуклеиновых кислот ультрацентрифугированием при 105000 g.

Выделение белка. Гель-хроматографию ЛПБК проводили на колонке (2,5×66 см) с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl, 0,25% дезоксихолат натрия, 1 мМ ЕДТА, 0,02% NaNO₃ при 37°C. Перед нанесением на колонку образцы ЛПБК выдерживали в течение ночи при 37°C в 3 мл того же буфера. Фракционирование проводили со скоростью 0,3 мл/мин, объем фракции — 2,2 мл. Свободный объем колонки, определенный с помощью синего декстрана 2 мДа (Pharmacia, Швеция), был равен 110 мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (DDC—ПААГ-электрофорез) проводили согласно Лэмли [17]. Фракции ЛПБК с колонки смешивали 1:1 (по объему) с буфером для образцов и перед нанесением на пластинку кипятили 2 мин. Присутствие в буфере для образцов меркаптоэтанола не влияло на вид электрофореграммы. ЛПС, разделенные в геле, окрашивали ионами серебра по методу [14], белки — раствором кумасси G-250 в 3,5%-ной хлорной кислоте [1]. Для определения молекулярной массы полипептидов использовали набор белков маркеров (DDC-6H Sigma, США). Окрашенные на белки гели сканировали на лазерном денситометре 2202 (ЛКВ, Швеция) при 633 нм. Соотношение 40 кДа и 14,5 кДа определяли по площадям соответствующих пиков на денситограмме и допускали, что оба белка на единицу веса связывают одинаковое количество красителя.

Аналитическое центрифугирование. Молекулярные массы и коэффициенты седиментации ЛПБК и ЛПС определяли при концентрации полимеров 0,2—1 мг/мл в трис-НСl буфере (рН 8,0), содержащем 0,1 М NaCl.

Растворы нужной концентрации выдерживали при различных температурах (20 и 45°C) в течение 72 ч. Опыты по скоростной и равновесной седиментации проводили при тех же температурах на аналитической ультрацентрифуге 3170 (МОН, Венгрия) со шпирен-оптикой. Для определения коэффициента седиментации использовали ячейки капиллярного типа при скорости ротора 15000 об/мин. Константы седиментации вычисляли экстраполяцией на бесконечное разбавление с использованием метода наименьших квадратов.

Молекулярные массы ЛПБК и ЛПС определяли методом седиментационного равновесия при 4000 об/мин с использованием шестиканальной ячейки. Средневесовую молекулярную массу M_w рассчитывали путем интегрирования по всей высоте ячейки [4]. Зависимость молекулярной массы ЛПБК от радиального расстояния при 20°C аппроксимировали полиномом второго порядка.

Опыты по скоростной седиментации белка 40 кДа и белка-порина проводили на аналитической ультрацентрифуге УЦА-65 (СССР) с ультрафиолетовой оптикой и системой автоматической регистрации при 20 и 45°C. Для определения коэффициентов седиментации использовали растворы с концентрацией белка 0,15:0,6 мг/мл в трис-НСl буфере (рН 7,3) с 0,25% ЕДТА.

Скорость вращения ротора выбиралась от 20000 до 50000 об/мин.

Константы седиментации находили экстраполяцией на бесконечное разбавление при скорости седиментации 45000 об/мин.



Как известно, в эндотоксине (ЛПБК) белковый компонент представляет собой сложную смесь белков [21]. Ранее нами было показано, что культивирование *Yersinia* при низкой температуре приводит к уменьшению числа белков в наружной мембране этого микроорганизма [6]. В связи с этим для выделения эндотоксинов использовали клетки псевдотуберкулезного микроба, выращенные при 4°C. При равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия эндотоксин собирается в одной зоне с плотностью 1,41 г/см³ и, таким образом, представляет собой комплекс ЛПС и белка.

Очищенный эндотоксин по данным DDC—ПААГ электрофореза содержит два полипептида с молекулярными массами 40 и 14,5 кДа, в соотношении 4:1 (рис. 1).



Рис. 1. SDS-ПААГ электрофорез: 1—ЛПБК; 2,4—40 кДа белок; 5,3—персинин; 1, 2, 3—образцы прогреты в течение 5 мин при 100°C, 4,5— в течение 2 ч при 37°C

Как известно, в эндотоксине белковый компонент прочно связан с ЛПС. В связи с этим исследования белкового компонента ЛПБК тормозятся целым рядом методических трудностей, связанных с выделением его из эндотоксина и последующим фракционированием на составляющие полипептиды.

Для разделения эндотоксиновых компоненты был использован подход, который обычно применяется для выделения белков из мембранных липид-белковых комплексов [13]. При фракционировании на сефадексе G-200 в присутствии детергента 46% агрегатов 40 кДа белка выходит сразу за свободным объемом колонки (рис. 2). Оставшееся количество белкового компонента ЛПБК элюируется с колонок вместе с ЛПС в последующих двух пиках, которые различаются по содержанию белка и количественному белковому составу (рис. 2а). Так, во втором пике обладает 40 кДа белок, в третьем — 14,5 кДа белок. Соотношение 40 и 14,5 кДа для пиков II и III составляет 1,9 и 0,6 (по весу) соответственно; общее содержание белка во втором выше, чем в третьем (рис. 2).

Таким образом, даже после обработки эндотоксина дезоксихолатом натрия, по-видимому, сохраняются комплексы ЛПС и белка.

Известно, что ЛПС, практически свободный от белка, может быть выделен из грамотрицательных бактерий методом Вестфала [20]. Этот метод был использован нами для выделения ЛПС из псевдотуберкулезного

микроба. Полученный ЛПС содержал менее 1% белка и имел в градиенте хлористого цезия плотность 1,45 г/см³.

Ранее нами показано, что ЛПС и ЛПБК из *Yersinia Pseudotuberculosis*, как амфифильные соединения, формируют в водном окружении агрегаты [3]. Высокоупорядоченная струк-

Для определения средневесовой (M_w) и Z-средней (M_z) молекулярной массы ЛПБК и ЛПС был применен метод равновесной седиментации.

При 20°C для всех концентраций ЛПБК график зависимости $\ln C$ от X^2 не был линейным. Кривая, выражающая эту функцию, отклоняется вверх от прямой, что характерно для поли-

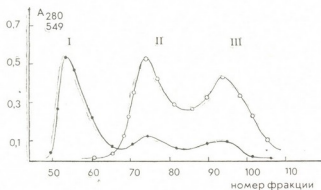


Рис. 2. Гель-хроматография на сефадексе G-200 эндотоксина в присутствии 0,25% дезоксихолата натрия. Выходные кривые построены: 1 — для белка (280 нм); 2 — для 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (549 нм) — специфического моносахарида ЛПС из псевдотуберкулезного микроба; 1 — ●—; 2 — ○—

тура ЛПС агрегатов согласуется с относительно высокой температурой из фазового перехода, которая для различных образцов ЛПС лежит в области 30—40°C [10, 11].

Мы изучили гидродинамические характеристики агрегатов эндотоксина и составляющих его компонентов при двух температурах — ниже 20°C и выше 45°C температуры фазового перехода. Для исследования полученных вышеописанными способами образцов ЛПБК, ЛПС и выделенного из эндотоксина 40 кДа белка использовали метод седиментационного анализа.

Одним из основных требований, предъявляемых к биополимерам при изучении физико-химических свойств, является гомогенность. Критерием гомогенности ЛПБК и ЛПС является гомогенность плотности в градиенте CsCl и единственная граница седиментации для ЛПБК, ЛПС и 40 кДа белка при варьировании скорости центрифугирования.

дисперсных систем. Такая полидисперсность может быть обусловлена самоассоциацией частиц в растворе [8]. Для уточнения этого предположения построены зависимости $\ln C$ от X^2 для разных начальных концентраций ЛПБК. Для каждого эксперимента эту зависимость аппроксимировали кубическим полиномом, по которому вычисляли значение $d \ln C / dx$ и рассчитывали молекулярную массу (M). Анализ показал, что семейство точек $M=f(X)$ на графике хорошо укладывается в одну непрерывную кривую, что соответствует наличию самоассоциации в растворе. В пользу самоассоциации АПБК говорит и характер зависимости коэффициента седиментации от концентрации (рис. 3). Полученные значения M и константы седиментации для ЛПБК приведены в табл. 1.

Результаты седиментационного анализа показывают, что при 20°C ЛПС, по сравнению с ЛПБК, образует более крупные частицы, которые слабо взаимодействуют друг с другом, что следует из линейной зависимости мо-

Гидродинамические характеристики
 ЛПБК, ЛПС и 40 кДа белок

Параметры	ЛПБК		ЛПС		40 кДа белок	
	20°C	45°C	20°C	45°C	20°C	45°C
$S_{C_0} \times 10^{-13}$	26	2,4	11,5	17,2	7,2	2,3 7,2 12
$M_{W_0} \times 10^6$	1,3	0,15	2,3	0,29	н/о	
f/f_0	1,1	4,2	6,5	1,2	н/о	

Примечание: S_{C_0} — коэффициент седиментации при нулевой концентрации;
 M_{W_0} — средневесовая молекулярная масса, определенная методом равновесной седиментации;
 f/f_0 — отношение коэффициентов трения (фактор Перрена)

лекулярной массы от концентрации, а также характера концентрационной зависимости коэффициента седиментации (рис. 3). Превышение молекулярной массы ЛПС в 2 раза, по сравнению с ЛПБК, можно объяснить бо-

связан с липидной частью и может в определенной степени экранировать гидрофобные участки ЛПС. Присутствие белкового компонента в эндотоксине существенным образом влияет и на форму его частиц в

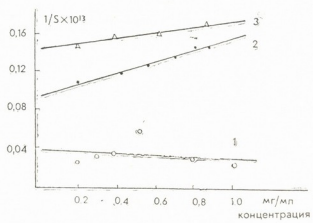


Рис. 3. Концентрационная зависимость коэффициента седиментации: 1 — для ЛПБК; 2 — для ЛПС; 3 — для белка при 20°C

лее сильным гидрофобным взаимодействием между молекулами ЛПС. В случае ЛПБК это взаимодействие, вероятно, ослаблено белковым компонентом, который, как известно [7],

растворе, что следует из сравнения факторов Перрена для ЛПС и ЛПБК, рассчитанных на основании полученных седиментационных данных (табл. 4).

Если при 20°C частицы ЛПБК можно с некоторым приближением аппроксимировать моделью эллипсоида с аксиальным отношением $r \sim 10$, то частицы ЛПС при данной температуре должны иметь более вытянутую форму.

Для определения четвертичной структуры организации молекулы 40 кДа белка из эндотоксина было проведено сравнение с белком-поринном. 40 кДа белок по молекулярной массе, определенной DDC—ПААГ электрофорезом, совпадает с белком-поринном нерсинином, полученным ранее из внешней мембраны *Yersinia Pseudotuberculosis* [5]. Известно, что нерсинин, как и порины других бактерий, в нативной мембране находится в виде тримеров [19].

При электрофорезе в DDC—ПААГе сравниваемые белки без предварительного кипячения образцов давали идентичную картину: в области 120 кДа были обнаружены 3—4 близко-расположенные полосы (рис. 1). Недавно аналогичные электрофореграммы были получены для тримера порина из *E. coli* [16]. Наблюдаемая множественность полос на фореграммах, как полагают, вызвана присутствием в белках-поринах связанного ЛПС.

Белок 40 кДа, выделенный из эндотоксина, и белок-порин проявляли сходные свойства в экспериментах по скорости седиментации при 20°C. При варьировании скорости центрифугирования от 20 000 до 50 000 об/мин в диапазоне концентраций белка 0,1—0,6 мг/мл наблюдается одна полоса, что свидетельствует о гомогенности выделенного 40 кДа белка. Он имеет константу седиментации 7,2 S. Слабовыраженная зависимость

коэффициента седиментации от концентрации и ее линейный характер (рис. 3) указывают на отсутствие самоассоциации между молекулами белка и позволяет с некоторой осторожностью предполагать глобулярную организацию его в растворе [12]. Подобный характер концентрационной зависимости коэффициента седиментации наблюдается для белка-порина. Он имеет близкое значение коэффициента седиментации 7,6 S.

При повышении температуры до 45°C в растворе 40 кДа белка наблюдаются как моно-, так и тримерные формы полимера, с коэффициентами седиментации 2,3 S и 7,2 S, а также крупные образования 12 S.

Для ЛПС и ЛПБК при переходе от 20 к 45°C наблюдается существенная диссоциация агрегатов полимеров, приводящая к образованию монодисперсных частиц с M 290 и 150 кДа соответственно, не склонных к самоассоциации. Причем, диссоциация сопровождается изменением формы частиц как ЛПС, так и ЛПБК. Если в случае ЛПС, повышение температуры способствует образованию более компактных частиц, то для частиц ЛПБК наблюдается переход от компактной формы (при 20°C) к ассиметричной (при 45°C). Такое изменение, вероятно, обусловлено белковым компонентом эндотоксина.

Таким образом, сравнительное изучение гидродинамических характеристик ЛПБК, ЛПС и 40 кДа белка показало, что белок вносит существенный вклад в надмолекулярную организацию эндотоксина как при низких (20°C), так и высоких (45°C) температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гааль Э., Медьши Г., Вереккей Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул, «Мир», М., 1982.
2. Ермак И. М., Фролова Г. М., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биорган. химия, 2, 1270—1275, 1985.
3. Ермак И. М., Ядыгина Г. М., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биофизика, 32, 288—292, 1988.
4. Моравец Г. Макромолекулы в растворах, «Мир», М., 1967.
5. Новикова О. Д., Зыкова Т. А., Ядыгина Г. М., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биол. мембраны, 2, 6, 714, 1985.
6. Соловьева Т. Ф., Ермак И. М., Мороз С. И., Красикова И. Н., Новикова О. Д., Хоменко А. А., Фролова Г. М., Иванова Е. П.,



Тимченко Н. Ф., Оводов Ю. С. Биологические мембраны, 5, 49, 1988.

7. Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биооргани. химия, 9, 6, 725—733, 1983.

8. Barklay A. B., Eason R. Biochim. Biophys. Acta, 269, 1, 37—42, 1972.

9. Boivin A., Mesrobianu L. C. Compt. Rend Soc. Biol., 113, 491—492, 1933.

10. Brandenburg K., Blume A. Thermodynamica Acta, 119, 1, 127—142, 1987.

11. Coaghlin R., Haug A. McCroaty E. H. Biochim. Biophys. Acta, 729, 1, 161—166, 1983.

13. Elias Y. D. Ultrazentrifugen methoden Beckman Instruments, Munchen, 1961, 71—89.

13. Helenius A., Simons K. Biochim. Biophys. Acta, 415, 1, 29—79, 1975.

14. Hitchcock R. I., Brown T. Bacteriol., 154, 1, 269—271, 1983.

15. Hitchcock P. J., Morris G. Handbook of Endotoxin, ed. Proctor R. A., New York, 1985, 1, 300—380.

16. Holzenburg A., Engel A., Kessler R. Biochemistry, 28, 10, 4187—4193, 1989.

18. Leamly A. K. Nature, 4, 227, 680—685, 1970.

18. Lugtenberg B., Van Alpen L. Biochim. Biophys. Acta, 737, 1, 51—115, 1983.

19. Palva I. T., Randoll G. L. Bacteriol., 1, 279—285, 1987.

20. Westphal O., Luderiz O. Eur. J. Biochem., 9, 245—249, 1919.

21. Yamada H., Mizushima G. Eur. J. Biochem., 103, 1, 209—218, 1980.

YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS-ის ინფორმაციის და მისი კომპონენტების ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები

ი. მერმაკი, ს. ბახოლდინა, ვ. ხომენკო, თ. სოლოვიოვა, ვ. სოლოვიოვა, ვ. ფურმანი, გ. სტურუა, გ. გედევანიშვილი

სსრკ მეცნიერებათა აკადემიის შორეული აღმოსავლეთის განყოფილების წყნარ ოკეანის ბიოორგანული ქიმიის ინსტიტუტი, ვლადივოსტოკი

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგური ფიზიკის ინსტიტუტი, თბილისი

რ ე ზ ი უ მ ე

სედიმენტაციური ანალიზის მეთოდებით განსაზღვრულ იქნა ხსნარებში 20° და 45°C-ზე *Yersinia pseudotuberculosis* ბაქტერიიდან გამოყოფილი და გაწმენდილი ლიპოპოლისაქარიდისა (ლპს) და ლიპოპოლისაქარიდცილის კომპლექსების (ლპცკ) ფორმა და მოლეკულური მასა.

შესწავილია 0,25% Na-დღს-ს თანხლებით G-200 სეფადექსის სვეტზე, გელ-ფილტრაციის საშუალებით, გამოყოფილი ლპცკ-ის 40 კდა მასის ცილოვანი კომპონენტის სედიმენტაციური თვისებები.

ასევე ნაჩვენებია 40 კდა ცილისა და ცილა-პორინის იერსინინის ფიზიკო-ქიმიური თვისებების მსგავსებას.

20-დან 45°C-მდე ტემპერატურის ცვლილებისას შეიმჩნეოდა ლპს-სა და ლპცკ-ს აგრეგატების დისოციაცია 290 და 150 კდა მასის მონოდისპერსული ნაწილაკების წარმოქმნით.

ამგვარად ცილოვანი კომპონენტს მნიშვნელოვანი წვლილი შეაქვს ენდოტოქსინის შემოლეკულურ ორგანიზაციაში როგორც დაბალ, ასევე მაღალ ტემპერატურაზე.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ENDOTOXIN FROM YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS AND ITS COMPONENTS

I. M. YERMAK, S. I. BAKHOLDINA, V. A. KHOMENKO, T. F. SOLOVYEVA, V. Ya. FURMAN, M. G. STURUA, G. I. GEDEVANISHVILI

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Centre, Academy of Sciences USSR, Vladivostok
Institute of Molecular Biology and Biological Physics, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

S u m m a r y

Methods of sedimentation analysis have been used to determine the constants of sedimentation and to assess the

form and molecular masses of lipopolysaccharide (LPS) and lipopolysaccharide—protein (LPBC) complexes of purified

endotoxin from *Yersinia pseudotuberculosis* in solution at 20° and 45°C.

Sedimentation properties of the protein 40kDa (according to SDS — gel electrophoresis) component, isolated from LPBC in the presence of 0.25% SDS on the column Sephadex G — 200 have been defined. The similarity of physico-chemical characteristics of the 40kDa protein and protein—purine yersinine are shown.

With temperature changing from 20°C to 45°C one can observe the dissociation of both LPS and LPBC aggregates, with the formation of monodispersed particles with molecular masses 290 and 150kDa, respectively. The protein component is essential for supramolecular organization of endotoxin both at low and high temperatures.

Известия АН Грузии, серия биологическая
(на грузинском, русском и английском языках)

Корректор Д. Р. Арчвадзе

Сдано в набор 15.12.90; Подписано в печать 14.02.91.
Формат бумаги 70×108^{1/16}. Бумага № 1. Высокая печать
6,7 усл.-печ. л. 7,23 кр.-отт. 5,5 уч.-изд. л.
Тираж 1000 экз. Заказ 1873. Цена 1 руб.

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

0127/48

Цена 1 руб.

Индекс 76204



ISSN - 0321-1665 Изв.АН Грузии, сер.биологическая, 1991, т.17, №1, 1-72