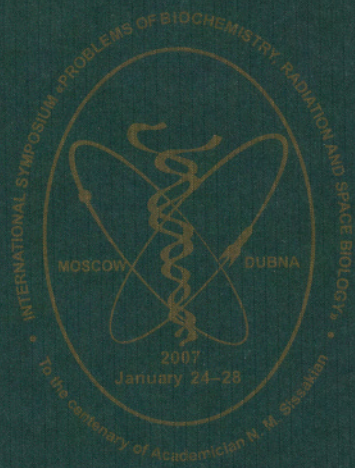


28.072104  
17-781



**ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ, РАДИАЦИОННОЙ  
И КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**  
**III МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ**  
**ПОД ЭГИДОЙ ЮНЕСКО,**  
посвященный 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисакяна

**Труды**

28.072 (04)  
17-781

Российская академия наук  
 Институт биохимии им. А. Н. Баха  
 ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем  
 Национальная академия наук Армении  
 Институт биохимии им. Г. Х. Бунатяна НАН Армении  
 Ереванский государственный университет  
 Международный университет природы, общества и человека «Дубна»  
 Объединенный институт ядерных исследований

## ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ, РАДИАЦИОННОЙ И КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

### III МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ ПОД ЭГИДОЙ ЮНЕСКО,

посвященный 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисакяна  
 Москва, Дубна, 24–28 января 2007 г.

*Труды*

## PROBLEMS OF BIOCHEMISTRY, RADIATION AND SPACE BIOLOGY

### III INTERNATIONAL SYMPOSIUM UNDER THE AUSPICES OF UNESCO

dedicated to the centenary of Academician N. M. Sissakian's birth  
 Moscow, Dubna, January 24–28, 2007

*Proceedings*

Объединенный институт  
 ядерных исследований  
 Дубна, 2007  
 БИБЛИОТЕКА

1448 094



Норайр Мартиросович Сисакян (1907–1966)

УДК [577.1 + 577.391] (042)  
ББК 28.072я434 + 28.089я434  
П78

Под общей редакцией  
академика *А. И. Григорьева* и академика *О. Г. Газенко*

Составители:  
*Г. М. Арзуманян*  
*И. В. Кошлань*  
*А. Н. Сисакян*  
*Г. Н. Тимошенко*

Фото *Ю. А. Туманова, Н. А. Кошлань, С. А. Медянцевой*

**Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии: Труды**  
П78 III Международного симпозиума под эгидой ЮНЕСКО, посвященного 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисакяна (Москва, Дубна, 24–28 января 2007 г.). — Дубна: ОИЯИ, 2007. — 346 с., 28 с. фото.

ISBN 5-9530-0163-0

В настоящий сборник вошли доклады, представленные на III Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», посвященный 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисакяна (Москва, Дубна, 24–28 января 2007 г.).

УДК [577.1 + 577.391] (042)  
ББК 28.072я434 + 28.089я434

#### ОРГАНИЗАТОРЫ СИМПОЗИУМА:

- Российская академия наук
- Отделение биологических наук РАН
- Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН
- ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН
- Национальная академия наук Армении
- Институт биохимии им. Г.Х. Бунатяна НАН Армении
- Ереванский государственный университет
- Международный университет природы, общества и человека «Дубна»
- Объединенный институт ядерных исследований

#### при поддержке:

- Российского фонда фундаментальных исследований
- Юниаструм - банка
- МДМ - банка
- Компании ВЕЯ
- Коммерческо-финансовой компании ТАМП
- НПЦ «Аспект»

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Газенко О.Г.	Россия, РАН, ГНЦ РФ ИМБП	почетный председатель
Григорьев А.И.	Россия, РАН, ГНЦ РФ ИМБП	председатель комитета
Беридзе Т.Г.	Грузия, АН Грузии	
Бурлакова Е.Б.	Россия, ИБХФ РАН	
Войткевич Н.Д.	Россия, ФАНИ	
Габриелян Э.С.	Армения, НАН	
Галоян А.А.	Армения, НАН, ИБХ НАН	
Геворкян Э.С.	Армения, ЕГУ	
Гончар А.А.	Россия, РАН	
Кадышевский В.Г.	ОИЯИ	
Карагезян К.Г.	Армения, ИМБ НАН	
Кирпичников М.П.	Россия, РАН, МГУ	
Ковальчук М.В.	Россия, РАН	
Костюк В.В.	Россия, РАН	
Кузнецов О.Л.	Россия, РАЕН	
Кузьминов В.А.	ЮНЕСКО, ROSTE	
Мазуренко С.Н.	Россия, ФАНИ	
Мартirosян Р.М.	Армения, НАН	
Маш Р.	Франция, АН Франции	
Мур Г.	ЮНЕСКО, ROSTE	
Никогосян А.	США, NASA	
Орджоникидзе Г.Э.	ЮНЕСКО	
Осипов Ю.С.	Россия, РАН	
Островский М.А.	Россия, РАН	
Платэ Н.А.	Россия, РАН	
Попов В.О.	Россия, ИНБИ РАН	
Садовничий В.А.	Россия, РАН, МГУ	
Саркисян Ф.Т.	Армения, НАН	
Сисакян А.Н.	ОИЯИ	
Смбатян А.Б.	Армения, Посольство РА в России	
Спиллантини П.	Италия, НИЯФ	
Тосунян Г.А.	Россия, Российская ассоциация банков	
Чубарян Э.В.	Армения, ЕГУ	

## ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Григорьев А.И.	председатель оргкомитета
Красавин Е.А.	зам. председателя оргкомитета
Попов В.О.	зам. председателя оргкомитета
Юрина Н.П.	ученый секретарь
Кошлань И.В.	ученый секретарь
Арзуманян Г.М.	администратор симпозиума
Авакян Ц.М.	
Будагова Л.Н.	
Геворкян Г.А.	
Мардоян Л.Г.	
Маркосян Л.С.	
Одинцова М.С.	
Орловский А.Ф.	
Петров В.М.	
Сисакян А.Н.	
Сисакян Н.И.	
Тимошенко Г.Н.	
Филиппович И.И.	

Решением 33-й сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО 100-летие со дня рождения академика Норайра Мартиросовича Сисакяна включено

в календарь юбилейных дат ЮНЕСКО на 2006-2007 гг.

III Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» (Москва, Дубна) проходил в период с 24 по 28 января 2007 г. и был организован Российской академией наук, Отделением биологических наук РАН, Институтом биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институтом медико-биологических проблем РАН, Национальной академией наук Республики Армения, Институтом биохимии им. Г.Х. Бунатяна НАН РА, Ереванским государственным университетом, Международным университетом природы, общества и человека «Дубна» и Объединенным институтом ядерных исследований.

Симпозиум стал традиционным местом встреч для биохимиков, радиобиологов и специалистов в области космической биологии и медицины разных институтов и стран. В этом году он имел статус юбилейного и был приурочен к 100-летию со дня рождения академика Норайра Мартиросовича Сисакяна.

Академик Н.М. Сисакян (1907-1966) — крупнейший ученый-биохимик, один из основоположников космической биологии, выдающийся организатор науки и международного сотрудничества ученых. В течение ряда лет академик Н.М. Сисакян был членом Президиума АН СССР, являясь академиком-секретарем Отделения биологических наук и главным ученым секретарем Президиума АН СССР. Норайр Мартиросович являлся действительным членом и вице-президентом Международной академии астронавтики, председателем Комитета по биоастронавтике Международной астронавтической федерации. Он стоял у истоков Пагуошского движения ученых за мир, в 1964-1966 гг. был Президентом XIII сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО.

В работе симпозиума приняли участие свыше 150 ученых из России, Армении, Грузии, Белоруссии, Италии, Канады, США. Было сделано 18 пленарных, 50 секционных и 20 постерных докладов.

Открытие симпозиума состоялось 25 января в Москве в президентском зале РАН. На церемонии торжественного открытия выступили выдающиеся ученые и деятели науки: академики РАН Н.А. Платэ, О.Г. Газенко, А.И. Григорьев, академик НАН РА А.А. Галоян, директор Института биохимии им. А.Н. Баха проф. В.О. Попов, ответственный секретарь Российского Пагуошского комитета РАН М.А. Лебедев. Чрезвычайный и полномочный посол Республики Армения в РФ А.Б. Смбалян зачитал приветственный адрес от Президента Армении Р.С. Кочаряна, приветствие от генерального директора ЮНЕСКО К.Мацууры огласил директор бюро ЮНЕСКО в Москве Дендев Бадарч. Приветственный адрес участникам форума был направлен и руководителем Федерального агентства по науке и инновациям РФ С.Н. Мазуренко.

Во время выступлений было сказано много теплых слов о Н.М. Сисакяне, его огромном вкладе в науку, организаторских способностях, умении сплачивать коллективы и работать с людьми. Особое внимание выступающие уделили преемственности поколений и важности передачи всего лучшего, что было накоплено предшественниками, молодым ученым и исследователям.

В дни работы симпозиума видным ученым и организаторам науки были вручены медали имени академика Н.М. Сисакяна, учрежденные Российской академией естественных наук.

Научную часть программы составили три секции: биохимия; космическая биология и медицина; общая и космическая радиобиология. По единодушному мнению всех участников симпозиума, одной из его характерных особенностей является возможность ознакомиться с разработками, осуществляемыми специалистами, работающими в смежных областях науки. Это значительно обогащает и расширяет научный кругозор биологов, работающих в различных областях современной науки, позволяя сосредоточить внимание на ее актуальных проблемах, дает возможность критического анализа подходов к решению собственных задач в сотрудничестве с коллегами из других институтов и лабораторий.

Итоги работы симпозиума были подведены в ходе заседания круглого стола «Научное наследие академика Н.М. Сисакяна и современные проблемы биохимии и космической медицины», которое проходило под председательством академика НАН РА А.А. Галояна и проф. Е.А. Красавина.

Следует особо отметить активное участие в работе симпозиума молодых ученых. Ими был представлен ряд интересных и перспективных работ. По итогам конкурса докладов молодых ученых было проведено награждение дипломами и премиями (одна первая, две вторые и две поощрительные премии) пятерых молодых ученых и специалистов. Безусловно, работ, достойных награждения, было гораздо больше, и сделать выбор в пользу того или иного доклада было достаточно сложно.

Продолжение юбилейных мероприятий проходило в Армении. Международный симпозиум «Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики» прошел под эгидой ЮНЕСКО 2-4 апреля 2007 г. в г.Ереване и в г.Аштараке, где родился Н.М.Сисакян. Организаторами этого научного форума стали Национальная академия наук Республики Армения, Институт биохимии им. Г.Х. Бунатяна НАН РА, Ереванский государственный университет, Ереванский физический институт им. А.И. Алиханяна, Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Объединенный институт ядерных исследований.

Открытие симпозиума состоялось в зале Президиума НАН РА. С приветствиями выступили президент НАН академик Р.М. Мартиросян и министр культуры Армении А.С. Погосян. Приветствие от имени Президиума РАН зачитал академик РАН М.А. Островский. От имени ОИЯИ участников симпозиума приветствовал сын академика Н.М. Сисакяна, член-корреспондент РАН Алексей Норайрович Сисакян. От имени дирекции и коллектива Института биохимии им. А.Н. Баха с приветственным словом выступила профессор Н.П. Юрина. Ряду видных ученых были вручены медали РАЕН имени академика Н.М.Сисакяна. С пленарными докладами выступили академик М.А. Островский (РАН), академики НАН РА А.А. Галоян и М.А. Давтян, профессор П. Спиллантини (Италия) и другие. Секционные заседания симпозиума

проходили на биологическом факультете Ереванского государственного университета. Работа секций проходила по двум направлениям: биохимия и молекулярная, радиационная биология и генетика.

Нельзя не отметить культурную программу Симпозиума. Участники посетили г. Аштарак, родину Н.М. Сисакяна, школу его имени, дом-музей, возложили цветы к его памятнику, встретились в местном Дворце культуры с жителями города, которые бережно хранят память о выдающемся земляке. Незабываемым было посещение духовного центра Армянской апостольской церкви в Эчмиадзине, где делегация участников симпозиума была принята Каталикосом всех армян Гарегином II. В своем обращении он подчеркнул неразрывную связь армянского и русского народов, культур, общность духовных ценностей. В Институте виноделия и виноградарства НАН, где в 1940-1950 гг. работал Н.М. Сисакян, состоялось открытие мемориальной доски в его память.

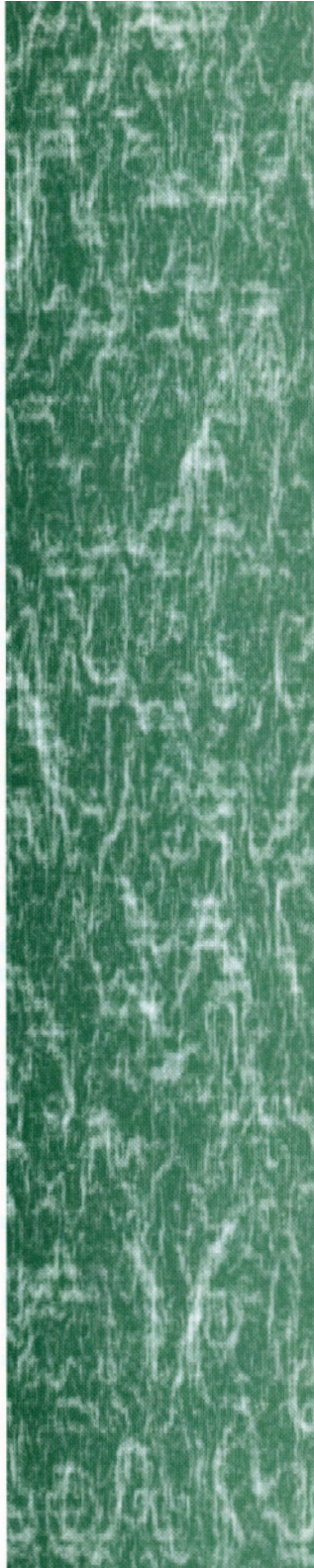
Подводя итоги работы симпозиума, академик А.А. Галоян сказал: «Нас всех сегодня собрал Норайр Мартиросович Сисакян, и мы отдаем глубокую дань памяти этому светилу за тот огромный вклад, который он внес в науку».

*Оргкомитет симпозиума*

Адрес симпозиума в интернете:

[www.sissakian.ru](http://www.sissakian.ru)

# **ВЫСТУПЛЕНИЯ**





## А.И. Григорьев

Академик РАН, академик-секретарь Отделения биологических наук РАН,  
директор ГНЦ РФ – ИМБП

Уважаемые коллеги!

Мне доставляет большое удовольствие приветствовать вас в президентском зале Российской академии наук, и я хочу вас всех поздравить с днем рождения блестящего биохимика, прекрасного биолога, великолепного организатора, человека широчайшей души академика Сисакяна Норайра Мартиросовича. Сегодня, 25 января, исполняется 100 лет со дня его рождения. В этом зале сегодня сидят те, кто имел счастье с ним работать – его ученики, и те, кто не работал с ним вместе, но знал его через его учеников и по публикациям. Мне хотелось бы сказать несколько слов об этом замечательном ученом, который родился в небольшом армянском селении Аштараке. Нам, представителям делегации Российской академии наук, побывавшей два года назад в Армении, удалось увидеть этот город, посетить сельскую школу, где учился талантливый мальчик, рано, в 12 лет, лишившийся мамы. Он с детства тянулся к знаниям, после школы поступил в Ереванский университет, потом перевелся в Ленинградский сельскохозяйственный институт и закончил свое образование в Тимирязевской академии. Талантливый молодой человек был приглашен академиком Д.Н. Прянишниковым в аспирантуру, он рано защитил кандидатскую диссертацию, а через 4 года, в 1940 г., блестяще защитил докторскую диссертацию.

Уже в то время труды Норайра Мартиросовича по биохимии растений были высоко отмечены научной общественностью. Он был приглашен в институт Баха – старейший академический институт, с которым фактически была связана вся дальнейшая научная судьба Норайра Мартиросовича. Около тридцати лет он работал в этом замечательном институте, и основные его научные достижения связаны именно с этим коллективом. У него были удивительные учителя – академик А.Н. Бах и, конечно же, его старший товарищ академик А.И. Опарин. К несчастью, мирный труд был прерван войной. В период войны Норайр Мартиросович занимался в большей степени прикладной биохимией, а не фундаментальной. Я думаю, что об этом подробнее расскажет сегодня В.О. Попов в своем докладе. Им был предложен оригинальный метод сохранения витаминов при сушке овощей, картофеля, что было крайне важно в тот тяжелый период для нашей страны и для армии. После завершения Великой Отечественной войны его фундаментальные исследования продолжились уже в полном масштабе. Они в основном были посвящены клеточной биологии и биохимии растений. Ряд блестящих работ был посвящен хлоропластам. И, наверное, это отдельный, очень важный и очень большой раздел деятельности этого замечательного ученого.

Однако его деятельность не ограничивалась только фундаментальной биохимией. Я имею в виду его работы в области молекулярной биологии, когда в конце 1940-х – начале 1950-х гг. вместе с В.А. Энгельгардтом и другими коллегами он начинал в нашей стране исследования по клеточной молекулярной

биологии, продолжая уделять много внимания аспектам прикладной биохимии. Наши армянские коллеги, наверное, расскажут, какая это была замечательная лаборатория. Несколько лет тому назад мне удалось побывать в этой лаборатории в Ереване, где по-прежнему ощущается дух академика Н.М. Сисакяна и где продолжатели его дела проводят исследования по биохимии растений, в частности, продолжают исследования биохимии вина. Он был одним из тех, кто разработал научные подходы к биохимии виноделия, и эти работы имели и имеют громадное практическое значение. Им был издан прекрасный сборник по биохимии виноделия, который специалисты до сих пор оценивают как замечательный труд в этой области, и, конечно же, эти работы по-прежнему востребованы.

Мне как представителю космической биологии хотелось бы подчеркнуть особую значимость тех исследований, которые проводил академик Н.М. Сисакян в этой области научных знаний. В конце 1950-х гг. эти исследования были начаты О.Г. Газенко, который вместе с Норайром Мартиросовичем стоял у истоков космической биологии. Очень важно было в то время правильно определить основные направления, которые предстояло развивать в ближайшие годы в такой необычной новой области знаний, как космическая биология. И наши учителя во главе с Норайром Мартиросовичем удивительным образом рассмотрели и выбрали наиболее значимые направления развития космической биологии. Это были фундаментальные проблемы влияния гравитации и излучения на физиологические, биохимические механизмы, изменения в различных биологических объектах. Это были и прикладные аспекты космической биологии, такие как создание систем жизнеобеспечения, особенно биологических систем жизнеобеспечения, что, конечно, было ближе академику Н.М. Сисакяну, поскольку он в своей научной деятельности уделял очень много внимания биохимии растений.

Очень интересные работы были выполнены в области космической радиобиологии. Мне удалось познакомиться с фильмом, который был снят в честь этого юбилея. На мой взгляд, фильм получился очень хорошим. Я не знаю, будет ли он показан по телевидению, по-видимому, да, и вы увидите, как начиналась космическая биология и что в настоящее время делается в развитие идей, которые были рождены Норайром Мартиросовичем и его коллегами в конце 1950-х гг. В этой области мы имеем безусловные успехи, и в значительной степени они определены тем, как это все начиналось. Аристотель говорил, что правильное начало – половина успеха, это действительно так. Начало было настолько значимым и настолько правильным, что мы до сих пор, вот уже по прошествии пятидесяти лет, многие из тех проблем, которые были поставлены, считаем важнейшими. Это касается не только вопросов космической биологии, но и вопросов космической физиологии и медицины. Кстати, биолог Н.М. Сисакян многие годы входил в состав главной медицинской комиссии по отбору космонавтов. О.Г. Газенко как врач многие годы возглавлял эту комиссию, и в этой комиссии был ряд выдающихся наших ученых, таких как В.Н. Черниговский и Н. М. Сисакян.

Мне особо хотелось бы сказать о связи академика Н.М. Сисакяна с деятельностью Академии наук. Во-первых, это директорство в Институте биохимии РАН, и мне очень приятно, что здесь присутствует много сотрудников

этого института. ИБХ действительно прекрасный институт, и то, что вы продолжаете наследие Норайра Мартиросовича, – честь и хвала вам за это. Будучи директором института, Норайр Мартиросович был рано избран в Академию наук Советского Союза (членом-корреспондентом, а затем академиком). Это хорошо, что он рано был избран, особенно по теперешним возрастным меркам. Человек он был энергичный, деятельный, очень организованный, и, естественно, это видело руководство академии. Несколько лет он проработал заместителем главного ученого секретаря академии, несколько лет он был академиком-секретарем Отделения биологических наук, а затем, в 1963-м г., он был избран главным ученым секретарем Академии наук Советского Союза. Он пробыл в этой должности не долго, всего три года, но запомнился многим неиссякаемой энергией, самоотверженностью в работе, преданностью Академии наук. Об этом можно прочитать, кстати, в книге, которую выпустили к юбилею Норайра Мартиросовича. Там вы увидите переписку руководства Академии наук по тем или иным вопросам с руководством страны. Здесь присутствуют сотрудники из нашего наукограда Пушкино, а ведь в значительной степени благодаря усилиям Келдыша и Сисакяна удалось начать строительство этого наукограда в те сроки, которые были запланированы в Академии наук, но которые не очень поддерживались некоторыми руководителями Московской области. Сисакян Н.М. был очень деятельным человеком и работал слишком много, по-видимому, это и повлияло на то, что он очень рано ушел из жизни, ведь ему не было еще и 60 лет.

Он запомнился всем работавшим с ним не только как ученый, но и как замечательной души человек. Мне посчастливилось присутствовать на круглом столе и слышать, как его ученики рассказывали тем, кому не привелось с ним работать и кто знает об этом удивительном человеке, в основном, по воспоминаниям, какие теплые, сердечные отношения складывались между ним и его подчиненными. И это несмотря на то, что был он очень требовательным человеком и к себе, и к окружающим и очень немногословным. Это вы можете почувствовать в стихах его сына, Алексея Норайровича, который очень интересно описывает, каким образом отец пытался воспитывать детей, хотя у него практически не было времени на это. Но в семье царил атмосфера науки, витала наука, и супруга его имела отношение к агробиологии, и все дети его стали учеными, сын – член Российской академии наук. Естественно, что в значительной степени это определилось семьей. Может быть, Норайр Мартиросович не очень много внимания уделял воспитанию детей в обычном понимании – помой руки, покажи дневник и т.д. Видимо, не в этом заключается воспитание, воспитывают старшие, главным образом, своим примером. Было очень значимым брать пример с такого человека, представлявшего нашу Академию наук и нашу страну за рубежом. Ведь Норайр Мартиросович нес очень большую нагрузку по участию страны в деятельности различных международных организаций. Мы больше знаем о его работе в ЮНЕСКО, действительно, это было необычно для того времени – представитель СССР был избран председателем сессии этой организации. В знак благодарности ЮНЕСКО сочла возможным год столетия этого блестящего ученого объявить годом Н.М. Сисакяна, это очень приятно. Однако помимо этого он состоял во многих международных космических

организациях и представлял Советский Союз очень достойно. Он стал первым вице-президентом Международной астронавтической академии, Международной астронавтической федерации, впервые возглавил комитет биоастронавтики. По его инициативе в 1961 г. был проведен первый международный симпозиум «Man in Space» – человек в космосе. В этом году, в мае, в Китае пройдет уже пятнадцатый такой международный симпозиум, но начало ему положено Н.М. Сисакианом и его коллегами. Я много могу рассказывать о том большом вкладе, который Нораир Мартиросович внес в достойное представление научной жизни нашей страны за рубежом. И уверяю вас, в 1960-е гг. это было не так просто. Хотя, конечно, наука была тогда на подъеме в Советском Союзе, особенно космическая наука, которую он представлял. Некоторые из вас помнят те первые пресс-конференции после полета Юрия Гагарина и после полета Валентины Терешковой, где вместе с академиком М.В. Келдышем академик Н.М. Сисакиан представлял Академию наук и российскую науку.

Дорогие друзья, у нас есть возможность в течение трех дней (один день в Москве, два дня в Дубне) работать на этом симпозиуме. Мы будем не только делиться воспоминаниями, но будем рассказывать о том, как развиваются те научные направления, которые в свое время начинал этот блестящий ученый. Очень важно и правильно, когда молодые люди в науке знают, чьи идеи они развивают. Конечно же, эти идеи со временем модифицируются, но основные посылки были заложены многие-многие годы тому назад.

Я хочу всех вас поздравить еще раз с днем рождения Нораира Мартиросовича и поблагодарить за то, что вы сочли возможным прийти сюда, в этот зал, где нас всех объединяет Нораир Мартиросович! Дорогие друзья, разрешите мне открыть наш симпозиум и, естественно, первое слово мне хотелось бы предоставить вице-президенту нашей Академии наук Николаю Альфредовичу Платз, который любезно принял приглашение оргкомитета приехать сюда сегодня. Николай Альфредович всегда принимал участие в этих мероприятиях, я думаю, не только потому, что он вице-президент, который курирует биологию, и не только потому, что он многие годы был также удивительно ярким ученым секретарем Академии наук, но и потому, что нас всех притягивает в этот зал личность удивительного ученого и человека Н.М. Сисакиана.

Благодарю за внимание.

Н.А. Платз

Академик РАН, вице-президент РАН

Уважаемые участники симпозиума, коллеги, друзья!

Начну вот с какой простой мысли. Нораир Мартиросович Сисакиан родился 25 января в далеком селе Аштарак. 25 января для России старой и сегодняшней – это праздник молодежи и студенчества. Это невольное совпадение, как мне кажется, символизирует единство, взаимодействие и дружбу армянских и российских людей. Нораир Мартиросович по духу был истинным интернационалистом – человеком, который не разделял никаких националистических идей и заботился о науке с большой буквы, развивая ее и защищая интересы государства. Мне кажется, что пример его жизни: учебы, работы и всей деятельности, очень ярко демонстрирует талант армянского народа, то естественное и родственное единение душ, помыслов, которые объединяют наши две нации.

Так случилось, что я был знаком с Нораиром Мартиросовичем лично. Не могу сказать, что я с ним дружил, так как была большая разница в возрасте и разница в положениях тоже существенная. Первые встречи состоялись в 1965 г., когда я оказался вместе с Нораиром Мартиросовичем в крайне интересной зарубежной командировке. Делегация Академии наук СССР во главе с Мстиславом Всеволодовичем Келдышем отправилась в Англию. Состав делегации был уникален: М.В. Келдыш, Н.Н. Семенов, Н.Н. Боголюбов, Н.М. Сисакиан. Мне посчастливилось оказаться в составе этой делегации. И надо сказать сразу, что Нораир Мартиросович произвел на меня очень сильное впечатление несколькими своими человеческими качествами. Во-первых, феноменальным профессионализмом, образованностью в самых широких областях химии, биохимии, биотехнологии, в государственных делах, даже в использовании атомной энергии. В Англии мы посетили правительственную сельскохозяйственную станцию. Тогда начиналась эпоха биотехнологического развития и приспособления растительных белков для изготовления пищевых продуктов для человека. В нашей стране идею создания искусственной пищи и бифштексов из растительных белков продвигал Александр Николаевич Несмеянов. А в Англии была правительственная программа по переработки белка из травяной массы для того, чтобы сделать что-то съедобное для человека. Нас там угощали этими продуктами, но Нораир Мартиросович сразу не купился на эти блестящие пиаровские ходы наших хозяев и задавал такие вопросы, которые показывали, что этот человек феноменально глубоко все это видит и понимает все хорошие и отрицательные стороны этого дела. Вся наша делегация буквально смотрела Нораиру Мартиросовичу в рот: вот, как Вы скажете, так и будет. И надо представить себе, те, кому приходилось работать с Мстиславом Всеволодовичем, скажет, что это было нехарактерное для президента Академии наук поведение, так как он имел на все свою четкую и жесткую точку зрения. Это была реакция на профессионализм и демонстрацией того, как все эти тоже великие люди относились к Нораиру Мартиросовичу. Вторая черта – это феноменальная

тактичность в обращении с людьми. В нашей делегации было два молодых человека, я был кандидатом наук, но не ощутил никакого высокомерия, никакой «давилочки» авторитетом, наоборот, максимальное уважение к молодому человеку, который оказался в одной компании с маститыми учеными. Я был химиком, специалистом совсем по другой специальности; помню, как он, пытаясь вовлечь меня в круг своих интересов, рассказывал о проблемах биохимических, биотехнологических, относясь совершенно спокойно и уважительно к моим вопросам, которые, может быть, иногда были даже наивными, поскольку это не моя специализация. И вот эта уравновешенность, сбалансированность и такт высочайшего интеллигента, которыми был наделен Нораир Мартиросович, – все это произвело на меня очень сильное впечатление. Спустя какое-то время я встретился с Норайром Мартиросовичем в Институте биохимии, когда мне понадобились от него какие-то консультации. Он меня с удовольствием принял и очень внимательно отнесся. И, как я слышал от многих его молодых учеников, этот человек был так воспитан, воспитан, по-видимому, родителями, но и сам для себя он выбирал такую линию поведения.

Через какое-то достаточно продолжительное время я оказался в служебном кабинете Норайра Мартиросовича в здании Президиума Академии наук, занимая ту должность, которую он занимал за 30 лет до меня. Это было в 1996 г. Я просто стал интересоваться кругом вопросов, которые входили в профессиональную обязанность ученого секретаря. Разбирая какие-то бумаги, читая тексты выступлений, я проникался все большим и большим уважением к государственной деятельности академика Н.М. Сисакяна. Надо отметить, что с присущей ему интеллигентностью, воспитанием и упорством тигра со львом он сражался за интересы Академии наук. Он мог с улыбкой находить какие-то аргументы для правительства, но также мог сжать губы и говорить жесткие слова тем чиновникам, которые не понимали, как ему казалось, в тот момент необходимости принятия решений по развитию науки. И к нему прислушивались. Анатолий Иванович Григорьев совершенно прав, когда вспомнил, что в целом ряде случаев тандем Келдыш-Сисакян во многом определял те положительные прогрессивные шаги в организационном плане, которые в 1960-х гг. удавалось решить Академии наук. А ведь это были совсем не плохие годы для Академии наук и для всей нашей науки. Какой многогранной была личность этого человека, который сумел объединить в своей деятельности отличнейшие свершения фундаментальной и прикладной науки с занятием государственных должностей. Я уже не говорю про космос и медицинские проблемы отбора космонавтов. Вся эта программа проводилась с его участием и очень активно.

Вспомню случай, который я привожу, цитируя Анатолия Ивановича Григорьева, который упомянул, что Норайр Мартиросович занимался виноделием и имел к этому интерес. Мне кажется, трудно представить себе настоящего армянина, который не интересуется хорошим вином. Судьба свела меня с одним из талантливых представителей опять же армянского народа – с Калустом Акоповичем Калунянцем, он заведовал кафедрой виноделия Московского технологического института пищевой промышленности, а я как химик-полимерщик занимался тем, что искал способы стабилизации вин без введения дополнительных консервантов, т.е. способом убирания «опасных» веществ, которые способствовали преждевременному старению хорошего и

доброе вино. Мы вели несколько совместных работ, так вот К.А. Калунянц цитировал Н.М. Сисакяна как бога, как Евангелие от Матфея. Он так к этому относился. И надо сказать, что тогда я тоже прочитал несколько работ Норайра Мартиросовича и увидел, что и в этой области, о которой большинство говорит с улыбкой, но на самом деле там существуют сложные биохимические проблемы, он преуспел и решил много сложных задач.

Я сердечно признателен организационному комитету за честь, которая мне предоставлена, выступить здесь и хотел передать от имени всего Президиума Российской академии наук и от имени президента Академии Юрия Сергеевича Осипова самые лучшие пожелания всем, кто собрался в этом зале, и высочайшие слова уважения к памяти этого очень незаурядного человека, я бы сказал, личности, которая возвышается, как хорошая высокая гора, на которую надо смотреть и, если ты можешь, постепенно приближаться к вершине этой горы. И если нам удастся учиться у человека, который олицетворяет эту гору, то, значит, в жизни нам повезло.

Большое спасибо за внимание.

Добрый день, уважаемые товарищи!

Прежде всего, хочу поблагодарить за возможность сказать несколько слов в день памяти Норайра Мартirosовича Сисакяна. Я не уверен, что уложусь в 10 минут, и, кроме того, я достаточно много выступал с докладами о жизни и деятельности Норайра Мартirosовича, написал воспоминания, поэтому постараюсь сегодня остановиться на тех вопросах, которые раньше не освещал. Прежде всего, это относится к области космической биологии – области, которая живо интересовала и увлекала Норайра Мартirosовича. Я хочу вспомнить о том, как он оказался вовлеченным в эту деятельность. Начало этой работы относится к самому концу 1940-х – началу 1950-х гг., когда на привезенных из Германии частях ракеты ФАУ-2 начались испытания ракетного оружия в «Капустином яру» на границе Оренбургской области. Уже в 1949 г. С.П. Королеву пришла в голову мысль, что стоит использовать пробные суборбитальные запуски ракет для того, чтобы получать полезную научную информацию, которая касалась бы, например, состояния, особенностей и свойств верхних слоев атмосферы. Затем родилась мысль о возможности проведения на этих ракетах и тех, которые будут построены на их основе, биологических экспериментов, поскольку уже тогда он думал о будущих полетах человека в космос. Но он не очень хорошо себе представлял, куда лучше обратиться, чтобы привлечь людей, могущих осуществлять эти биологические эксперименты. Он посоветовался с А.Н. Туполевым, и тот ему сказал, что недавно в Москве организовали Институт авиационной медицины военно-воздушных сил, который ему, Туполеву, и ряду других авиационных конструкторов помогает с точки зрения согласования технических возможностей летательного аппарата с физиологическими возможностями человека. Это послужило основанием для того, чтобы С.П. Королев обратился в военное ведомство и привлек сотрудников этого института к проведению биологических экспериментов.

В 1950-м г. началась подготовка этих исследований, это были полеты с участием собак, и Евгений Александрович Ильин, наверное, нам сегодня об этом расскажет. Испытания проводились на так называемых академических ракетах. Из них значительная часть упала, не успев толком подняться, но все-таки некоторые из них поднялись в атмосферу, экспериментальные кабины отделились и на парашютах спустились на землю. В то время общее руководство научными исследованиями велось по теме «Верхние слои атмосферы», не было и речи о космосе. Только много позже, когда были созданы предпосылки для запуска искусственных спутников Земли, начали говорить об исследовании космического пространства, хотя эти первые ракеты достигали довольно большой высоты, до 200 с лишним километров, то есть фактически выходили в космическое пространство. В первые годы вся научная программа была необычайно секретна, обо всех этих испытаниях знал очень ограниченный круг лиц. Ну, скажем, президент Академии наук, его ближайшие помощники и больше никто. Была создана так называемая «комиссия № 1» под председательством М.В. Келдыша,

которая занималась рассмотрением проектов, представляемых ракетчиками для реализации. Но когда дело дошло до рассмотрения того, что собираются делать представители Института авиационной медицины, то руководители Академии наук были несколько смущены тем, насколько хорошо понимают военные врачи, что они делают. Решили провести выездную сессию Академии наук и Академии медицинских наук на базе этого Института авиационной медицины. Время было непростое, потому что прошла сессия ВАСХНИЛЛ, там кого-то уже «выбили», готовилась объединенная сессия по учению И.П. Павлова, то есть пресс уже был достаточно сильно закручен. Поэтому на той выездной сессии собрались те, кто выжил в этот период времени. Среди людей, которые были на этом совещании от Академии медицинских наук, был академик В.Н. Черниговский (он был и в Академии наук, но одновременно он был вице-президентом Академии медицинских наук). Был в составе этой выездной сессии и Норайр Мартirosович Сисакян, а также ряд других лиц, например, Константин Михайлович Быков, сейчас я не помню всех. Для них, естественно, это направление научных работ тоже было очень свежей областью. Не очень ясно было, что надо делать. Какие-то теоретические предпосылки были, но эти предпосылки относились к периоду 1934 г., когда проходила в нашей стране знаменитая стратосферная сессия, которой руководил Н.И. Вавилов, где была секция биологии и медицины, которой руководили Г.А. Надсон – в то время очень известный микробиолог и Л.А. Арделин – очень известный и авторитетный физиолог. Именно тогда, на сессии 1934 г., была впервые сформулирована программа изучения влияния на живые организмы верхних слоев атмосферы, в частности, в докладе Л.А. Арделина. Так или иначе, было принято решение, что от Академии медицинских наук курировать, наблюдать и контролировать деятельность военных врачей будет академик В.Н. Черниговский, а от Академии наук – академик Н.М. Сисакян. Кроме этого, был привлечен и В.А. Энгельгардт. Таким образом, была обозначена группа лиц, которые должны были нести ответственность перед наукой за то, что делается в этом направлении. Еще раз подчеркиваю, что все было необычайно секретно, название, так скажем, ракеты, лотка для животных не могло нигде писаться. Это писалось так: «агрегат номер такой-то» или «изделие номер такой-то». И это не могла печатать машинистка, это только исполнитель мог от руки чернилами вносить во всех документах, которые шли в контрольные органы и министерство обороны. Вот в это время мне посчастливилось познакомиться и с Владимиром Николаевичем Черниговским, и с Норайром Мартirosовичем Сисакяном. Этому способствовало то обстоятельство, что в то время у меня уже был автомобиль, и я мог быстрее передвигаться по Москве – поэтому мне и было поручено поддерживать связь с академическими учреждениями. Здесь была совсем другая атмосфера, в отличие от военной среды, это была другая планета. Здесь люди относились друг к другу доброжелательно, с интересом и, что очень важно, с уважением. Словом, я хочу сказать, что лично для меня этот период жизни окрашен знакомством, контактами и общением с людьми с другой планеты. Но планеты очень хорошей, интеллигентной, умной и дающей очень много для выполнения тех задач, которые были поставлены сначала небольшой, а потом все возрастающей по

численности группе военных врачей, которые занимались развитием космической медицины.

Нужно сказать, что участие Академии наук было своеобразным. Оно подразумевало, прежде всего, ознакомление наших академических наблюдателей с полученными результатами. Они их должны были просматривать, давать необходимые рекомендации, замечания и визировать. Только после этого сверхсекретные отчеты приобретали вид, который мог быть пригоден для отправки руководству. Интересно, что та часть, которая касалась этих работ в чисто физиологической части, а именно: операционная подготовка животных, разработка некоторых физиологических датчиков, методик наблюдения исследований – это все было отнесено к компетенции В.Н. Черниговского. А то, что вытекало из планов 1934 г., – общебиологические и эволюционные подходы к развитию этих исследований – всем этим занимался Нораир Мартиросович. И надо сказать, занимался очень эффективно, потому что, как уже сегодня об этом говорил А.И. Григорьев, он был очень широко образован в общих проблемах биологии. Нам всем было очень приятно общаться и работать с ним. Он был очень внимательным и доброжелательным человеком, хотя был и, как справедливо было сказано сегодня, строг и требователен. Но лично я ему бесконечно признателен, потому что чувствовал, что он ко мне хорошо относился. Мне посчастливилось бывать не только в его кабинете на работе, но и у него дома, познакомиться с его великолепной семьей.

Я ему обязан также, в каком-то смысле, карьерой. Я вспоминаю, как-то я приехал к нему в академию. И поскольку я курил довольно много, то стоял в коридоре перед входом в его кабинет и курил около пепельницы. Нораир Мартиросович вышел в приемную и спросил: «А где тут профессор Газенко?» А я не был тогда профессором. Его секретарь, Людмила Ивановна, сказала: «Я сейчас его позову». Я все слышал, поскольку дверь была открыта. Зашел к нему в кабинет и сказал: «Нораир Мартиросович, мне как-то неловко, вы меня называете профессором, а я ведь не профессор». – «Как так не профессор?!» – «Ну, не профессор». Он взял трубку и позвонил В.П. Елютину (министру образования СССР): «Послушайте, Газенко, оказывается, не профессор, как такое может быть?!» Не знаю, что тот ему ответил, но он меня спросил: «Какая у вас официальная должность?» – «Заведующий отделом». – «У вас есть сотрудники, которые диссертации пишут, и сколько?» Я ответил: «Семь человек». Словом, он договорился с Елютиным, чтобы я стал профессором, и я им стал! Вот так это было в то время.

Спасибо за внимание.

Е.А. Ильин

Зам. директора по науке ГНЦ РФ – ИМБП, руководитель программы биологических исследований на беспилотных объектах

Глубокоуважаемые коллеги!

Прежде всего, мне хотелось бы выразить благодарность оргкомитету за предоставленную возможность выступить на симпозиуме, посвященном 100-летию со дня рождения выдающегося ученого, нашего соотечественника, академика Нораира Мартиросовича Сисакяна.

Для российской космонавтики 2007 г. богат событиями, юбилейными датами, юбилеями людей, которые внесли существенный вклад в развитие нашей космонавтики и создание новых областей естествознания, космической биологии. В этом году мы будем отмечать 150-летие со дня рождения К.Э. Циолковского, 100-летие со дня рождения С.П. Королева, 110-летие со дня рождения А.Л. Чижевского. Естественно, не могу не напомнить, что в этом году исполняется 50 лет со дня запуска первого в мире искусственного спутника Земли и 50 лет с момента первого полета живого существа в околоземном пространстве. Другими словами, для России 2007 г. можно с полным основанием назвать годом Космоса.

Примечательно то, что вклад академика Н.М. Сисакяна, его идей, его взглядов в создание и развитие космической биологии является исключительно большим. Как академик-секретарь Отделения биологических наук Академии наук СССР и как человек широкой эрудиции он всячески помогал, поощрял проведение первых биологических экспериментов в космосе. Как ученый-биохимик он проводил исследования аминокислотного состава белковой фракции хлореллы, одного из потенциальных компонентов биологических систем жизнеобеспечения для будущих длительных, скорее всего, межпланетных космических полетов. Естественно, как сегодня уже отмечалось, академик Н.М. Сисакян работал в тесном контакте с ведущими учеными нашей страны, вовлеченными в космическую деятельность, – это академик О.Г. Газенко, академики В.Н. Черниговский, В.В. Парин, профессор А.М. Генин. Работа в таком тесном контакте позволила впервые группе ученых нашей страны в 1962 г. подробно описать предмет космической биологии, перечень ее проблем и задач, перечень факторов космического полета и космического пространства, их возможного неблагоприятного влияния на организм и, естественно, наметить перспективы дальнейших исследований применительно к межпланетным полетам, к жизни на Земле. В 1962 г. Академия наук СССР стала издавать сборник «Труды и проблемы космической биологии». В первом томе этих трудов был ряд основополагающих и теоретических статей, которые фактически явились фундаментом космической биологии и предопределили ее дальнейшее развитие. На первом месте в то время стояла проблема исследования влияния факторов космического пространства, естественно, включая факторы космического полета на процессы жизнедеятельности организмов. Поскольку сам Нораир Мартиросович уделял внимание процессам жизнедеятельности растительных организмов, то его, конечно, в большей степени интересовал вклад этих объектов в создание будущих космических систем жизнеобеспечения. Безусловно, его

также интересовала такая проблема, как формы и условия жизни на других планетах. К сожалению, в докладе мы не можем подробно остановиться на всех проблемах космической биологии. Тем не менее постараюсь подробно изложить ту первую проблему, которую мы обозначили в докладе, и те основные задачи, которые в этой проблеме имеются.

Одна из важнейших задач, как совместно со своими коллегами писал Н.М. Сисакян, — это изучение влияния факторов космического полета на различные стороны жизнедеятельности земных организмов с тем, чтобы на основании этих исследований решить вопрос об их возможном повреждающем действии и о разработке каких-то средств защиты. Уже в 1962 г. стоял вопрос о том, что человека и живые организмы, которые будут отправлять в космос, придется защищать от вредоносного воздействия факторов космического пространства. Первым орбитальным экспериментам предшествовали запуски геофизических ракет, на которых были проведены значительные эксперименты на собаках. В экспериментах участвовало более 60 собак. Некоторых из них запускали по несколько раз в верхние слои атмосферы, но максимальная длительность экспозиции к условиям невесомости и воздействия космической радиации составляла всего-навсего 20 минут. В 1957 г., буквально через месяц после запуска первого искусственного спутника Земли, был проведен исторический эксперимент с первым живым существом, которое отправили в космос по околоорбитальной орбите. Эксперимент был запланирован таким образом, что собаки лайки должны были прожить на орбите 7 дней, и ту информацию, которую получали по каналам телеметрии, предполагалось использовать для будущих полетов человека. Однако случилось так, что неполадки в системе терморегулирования кабины с животными привели к тому, что через 5 ч полета температура повысилась до 41° С и, естественно, это был предел переносимости живым организмом такой температуры, что привело к фактическому прекращению эксперимента. Тем не менее первые три витка ученые получали хорошего качества информацию о состоянии животных. Расстояние, на которое передавалась информация, составляло 300 км от Земли, и фактически это было началом телемедицины, того направления, которое сейчас очень успешно развивается и в нашей стране, и за рубежом. В это время у С.П. Королева уже были планы посылки в космос человека. Стали изготавливать соответствующие аппараты для полета человека. В период, предшествующий первому полету человека в космос, в 1960 — 1961-м гг., были проведены запуски кораблей «Восток», модифицированных под задачи проведения экспериментов над животными. Основной целью этих экспериментов являлась проверка жизнедеятельности высокоорганизованного живого организма при полетах длительностью около 29 ч, оценка безопасности на всех этапах полета, оценка работы систем обеспечения жизнедеятельности и оценка работ систем телеметрии. Фактически вся эта программа исследований на кораблях «Спутник» (это их официальное название) была направлена на решение вопроса о возможности запуска человека в космос и возможности его безопасного полета. Эти исследования, в ходе которых на Землю передавался большой объем телеметрической информации, плюс многочисленные исследования, которые проводились после окончания полета, позволили сделать вывод о том, что полет человека в космос возможен.

В предшествующих выступлениях говорили о Норайре Мартиросовиче как об ученом. Он был не просто выдающимся ученым, но большим энтузиастом и замечательным организатором науки. По его инициативе в системе Академии наук СССР было создано десять лабораторий, которые занимались проблемами космической биологии. Главную роль в этих исследованиях выполнял Авиационный институт, который впоследствии был переименован в Институт космических и авиационных исследований Министерства обороны СССР. Норайр Мартиросович внес большой вклад не только в космическую биологию, но и в космическую медицину. Он работал в комиссии по оценке готовности космонавтов к космическим полетам. Он руководил комиссией по формированию научных и биологических программ исследований в космосе. На пресс-конференции «Утро космической эры», которая проводилась после полета Юрия Алексеевича Гагарина, академик Н.М. Сисакян вместе с академиком А.Н. Несмеяновым выступили перед мировым сообществом с научными докладами по итогам этого исторического полета.

К сожалению, получилось так, что после первых успешных космических полетов интенсивность проведения биологических исследований в космосе несколько снизилась. Тем не менее космическая биология продолжала развиваться. Буквально через два года после создания Института медико-биологических проблем его сотрудниками был проведен эксперимент на двух собаках в космическом полете продолжительностью 22 дня, что само по себе явилось огромным достижением. В то время максимальная продолжительность полетов космонавтов составляла 5 суток. На основании этого эксперимента учеными были сделаны выводы, которые значительно опережали развитие космонавтики. Эти 22 дня полета выявили, что длительное пребывание в невесомости приводит к существенным изменениям в мышечной системе, в скелетной системе, в сердечно-сосудистой системе, в метаболизме организма. Когда эти данные были проанализированы, специалисты в области космической биологии и медицины пришли к однозначному выводу, что дальнейшие длительные космические полеты просто невозможны без применения в полете средств защиты от неблагоприятного действия невесомости. Таким образом, экспериментально было показано, что в рамках космической медицины необходимо развивать направление разработки средств защиты и профилактики от действия космических факторов.

В конце 1960-х — начале 1970-х гг., когда в нашей стране стала активно проводиться работа по созданию орбитальных станций и по осуществлению на них длительных космических полетов человека, интерес к биологическим исследованиям в космосе существенно поднялся и активизировался. Правительством было выпущено постановление о создании специальных спутников для биологических исследований с целью решения проблем космической медицины, для обеспечения полетов человека различной продолжительности и различного назначения. Когда эта программа стала формироваться, то, естественно, пришлось снова обратиться к тем основополагающим работам академика Н.М. Сисакяна, академика О.Г. Газенко и их коллег, которые были опубликованы в 1962 г. Была открыта комплексная программа «БИОН» для физиологических, морфологических исследований по оценке механизмов возможного повреждающего действия факторов космического

также интересовала такая проблема, как формы и условия жизни на других планетах. К сожалению, в докладе мы не можем подробно остановиться на всех проблемах космической биологии. Тем не менее постараюсь подробно изложить ту первую проблему, которую мы обозначили в докладе, и те основные задачи, которые в этой проблеме имеются.

Одна из важнейших задач, как совместно со своими коллегами писал Н.М. Сисакян, — это изучение влияния факторов космического полета на различные стороны жизнедеятельности земных организмов с тем, чтобы на основании этих исследований решить вопрос об их возможном повреждающем действии и о разработке каких-то средств защиты. Уже в 1962 г. стоял вопрос о том, что человека и живые организмы, которые будут отправлять в космос, придется защищать от вредоносного воздействия факторов космического пространства. Первым орбитальным экспериментам предшествовали запуски геофизических ракет, на которых были проведены значительные эксперименты на собаках. В экспериментах участвовало более 60 собак. Некоторых из них запускали по несколько раз в верхние слои атмосферы, но максимальная длительность экспозиции к условиям невесомости и воздействия космической радиации составляла всего-навсего 20 минут. В 1957 г., буквально через месяц после запуска первого искусственного спутника Земли, был проведен исторический эксперимент с первым живым существом, которое отправили в космос по околокруговой орбите. Эксперимент был запланирован таким образом, что собаки лайки должны были прожить на орбите 7 дней, и ту информацию, которую получали по каналам телеметрии, предполагалось использовать для будущих полетов человека. Однако случилось так, что неполадки в системе терморегулирования кабины с животными привели к тому, что через 5 ч полета температура повысилась до 41° С и, естественно, это был предел переносимости живым организмом такой температуры, что привело к фактическому прекращению эксперимента. Тем не менее первые три витка ученые получали хорошего качества информацию о состоянии животных. Расстояние, на которое передавалась информация, составляло 300 км от Земли, и фактически это было началом телемедицины, того направления, которое сейчас очень успешно развивается и в нашей стране, и за рубежом. В это время у С.П. Королева уже были планы посылки в космос человека. Стали изготавливать соответствующие аппараты для полета человека. В период, предшествующий первому полету человека в космос, в 1960 – 1961-м гг., были проведены запуски кораблей «Восток», модифицированных под задачи проведения экспериментов над животными. Основной целью этих экспериментов являлась проверка жизнедеятельности высокоорганизованного живого организма при полетах длительностью около 29 ч, оценка безопасности на всех этапах полета, оценка работы систем обеспечения жизнедеятельности и оценка работ систем телеметрии. Фактически вся эта программа исследований на кораблях «Спутник» (это их официальное название) была направлена на решение вопроса о возможности запуска человека в космос и возможности его безопасного полета. Эти исследования, в ходе которых на Землю передавался большой объем телеметрической информации, плюс многочисленные исследования, которые проводились после окончания полета, позволили сделать вывод о том, что полет человека в космос возможен.

В предшествующих выступлениях говорили о Норайре Мартиросовиче как об ученом. Он был не просто выдающимся ученым, но большим энтузиастом и замечательным организатором науки. По его инициативе в системе Академии наук СССР было создано десять лабораторий, которые занимались проблемами космической биологии. Главную роль в этих исследованиях выполнял Авиационный институт, который впоследствии был переименован в Институт космических и авиационных исследований Министерства обороны СССР. Норайр Мартиросович внес большой вклад не только в космическую биологию, но и в космическую медицину. Он работал в комиссии по оценке готовности космонавтов к космическим полетам. Он руководил комиссией по формированию научных и биологических программ исследований в космосе. На пресс-конференции «Утро космической эры», которая проводилась после полета Юрия Алексеевича Гагарина, академик Н.М. Сисакян вместе с академиком А.Н. Несмеяновым выступили перед мировым сообществом с научными докладами по итогам этого исторического полета.

К сожалению, получилось так, что после первых успешных космических полетов интенсивность проведения биологических исследований в космосе несколько снизилась. Тем не менее космическая биология продолжала развиваться. Буквально через два года после создания Института медико-биологических проблем его сотрудниками был проведен эксперимент на двух собаках в космическом полете продолжительностью 22 дня, что само по себе явилось огромным достижением. В то время максимальная продолжительность полетов космонавтов составляла 5 суток. На основании этого эксперимента учеными были сделаны выводы, которые значительно опережали развитие космонавтики. Эти 22 дня полета выявили, что длительное пребывание в невесомости приводит к существенным изменениям в мышечной системе, в скелетной системе, в сердечно-сосудистой системе, в метаболизме организма. Когда эти данные были проанализированы, специалисты в области космической биологии и медицины пришли к однозначному выводу, что дальнейшие длительные космические полеты просто невозможны без применения в полете средств защиты от неблагоприятного действия невесомости. Таким образом, экспериментально было показано, что в рамках космической медицины необходимо развивать направление разработки средств защиты и профилактики от действия космических факторов.

В конце 1960-х – начале 1970-х гг., когда в нашей стране стала активно проводиться работа по созданию орбитальных станций и по осуществлению на них длительных космических полетов человека, интерес к биологическим исследованиям в космосе существенно поднялся и активизировался. Правительством было выпущено постановление о создании специальных спутников для биологических исследований с целью решения проблем космической медицины, для обеспечения полетов человека различной продолжительности и различного назначения. Когда эта программа стала формироваться, то, естественно, пришлось снова обратиться к тем основополагающим работам академика Н.М. Сисакяна, академика О.Г. Газенко и их коллег, которые были опубликованы в 1962 г. Была открыта комплексная программа «БИОН» для физиологических, морфологических исследований по оценке механизмов возможного повреждающего действия факторов космического



полета на живые системы с целью разработки рекомендаций по возможным длительным полетам человека. В рамках этой программы в период с 1973 г. по 1996 г. было запущено одиннадцать биологических спутников, максимальная длительность их полета составляла двадцать два дня и, в отличие от того периода секретности, который был до начала 1960-х гг., эта программа, начиная с третьего полета, превратилась в международную программу. В этой программе участвовали практически все европейские страны, США, Канада и Китай. Спектр объектов исследований при реализации программы «БИОН» был достаточно широк. Имн являлись как простейшие микроорганизмы (одноклеточные бактерии), так и высокоорганизованные организмы (крысы, обезьяны), т.е. для того чтобы ответить на вопросы, которые стояли перед космической биологией, был выбран широкий спектр объектов исследования (более 20 наименований различных видов организмов, стоящих на различных уровнях онтогенеза, генетического и эволюционного развития). Исследования, которые проводились по программе «БИОН», можно условно разделить на несколько направлений: гравитационное, физиологическое, радиобиологическое. Отдельно изучалась проблема искусственной силы тяжести. Что показали проведенные исследования? Они не выявили какого-либо повреждающего влияния невесомости и космической радиации, характерной для орбит, по которым проходили полеты, на клеточный цикл, на наследственный аппарат клетки, на внутриклеточные процессы. И, к удивлению ученых, не было обнаружено нарушений в эмбриональном и онтогенетическом развитии организмов, которые находились в отсутствие земной силы тяжести. Вместе с тем при проведении исследований физиологического плана был выявлен огромный перечень функциональных, структурных и метаболических изменений в различных системах организма. Скрупулезный анализ этих изменений выявил, что они носят обратимый характер, не являются патологическими, и спустя некоторое время после окончания полета происходит нормализация функций всех исследованных систем организма. На основании полученных результатов была подробно описана феноменология, изучен механизм развития этих изменений. Результаты отражены в многочисленных публикациях и коллективных монографиях, изданных Институтом медико-биологических проблем.

Академика Н.М. Сисакяна и многих других исследователей интересовала проблема полетов на другие планеты. Одним из вопросов, который стоял перед исследователями, было изучение влияния вспышек на Солнце и влияние невесомости на радиационную чувствительность организмов. Для того чтобы ответить на эти вопросы, на одном из спутников был установлен  $\gamma$ -облучатель с источником  $^{137}\text{Cs}$ . На десятые сутки полета в невесомости было проведено облучение животных в дозах, приводящих к развитию лучевой болезни. Далее полет продолжался еще десять суток, а затем исследования были продолжены на Земле. Результаты исследования показали, что невесомость существенно не модифицирует острые радиационные эффекты. Коэффициент модификации был близок к единице, и только по некоторым показателям, прежде всего, по показателям крови коэффициент составил 1,2. Обращаю внимание, что это было показано именно для острых доз облучения. Если же рассматривать полет без таких острых воздействий, а как комбинированное действие невесомости и повышенных уровней космической радиации, то, к сожалению, эта проблема до

сих пор остается нерешенной. В нашем институте мы только планируем 500-суточный эксперимент на обезьянах, воздействуя на них хроническим излучением с тем, чтобы можно было представить истинную картину отдаленных последствий и экстраполировать ее на человека. Это делается с целью обеспечения безопасности полетов человека на Марс. Если развивать тему будущих межпланетных полетов, то одной из проблем в рамках задачи разработки средств профилактики и защиты человека от неблагоприятного действия длительной невесомости является проблема создания искусственной гравитации в космическом полете. Впервые в программе «БИОН» на ряде спутников проводились исследования с использованием бортовых центрифуг, которые во время полета создавали искусственную силу тяжести (такую же, как на Земле). Сравнительные исследования биологических объектов, находящихся в условиях искусственной гравитации, показали, что идея Циолковского о целесообразности создания искусственной силы тяжести в будущих межпланетных полетах находит экспериментальное подтверждение. Это направление заслуживает того, чтобы его продолжать в наземных и в будущих межпланетных условиях. Несмотря на успехи нашей пилотируемой космонавтики и исследования по программе «БИОН» многие вопросы еще остаются открытыми. В частности, мы полагаем, что в будущих исследованиях нам надо больше уделить внимания исследованиям на молекулярном и молекулярно-генетическом уровне. Мы полагаем, что проблема онтогенеза при многократной репродукции также продолжает оставаться актуальной. Ее актуальность обусловлена необходимостью создания биологических систем жизнеобеспечения. Применительно к марсианскому полету представляется важным изучить протекание в космическом полете различных патологических проявлений и заболеваний. Естественно, важна проблема условий возникновения и распространения жизни во Вселенной. Если говорить о ближайших планах, то это биологические исследования на космическом аппарате «Фотон». В 2010 г. мы планируем продолжить программу «БИОН» на очередном биологическом спутнике. В новой федеральной космической программе России предусматривается три запуска таких космических аппаратов. В 2010 г. планируется участие в программе полета космического аппарата на Фобос (спутник Марса), где мы планируем провести биохимические, геологические исследования проб грунта на предмет возможного обнаружения жизни на этих планетах.

Биологические исследования, которые нами проведены, имеют существенное значение для космической медицины, для решения проблем будущих межпланетных полетов, но уже сейчас многие результаты внедрены в клинику. Некоторые результаты используются для более глубокого понимания роли естественной земной силы тяжести в процессах жизнедеятельности, в процессах функционирования различных систем и органов организмов. В этой связи представляется, что все то, что писали в 1962 г. академик Н.М. Сисакян, академик О.Г. Газенко, профессор А.М. Генин, было научным предвидением того, что исследования по космической биологии позволят не только найти решения, связанные с будущими межпланетными полетами человека, но они будут способствовать построению наиболее общих концепций биологии, касающихся проблем жизни вообще. Спасибо за внимание.

А.А. Галоян

Академик НАН РА, директор Института биохимии им. Г.Х. Бунатяна НАН  
Армении

Глубокоуважаемый Николай Альфредович, глубокоуважаемый Анатолий  
Иванович, глубокоуважаемый Алексей Норайрович, уважаемые участники  
конференции!

Прежде всего, хочу выразить Президиуму Российской академии наук, оргкомитету симпозиума благодарность за оказанную честь выступить в день открытия III Международного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», посвященного 100-летию со дня рождения великого сына Армении и России, крупнейшего биохимика XX века академика Норайра Мартиросовича Сисакяна. Делегация Армении низко склоняет головы перед светлой памятью нашего великого соотечественника академика Норайра Мартиросовича Сисакяна. Я не собираюсь в предоставленное мне время дать полную характеристику многогранной деятельности академика Н.М. Сисакяна для Армении. Ее результаты хорошо известны, опубликованы во многих статьях крупных ученых нашей страны.

Позвольте весьма кратко подчеркнуть наиболее важные аспекты вклада академика Н.М. Сисакяна в развитие биохимии и биологических наук Армении, которые органически переплетаются со всеми другими успехами, которых он достиг в России. Вместе с тем в выступлении хотел бы отметить непрерывность научного сотрудничества, о чем говорил академик Н.А. Платэ, относительно срастания проблем академий наших стран и раньше, и сейчас. О необходимости сохранения и приумножения российско-армянских научных связей всегда говорил академик Н.М. Сисакян, который сам был примером этой великой дружбы между Россией и Арменией. Ознакомившись с архивными материалами, перепиской ученых Армении и Н.М. Сисакяна, можно сделать вывод о его огромной роли в развитии наук Армении, в частности биологических наук. Существованию науки гидрохимии в Республике Армения мы во многом обязаны академику Н.М. Сисакяну, который в течение нескольких лет боролся с правительственными чиновниками, чтобы доказать крайнюю необходимость для малоземельной Армении гидрохимии и гидропоники. Вот что пишет об этом академик Г.С. Давтян в письме к Н.М. Сисакяну: «Дорогой Норайр-джан, моя лаборатория стала футбольным мячиком. Помогите мне сохранить эту лабораторию». Именно Норайр Мартиросович через правительство Армении и Президиум Академии наук СССР добился сохранения этого научного центра в Армении и, более того, вместе с Г.С. Давтяном принял самое активное участие в установлении наиболее важных и фундаментальных направлений развития этого учреждения. Сегодня этот институт успешно и продуктивно работает под руководством члена-корреспондента НАН РА С.Х. Майрапетяна. Необходимо подчеркнуть огромный вклад академика Н.М. Сисакяна в развитие биохимии виноделия, о чем очень красноречиво говорили в предшествующих выступлениях. Ныне Институт виноделия успешно и продуктивно работает. Под руководством Н.М. Сисакяна проводились многочисленные многосторонние исследования биохимии виноградной лозы и плода в процессе роста и развития растения. Он уделял

большое внимание химическим особенностям многих сортов армянского винограда с целью выяснить те особенности и потенциальные возможности, использование которых позволило бы получить высококачественное вино и коньяк.

К этому времени уже были известны выдающиеся открытия Н.М. Сисакяна, касающиеся субклеточных частиц растений и животных, которые, по сути дела, стали фундаментом для развития молекулярной биологии и физико-химической биологии в наших странах. По его инициативе в Ереване в Институте виноделия и виноградарства была создана специальная лаборатория биохимии винограда, ее научным руководителем и консультантом долгие годы был именно Н.М. Сисакян. Проведенные уникальные исследования хересных вин позволили организовать производство по выпуску этих вин на его родине в Аштараке и в Крыму. Производимые вина по своему качеству не уступали известным во всем мире испанским и португальским хересным винам.

Велики заслуги Н.М. Сисакяна в подготовке научных кадров в области биохимии, биотехнологии и физико-химической биологии как в России, так и в Армении. Многие его ученики до сих пор успешно работают в научных центрах наших стран. Н.М. Сисакян также уделял пристальное внимание молекулярно-генетическим свойствам различных сортов пшеницы Армении. Указанная проблема в свое время заинтересовала великого русского ученого академика Николая Вавилова, который был в Армении и дал высокую оценку генетическим особенностям сортов пшеницы. Н.М. Сисакян совместно со своим учеником Л.С. Маркосяном проводили исследования биохимических особенностей различных сортов пшеницы, произрастающих в различных климатических зонах: высокогорных, предгорных и в долинах Армении.

В Армении Н.М. Сисакяном были заложены основы новых направлений фундаментальной и прикладной биохимии по производству пищевых продуктов, столь важных тогда для нашего народа. Н.М. Сисакян способствовал также созданию новых лабораторий биохимии в Институте ботаники и биохимии микроорганизмов, в Институте биохимии Академии наук Армении. Были созданы новые биотехнологии для получения аминокислот, сахаристых веществ, этанола, органических кислот, инулина и крахмала. По инициативе Н.М. Сисакяна в целях развития космической биологии в Институте микробиологии НАН РА были развернуты под руководством академика НАН РА Э.Г. Африкяна исследования по биоразрушению синтетических материалов, применяемых в космических аппаратах. Получены оригинальные данные по биоразрушению полимеров, а также биологической безопасности компонентов замкнутой системы. Более того, Институт микробиологии НАН РА был головным институтом СССР в области исследования биоразрушающего действия микроорганизмов на полимеры и синтетические материалы.

Академик Н.М. Сисакян вместе с академиком В.А. Амбарцумяном и академиком Г.Х. Бунатяном сыграли большую роль в организации Института биохимии НАН РА. В Институте биохимии открыты новые гормональные системы мозга, выяснены нейрохимические основы регуляции иммунной системы мозга. Задачи функциональной нейрохимии – раскрыть физико-химические и молекулярно-генетические основы физиологических феноменов, открытых крупнейшими нейробиологами России: И.М. Сеченовым, И.П. Павловым,

А.И. Веденским, А.А. Ухтомским, Х.С. Коштоянцем, А.Ф. Самойловым и другими, которые заложили основы фундаментальной нейрохимии. Как видите, мы опять являемся свидетелями вклада Российской академии наук в развитие нейрохимии и других нейробиологических наук Армении и других стран. Продолжается тандемная система Россия – Армения, и крайне важно в настоящее время продолжить лучшие традиции сотрудничества наших стран. До распада Советского Союза Институт биохимии РАН был координационным центром нейрохимии в СССР, и мне выпала честь, по предложению академика С.Е. Северина и Е.М. Крепса, долгое время возглавлять научную сессию по нейрохимии научного совета по биохимии человека и животных Академии наук СССР. Учитывая прогрессирующее развитие нейрохимии в Армении, директивные органы СССР и Президиум Академии наук СССР в 1981 г. постановили создать совместный журнал «Нейрохимия», что являет собой еще один пример успешной тандемной работы академий наук Армении и России. После развала СССР по экономическим причинам журнал не мог выпускаться в Армении. Россия пришла на помощь, и в настоящее время этот журнал издается издательством «Наука» под главной редакцией академика А.А. Галояна. Что важно, журнал полностью переводится в США.

Недавно в Москве состоялось совместное заседание Президиума Академии наук Российской Федерации и Национальной академии наук Республики Армения, где был заключен новый договор о сотрудничестве двух академий наук. Этот договор был подписан вице-президентом РАН академиком Н.А. Платэ, который сыграл огромную роль в подготовке этого документа. Из шестидесяти шести совместных тем двадцать четыре относятся к биологическим наукам. Думаю, что данное соглашение имеет историческое значение, что важно именно в этот период развития отношений наших двух стран. Мы почувствовали исключительную доброжелательность и глубокое понимание значимости совместных исследований ученых Армении и России. Члены Президиума Российской академии наук оказали самое большое внимание ученым Армении, что является залогом дружбы и успехов наших дальнейших совместных исследований. Мы имеем 35-летний опыт сотрудничества Академии наук России и научных центров Армении. Институт биохимии им. Г.Х. Бунатяна НАН РА долгие годы имел лабораторию в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН. Именно в этом центре нам удалось развернуть широкий фронт исследований по установлению новых гормональных систем мозга, имеющих важное значение в понимании роли мозга в регуляции иммунной системы организма. Стартом для начала широких новых исследований и открытия нами кардиоактивных и иммуномодуляторных нейрорганов мозга было заседание Президиума Академии наук СССР 28 июня 1967 г. Для меня было большой честью предложение президента Академии наук СССР академика Мстислава Всеволодовича Келдыша выступить с докладом об открытии нами новых гормонов мозга. Именно после этого заседания были открыты возможности финансирования и продолжения наших работ. Как мы видим, опять успешно действует тандемная система. Буквально на днях в архивных документах прочитал письмо академика В.А. Амбарцумяна к академику Н.М. Сисакяну с просьбой помочь в развитии этих исследований с Чехословацкой академией наук. После поддержки Н.М. Сисакяна эти совместные работы стали возможны. За

последние три года совместно с учеными Института биологии гена РАН нами проведены совместные исследования в лаборатории члена-корреспондента РАН Л.И. Корочкина по изучению действия открытых нами новых нейрорганов цитокинов на молекулярно-генетические механизмы гематопоэза костного мозга. Это очень важно для медицины, для космонавтики, так как речь идет об иммунной системе, о защитных механизмах крови и т.д. Изучение регуляторов костного мозга играет огромную роль в развитии иммунологии, гематологии, трансплантации и т.д., имеет, безусловно, огромное практическое значение. За указанное время нами получено достаточное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о специфичном воздействии этих гормонов на стволовые клетки костного мозга. Академик Г.П. Георгиев на последнем заседании Президиума РАН поднял вопрос о необходимости создания совместной лаборатории в Институте биологии гена РАН для ведения дальнейших эффективных исследований.

Позвольте сказать несколько слов о феномене Н.М. Сисакяна. В своих воспоминаниях о нем академик С.Е. Северин писал: «Это удивительный (это слово он повторяет неоднократно) человек, который жил, работал для других. О себе он думал в последнюю очередь». Удивительный феномен Сисакяна этим не ограничивается. Именно Норайр Мартиросович Сисакян до 16 лет не получил даже начального школьного образования. Большому его научному подъему было уделено всего-навсего 30 лет. За это время он успел создать новую школу по биохимии и молекулярной биологии. Заложил основы для развития различных областей физико-химической биологии. Сыграл ведущую роль в развитии космической биологии, стал крупным организатором Академии наук СССР и одной из выдающихся личностей XX века. Кроме его генетической предрасположенности, могучего таланта, большого интереса к науке важнейшую роль в развитии его таланта сыграла научная среда России. Именно академик А.Н. Бах, один из основателей биохимической науки XX века, был его научным руководителем. Он по-отечески помогал и следил за научным ростом своего ученика. Об этом неоднократно говорил сам Н.М. Сисакян. Именно среди крупнейших российских ученых выросла большая плеяда армянских ученых: академик Л.А. Орбели, который одно время был вице-президентом Академии наук СССР; директор Эрмитажа, крупнейший востоковед академик И.А. Орбели, братья Алиханьяны, академик В.А. Амбарцумян и др. В этом секрет феномена Сисакяна, и мы должны четко представлять это, потому что нынешнему молодому поколению необходимо знать о благотворном влиянии российской науки. В период политических и экономических баталий необходимо свято беречь российско-армянские отношения и активно действовать по сохранению жизнеутверждающей роли России в развитии науки в Армении. Полагаю, что с такими мыслями Норайр Мартиросович Сисакян обратился бы к нам сейчас, ибо ориентация армян на Россию имеет многовековые исторические корни.

Хочу сказать несколько слов о человеческом подвиге Н.М. Сисакяна. В тяжелое для страны время он встал на защиту опальных ученых. В период организованных нападков на генетику, крупных генетиков и трагический период смерти одного из ее корифеев Н.И. Вавилова проявился феномен Сисакяна – гуманиста, крупного мыслителя и истинного патриота России.

Удивительна его прозорливость и активная деятельность по созданию научных контактов с крупными зарубежными учеными армянского происхождения. Мне посчастливилось два раза встретиться с Норайром Мартиросовичем. Это было в 1957 г., тогда я только защитил кандидатскую диссертацию, и надо было встретить зарубежного профессора Манасе Севака (крупнейшего в мире биохимика микроорганизмов) для того, чтобы развить это направление в Советском Союзе и, в частности, в Армении. Позвонил президент нашей академии В.А. Амбарцумян: «Знаешь, тебе надо зайти к Н.М. Сисакяну и Х.С. Коштоянцу. Вам надо организовать встречу зарубежного коллеги и отправить его в Армению». Кабинет Сисакяна находился на втором этаже в Президиуме Академии наук СССР, и, безусловно, я с некоторой опаской вошел в приемную, но, к своему удивлению, был очень скоро и радушно принят. Технические вопросы были решены достаточно быстро, более того, Н.М. Сисакян спросил о моем мнении по составу встречающей делегации и согласился с тем, что ему также надо быть в числе встречающих. Это было правильным решением, так как даже в машине Н.М. Сисакян и Х.С. Коштоянц живо обсуждали перспективные задачи биохимии микроорганизмов.

В заключение еще раз хочу восславить талант этого великого и истинного ученого XX века. Наша задача – продолжить развивать наследие Н.М. Сисакяна в будущем.

Спасибо за внимание.

**В.Ю. Хомич**

Академик РАН, руководитель Российского фонда фундаментальных исследований

Дорогие коллеги, друзья!

От имени Российского фонда фундаментальных исследований хочу поприветствовать Вас и поблагодарить за ту работу, которую Вы проводите сейчас. Проводя эту конференцию, Вы делаете очень важный вклад в современную науку. Хочу несколько слов добавить от своего имени. К сожалению, мне не довелось лично встречаться с Норайром Мартиросовичем Сисакяном, но я являюсь учеником его сына, выдающегося ученого Иосифа Норайровича Сисакяна. И хочу сказать, может быть, даже такую неожиданную вещь. Вы знаете, Н.М. Сисакян внес очень большой вклад в фундаментальную науку: в физику, в научное приборостроение, в ядерную физику, в филологию – через своих детей. Наверно, по пальцам можно пересчитать семьи в нашей стране, в которых все дети стали бы выдающимися, замечательными учеными. Людмила Норайровна – выдающийся филолог. Иосиф Норайрович (рано ушедший от нас) был основоположником компьютерной оптики. Про Алексея Норайровича мне даже неудобно говорить, вы все его прекрасно знаете, он член Академии наук, выдающийся физик, директор Объединенного института ядерных исследований. Это вклад Норайра Мартиросовича Сисакяна через детей в развитие этих областей науки и через учеников его детей, которых немало сидит в этом зале. Мы впитали ту мудрость, которая наполняла эту семью. Я очень много слышал от Иосифа Норайровича о семье. Отец для него был непререкаемым авторитетом и учителем как в науке, так и в жизни. У него было два таких учителя – дедушка (по материнской линии) и отец. И эти унаследованные знания и мудрость он пытался передать уже своим ученикам. Поэтому большое спасибо Вам, большое спасибо семье и, естественно, большое спасибо Норайру Мартиросовичу Сисакяну, который так много сделал для науки и заложил эти семена в своих детей и в нас, в учеников его учеников.

Спасибо.

**А.Б. Смбалян**  
Посол Республики Армения в России

Уважаемые члены Российской академии наук, дамы и господа, дорогие друзья! Для меня огромная честь как для посла находиться здесь среди вас, среди научной элиты России, и мне особенно приятно, что здесь присутствует такая представительная делегация из Армении. Как я вижу, сюда приехали крупнейшие ученые – академики из Еревана, чтобы вместе с вами участвовать в симпозиуме, посвященном 100-летию со дня рождения Н.М. Сисакяна. Я думаю, что это очень хороший шаг для восстановления той творческой атмосферы, которая была, как вы говорили, в 1960-1970-е гг. Позвольте мне зачитать телеграмму от президента Армении Роберта Седраковича Кочаряна.



ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ՆՊԽԱԳԱԿԻ ԱՇԽԱՏԱԿԱԾՐ  
АППАРАТ ПРЕЗИДЕНТА РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

ТЕЛЕГРАММА

От: Президента Республики Армения, г-на Р.С. КОЧАРЯНА  
24 января 2007 г., гор. Ереван

Участникам Международного симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии," посвященного 100-летию академика Норайра Сисакяна

Приветствую организаторов и участников Международного симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии," посвященного 100-летию академика Норайра Мартirosовича Сисакяна.

Академик Сисакян имел огромный вклад в становление и развитие космической биологии и медицины. Но что еще более важно он всей своей жизнью служил примером человеколюбия и гуманности. Именно это отражено в решении ЮНЕСКО о включении юбилея академика Сисакяна в календарь юбилейных дат престижной международной организации.

Он искренне верил и вносил исцеляющий вклад в развитие науки без границ. Символично, что юбилейные мероприятия будут проводиться и в Армении, и в России, на базе Объединенного института ядерных исследований г. Дубна, деятельность которого целиком соответствует духу международного сотрудничества, заложенному в свое время академиком Сисакяном.

Еще раз приветствуя участников симпозиума, желаю интересной и плодотворной работы.

**Роберт КОЧАРЯН**

**Дендев Бадарч**  
Руководитель офиса ЮНЕСКО в Москве

Уважаемый господин председатель, уважаемые участники конференции, дамы и господа!

Позвольте мне поприветствовать Вас от имени генерального директора ЮНЕСКО Коитиро Мацууры и поздравить с открытием симпозиума, посвященного 100-летию со дня рождения крупного ученого и выдающегося международного деятеля академика Н.М. Сисакяна. Мне выпала большая честь зачитать послание генерального директора ЮНЕСКО по этому случаю.

**Message from Mr Koïchiro Matsuura,**  
**Director-General of UNESCO**  
**on the occasion**

**of the Third International Symposium**

**"Problems of Biochemistry, Radiation and Space Biology"**  
**dedicated to the centenary of Academician Norair Sissakian**

**24 January 2007**

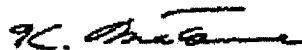
I am honoured to send my greetings to the Third International Symposium on "Problems of Biochemistry, Radiation and Space Biology", which is being held to commemorate the 100<sup>th</sup> anniversary of the birth of Academician Norair Sissakian. His name has added a truly remarkable page to the history of our Organization. At the decision of the 33<sup>rd</sup> session of UNESCO's General Conference, the centenary of Norair Sissakian has been included in the list of celebrations of anniversaries associated with UNESCO in 2006 and 2007.

The memory of this outstanding scholar and organizer of scientific activities lives on in UNESCO, and among people in science, culture and education worldwide. Norair Sissakian was a member of both the UNESCO Advisory Board on research in the fields of mathematical and natural sciences, and the UNESCO Executive Board. From 1964 to 1966 he was also President of the 13<sup>th</sup> Session of UNESCO's General Conference – the first time in the history of this Organization that such a high position was occupied by a citizen of your great country. Academician Sissakian initiated many promising international projects. One such example is the Soviet-American project, "Backgrounds of Space Biology and Medicine", and another is the Russian-American five-volume "Space Biology and Medicine". He

was one of the organizers of the Fifth International Biochemical Congress, held in Moscow in 1961, recognized as one of the world's most prestigious fora for scientists. He was Vice-President of the International Astronautics Academy and Chairman of the Bioastronautics Committee of the International Astronautics Academy. During the Cold War, Norair Sissakian initiated the symposium "Man and Space", which has now met for 45 years under the auspices of UNESCO. His contribution to the promotion of a culture of peace was also remarkable. His activity in UNESCO was inspired by the idea of developing peaceful co-existence among states through fruitful international cooperation. Norair Sissakian was convinced that science belongs to everybody, that cooperation unites peoples and nations, and that those who solve problems together would never kill each other. Though absorbed by the problems of space biology and medicine, he was first and foremost a citizen of the planet earth who considered the world as a single, great Motherland, a home for all nations to live in peace and love. In space research itself, he dreamed of participating in a great project uniting the efforts of different countries and peoples that would make space flights available for all of humanity. Academician Norair Sissakian disappeared at the young age of 59. But this short life included so much! He connected the vastness of space with earth's horizons. He started on his journey in the Armenian village of Ashtarak, at the foot of the famous Mount Ararat, and completed it within the walls of a scientific research laboratory. The marks of his great life also exist in outer space. One of the craters on the Moon was named after Norair Sissakian. As you know, UNESCO promotes international cooperation among its Member States and Associate Members in the fields of education, science, culture and communication in order to achieve the most ambitious goal: to build peace in the minds of men. UNESCO is working to create the conditions for genuine dialogue based upon respect for the shared values and dignity of each civilization and culture.

We must take as our guide the global vision of sustainable development based upon the observance of human rights, the promotion of mutual understanding and the alleviation of poverty, all of which lie at the heart of UNESCO's mission and activities. Today's Symposium offers an opportunity to address vital topics of international research in the sphere of the life sciences. It is an invitation to extend the borders of human knowledge and to unveil the mysteries of the universe. The partnership of scientists is highly valued by UNESCO, and this Symposium furnishes an excellent chance to strengthen our cooperation still further.

I wish you every success in your common work.



Koichiro Matsuura

БЛАНК ПРАВИТЕЛЬСТВЕННОЙ  
ТЕЛЕГРАММЫ

УЛ. ЖОЛНО-КЮРИ, 6  
Г. ДУБНА, МОСКОВСКАЯ ОБЛАСТЬ, 141980  
ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ДИРЕКТОРУ ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЧЛЕНУ-КОРРЕСПОНДЕНТУ РАН СИСАКЯНУ АЛЕКСЕЮ НОРАЙРОВИЧУ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И ИННОВАЦИЯМ ПОЗДРАВЛЯЕТ  
ВСЕХ УЧАСТНИКОВ И ОРГАНИЗАТОРОВ III МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА  
«ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ, РАДИАЦИОННОЙ И КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ»  
НАЧАЛОМ РАБОТЫ.

ЗАДАЧИ, РЕШАЕМЫЕ БИОХИМИЕЙ, РАДИАЦИОННОЙ И КОСМИЧЕСКОЙ  
БИОЛОГИЕЙ, ИМЕЮТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПОНИМАНИЯ  
САМИХ ОСНОВ ЖИЗНИ НА ПЛАНЕТЕ, ЕЁ ЭВОЛЮЦИИ И ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ  
ВЕКОВОЙ МЕЧТЫ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА - ВЫХОДА ЧЕЛОВЕКА В ДАЛЬНИЙ  
КОСМОС.

ВАШ СИМПОЗИУМ ПРИУРОЧЕН К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ  
КРУПНОГО УЧЕНОГО-БИОХИМИКА АКАДЕМИКА НОРАЙРА МАРТИРОСОВИЧА  
СИСАКЯНА, СТОЯВШЕГО У ИСТОКОВ КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ В СССР.

УВЕРЕН, ВАШ СИМПОЗИУМ ПОСЛУЖИТ УКРЕПЛЕНИЮ МЕЖДУНАРОДНЫХ  
СВЯЗЕЙ И ОТКРОЕТ НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ПЛОДОТВОРНОГО НАУЧНОГО  
СОТРУДНИЧЕСТВА.

ЖЕЛАЮ УСПЕШНОЙ РАБОТЫ ВАШЕМУ ФОРУМУ!

РУКОВОДИТЕЛЬ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА  
ПО НАУКЕ И ИННОВАЦИЯМ

С.Н. МАЗУРЕНКО

Тверская ул., д.11, стр.1  
Москва, 125009

Руководитель  
Федерального агентства  
по науке и инновациям  
С.Н. Мазуренко

Дорогие коллеги, друзья!

Для меня это уникальная возможность выступить сегодня, в день столетия отца. В первую очередь хочу сказать слова благодарности вам за то, что вы храните память об отце, храните память об истории, о людях того поколения, к которому принадлежал отец. Потому что это было великое поколение. На нем стоит сегодняшняя наука, в том числе и в России. Конечно, хочу выразить слова благодарности членам семьи судьбе за то, что она подарила нам счастье быть детьми такого отца. Тогда, когда мы были детьми, нам казалось, что все так и должно быть. Может быть, мы даже обижались на то, что он уделяет нам мало внимания. Но сейчас, по прошествии многих лет, мы понимаем, что нам в жизни очень повезло. Вспоминая об отце, а мы делаем это каждый день, мы сверяем свои поступки с тем масштабом, который он задал. Я часто вспоминаю слова, которые принадлежат Герцену (удивительно, что он это сказал, так как образ, который он нарисовал, скорее, был бы присущ какому-нибудь биохимику). Он сказал: «Личность подобна бродильному ферменту, который, даже умирая, продолжает действовать на окружающую среду». Удивительно, почему Герцену эта мысль пришла в голову, но я думаю, что этот образ имеет к папе прямое отношение, и один из примеров тому – сегодняшний день. Папа более сорока лет тому назад ушел из физической жизни, но по-прежнему продолжает собирать людей. Сегодня он собрал нас с вами в этом зале нового здания Академии наук. Кстати, задание на проект этого здания был подписан им как главным ученым секретарем Академии наук совместно с Мстиславом Всеволодовичем Келдышем. Надо сказать, что благодаря папе даже в эти последние очень тяжелые для науки годы не раз собирались биологи Армении, России и других стран. Биологи собирались с физиками, что тоже очень ценно.

Это не отмечено ни в какой биографии, но я могу точно сказать, что это так. Папа говорил нам, что в детстве он хотел стать физиком или математиком. Его больше привлекали точные науки, но время было особенное, и путевки комсомола были тогда только на агрономический факультет Ереванского университета. Он пошел и стал биологом, но нас он подталкивал к физико-математической стезе. И то, что завтра наше совещание продолжится в Дубне, тоже символично, так как это тоже союз биологов и физиков, который должен быть. Надо сказать, что слова о единении науки я очень часто слышал от папы, так же как и от своих учителей. В науке эти слова слышал от Николая Николаевича Боголюбова. Игорь Евгеньевич Тамм об этом очень часто говорил так, что когда-то наступит век, когда физика и биология дадут вместе очень большой прорыв вперед и биология станет царицей всех наук. Мне кажется, что сейчас мы стоим на пороге этого великого события, которое позволит и продлить жизнь человека, и решить много других проблем. Главное, чтобы политики все это правильно понимали, а ученые готовы здесь активно работать.

Если продолжить рассматривать феномен этого могучего бродильного фермента, то сегодня в зале больше половины людей, которые папу вообще

никогда не видели. Михаил Александрович Лебедев, который выступал с докладом о Пагуошском движении, – внук Михаила Дмитриевича Миллионщика, вице-президента Академии наук СССР. Они с папой были большими друзьями, и в дачных поселках было много совместных встреч. Как видим, эти связи передаются в поколениях через детей и учеников, но многие люди попали в орбиту папиного влияния, уже не имея никаких генетических связей и взаимоотношений учитель-ученик. То ли при работе над фильмом, то ли работая над книгой, то ли при подготовке других материалов, то ли, казалось бы, попадая в эту орбиту случайным образом. Но это все равно важно, так как личность папы обладает уникальной способностью притягивать к себе людей, даже физически отсутствуя.

Конечно, было трудное время, но был всплеск в науке и было многое, что сделало отца таким, каким он был. Но главную роль в его жизни сыграла наша мама. Сегодня ее надо обязательно вспомнить. Она отказалась не только от карьеры ученого. Будучи носительницей сильных российских генов, она помогала папе ориентироваться в российской обстановке. Надо сказать, что всегда есть такие подробности, может, они кажутся незначительными, тем не менее они также характеризуют человека. Папа всегда очень тщательно готовился к своим выступлениям, потому что все-таки родной его язык был армянский. Учась действительно очень короткое время и очень короткое время действуя в науке (так уж судьба распорядилась), он знал достаточно много иностранных языков, но по-русски он говорил с акцентом. И перед каждым выступлением он садился с мамой и тренировался правильно произносить слова. Так было буквально до последних дней его жизни. Мама была его другом и советчиком. Она всю себя отдала нам и пожертвовала своей научной жизнью ради детей, внуков и правнуков. И сегодня мы действительно имеем право говорить о некоей научной династии, которая существует сейчас.

Вчера, кстати, исполнилось сто лет со дня рождения маминого брата Алексея Петровича Алексеева, который был папиным другом и познакомил маму с папой семьдесят шесть лет тому назад. Он был ученым-агрохимиком, кандидатом наук, майором советской армии и погиб в 1944 г. – так все это в жизни переплетается. То, что папа и то великолепное поколение, к которому он принадлежал, передали нам, считаю нашим святым долгом передать следующему поколению – это абсолютное, трепетное и святое отношение к науке, к научному результату, вот к этой науке, которая не есть работа, отличная от жизни, к науке как к элементу жизни. Перефразируя Станиславского, можно сказать, что они любили науку в себе, а не себя в науке. И если это отношение к науке передается следующему поколению, то думаю, что это будет очень важным результатом деятельности моего поколения по отношению к молодому поколению. Конечно, очень правильно говорили все выступавшие, и те слова в фильме, о котором шла речь, и то, что говорил Р.М. Мартirosян (президент Национальной академии наук Армении), что и дела, и имя папы принадлежат и России, и Армении. Так оно и есть. Папа, конечно, очень любил и армянские, и российские традиции и был гражданином и сыном Советского Союза, которого сегодня, к сожалению, уже не существует. Вместе с тем по мироощущению он был гражданином планеты Земля. Отсюда его активная и успешная деятельность в ЮНЕСКО, в Пагуошском движении. Трудно, конечно, объять все сферы его деятельности, но надо сказать,

что он оставил своих учеников в Белоруссии, Грузии, Казахстане, Чехии, Словакии и даже маленькой Чувашии, т.е. он действительно был человеком, который был открыт для всего мира. Надо сказать, что он даже иногда обижался, когда к нему обращались за помощью и говорили, к примеру, что родом из Аштарака, – в сердцах он говорил, что зачем это говорить, потому что он бы и так помог. Потому что у него была очень открытая душа и мироощущение, которое исходило из общности людей, которые не должны делиться на национальности. Было мироощущение, что и науки не делятся на науки. Наука едина, и все деление происходит в нашем сознании, и это политические условности. Конечно, надо ценить традиции любого народа и ценить традиции любого научного направления.

Век физический, который был отпущен папе; короткий, но, тем не менее, сегодня мы отмечаем его век. Если мы сохраним традиции его поколения, то век этот продолжится дальше и дальше...

Спасибо.





25 января 2007 г., Москва, Президентский зал РАН. Открытие международного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», посвященного 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисаяна.

Слева направо: член-корреспондент РАН А. Н. Сисаян, академик А. Н. Тавхелидзе, чрезвычайный и полномочный посол Республики Армения в России А. Б. Смбатян, почетный председатель симпозиума академик О. Г. Газенко, председатель симпозиума академик-секретарь Отделения биологических наук РАН академик А. И. Григорьев, вице-президент РАН академик Н. А. Платэ, директор Института биохимии РАН профессор В. О. Попов, академик НАН РА А. А. Галоян, директор бюро ЮНЕСКО в Москве Д. Бадарч



Пленарное заседание



Вице-президент РАН академик Н. А. Платэ открывает пленарное заседание



Выступает почетный председатель симпозиума академик О. Г. Газенко



Выступает директор Института биохимии им. А. Н. Баха РАН профессор В. О. Попов



Чрезвычайный и полномочный посол Республики Армения в России А. Б. Смбатян зачитывает приветственный адрес Президента Республики Армения Р. С. Кочаряна



Выступает директор Объединенного института ядерных исследований член-корреспондент РАН А. Н. Сисакян — сын академика Н. М. Сисакяна



Слева направо: член-корреспондент РАН А. Н. Сисакян, академик НАН РА Э. Г. Африкян, историк Е. Р. Курапова



Участники и гости симпозиума возложили венки и цветы к памятнику академика Н. М. Сисакяна на Новодевичьем кладбище в Москве (авторы памятника: скульптор Р. Мурадян, архитектор Р. Бекунц).  
На фото вверху Л. Н. Будагова-Сисакян и А. Н. Сисакян — дети академика Н. М. Сисакяна



Слева направо: ученый секретарь симпозиума И. В. Кошлань, член-корреспондент РАН А. Н. Сисакян, администратор симпозиума Г. М. Арзуманян, ученики академика Н. М. Сисакяна — доктор биологических наук М. С. Одинцова, академик АН Грузии Т. Г. Беридзе





26 января, Дубна, Дом международных совещаний.  
Выступает чрезвычайный посланник посольства Армении в РФ А. Б. Манукян.  
За столом президиума справа налево: академик В. Г. Кадышевский,  
зам. главы г. Дубны С. Ф. Дзюба, профессор Е. А. Красавин,  
академик НАН РА А. А. Галоян, член-корреспондент РАН А. Н. Сисакян



Постерная секция. Молодые участники симпозиума и А. Н. Сисакян



Слева направо: академик НАН РА А. А. Галоян, профессор Г. А. Геворкян,  
профессор А. А. Трчунян, профессор Е. А. Красавин



В зале заседаний



Доклад профессора П. Спиллантини (Италия)



Ректор Международного университета природы, общества и человека «Дубна» профессор О. Л. Кузнецов (справа) и директор ОИЯИ А. Н. Сисакян



Профессор С. М. Авакян (слева) и член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян



Доктор филологических наук Л. Н. Будагова-Сисакян и академик НАН РА А. А. Галоян



Президент РАЕН О. Л. Кузнецов вручает диплом и медаль им. академика Н. М. Сисакяна, учрежденные Российской академией естественных наук, профессору Л. С. Маркосяну — ученику академика Н. М. Сисакяна



Слева направо: ученый секретарь симпозиума Н. П. Юрина, профессор Н. В. Карапетян, академик Т. Г. Беридзе



Секционное заседание



Доктор физико-математических наук А. В. Шафиркин (слева) и академик М. А. Островский







А. Н. Сисакян и Г. М. Арзуманян с победителями конкурса молодых ученых



Ереван–Аштарак, 2–4 апреля 2007 г.  
Делегация приглашенных участников на симпозиуме «Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики», посвященном 100-летию со дня рождения академика Н. М. Сисакяна



Группа участников симпозиума в Доме международных совещаний в Дубне



Ереван, Президиум НАН РА. Президент Национальной академии наук Республики Армении Р. М. Мартиросян открывает симпозиум



Участники пленарного заседания



Пленарное заседание в Ереванском государственном университете



Ереванский государственный университет.  
У кафедры декан биологического факультета профессор Э. С. Геворкян.  
В президиуме крайний справа — ректор ЕГУ член-корреспондент НАН РА  
А. Г. Симонян. Крайний слева — академик НАН РА М. А. Давтян



Памятник Н. М. Сисакяну  
на его родине в г. Ашгараке  
(скульптор А. Авакян,  
архитектор Г. Гюрджиан)



А. Н. Сисакян делает запись  
в книге для почетных гостей



Эчмиадзин, центр Армянской апостольской церкви.  
Делегация участников симпозиума на приеме у Католикоса всех армян Гарегина II



В своем выступлении Католикос  
всех армян Гарегин II отметил  
неразрывную связь армянского  
и русского народов, их культур,  
общность духовных ценностей



*Симпозиум  
в лицах*

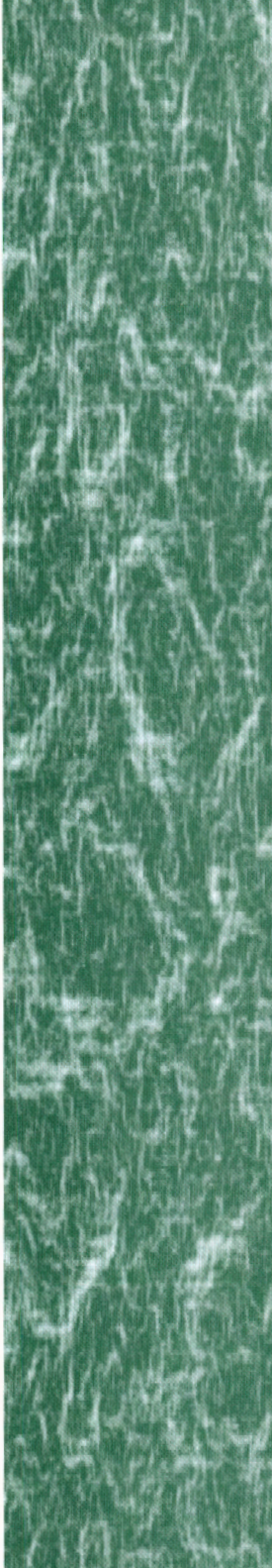








**ПЛЕНАРНЫЕ  
ДОКЛАДЫ**





## ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОЗАЩИТА У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Карапетян Н.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, nkarap@inbi.ras.ru

Свет является не только источником энергии для фотосинтеза; избыток света ведет к фотодеструкции фотосинтетического аппарата. Фотосинтезирующие организмы способны к диссипации избыточной энергии, ведущей к стабилизации фотосинтетического аппарата. Оптимальный фотосинтез зависит от баланса между поглощением энергии возбуждения и использованием при фотосинтезе, т. е. от соотношения активность/стабильность фотосинтетического аппарата. Конечная эффективность фотосинтеза определяется не только активностью переноса электрона и фиксации  $\text{CO}_2$ , но и стабильностью фотосинтетического аппарата. Диссипация избыточной энергии происходит с участием фотосинтетических пигментов: те же пигменты (хлорофиллы, каротины) участвуют как в фотосинтетическом превращении энергии света, так и в диссипации избыточно поглощенной энергии.

Процессы миграции энергии возбуждения в пигментной антенне, разделение зарядов и перенос электрона в фотосинтетическом аппарате высших растений и цианобактерий происходят по одному и тому же механизму. Однако, в отличие от высших растений и водорослей, у цианобактерий основным светосборщиком служат фикобилисомы. У цианобактерий отсутствуют хлорофилл-содержащие светособирающие комплексы, и весь хлорофилл локализован в кор антенне и в реакционных центрах фотосистем 1 и 2 (ФС1, ФС2).

В этой работе будут представлены данные о роли хлорофиллов и каротиноидов в диссипации энергии у цианобактерий. Цианобактерии как наиболее древние фотосинтезирующие организмы могут обладать уникальными путями дезактивации избыточной энергии для защиты фотосинтетического аппарата. Наши данные свидетельствуют о важной роли длинноволновых хлорофиллов (ДВХ) ФС1 в процессах диссипации энергии [1, 2].

### Организация и роль ДВХ ФС1 цианобактерий в миграции энергии к реакционным центрам

Установлено, что цианобактерии существенно обогащены ФС1 [3]. Доказано, что комплекс ФС1 в мембранах цианобактерий существует преимущественно в виде тримеров, которые обогащены ДВХ [4]. Один мономерный комплекс в тримере ФС1 (или в пересчете на П700) цианобактерии *A. platensis* содержит 7-8 молекул хлорофилла с поглощением при 708 нм и 3 молекулы хлорофилла с поглощением при 740 нм [5]. Установлено, что наиболее ДВХ тримеров ФС1 цианобактерии *A. platensis*, поглощающая при 740 нм и флуоресцирующая при 760 нм (77 К), возникает в результате взаимодействия хлорофиллов, локализованных на разных мономерных комплексах тримеров ФС1 [6]. В отличие от ФС1 одноклеточных цианобактерий, выход флуоресценции наиболее ДВХ нитчатой цианобактерии *A. platensis* существенно зависит от редокс состояния П700: максимален при восстановленном П700 и снижается более чем на порядок при окисленном П700 [7]. При изучении кинетики миграции энергии в антенне тримеров ФС1 *A. platensis* установлено, что скорость миграции энергии от антенны к окисленному П700 существенно (более чем на два порядка) выше, чем к

восстановленному P700 [8]. Подобная закономерность открывает новые пути для изучения взаимосвязи переноса энергии в антенне в зависимости от редокс состояния кофакторов реакционного центра ФС1.

В условиях недостатка энергии света ДВХ функционирует как светосборщик: энергия, поглощенная этой формой хлорофилла, с высокой эффективностью мигрирует к P700 в ходе обратного переноса энергии (uphill), вызывая окисление P700 [7]. С использованием фемтосекундной флуоресцентной спектроскопии ФС1 показано, что ДВХ замедляют установление энергетического равновесия и улавливание энергии P700; установление энергетического равновесия в гетерогенной антенне и разделение зарядов тем медленнее, чем ниже энергия ДВХ [9]. Замедляя улавливание энергии возбуждения реакционным центром P700, эти формы хлорофилла разгружают тем самым реакционный центр ФС1 цианобактерий от избыточного притока квантов света.

#### Участие ДВХ ФС1 в диссипации избыточно поглощенной энергии

Хотя наиболее ДВХ достаточно удалена от P700 (около 40 Å), окисленная форма P700 (P700<sup>+</sup>) в тримере ФС1 цианобактерии *A. platensis* тушит флуоресценцию при 760 нм на два порядка эффективнее, чем восстановленный P700 [5,8]. Когда кофакторы реакционного центра ФС1 (филлохинон и железо-серный центр) восстановлены, диссипация избыточной энергии происходит через триплет P700, который тушит флуоресценцию при 760 нм [5]. Обнаружено энергетическое взаимодействие хлорофиллов антенны мономерных комплексов в тримере ФС1 цианобактерии *A. platensis* с участием наиболее ДВХ; взаимодействие катион-радикала P700 с ДВХ ведет к дополнительной диссипации избыточной энергии, защищая тем самым комплекс от фотодеструкции [10].

#### Природа нефотохимического тушения у цианобактерий

Так как цианобактерии лишены виолаксантинового цикла, в процесс нефотохимического тушения с участием каротиноидов у цианобактерий включаются другие механизмы диссипации энергии. Нами установлено, что при освещении клеток цианобактерий светом 500 нм, поглощаемым каротиноидами, происходит тушение флуоресценции фикобилисом [11]. На основании исследования этого явления у мутантов цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803, дефективных по ФС2, по IsiA комплексу, и по аллофикоцианину (apcE) показано, что участниками этого тушения служат водорастворимый каротин-белковый комплекс и аллофикоцианин фикобилисом [12, 13]. Исследование температурной зависимости индуцированного синим светом тушения флуоресценции и влияния глицерина и сахарозы на этот процесс указывает на то, что взаимодействие водорастворимых комплексов ОСР-аллофикоцианин происходит по типу белок-белкового взаимодействия [14].

#### Выводы

Цианобактерии как наиболее древние фотосинтетики обладают уникальными путями дезактивации избыточной энергии для защиты фотосинтетического аппарата. Наши данные свидетельствуют о том, что ДВХ ФС1: (i) способны эффективно передавать поглощенную энергию к P700 в условиях недостатка освещения, что ведет к увеличению сечения поглощения, (ii) в условиях избыточной энергии возбуждения ДВХ участвуют в диссипации энергии в тепло.

Кроме того, нами обнаружен новый путь диссипации энергии у клеток цианобактерий на ранних стадиях светосбора: энергия, поглощенная каротиноидами, тушит флуоресценцию фикобилисом, предотвращая тем самым доступ энергии возбуждения к ФС2 и ФС1.

Настоящая работа поддержана программой МКБ РАН и РФФИ (грант 05-04-48526).

#### Литература

1. Karapetyan N.V., Holzwarth A.R., Roegner M. (1999) FEBS Lett. 460, 395-400
2. Karapetyan N.V., Schlopper E., van Grondelle R., Dekker J.P. (2006) In: Photosystem I: The Light-Driven, Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase (Golbeck J.H., ed.) vol. 24, pp. 177-192, Springer
3. Shubin V.V., Murthy S.D.S., Karapetyan N.V., Mohanty P. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1060, 28-26
4. Shubin V.V., Tsuprun V.L., Bezmertnaya I.N., Karapetyan N.V. (1993) FEBS Lett. 334, 79-82
5. Schlopper E., Cetin M., Byrdin M., Terekhova I.N., Karapetyan N.V. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1706, 53-67
6. Kruij J., Karapetyan N.V., Terekhova I.V., Roegner M. (1999) J. Biol. Chem. 274, 18181-18188
7. Karapetyan N.V., Dorra D., Schweitzer G., Bezmertnaya I.N., Holzwarth A.R. (1997) Biochemistry US 36, 13830-13837
8. Shubin V.V., Bezmertnaya I.N., Karapetyan N.V. (1995) J. Photochem. Photobiol. 30B, 153-160
9. Gobets B., van Stokkum I.H.M., Roegner M., Kruij J., Schlopper E., Karapetyan N.V., Dekker J.P., van Grondelle R. (2001) Biophys. J. 81, 407-424
10. Karapetyan N.V., Shubin V.V., Strasser R.J. (1999) Photosynth. Res. 61, 291-301
11. Rakhimberdieva M.G., Stadnichuk I.N., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. (2004) FEBS Lett. 574, 85-88
12. Rakhimberdieva M.G., Elanskaya I.V., Vavilin D.V., Vermaas W.F.J., Karapetyan N.V. (2006) Biochim. Biophys. Acta 1757, Suppl. 1, 286-287.
13. Rakhimberdieva M.G., Vavilin D.V., Vermaas W.F.J., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. Biochim. Biophys. Acta 1767 (in press).
14. Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Y.V., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. (2007) FEBS Lett. (in press).

## ПРОБЛЕМЫ И НАПРАВЛЕНИЯ СОВРЕМЕННОЙ РАДИОЭКОЛОГИИ

<sup>1</sup>Кутлахмедов Ю.А., <sup>2</sup>Корогодин В.И., <sup>1</sup>Родина В.В.

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ, Киев, Украина

<sup>2</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия.  
ecoetic@mail.kar.net

В современной радиоэкологии можно выделить три основных направления:

1. *Исследование миграции и перераспределения радионуклидов попавших в экосистему.* Практически 80 % всех работ посвящено этому направлению радиоэкологических исследований. Активно изучаются параметры  $K_n$  – коэффициенты накопления радионуклидов от абиотических компонент экосистем (вода, почва и т.п.) к биоте. Такие данные нужны для оценки и прогноза перехода радионуклидов в биоту и затем к человеку, через органы дыхания и пищеварения и дозовых нагрузок на человека. Это направление радиоэкологии детально освещено в литературе.

2. *Оценка влияния дозы от радионуклидов попавших в биоту экосистем.* Значительно меньше исследований (около 15 % работ) посвящено теме оценки влияния радионуклидов и доз от них на биоту. Доминирует следующая парадигма радиологии – если хорошо человеку в условиях радионуклидного загрязнения, то биоте хорошо и подавно. На наш взгляд эта парадигма не всегда верна, а точнее почти всегда неверна.

Проблема состоит в том, как оценить меру воздействия дозы на биоту экосистем.

Для оценки состояния и благополучия экосистем используют до 30 различных показателей и параметров – от разнообразия видов до биомассы и т. д. Важная особенность этих показателей, что практически все они начинают существенно изменяться только когда биота претерпевает значительные изменения. Практически очень важно иметь показатели и параметры, которые позволяли бы опережающим образом оценивать состояние биоты экосистем и особенности распределения и перераспределения поллютантов в реальных ландшафтах. На основе теоретического анализа и экспериментальных исследований нами предложено использовать такую меру – как радиоемкость и/или фактор радиоемкости экосистем и ее составляющих. Радиоемкость определяется как предельное количество поллютантов (радионуклидов) которое может аккумулироваться в биотических компонентах экосистемы, без нарушения их основных функций (воспроизводство и кондиционирование среды обитания). Фактор радиоемкости определяется как доля поллютантов, что накапливается в том или ином компоненте экосистемы (в ландшафте). Нами было предложено для оценки благополучия биоты в экосистеме использовать в качестве определяющих – два параметра – биомасса видов в экосистеме и их способность очищать – кондиционировать среду от отходов жизнедеятельности и поллютантов, попадающих в экосистему. В таблице 1 показаны дозы, которые устанавливают возможный предел в радиоемкости биоты экосистем, после превышения которого возможно поражение биоты и составляют они 0,4 Гр/год для животных и 4 Гр/год для растений.

Для оценки дозовых нагрузок на биоту перспективно использовать модель и расчеты Б. Амиро, результаты которых представлены в таблице 2 в виде «дозовых цен» для некоторых радионуклидов попавших в экосистему. На основе шка-

Таблица 1. Шкала дозовых нагрузок на экосистемы (Г.Г.Поликарпов и др)

ЗОНА	Мощность поглощенной дозы (Гр/год)
Зона радиационного благополучия	< 0,001-0,005
Зона физиологической маскировки	0,005 – 0,05
Зона экологической маскировки: Для наземных животных Для гидробионтов и наземных растений	0,05 – 0,4 0,05 – 4
Зона явных экологических эффектов: Драматических: Для наземных животных Для гидробионтов и наземных растений Катастрофических: Для животных и растений	>> 0,4 >> 4 >> 100

лы дозовых нагрузок на экосистемы и их элементы удалось оценить предельные концентрации радионуклидов, выше которых можно ожидать заметного влияния на структуру, биологические характеристики и параметры радиоемкости экосистем. Для <sup>137</sup>Cs предельный уровень радиоемкости- радионуклидного загрязнения не должен превышать 600 кБк/кг массы биоты. Таким образом, можно провести обоснованное экологическое нормирование и устанавливать предельные уровни поступления радионуклидов в разные типы экосистем.

3. *Применение биогенных радионуклидов как трассеров, отражающих состояние и эффекты на биоту радиации, тяжелых металлов и других поллютантов.*

Таблица 2. Величины значений дозовых коэффициентов для биоты экосистем по некоторым радионуклидам (В. Амиро).

Радионуклид	Внутреннее облучение, Гр/год/Бк/кг	Внешнее облучение			
		вода, Гр/год/Бк/м <sup>3</sup>	воздух, Гр/год/Бк/м <sup>3</sup>	Почва, Гр/год/Бк/кг	вегетация, Гр/год/Бк/кг
<sup>137</sup> Cs	4,1 10 <sup>-6</sup>	2,7 10 <sup>-9</sup>	1,72 10 <sup>-6</sup>	4,02 10 <sup>-6</sup>	1,72 10 <sup>-6</sup>
<sup>40</sup> K	3,44 10 <sup>-6</sup>	1,76 10 <sup>-9</sup>	1,43 10 <sup>-6</sup>	2,64 10 <sup>-6</sup>	1,43 10 <sup>-6</sup>
<sup>241</sup> Am	2,86 10 <sup>-5</sup>	1,48 10 <sup>-10</sup>	7,73 10 <sup>-8</sup>	2,22 10 <sup>-7</sup>	7,73 10 <sup>-8</sup>
<sup>239</sup> Pu	2,64 10 <sup>-5</sup>	3,72 10 <sup>-12</sup>	2,35 10 <sup>-9</sup>	5,58 10 <sup>-9</sup>	2,35 10 <sup>-9</sup>
<sup>90</sup> Sr	9,92 10 <sup>-7</sup>	3,07 10 <sup>-10</sup>	2,83 10 <sup>-7</sup>	4,61 10 <sup>-7</sup>	2,83 10 <sup>-7</sup>

Закономерности перераспределения радионуклидов-трассеров в разных типах экосистем, описываемые моделями радиоемкости, позволили на основе экологического нормирования определить предельно-допустимые сбросы и выбросы радионуклидов в конкретные виды экосистем. Предлагаемый метод определения экологически обоснованных предельно-допустимых радионуклидных загрязнений экосистем и их компонентов может служить теоретической основой для системы экологического нормирования сбросов и выбросов разных поллютантов в окружающую среду. Подход на основе применения биогенных трассеров позволяет в рамках теории и моделей радиоемкости одновременно оценивать процессы миграции радионуклидов, определять дозовые нагрузки на биоту экосистем, и устанавливать фундаментальные параметры скоростей перераспределения радионукли-

дов и других поллютантов в любых типах экосистем с учетом возможного синергизма их эффектов на биоту.

Особую проблему представляют реальные ландшафты, когда оценки параметров радиоемкости относятся к большим территориям, где действуют системы факторов влияющих на перераспределение радионуклидов по биотическим и абиотическим компонентам экосистем. Определены главные факторы влияния на параметры радиоемкости – крутизна склонов, вид растительного покрытия поверхности, скорости стока, тип почвы. На примере выбранного полигона-заказника в Конче-Заспе возле Киева проведены оценки ландшафта территории и параметров его радиоемкости – вероятности удержания поллютанта в элементах ландшафта (рис 1).

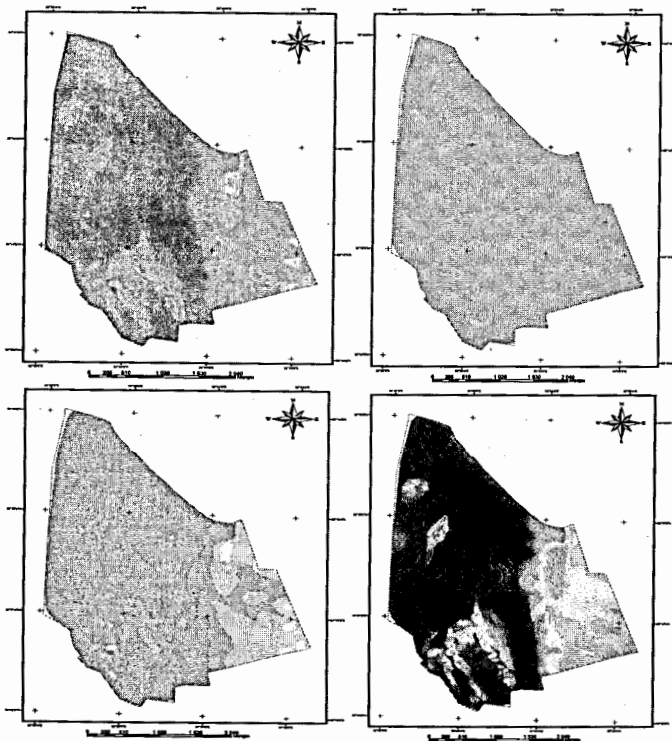


Рис 1. Результаты применения аналитической ГИС технологии: а) карта радиоемкости полигона; б) карта первоначального равномерного загрязнения полигона; в) карта распределения  $^{137}\text{Cs}$  на полигоне через 10 лет после аварии на ЧАЭС; г) карта распределения  $^{137}\text{Cs}$  на полигоне через 30 лет после аварии (чем выше плотность черной окраски ландшафта, тем выше уровень радионуклидного загрязнения)

Таким образом, мы разработали метод и применили аналитическую ГИС-технологии для оценки и прогноза перераспределения поллютантов в реальных ландшафтах.

## ВКЛАД АКАДЕМИКА Н.М. СИСАКЯНА В СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ПАГУОШСКОГО ДВИЖЕНИЯ УЧЕНЫХ

Лебедев М.А.

*Российский Пагуошский комитет при Президиуме РАН, MLebedev@pugwash.ru*

В 2007 г. исполняется 100 лет со дня рождения академика Норайра Мартirosовича Сисакяна и 50 лет Пагуошскому движению ученых – одной из старейших неправительственных научных организаций, положивших начало диалогу ведущих ученых мира по вопросам безопасности, разоружения и научного сотрудничества и удостоенной Нобелевской премии мира 1995 г.

Академик Норайр Мартirosович Сисакян принадлежит к числу крупнейших ученых мира, стоявших у истоков Пагуошского движения.

К середине 1950-х гг., несмотря на тяжелое международное положение, обусловленное наращиванием СССР и США своих ядерных арсеналов, советское руководство (во многом благодаря принципиальной позиции Президиума АН СССР) осознано необходимость расширения международных научных связей Академии наук.

Советские ученые, находясь за «железным занавесом» и практически не имея научных контактов в послевоенное время с учеными остального мира, стремились донести до руководства страны необходимость начала широкого международного диалога об опасностях, которые грозят миру в случае возможного применения ядерного оружия.

9 июля 1955 г. в Лондоне был оглашен Манифест Рассела – Эйнштейна, в котором 11 крупнейших ученых мира призвали политиков отказаться от решения международных споров и конфликтов с использованием ядерного оружия. Авторы документа также обратились к ведущим ученым с предложением собраться на международную конференцию для оценки той опасности, которая возникла в связи с военным использованием атомной энергии. К сожалению, фамилий советских ученых под этим документом нет. Это произошло в связи с тем, что руководство СССР весьма настороженно относилось к политическим и философским взглядам Бертран Рассела, который был непосредственным инициатором создания Манифеста.

Конференция ученых, инициированная Манифестом Рассела – Эйнштейна, состоялась с 7 по 11 июля 1957 г. в канадской деревушке Пагуош (Pugwash). На ней собрались 22 ученых из 10 стран, включая четырех представителей Академии наук СССР.

На форуме помимо обсуждения тех опасностей, которые угрожают человечеству в связи с наращиванием ядерных арсеналов, обсуждались и конкретные формы взаимодействия ученых мира по развитию международного научного сотрудничества и установления более доверительных отношений внутри мирового научного сообщества [1].

Конференция 1957 г. положила начало широкому международному Пагуошскому движению ученых за мир, разоружение и научное сотрудничество.

Впервые академик Н.М. Сисакян принял участие в работе Пагуошского движения ученых в 1959 г. в 4-й конференции «Контроль над вооружениями и международная безопасность», которая состоялась в Бадене (Австрия) с 25 июня

по 4 июля. Нораир Мартиросович не только участвовал в конференции, но был и руководителем делегации Академии наук СССР, а также председателем пятого пленарного заседания конференции, посвященного контролю над испытаниями ядерного оружия.

Выступая на первом заседании указанной конференции с главным пленарным докладом «Мирное сосуществование, урегулирование важнейших проблем и современное международное сотрудничество», академик Н.М. Сисакян подчеркивал: «Нам – работникам науки не свойственно быть утопистами. Накапливая опыт, двигаясь от эксперимента к эксперименту, от одного открытия к другому по дороге научного прогресса, мы умеем ценить, как никто другой, каждое, хотя бы небольшое, завоевание научного сообщества, каждый, хотя бы скромный шаг, обогащающий сокровищницу научной мысли. Руководствуясь тем же методом и в международных отношениях мы не должны искать ни «философского камня», ни чудодейственный «панacea», способных разрешить все международные проблемы и распутать весь узел накопившихся годами международных противоречий. Предоставим поиски того и другого демагогам и политическим шарлатанам. Но с тем большим вниманием мы должны отнестись к тем международным мероприятиям, которые могут, хотя бы частично, ослабить опасность атомной войны». Эти слова из доклада академика Н.М. Сисакяна 1959 г., к сожалению, актуальны и в наши дни. Ситуация в мире всё более становится напряженной, о чем красноречиво свидетельствует положение на Ближнем Востоке и в Северо-Восточной Азии, а также тупик в переговорном процессе по сокращению и нераспространению ядерного оружия.

«Я лично убежден, – отмечал на 4-й Пагуошской конференции Н.М. Сисакян, – что пора торжественных деклараций общего характера об опасностях ядерной войны, о необходимости с ней бороться и т.п., безусловно, сыгравшая свою положительную роль на определенном историческом этапе, уже миновала или, во всяком случае, подходит к концу. От нас, ученых, народы ждут <...> конкретных действий и прежде всего указания тех методов, при помощи которых может быть ослаблена атомная опасность и расчищена дорога к окончательному ее устранению» [2]. Этим заявлением во многом именно Н.М. Сисакян завершил дискуссию между учеными СССР и Запада о формах и методах деятельности Пагуошского движения. Он отчетливо осознавал, что только откровенные дискуссии в применении со строгой научной логикой, могут дать реальные результаты по сокращению оружия массового уничтожения и контролю над вооружениями.

В докладе на 7-й Пагуошской конференции, состоявшейся в Стоу (шт. Вермонт, США) 5-9 сентября 1961 г., «Международное сотрудничество в области биологических наук», академик Н.М. Сисакян сделал конкретные предложения по научному сотрудничеству в области исследования форм жизни, законов воспроизводства, биологической репродуктивности Мирового океана, природы фотосинтеза, мозга человека, борьбы со смертельными болезнями [3]. Его идеи нашли воплощение в деятельности ряда международных научных организаций. На 8-й Пагуошской конференции, прошедшей также в Стоу 11-16 сентября 1961 г. академик Н.М. Сисакян совместно со специалистом по военной истории генералом Н.А. Таленским представил доклад под названием «Меры по уменьшению

опасности непреднамеренной войны, международные силы безопасности, методы урегулирования спорных вопросов». Встречи Н.М. Сисакяна с американскими учеными и посещения ряда научных учреждений США, которые состоялись во время его участия в 7-й и 8-й Пагуошских конференциях сыграли существенную роль в определении возможных направлений научного сотрудничества между Советским Союзом и Соединенными Штатами. Конференция проходила через несколько месяцев после первого полета человека в космос, и интерес к советским ученым со стороны иностранных коллег был очень большим. Академик Н.М. Сисакян в ходе своих встреч и интервью в США активно выступил за недопущение использования космического пространства в военных целях, при этом подчеркивая необходимость международного сотрудничества для мирного освоения космоса. Огромный научный авторитет Нораира Мартиросовича способствовал включению в повестку Пагуошских конференций обсуждения форм и методов международного научного сотрудничества в сфере освоения космоса. Это позволило к концу 1960-х годов заключить международный Договор о принципах деятельности государств по исследованию и использованию космического пространства, включая Луну и другие небесные тела и двусторонние соглашения между Академией наук СССР и Национальной академией наук США о совместных советско-американских разработках по освоению космоса.

Занимая с 1963 г. пост Главного ученого секретаря Президиума Академии наук СССР, академик Н.М. Сисакян внес большой вклад в развитие международного научного сотрудничества, установления связей АН СССР с зарубежными академиями, научными обществами и международными научными организациями.

В архиве Российского Пагуошского комитета при Президиуме РАН сохранилась обширная переписка академика Н.М. Сисакяна со многими западными учеными, а также его пометы и замечания к проекту документов по развитию международных научных связей АН СССР. Как справедливо отмечено в третьем сборнике воспоминаний и документов, посвященном памяти Н.М. Сисакяна, эти фонды Российского Пагуошского комитета ждут своего исследователя и смогут дополнить обзор многогранной научной, организационной и международной деятельности Нораира Мартиросовича [4].

Академик Н.М. Сисакян являлся одним из всемирно признанных научных лидеров, наследие, которого и в XXI в. представляет большой интерес не только для биохимиков, но и для историков и организаторов науки.

Имя академика Н.М. Сисакяна навсегда вписано в историю Пагуошского движения ученых, и Нобелевская премия мира, присужденная в 1995 г. Пагуошу, по праву принадлежит и Нораиру Мартиросовичу Сисакяну.

#### Литература

1. Рыжов Ю.А., Лебедев М.А. Ученые Академии наук в Пагуошском движении // Вестник РАН. 2005. Т. 75, № 6. С. 491-497.
2. Сисакян Н.М. Мирное сосуществование, урегулирование спорных вопросов и международное сотрудничество на современном этапе: [Докл. на 4-й Пагуошской конференции]. Архив Российского Пагуошского комитета. Оп. 1. Д. 4.: Мат-лы IV Пагуошской конференции ученых (Баден, Австрия, 1959 г.). Машинопись с правкой.

3. Сисакян Н.М. Пагуошские встречи ученых: К итогам VII и VIII Пагуошских конференций (г. Стоу, США) // Вестник АН СССР. 1961. № 11. С. 81-84.
4. Курапова Е.Р. Предисловие // Академик Нораир Мартиросович Сисакян: портрет на фоне эпохи: К 100-летию со дня рождения. М.: Наука, 2006. С. 3-11.

## АКАДЕМИК Н.М. СИСАКЯН И ЕГО ВКЛАД В РАЗВИТИЕ БИОХИМИИ

Попов В.О., Юрина Н.П.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, vpopov@mars.rags.ru*

Наш институт гордится тем, что в его стенах работал выдающийся ученый, талантливый организатор науки и международного сотрудничества Нораир Мартиросович Сисакян. В 1935 г. Н.М. Сисакян поступил в аспирантуру Института биохимии и с этого года его жизнь, и научная деятельность были неразрывно связаны с Институтом. Н.М. Сисакян защитил кандидатскую диссертацию в 1936 г., докторскую – в 1940 г., стал заведующим лабораторией, затем заместителем директора Института. В 1953 г. был избран член-корр. АН СССР, а в 1960 г. – академиком АН СССР.

С 1959 года наряду с научной деятельностью Н.М. Сисакян вел большую научно-организационную работу в Президиуме АН СССР. В 1959-1963 г. он был академиком-секретарем Отделения биологических наук АН СССР, в 1963-1966 г. – Главным ученым секретарем Президиума АН СССР. Научная и общественная деятельность Н.М. Сисакяна была многогранна и широко известна. В 1956-1959 г. он был избран членом Консультативного комитета ЮНЕСКО, в 1959-1964 г. – членом Исполнительного совета ЮНЕСКО, с 1964 по 1966 г. он являлся Президентом XIII сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО, вице-президентом Международной академии астронавтики, Председателем Международного комитета биоастронавтики [1].

С самого начала научной деятельности Нораир Мартиросович оказался в среде крупных ученых. В Институте биохимии работали академики В.А.Энгельгардт, А.И. Опарин, А.Н. Белозерский, А.Л. Курсанов, А.А. Красновский и А.Н. Теренин, члены-корр. Академии наук В.Л. Кретович, В.Н. Букин и Д.Л. Талмуд, проф. Б.А. Рубин и многие другие. Не будет преувеличением сказать, что в то время Институт биохимии был основным центром биохимической науки в нашей стране.

Свою первую диссертационную работу Нораир Мартиросович Сисакян выполнил под руководством академиков А.Н. Баха и А.И. Опарина. Это была первая защита диссертации в только что созданном А.Н. Бахом Институте биохимии. В этой работе Нораиру Мартиросовичу удалось установить важное значение фосфора в сахаронакоплении и обнаружить нарушения углеводного обмена у свеклы и цикория при недостаточности этого элемента в питании растений. Н.М. Сисакян защитил докторскую диссертацию на тему «Биохимическая характеристика засухоустойчивости растений». В этой работе им впервые было установлено, что засухоустойчивость определяется особенностями энзиматического аппарата растительной клетки и показано, что при глубоком водном дефиците происходят необратимые изменения в состоянии ферментов, которые приводят к гибели растений.

В начале Великой Отечественной войны (в октябре 1941 г.), когда началась битва за Москву, Нораир Мартиросович пошел добровольцем в ополчение. Через несколько месяцев биохимика отозвали с фронта. Он получил научное задание – разработать методы сушки овощей без потери витаминов и наладить производство витаминных концентратов и препаратов. При выполнении этого задания

Норайр Мартиросович использовал результаты своей докторской работы. Н.М. Сисакяну удалось разработать новый способ сушки овощей и картофеля, позволявший сохранять витамины. Это был весомый вклад отечественной науки в общее дело победы. Уже в 1942 г. благодаря этому способу сушки было сохранено 200 млн. человеко-доз витамина С, а в 1943 г. почти две трети картофеля и овощей сушили по этому методу.

В 1942 году Норайр Мартиросович организовал в Институте биохимии Лабораторию энзимологии, которой руководил до последнего дня своей жизни (12 марта 1966 г.). Он много внимания уделял работе лаборатории, всемерно способствуя научному росту сотрудников и учеников.

Норайра Мартиросовича всегда отличала многогранность интересов: от технической биохимии, биохимии и молекулярной биологии клеточных структур до проблем космической биологии. Ему, как правило, удавалось находить наиболее перспективные пути исследования в различных областях науки и использовать для решения проблем самые современные экспериментальные подходы.

Уже в начале творческого пути он занимался разработкой научных основ виноградарства и виноделия. Это было не случайно. Его родная Армения знаменита коньяками, шампанскими и хересными винами. Исследования проводились Н.М. Сисакяном широким фронтом – от биохимической характеристики винограда, в особенности процессов, протекающих в ягоде при созревании, до химизма процессов, происходящих при созревании вин и коньяков. Благодаря новым разработкам и совершенствованию технологий удалось существенно ускорить процессы созревания вин и коньяков. Результаты исследований по этой тематике были обобщены в сборниках статей «Биохимия виноделия», семь выпусков которых вышло под редакцией Н.М. Сисакяна и при его непосредственном участии. Следует отметить, что исследования Н.М. Сисакяна в области виноградарства и виноделия сохранили актуальность и заложили научные основы развития виноградарства и виноделия в нашей стране. Они были продолжены проф. И.А. Егоровым, проф. А.К. Родопуло, А.Ф. Писарническим и в настоящее время ведутся в нашем институте.

Широкую известность получил цикл работ Норайра Мартиросовича, посвященных изучению действия радиации на протекающие в растениях биохимические процессы. Было показано, что происходящие при радиации нарушения в различных звеньях обмена веществ проявляются неодинаково. Наиболее сильно они выражены в обмене нуклеиновых кислот. При этом вследствие взаимосвязанности протекающих процессов в клетке радиационные изменения в обмене одного звена влекут за собой серьезные изменения в целом организме. Эти приоритетные результаты были доложены Н.М. Сисакяном в 1955 г. на I-ой Женевской конференции по мирному использованию атомной энергии. В дальнейшем они получили подтверждение и развитие в ряде других лабораторий.

К главным научным достижениям Н.М. Сисакяна относится исследование биохимии клеточных структур растений. Основным объектом этих исследований Н.М. Сисакян явились – органеллы растительного происхождения, которые в то время были мало изучены. Между тем всестороннее изучение именно этих структур представляло большой интерес, поскольку один из видов пластид – хлоропласты, связан с процессом фотосинтеза. При их непосредственном участии

происходит первичное образование органического вещества, благодаря которому, в конечном счете, возможна жизнь на нашей планете.

Исследования хлоропластов начались Норайром Мартиросовичем в 1946 году с разработки методов выделения этих структур (совместно с его докторантом А.С. Вечером) и определения их ферментативной активности (совместно с А.М. Кобяковой и другими сотрудниками). Эти исследования привели к обнаружению в хлоропластах многих ферментов, в том числе ферментов непосредственно не связанных с фотосинтезом, что указывало на полифункциональность этих клее-точных органелл.

Н.М. Сисакяном была выдвинута гипотеза, согласно которой хлоропласты не только улавливают свет и синтезируют углеводы в процессе фотосинтеза, но и выполняют в клетке еще какие-то функции. Так возникло у Н.М. Сисакяна предположение о важной роли этих структур в жизнедеятельности растительной клетки и об их относительной автономии, нашедшее впоследствии полное подтверждение. В этом Норайр Мартиросович Сисакян опередил мировую науку. Результаты работ по ферментативной активности пластид стали темой «Баховского чтения», прочитанного Норайром Мартиросовичем в 1949 году, изданного в 1951 году и удостоенного Государственной премии СССР (1952). Более полувек назад (в 1952 году) на основе люминесцентно-микроскопического анализа Н.М. Сисакян впервые доказал наличие нуклеиновых кислот в этих органеллах растительной клетки [2]. В хлоропластах и лейкопластах ряда высших растений в руководимой Н.М. Сисакяном лаборатории были обнаружены нуклеиновые кислоты – РНК и ДНК. В дальнейшем с помощью вновь разработанных методов Норайр Мартиросович с сотрудниками подтвердил полученные в его лаборатории данные о наличии ДНК в хлоропластах. Без преувеличения можно сказать, что обнаружение ДНК в хлоропластах (а также в митохондриях) эукариотических клеток явилось революционным событием в биологии, опровергнувшим существовавшее многие десятилетия классическое представление о том, что в клетке вся генетическая информация заключена в ядре. Обнаружение в хлоропластах нуклеиновых кислот и, в особенности, собственного генома, явилось стимулом для дальнейших исследований этих органелл. Эти результаты определили последующее направление не только его основной научной деятельности, но и дальнейшего исследовательского пути его учеников – профессоров И.И. Филиппович, М.С. Одинцовой, Н.А. Гумилевской, академика АН Грузии Т.Г. Беридзе.

Среди важных проблем, над которыми работал Н.М. Сисакян, одно из центральных мест принадлежало исследованиям синтеза белка в хлоропластах [3]. В 1955 г. Норайром Мартиросовичем с сотрудниками была опубликована работа, в которой впервые сообщалось о существовании этого процесса в хлоропластах. Было показано, что хлоропласты, изолированные из листьев фасоли, способны включать <sup>14</sup>C-глицин в белки. Через год подобные данные получили подтверждение в лаборатории проф. П. Замечника в Гарвардском университете (США) [4].

Кроме этого, Н.М. Сисакян и его сотрудники впервые обнаружили синтез липидов в изолированных хлоропластах и установили ряд особенностей липидного метаболизма этих органелл [5].

Позже Н.М. Сисакян и его сотрудники выделили из хлоропластов рибосомы

[6], аминоацил-тРНК-синтетазы и тРНК [7, 8], т.е. все компоненты аппарата трансляции, и установили, что белоксинтезирующий аппарат хлоропластов обладает значительно большим сходством с аппаратом трансляции бактерий, чем с аппаратом трансляции в цитоплазме клеток эукариот. Полученные данные подтвердили представления о полуавтономности пластид и принцип двойного кодирования всех функциональных комплексов этих органелл.

Работы Н.М. Сисакяна по изучению нуклеиновых кислот и белков хлоропластов относятся к истокам молекулярной биологии хлоропластов, бурный расцвет которой наблюдается в настоящее время. Сейчас в нашем Институте работает уже второе поколение его учеников, подрастает и третье поколение – молодые аспиранты, которые с энтузиазмом взялись за исследование устойчивости растительных организмов к стрессовым воздействиям, механизмов регуляции фотосинтеза и молекулярной биологии хлоропластов – всех тех научных направлений, над которыми многие годы работал Н.М. Сисакян, вложивший в них свою энергию и огромный талант ученого.

Академик А.Н. Белозерский вспоминал: "Всю свою жизнь Норайр Мартиросович с увлечением отдавал служению науке. В своём рабочем кабинете и в лаборатории он не замечал ни времени, ни усталости, ни недугов. Он работал буквально до последней минуты своей жизни и умер за рабочим столом в лаборатории в тот момент, когда обдумывал новый экспериментальный подход к интересовавшим его научным вопросам".

Заслуги Н.М. Сисакяна в науке были отмечены многими наградами: Государственной премией СССР (1952), премиями имени А.Н. Баха АН СССР (1950, 1966), премией имени И.И. Мечникова АН СССР (1951), премиями Льежского (1956) и Пастеровского институтов (1959). Решением 33-й сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО 100-летие со дня рождения академика Н.М.Сисакяна было включено в календарь юбилейных дат ЮНЕСКО на 2006-2007 гг.

Сегодня Институт биохимии является современным научным учреждением, 24 лаборатории которого занимаются фундаментальными и прикладными исследованиями в самых разных областях биохимии и молекулярной биологии. Сотрудники Института выполняют ~ 70 федеральных программ и грантов. В институте работают 208 научных сотрудников, среди которых 51 доктор и 142 кандидата наук. В аспирантуре института учится 41 аспирант. Таким образом, те основы, которые были заложены академиком Н.М. Сисакяном, продолжают достойно развиваться в Институте биохимии.

В заключение необходимо подчеркнуть, что практически все упоминавшиеся направления работ Норайра Мартиросовича были пионерскими. Это касается как работ по технической биохимии, так и работ по биохимии клеточных органелл. Уже ранние работы принесли Норайру Мартиросовичу широкую известность. Значимость полученных Н.М. Сисакяном научных результатов и его роль в организации отечественной и мировой науки привели к тому, что он вошел в историю биохимии как крупный ученый в области биохимии, один из основоположников космической биологии, выдающийся организатор отечественной науки и международного сотрудничества ученых.

## Литература

1. Академик Норайр Мартиросович Сисакян. Портрет на фоне эпохи. Составители: Е.Р. Курапова, А.Н. Сисакян, И.И. Филиппович. Москва. «Наука». 2006. 436 с.
2. Сисакян Н.М., Черняк М.С. О нуклеиновых кислотах пластид. Доклады АН СССР, 1952. Т. 87. С. 469-470.
3. Сисакян Н.М., Филиппович И.И. Доклады АН СССР, 1955. Т.102. С. 579-582.
4. Stephenson H.L., Thiman K.V., Zamecnik P.C. Arch. Biochem. and Biophys. 1956. V. 65. P. 194-198.
5. Сисакян Н.М., Смирнов Б.П. О путях синтеза фосфолипидов в хлоропластах *in vitro*. Доклады АН СССР, Т. 107. №3. 1956. С. 449-451.
6. Mikulska E., Odintsova M.S., N.M. Sissakian N.M. On the Isolation of Ribosomes from Chloroplasts. Die Naturwissenschaften. 1962. H. 23. S. 549-551.
7. Sissakian N.M., Philippovich I.I., Svetailo E.N., Aliev K.A., On the protein synthesizing system of chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta, 1965, V. 95, P. 474-435.
8. Филиппович И.И. Организация аппарата трансляции хлоропластов и его роль в биогенезе мембран. М.: Наука, 2006. 160 с.



## РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НОРМИРОВАНИЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНЫХ МЕЖПЛАНЕТНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТАХ

Шафиркин А.В.

Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,  
г. Москва, Россия

После первых орбитальных космических полетов в конструкторском бюро С.П. Королева начинают осуществляться технические проекты пилотируемых полетов на Луну и к Марсу и возникают дополнительные проблемы медико-биологического обеспечения длительных космических полетов, включая проблему радиационной безопасности. Она предусматривает постановку целого ряда физических и радиобиологических исследований таких, как: изучение источников радиационной опасности на трассах орбитальных и межпланетных полетов, исследования прохождения первичного и вторичных излучений через различные защитные материалы, а также исследования по изучению влияния различных факторов полета и характеристик радиационного воздействия, присущих космическому полету, на радиобиологический эффект.

Научной основой для решения вопросов радиационной безопасности космических полетов и нормирования допустимых уровней радиационного воздействия на космонавтов явились данные исследований, проводившиеся с 1964 г. в Институте медико-биологических проблем, Институтах Биофизики Минздрава СССР и Академии наук СССР, Государственном научно-исследовательском институте авиакосмической медицины МО СССР, и материалы теоретических и экспериментальных работ, выполненных на ускорителях протонов и многозарядных ионов в Объединенном Институте ядерных исследований. Был обобщен также опыт теоретических и экспериментальных радиобиологических исследований, проводившихся в большом числе других лабораторий в нашей стране и за рубежом, а также результаты гигиенических наблюдений и длительных эпидемиологических обследований персонала, работающего на предприятиях атомной промышленности, который позволил понять некоторые закономерности формирования поражения организма при сложном характере радиационного воздействия в условиях космического полета.

При этом на начальном этапе были сделаны акценты на определении риска возможного снижения работоспособности и жизнеспособности космонавтов в процессе полета в условиях сочетанного хронического облучения от детерминированных источников излучения: галактических космических лучей (ГКЛ) и радиационных поясов Земли (РПЗ), а также острых стохастически распределенных во времени воздействий солнечных космических лучей (СКЛ).

Действующие на начальной фазе освоения космоса нормативные документы регламентировали допустимые дозы для кратковременных орбитальных полетов, а также для полетов на трассе Земля-Луна-Земля с общей продолжительностью до 30 суток. Они были основаны на анализе большого объема радиобиологических данных по острому облучению крупных млекопитающих в различных дозах, данных по аварийному облучению людей. При их разработке был обобщен также большой клинический материал, касающийся осложнений при лучевой терапии [1-4].

В реакции организма после острого кратковременного облучения в суб-

летальных дозах 25-250 сГр и при более высоких уровнях воздействия можно выделить несколько стадий развития процесса. Первичная лучевая реакция включает симптомы, проявляющиеся в ближайшие часы после облучения. Она является отражением отклика периферических отделов нервной системы и характеризуется желудочно-кишечными симптомами: отказом от пищи, тошнотой, рвотой, диареей, кишечными спазмами, а также нервно-мышечными симптомами, к которым относятся: усталость, апатия, общая слабость, повышенное потоотделение, лихорадка, головные боли.

Для решения вопросов нормирования и установления уровней доз для экипажей космических аппаратов, применительно к кратковременным пилотируемым полетам в условиях ведущей радиационной опасности воздействиям СКЛ во время развития солнечных протонных событий (СПС), важно было проанализировать подробно степень нарастания тяжести радиобиологических проявлений по мере увеличения дозы. Эти данные представлены в таблице 1.

При обосновании пределов допустимых доз для космонавтов при полетах длительностью до 30 суток основная задача сводилась к ограничению уровня острого облучения за счет протонов СКЛ с целью недопущения сколько-нибудь значимого снижения работоспособности космонавтов и возможности развития у них первичной лучевой реакции средней степени тяжести в процессе полета.

В таблице 2 представлены предельные значения доз для космонавтов в СССР и для американских астронавтов применительно к первым кратковременным полетам.

Таблица 1. Радиобиологические реакции, развивающиеся в организме человека после облучения в различных дозах

Доза, сГр	Реакции в ближайшем пострадиационном периоде
15-25	Достоверно снижается концентрации лимфоцитов и увеличивается лабильность числа лейкоцитов.
25-50	В единичных случаях (1-5 %) развивается первичная лучевая реакция в выраженной форме. Уменьшаются концентрации лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови, относительное число лимфоцитов снижается на 25 %. В дальнейшем наблюдаются длительные в течение 3-х лет колебания их числа
50-100	Первичная лучевая реакция в острой форме имеет место у 5-10 % индивидуумов. Отмечается умеренная аплазия костного мозга, происходит дальнейшее снижение концентрации лейкоцитов и тромбоцитов в крови до 60-70 %. Число лимфоцитов снижается вдвое. Лимфопения может отмечаться на протяжении до 2-х лет.
100-150	Признаки ПЛР в тяжелой форме имеют место у 19-20 % людей. Число миелокарицитов в костном мозге снижено до 25-30 % при верхнем граничном значении дозы. Эритроидный и миелоидный ростки снижены в 3-4 раза. Концентрация нейтрофилов и лимфоцитов в крови уменьшается в 2 раза. Развиваются аутоаллергические реакции. Отмечаются единичные смертные случаи (< 1 %)
150-200	Выраженная ПЛР и средняя степень тяжести острой лучевой болезни у 30 - 50 % людей. Лейкопения достигает 10-30 %, лимфопения до 6-12 %, тромбоцитопения 10-20 % от нормы. Число эритроцитов оказывается сниженным до 60 %. Отмечаются смертельные исходы в 1-5 % случаев

Таблица 2. Предельные значения доз для космонавтов СССР и американских астронавтов в первых нормативных документах применительно к кратковременным полетам.

Критический орган и глубина в ткани, см	Величины доз, сЗв	Страна	Примечание
Кроветворная ткань (5 см)	15	СССР	Предел дозы за 30 суток полета ДОР
	50		
	125		
	25	США	Критическая доза Допустимая (планируемая)
	50		
Кожа (0,01)	400	США	Максимальная оперативная доза

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что у наиболее радиочувствительных людей при дозах превышающих 50 сГр может развиваться первичная реакция второй степени тяжести и иметь место некоторое кратковременное снижение работоспособности у 10 % индивидуумов. В связи с этим, в качестве допустимой дозы для кратковременных полетов в нормативах СССР была рекомендована доза 15 сЗв. При этой дозе отсутствуют какие-либо соматические эффекты, а могут отмечаться лишь минимальные кратковременные сдвиги в системе кроветворения.

Ввиду стохастического характера воздействия протонов солнечных вспышек и жестких ограничений по толщине и весу защиты космического аппарата, вводилось также понятие дозы оправданного риска (ДОР). В качестве ДОР рекомендовали дозу 50 сЗв на костный мозг (на глубине 5 см ткани), при которой лишь в единичных случаях могут иметь место легкие проявления первичной лучевой реакции.

Было рекомендовано использовать также понятие "критическая доза", равная 125 сЗв, которая устанавливалась как критерий для решения вопроса о возможности дальнейшего продолжения полета в условиях ухудшенной радиационной ситуации. Указанные ограничения доз должны были использоваться на всех этапах разработки и эксплуатации космических кораблей.

В США применяли близкие к установленным в СССР регламенты доз. В первых, это дозы, предназначенные для проектировщиков и лиц, разрабатывающих программу полета, и, во-вторых, это оперативные дозы (критерии) для использования во время полета.

По мере увеличения длительности полетов возникла необходимость учитывать реакцию организма в процессе полета на относительно кратковременные стохастически распределенные во времени воздействия протонов СКЛ на фоне хронического облучения от детерминированных источников радиационной опасности ГКЛ и РПЗ. Этот учет основывался на модели формирования радиационного поражения с учетом восстановительных процессов в организме и в системе кроветворения (модель эффективной остаточной дозы  $D_{эф}$ , предложенная Н. Блэром). Именно этот подход был применен в России в последующие годы при регламентации нормативных уровней радиации для длительных полетов до одного года. Он был использован во временных нормах радиационной безопасности космических полетов ВНРБ-75. При установлении допустимых доз в зависимости от длительности полета руководствовались принципом, чтобы эффективная остаточная доза к концу полета любой продолжительности достигала одного и того же уровня и не превышала 32 сЗв [5, 6].

Модель Блэра не позволяла достаточно точно учитывать восстановительные процессы при описании закономерности формирования радиационного поражения организма, поэтому в дальнейшем она была усовершенствована. Были предложены новые алгоритмы расчетов эффективной остаточной дозы [7], равноценной дозы [8,9], учитывающие восстановительные процессы в организме и развитие реального поражения организма в условиях неравномерного пространственного распределения поглощенных доз по телу. Подробно этот этап совершенствования подходов к нормированию представлен нами в работе [5].

За период с 1983 по 1990 гг был разработан и утвержден комплекс Государственных стандартов и Методических указаний под общим названием «Безопасность радиационная экипажа космического аппарата в космическом полете (БРЭКАКП)», который включал основные характеристики источников радиационного воздействия в космосе, методы расчетов поглощенных и эквивалентных доз, модели радиобиологических эффектов, используемые для расчетов радиационного риска [8, 10-21].

В ГОСТе 25645.201-83 «Безопасность радиационная экипажа космического аппарата в космическом полете работе. Термины и определения» для приведения сложного характера облучения в космическом пространстве к условиям стандартного радиационного воздействия при расчетах радиационного риска для космонавтов введено понятие обобщенной дозы  $H$  [10]. Алгоритм ее вычисления записывается в виде:

$$H[Зв] = \bar{D} [Гр] \cdot КК \cdot КВ \cdot КР \dots, \quad (1)$$

где  $\bar{D}$  – среднетканевая поглощенная доза; КК – коэффициент качества излучения, определяемый на основе регламентированной его зависимости от ЛПЭ; КВ – коэффициент временной неравномерности радиационного воздействия, учитывающий влияние мощности дозы и характера распределения дозы во времени на радиобиологический эффект; КР – коэффициент равноценности радиационного воздействия, учитывающий макропространственное распределение поглощенных доз по телу и приводящий эффекты неравномерного облучения к условиям равномерного радиационного воздействия.

В новых нормативах для полетов продолжительностью до 3-х лет [19] за определяющую величину, характеризующую в обобщенном виде меру радиационной опасности за время осуществления длительного космического полета, был принят радиационный риск, под которым подразумевалось увеличение риска гибели членов экипажа КА вследствие соматических радиобиологических эффектов в процессе полета.

Радиационный риск для космонавтов в процессе полета предполагали вычислять на основе математической модели обобщенного радиобиологического эффекта [20], который определялся в зависимости от характера распределения во времени мощности обобщенной дозы  $H(t)$  и самой величины обобщенной дозы  $H(t)$ . Мощность обобщенной дозы вычислялась на основе характера изменения во времени равноценной дозы  $G(t)$ , определяющей характер развития поражения в системе кроветворения при неравномерном распределении поглощенных доз по телу. Нормативные значения радиационного риска за полет устанавливались пропорциональными длительности полета на основе выражения:

$$Rn^{rad}(T) = 0,6 \cdot 10^{-4} T, \quad (2)$$

где  $T$  – длительность полета в месяцах.

Соответствующие значения допустимых эквивалентных равноценных доз в зависимости от длительности полета устанавливались следующим уравнением:

$$Gn(T) = 0,05 + 4 \cdot [1 - \exp(-T/72)] \quad (3)$$

В таблице 3 представлены регламентируемые значения радиационного риска и величины равноценных доз за полеты различной длительности, а также за весь период профессиональной деятельности. В этой таблице показаны также для сравнения нормативы, действовавшие в США до 2000 г. Наряду с пределами доз для костного мозга в ней представлены предельные дозы для хрусталика и кожи.

Этим новым нормативным документом, принятым в СССР в 1985г, как и в прежних нормативах, ограничивалась также доза однократного воздействия от излучения солнечных вспышек ( $\leq 50$  сЗв) и доза за всю профессиональную Деятельность космонавтов ( $\leq 400$  сЗв). Дозы годовые и за всю профессиональную деятельность на другие критические органы: хрусталик и кожу в данном документе не изменялись по сравнению с прежним документом ВНРБ-75 [5,19].

Дозовый предел за всю профессиональную карьеру астронавтов в новых нормативах установлен зависимым от возраста и пола астронавта в начальном периоде его деятельности. Он основан на допущении, чтобы суммарный дополнительный радиационно-обусловленный риск образования злокачественных опухолей в течение жизни не превышал бы 3 %.

Таблица 3. Пределы допустимых доз для космонавтов СССР и астронавтов США за различные периоды полета и за всю карьеру, сЗв [5].

Длительность полета, мес.	Нормативный уровень радиационного риска $Rn$ $10^{-4}$ СССР	Доза на костный мозг на глубине 5 см		Доза на хрусталик на глубине 0,3 см		Доза на кожу на глубине 0,01 см	
		СССР	США	СССР	США	СССР	США
1	0,6	10,5	25	75	100	150	150
3	1,8	21,5	-	120	-	240	-
6	3,6	37	-	165	-	330	-
12	7,2	66,5	50	225	200	450	300
Професс. предел за карьеру	-	400	(150-400)	600	400	1200	600

Предельные значения эквивалентных доз (сЗв) за карьеру в зависимости от начального возраста  $T_0$  для мужчин и женщин определяются из следующих уравнений:

$$\text{для мужчин: } D = 200 + 0,075(T_0 - 30) \quad (4)$$

$$\text{для женщин: } D = 200 + 0,075(T_0 - 38) \quad (5)$$

Из представленных уравнений следует, что предельные значения эффективных эквивалентных доз за карьеру для астронавтов мужчин, начинающих свою деятельность в возрасте 25, 35, 45 и 55 лет составляли соответственно 150; 250; 320 и 400 сЗв, а для женщин соответственно 100; 175; 250 и 300 сЗв.

Таким образом, в 80-90-е годы согласно действовавшим в то время нормативным документам в СССР и США допустимые дозы за год полета для кровеносной ткани, хрусталика глаза и кожи различались не очень сильно (менее чем в

1,5 раза). В то же время основные принципы, на которых были основаны оценки радиационной опасности для экипажей космических аппаратов в процессе полета, различались существенно.

В нормативах США основополагающей регламентируемой дозиметрической величиной является значение эффективной эквивалентной дозы за всю профессиональную деятельность астронавтов, при которой предельное значение дополнительного риска канцерогенеза за жизнь не превысит 3 %. Критерий превышения этого значения риска является одинаковым для астронавтов различного пола и возраста, что обусловило снижение допустимых доз для лиц молодого возраста с 4,0 Зв до 1,0-1,5 Зв. В то же время указанные нормативы в регламентирующих документах нашей страны оставались до 2004 г. неизменными и оказались большими, чем в документах США в 1,5 раза.

Принципиальное расхождение обусловлено тем, что ведущим критерием в оценке радиационной опасности в нормативных документах в СССР выступал радиационный риск смертности космонавтов в процессе полета и его зависимость от длительности полета, в то время как в документах США – риск отдаленных неблагоприятных радиационных последствий.

В последующем периоде в наших работах получила дальнейшее развитие концепция обобщенной дозы [23]. Поскольку выход непосредственных, ближайших радиационных эффектов в процессе осуществления полета с одной стороны, а также возможных неблагоприятных отдаленных последствий с другой стороны связан с формированием патологии в существенно различных критических системах организма, отличающихся временем развития поражения, его локализацией, скоростью протекания восстановительных процессов, было предложено значение обобщенной дозы вычислять отдельно на основе своего набора коэффициентов соответственно для ближайших эффектов  $H_B$  и отдаленных последствий  $H_O$ :

$$H_B = (\sum_{i=1}^n KK_{Bi} \cdot KB_{Bi} \cdot KP_{Bi}) \cdot KM_B$$

$$H_O = (\sum_{i=1}^n KK_{Oi} \cdot KO_{Oi} \cdot KP_{Oi}) \cdot KM_O$$

$KM_B$  и  $KM_O$  – коэффициенты модификации радиационного ответа организма в ближайшем в процессе полета и в отдаленном периоде за счет дополнительного действия нерадиационных факторов полета (в дозовом выражении). Этот новый дозиметрический функционал позволяет осуществить переход от сложного характера облучения в условиях космического пространства к условиям стандартного радиационного воздействия.

На рис. 1 показаны результаты экспериментальных исследований, представленных в литературе, касающихся определения коэффициентов относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений в зависимости от линейной передачи энергии (ЛПЭ) для нейтронов реакторного спектра и ускоренных заряженных частиц применительно к оценкам ближайших эффектов после облучения [24], а также зависимости коэффициентов качества излучений  $KK_{Bi}$  от ЛПЭ по данным 26 Публикации МКРЗ и в соответствии с ГОСТ 25645.218-90 [22, 25].

Из данных рисунка видно, что значения коэффициентов ОБЭ применительно к ближайшим радиобиологическим проявлениям являются в 3-4 раза меньшими, чем значения коэффициентов качества  $KK$  излучений, определяемые норма-

тивными документами, поскольку последние относятся к отдаленным последствиям. Поэтому реально рассчитываемые значения радиационного риска в процессе полета являются завышенными даже при отсутствии учета дополнительного модифицирующего действия нерадиационных факторов, присущих космическому полету.



Рис.1. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ по эффектам разных тканей в ближайшем периоде после острых облучений.

Этого нельзя сказать по отношению к оценкам риска отдаленных неблагоприятных проявлений после завершения орбитальных или межпланетных полетов. Сравнительное изучение сокращения продолжительности жизни мелких лабораторных животных в результате воздействия нейтронов и гамма-излучения в различных дозах показало, что значения коэффициентов ОБЭ для нейтронов реакторного спектра могут достигать 30-46.

В отчете Научного комитета ООН по действию атомной радиации 2000 года Генеральной Ассамблее ООН приводятся еще большие значения коэффициентов ОБЭ нейтронов спектра деления на основе цитогенетических исследований культуры лимфоцитов человека 34-53, по индукции опухолей 16-59 [26]. В литературе представлены еще большие значения коэффициентов ОБЭ в отношении поражения нейронов коры головного мозга, а также эпителия хрусталика, которые составили значения от 50 до 100 [27 -30]. Указанные выше значения в 2-5 раз превышают максимальные нормативные величины. Из-за этого возможна недооценка риска отдаленных неблагоприятных радиационных проявлений. Поэтому уточнение величин коэффициентов ОБЭ ускоренных ионов и нейтронов имеет большое значение для обеспечения радиационной безопасности космонавтов при осуществлении длительных межпланетных космических полетов, в том числе при полете на Марс.

На основе концепции обобщенной дозы [23] с уточнением алгоритмов оценок значений коэффициентов  $K_{B_1} \cdot K_{P_1}$  [7-9] для космических излучений, которые учитывают неравномерный характер распределения дозы во времени и по глубине тела космонавтов, нами были проведены расчеты радиационных рисков в процессе межпланетных полетов, продолжительностью до 3-х лет, осуществляемых в период максимума солнечной активности (СА) за различными толщинами

защиты радиационного убежища, а также в процессе осуществления орбитальных полетов на станции «Мир» и «МКС». Эти данные представлены нами в работах [31-34], а также в материалах III Сисакяновских чтений в Ереване в мае 2004 г [35].

Дальнейшие исследования по обоснованию норм радиационной безопасности космических полетов были направлены на ограничение возможных отдаленных неблагоприятных радиационных последствий после завершения космических полетов. На основе материалов «Хронического эксперимента» по многолетнему облучению большой партии собак в режиме, моделирующем дозовые нагрузки при полете к Марсу [35,36], и модели радиационной скорости смертности млекопитающих [37] нами разработаны алгоритмы и проведены расчеты суммарного радиационного риска в течение жизни космонавтов и оценено возможное сокращение продолжительности их жизни после завершения полетов [31, 32, 34, 35].

На рис. 2 и рис 3 представлены рассчитанные значения суммарного радиационного риска в течение жизни космонавтов и возможное сокращение предстоящей продолжительности жизни (СППЖ) после завершения межпланетного полета в период максимума СА за различными толщинами защиты радиационного убежища ( $X_{py}$ ) и для двух толщин защиты бытовых отсеков ( $X_{60}$ ).

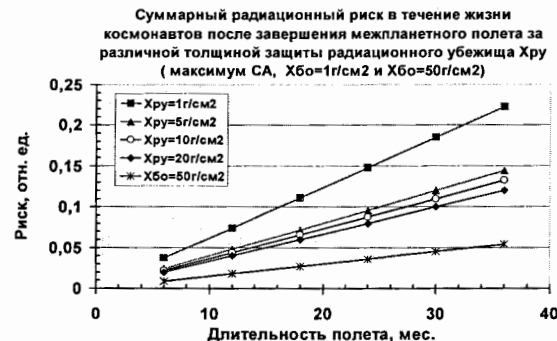


Рис. 2. Значения суммарного радиационного риска в течение жизни космонавтов при различной длительности межпланетного космического полета

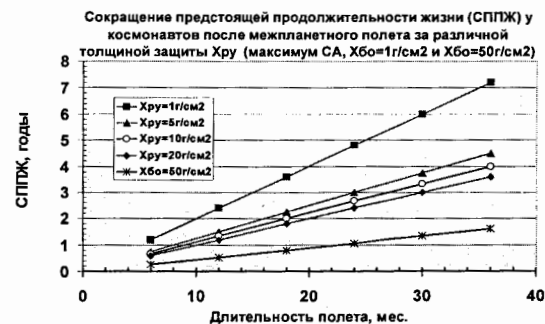


Рис. 3. Возможное сокращение предстоящей продолжительности жизни космонавтов после завершения межпланетного полета различной продолжительности.

Расчетные значения суммарного радиационного риска в течение жизни космонавтов (рис. 2) более, чем в 20 раз превышают представленные ранее нами [31, 32, 34, 35] значения радиационного риска в процессе полета, поскольку в этом случае рассматривается, во первых, существенно более длительный срок, а во вторых, – рассматривается развитие патологии в основных регуляторных системах организма, а не только в системе кроветворения, которая определяет устойчивость организма во время полета к повторным кратковременным воздействиям СКЛ на фоне хронического облучения от ГКЛ.

Как видно из данных рис 2. и рис. 3, при предполагаемой толщине защиты радиационного убежища 20 г/см<sup>2</sup> алюминия и длительности полета 2 года суммарный радиационный риск в течение жизни космонавта не превысит 8 %, а СППЖ составит менее 2,5 лет. Ввиду возможно больших значений биологической эффективности космических излучений, о чем говорилось выше, и заметных значений коэффициентов модификации радиационного ответа в отдаленном периоде за счет нерадиационных факторов полета реальная защита бытовых отсеков, по-видимому, может оказаться большей.

На рис. 4 представлены значения суммарного радиационного риска и риска развития опухолей у космонавтов различных возрастов после завершения двухлетнего межпланетного полета в период максимума СА за толщиной бытовых отсеков 30 г/см<sup>2</sup> алюминия [32, 34, 35]. Для канцерогенного риска представлены максимальная и минимальная оценки, без учета и с учетом коэффициента редукации дозы, учитывающего снижение эффективности радиационного воздействия при малых значениях мощности дозы. Отчетливо видно, что суммарный радиационный риск в течение жизни космонавтов превышает оценку риска развития опухолей в старших возрастных группах в 4-9 раз и практически не зависит от их возраста. Как было показано выше он почти в 20 раз превышает радиационный риск при проведении полета.

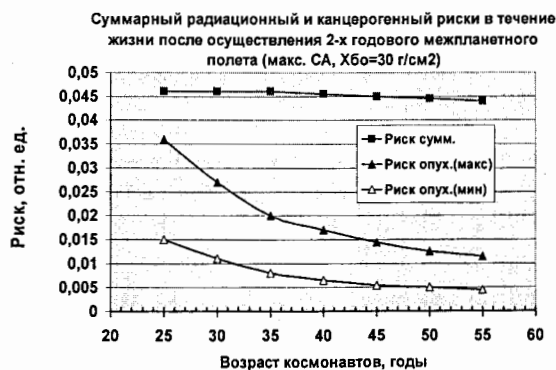


Рис. 4. Суммарный радиационный риск и риск развития опухолей (максимальная и минимальная оценки) для космонавтов различных возрастов после завершения двухлетнего межпланетного полета в период максимума СА.

Учитывая вышеуказанное, суммарный радиационный риск в течение жизни космонавтов, а также возможное сокращение средней предстоящей продолжительности жизни являются наилучшими показателями для оценки опасности радиационного воздействия, которое имеет место в условиях длительных космических полетов. Поэтому именно эти значения принимались за основу в новом документе при решении вопросов нормирования и обеспечения безопасности космонавтов и обосновании новых значений пределов доз для космонавтов за всю их профессиональную деятельность.

Анализ отдаленной патологии через 35-45 лет у лиц, подвергнутых бомбардировкам в Хиросиме и Нагасаки, у работников П/О «Маяк» Челябинской обл., начинавших работу в период становления предприятия в 1948-1950 гг. в условиях повышенных уровней воздействия ионизирующих излучений при суммарных дозах 150-200 сЗв и выше, а также у ликвидаторов последствий аварии (ЛПА) на Чернобыльской АЭС подтвердил наличие заметного радиационного риска, не связанного с развитием опухолей.

В настоящее время показано, что при хроническом облучении, как и при длительном действии ряда других факторов (химическом загрязнении окружающей среды, длительном действии невесомости, психоэмоционального стресса, неионизирующих электромагнитных излучений и др.) имеет место значительное напряжение регуляторных систем организма и более быстрое истощение его компенсаторных резервов, что является основной причиной ускоренного старения. Уменьшение компенсаторных резервов организма, как показали эпидемиологические исследования, приводит к снижению его адаптационных возможностей при действии экстремальных факторов и увеличению частоты заболеваемости и смертности [38-43].

Уже в начальные периоды работы на предприятиях атомной промышленности в 50-е годы XX столетия, когда работники подвергались облучению с относительно высокими значениями мощности дозы, отмечали сопутствующие нарушения кроветворения признаки вегето-сосудистой дистонии (ВСД) и астенического синдрома (АС), сопровождающиеся увеличением частоты жалоб на плохое самочувствие и сниженную работоспособность. В последующие годы, при снижении уровней облучения персонала за год, указанные проявления сглаживались. Однако в отдаленном периоде при суммарных дозах 1,5 Гр и выше учащались различные проявления нарушений в системе кровообращения, в том числе недостаточности мозгового кровообращения. В ряде работ при превышении указанного предела дозы отмечено некоторое увеличение частоты заболеваемости со стороны основных регуляторных систем организма: центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Эпидемиологические исследования показывают, что при более высоких значениях поглощенных доз – 2,5-4 Гр, пролонгируются нарушения мозгового кровообращения, а в старших возрастных группах наблюдается закономерное учащение гипертонии, церебрального атеросклероза, инфарктов и мозговых инсультов. Имеет место более раннее развитие этой патологии в более молодых возрастных группах [44-49].

В последние годы некоторые авторы выделяют ионизирующие излучения среди экзогенных факторов риска цереброваскулярных болезней в связи с отмечаемыми в ряде экспериментальных работ дегенеративными изменениями нейронов в коре головного мозга, в том числе в гипоталамусе, в отдаленном периоде после облучения [9, 27].

В последние годы некоторые авторы выделяют ионизирующие излучения среди экзогенных факторов риска цереброваскулярных болезней в связи с отмечаемыми в ряде экспериментальных работ дегенеративными изменениями нейронов в коре головного мозга, в том числе в гипоталамусе, в отдаленном периоде после облучения [9, 27].

У лиц, пострадавших при атомном взрыве, в ряду причин смерти в старших возрастных группах отмечено учащение церебрального атеросклероза и мозгового инсульта. Впервые влияние облучения на смертность от болезней системы кровообращения, в частности от мозгового инсульта, отмечено при дозах 1,5-2,5 Зв при сроках наблюдения до 25 лет. При обследовании спустя 35 лет исследователи подтвердили увеличение смертности от болезней системы кровообращения у лиц, облученных в дозе 2,0 Зв. Увеличение смертности было более выраженным, чем это могло быть обусловлено возрастом [50-52].

Результаты обследования здоровья ликвидаторов аварии на ЧАЭС за период 1993-2000 гг. также показали существенное увеличение частоты нарушений в системе кровообращения по сравнению с одновозрастным контролем [53-56]. По данным работы [53] при исследовании церебральной гемодинамики у 460 ликвидаторов аварии возрасте до 45 лет в первые 3 года отмечены нарушения сердечно-сосудистой регуляции (ВСД). В последующие годы определялась хроническая недостаточность мозгового кровообращения на фоне нарастающей системной артериальной гипертензии. Дисциркуляторная энцефалопатия у ликвидаторов на фоне атеросклероза сосудов головного мозга характеризовалась значительным ускорением ее развития. Автор отмечает, что наблюдаемые изменения почти на 20 лет опережали календарные сроки ее развития в норме и выделяет лучевую модель ускоренного старения.

В последних исследованиях при анализе результатов 15 летних наблюдений ЛПА на ЧАЭС, которые проводили работы в 1986 г., ведущей патологией также являлись болезни системы кровообращения, распространенность которых была в 3-4 раза выше, чем в обычной популяции. При этом отмечено отчетливое увеличение частоты цереброваскулярных болезней (ЦВБ) и гипертонической болезни. Хроническая недостаточность мозгового кровообращения или дисциркуляторная энцефалопатия достигала в структуре ЦВБ у ЛПА 94 %, а сама частота ЦВБ у ликвидаторов в возрасте 48-52 года достигала 30 %. Основу клинической картины заболевания составляли когнитивные нарушения и расстройства эмоциональной сферы. Неврологический и нейропсихологический синдромы, отмечаемые у ЛПА 1986 г., указывали на патологические изменения глубинных областей коры головного мозга, что нашло свое морфофункциональное подтверждение по данным исследований с помощью эмиссионной однофотонной компьютерной томографии (ЭОКТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ). На сцинтиграммах различных срезов выявлены гипометаболические очаги, локализованные в глубинных отделах лобных, височных, теменных и затылочных долей [54, 56].

Нами проведены расчеты суммарного радиационного риска, риска канцерогенеза и оценки возможного сокращения продолжительности жизни для космонавтов разных возрастов после осуществления орбитальных полетов на станции «Мир» в различные периоды солнечной активности [32, 33, 57, 58]. В таблице 4 представлены эти величины для полета продолжительностью один год.

Анализ соотношения мощностей доз на орбитальных станциях МИР и МКС при их совместном полете приблизительно на одной высоте в конце 2000г по датчикам Д2 бортового радиометра Р-16, сопоставление функций экранированности для других отсеков МКС, данных бортовой и индивидуальной дозиметрии за 11 экспедиций МКС за период 2000-2005 гг. [33, 59, 60] показал, что защита Российского модуля МКС за счет суммарного комплекса оборудования и других

модулей является существенно большей, так что мощность дозы оказывается значительно сниженной по сравнению с защищенностью на станции «МИР». Сопоставление результатов индивидуального и оперативного дозиметрического контроля за 11 экспедиций на МКС и за 28 экспедиций, проведенных на станции «Мир», показало, что уровни дозовых нагрузок на членов экипажей МКС в периоды минимума и максимума солнечной активности оказались приблизительно в 1,5 раза более низкими. Соответственно во столько же раз оказываются ниже расчетные значения радиационного риска отдаленных неблагоприятных проявлений для космонавтов после завершения годового полета.

Таблица 4. Расчетные значения среднетканевых эквивалентных доз для космонавтов в результате годового полета на ОС «МИР» в различные периоды СА и возможные отдаленные последствия

Цикл солнечной активности	Минимум СА	Промежуток СА	Максимум СА
Среднетканевая эквивалентная доза, сЗв	19,3	17,6	16,0
Суммарный радиационный риск в течение жизни, %	1,93	1,76	1,6
Риск, % развития опухолей в течение жизни у космонавтов в возрасте			
To=30 лет	1,03	0,92	0,85
To=40 лет	0,67	0,61	0,55
To=50 лет	0,52	0,48	0,43
Ожидаемое сокращение продолжительности жизни (годы) у космонавтов в возрасте			
To=30 лет	0,67	0,61	0,55
To=40 лет	0,59	0,54	0,49
To=50 лет	0,51	0,47	0,43

В 2004 г. были утверждены новые методические указания МУ 2.6.1. 44-03-2004 «Ограничение облучения космонавтов при околоземных космических полетах» для обеспечения радиационной безопасности космонавтов применительно к длительным орбитальным космическим полетам [58].

Основной целью при обосновании пределов доз в МУ 2.6.1. 44-03 – 2004 было сохранение нормального уровня здоровья и работоспособности космонавтов не только в полете, но и после завершения трудовой деятельности, а также обеспечить не превышение предельного значения суммарного радиационного риска в течение жизни космонавтов уровнем 10 %. При этом по расчетам возможное сокращение предстоящей продолжительности жизни не превысит 2,7; 3,1 и 3,4 года у космонавтов, начинающих свою профессиональную деятельность в возрасте 50; 40 и 30 лет соответственно.

При обосновании пределов доз для членов экипажей орбитальных космических станций были использованы рассмотренные выше данные 35-45-летних наблюдений за персоналом предприятия «Маяк», который подвергался хроническому облучению в широком диапазоне доз, сведения об отдаленных эффектах у лиц, подвергшихся атомным бомбардировкам в Хиросиме и Нагасаки, а также некоторые данные по характеру изменения здоровья ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС за 15 летний период наблюдения за ними.

Данные, необходимые для расчетов доз в представительных точках Фан-

томов в отсеках орбитальных станций, для оценки радиобиологических эффектов и величин радиационного риска, представлены в ГОСТ и Методических указаниях по проблеме БРЭКАКП [8-22]. Конкретные результаты расчетов среднетканевых эквивалентных доз, эквивалентных доз для кроветворной ткани, хрусталика и кожи в отсеках станции «Мир» для периодов минимума и максимума солнечной активности представлены в работах [9, 33, 57, 61].

Как указывалось выше, для расчетов радиационного риска в процессе полета и в течение всей жизни космонавтов мы использовали функционал «обобщенная доза», вычисляемый на основе среднетканевой эквивалентной дозы, умноженной на ряд коэффициентов, учитывающих сложный характер радиационного воздействия в условиях космического полета. В то же время основным дозиметрическим функционалом для обеспечения радиационной безопасности на Земле согласно [62] является эффективная эквивалентная доза, необходимая лишь для оценок возможного канцерогенного риска в течение жизни.

Нам представляется, что использование среднетканевой эквивалентной дозы, а также обобщенной дозы является более перспективным для решения вопросов радиационной безопасности, поскольку использование этих дозиметрических функционалов позволяет оценивать суммарный канцерогенный и неканцерогенный радиационный риск в течение жизни космонавтов, который для старших возрастных групп является в несколько раз большим, чем последний. На основе значений среднетканевой дозы можно также проводить отдельно расчеты вероятности развития опухолей, а также оценивать риск нарушений в системе кровообращения и увеличение частоты отмеченной выше неопухоловой отдаленной патологии.

Сопоставление расчетных значений локальных эквивалентных доз в различных точках на станции «Мир», эквивалентных доз в представительных точках органов в фантомах, представляющих модель тела человека [11], а также расчетных величин эффективной дозы на основе результатов фантомных измерений на станции «Мир» показало, что величина среднетканевой эквивалентной дозы оказалась на 10-15 % выше рассчитанного значения эффективной дозы и на 20 % выше дозы на костный мозг. [9, 33, 57, 58, 63].

Таким образом, для целей радиационной безопасности космических полетов среднетканевая доза может выступать в качестве верхней, а доза на костный мозг (на глубине 5 см) – в качестве нижней оценки эффективной дозы. Эти величины легко определяются на основе операционных величин (данных о распределении поглощенной дозы по станции по показаниям приборов радиационного контроля и результатов индивидуального дозиметрического контроля). В этих условиях использование среднетканевой эквивалентной и обобщенной доз обеспечивает некоторый коэффициент запаса в отношении оценок радиационного риска и способствует решению большого круга задач по обеспечению радиационной безопасности космонавтов и сохранению их здоровья.

Более высокие оценки радиационного риска, а также наличие комплекса нерациональных факторов, действующих на космонавтов в полете, привели к пересмотру дозовых пределов за период профессиональной деятельности космонавтов. Величина суммарной среднетканевой дозы за период профессиональной деятельности космонавтов в новых Методических указаниях по обеспечению

радиационной безопасности орбитальных космических полетов МУ 2.6.1. 44-03-2004 установлена равной 1 Зв [58]. Она снижена в 4 раза по сравнению с прежним нормативом (ГОСТ 25645.215-85).

В таблице 5 представлены в сравнительном аспекте нормативные уровни доз облучения космонавтов (астронавтов) в разных странах в процессе полета различной продолжительности и за всю карьеру. При установлении пределов доз, регламентирующих уровни радиационного воздействия в процессе космического полета длительностью от одного месяца до года принималось во внимание следующие положения:

1. С учетом ограничений на толщину радиационной защиты и вес КА, а также ввиду необходимости проведения внекорабельной деятельности (ВКД) в настоящих МУ предел дозы для космонавтов за год при осуществлении околоземного космического полета (КП) по дозе на кроветворные органы установлен равным 0,5 Зв.
2. Необходимо ограничение уровня эквивалентной дозы на костный мозг для кратковременного облучения за одно солнечное протонное событие (СПС), а также установление пределов доз за 30 суток и год полета для сохранения работоспособности космонавтов в течение всего времени КП. При превышении установленных в настоящих МУ значений доз возможно кратковременное снижение работоспособности, связанное с первичной лучевой реакцией непосредственно после развития мощного СПС, а также с увеличением вероятности астенизации организма при полетах длительностью около года и выше [1, 2, 4].
3. Пределы доз за год на хрусталик и кожу в МУ 2.6.1. 44-03-2004 установлены в 1,5 раза выше, чем для планируемого повышенного облучения в соответствии с НРБ-99, учитывая внекорабельную деятельность (ВКД) – производственную необходимость периодической работы космонавтов на внешней поверхности станции при меньшем уровне радиационной защиты, а также стохастический характер возникновения СПС.

Из данных таблицы видно, что для космонавтов России разного возраста предельное значение среднетканевой дозы установлено одинаковым 1,0 Зв, поскольку было показано, что суммарный радиационный риск практически не зависит от возраста начала космической деятельности (рис. 4). В то же время для астронавтов разного пола и возраста в нормативных документах США, Японии представлены разные пределы доз за карьеру, поскольку в основу положен только риск развития опухолей, который не должен превышать 3 % и недооценен суммарный радиационный риск.

Основной предел дозы для хрусталика – предельное значение эквивалентной дозы на хрусталик за всю карьеру космонавтов установлен в настоящих МУ равным 2,0 Зв. При превышении этого значения дозы возможно увеличение скорости образования помутнений хрусталика и увеличение частоты образования катаракта, о чем свидетельствуют данные экспериментальных работ и эпидемиологических исследований [28].

При обосновании этого предельного значения дозы на хрусталик для космонавтов России за всю их профессиональную деятельность учитывались полученные в экспериментальных работах высокие значения коэффициентов ОБЭ для ускоренных тяжелых ионов, достигающие при низких уровнях дозы значений в

Таблица 5. Нормативные уровни облучения космонавтов (астронавтов) в разных странах, Зв [58].

Критический орган и глубина в ткани	Длительность периода и возраст космонавтов	Россия		США NASA		Япония NASDA	
		PKA					
Кровотворные органы (5 см)	Однократное	0,15	-	-	-	-	-
	За 30 суток	0,25	0,25	0,25	-	-	-
	За год	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Хрусталик (0,3 см)	Однократное	-	-	-	-	0,5	-
	За 30 суток	0,5	1,0	1,0	-	-	-
	За год	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0
	За карьеру	2,0	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0
Кожа (0,01 см)	Однократное	-	-	-	-	2,0	-
	За 30 суток	1,5	1,5	1,5	-	-	-
	За год	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0
	За карьеру	6,0	6,0	6,0	20,0	20,0	20,0
Среднетканевая (эффективная)	За карьеру при начале работы в возрасте	М	Ж	М	Ж	М	Ж
	25 лет	1,0	1,0	0,7	0,4	-	-
	25-29 лет	1,0	1,0	-	-	0,6	0,6
	30-35 лет	1,0	1,0	-	-	0,9	0,8
	35 лет	1,0	1,0	1,0	0,6	-	-
	36-39	1,0	1,0	-	-	1,0	0,9
	45	1,0	1,0	1,5	0,9	1,2	1,1
	55	1,0	1,0	2,9	1,6	1,2	1,1

в интервале 40-67, а при совсем малых значениях дозы – 100 [29, 30]. Принимались во внимание также полученные недавно данные об увеличении частоты ухудшения прозрачности хрусталика и развитии начальных стадий катаракт у американских астронавтов при существенно меньших 2,0 Зв дозах на хрусталик, накопленных ими за весь период их профессиональной работы [64].

Основной предел дозы для кожи – предельное значение эквивалентной дозы на кожу за карьеру космонавтов, учитывая воздействие галактического и солнечного космических излучений, установлен в настоящих МУ равным 6 Зв. При превышении этого уровня дозы возможны неблагоприятные отдаленные последствия в виде сухости кожи, образования трещин, изменения капиллярного кровотока, дистрофических проявлений, изъязвлений [65-67]. Этот нормативный уровень соответствует нормативному уровню, установленному в NASA США (табл. 5.).

В табл. 6 приведены значения риска отдаленных радиационных последствий при нормативных значениях доз за карьеру, принятых космическими агентствами разных стран, участниц программы МКС. Значения пределов доз в США утверждены национальной комиссией по радиологической защите (NCRP) [68]. Как уже говорилось выше, в США, Японии критерием радиационной безопасности (РБ) является предельный уровень радиационного риска смертности в течение жизни от опухолей (3 %). Предельные значения эффективных доз существенно различаются для космонавтов, начинающих карьеру в разных возрастах.

Предельное значение дозы за весь период профессиональной деятельности для космонавтов России, начинающих карьеру в разных возрастах одинаков и равен 1 Зв. Согласно расчетам на основе среднетканевой дозы значение суммарного радиационного риска в течение жизни не превысит 10 %, риск смертности

от опухолей для космонавтов, начавших карьеру в возрасте 30; 40 и 50 лет не превысит 4,6; 3,1 и 2,4 % соответственно, а возможное сокращение продолжительности жизни не превысит 3,4 года.

Проведенные нами расчеты (см. табл. 6) показывают, что при предельном значении доз для американских астронавтов в возрасте 55 лет (2,9 Зв) суммарный радиационный риск в течение жизни может составить очень высокое значение (около 30 %). Об этом же свидетельствуют недавно полученные данные американских исследователей [69]. В этой работе авторы отмечают еще более высокий риск развития неопухолевой отдаленной патологии, связанной с развитием поражения сосудистого эндотелия и развитием нарушений в системе кровообращения. Они оценивают его как 14 % на 1 Зв.

Таблица 6. Суммарный радиационный риск в течение жизни космонавтов (астронавтов) в %, риск развития опухолей в %, ожидаемое сокращение продолжительности жизни в годах при предельных значениях доз за карьеру, принятых разными космическими агентствами [58].

Отдаленные последствия	Страна	Начальный возраст, годы	Доза за карьеру, Зв							Примечание
			0,6	0,7	0,9	1,0	1,2	1,5	2,9	
Суммарный радиационный риск, %		30	6,0	7,0	9,0	10	12	15	>30	Расчет на основе среднетканевой дозы в России
		40	Те же значения							
		50	Те же значения							
Сокращение продолжительности жизни, годы		30	2,0	2,4	3,1	3,4	4,1	5,0	10	Расчет на основе среднетканевой дозы в России
		40	1,8	2,2	2,8	3,1	3,7	4,5	9,0	
		50	1,6	1,9	2,4	2,7	3,2	3,9	7,8	
Риск опухолей	США	25	2,6	3,0	3,8	4,3	5,2	6,4	12,5	NASA [68]
	Япония	27-29	3,0	3,5	4,5	5,0	6,0	7,5	14,5	NASDA
	Россия	30	2,8	3,2	4,2	4,6	5,6	6,9	13,5	
Риск опухолей	США	35	1,8	2,1	2,7	3,0	3,6	4,5	8,7	NASA [68]
	США	45	1,2	1,4	1,8	2,0	2,4	3,0	5,8	NASA [68]
	Япония	36-39	1,8	2,1	2,7	3,0	3,6	4,5	8,7	NASDA
	Россия	40	1,9	2,2	2,8	3,1	3,7	4,7	9,0	
Риск опухолей	США	55	0,6	0,7	0,9	1,0	1,2	1,5	3,0	NASA [68]
	Япония	>40	1,5	1,8	2,3	2,5	3,0	3,7	7,3	NASDA
	Россия	50	1,4	1,7	2,2	2,4	2,9	3,6	7,0	

Примечание. Выделенные значения соответствуют предельным значениям доз за карьеру для космонавтов, астронавтов разных возрастов, принятых в разных странах.

На III Международном симпозиуме «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» к 100-летию со дня рождения Н.М.Сисакаяна в докладе доктора M.Durante «Cosmic radiation and noncancer risk» автор рассматривает кроме рака дополнительный в результате облучения риск развития в отдаленном периоде нейродегенеративных и сердечных болезней (частоты ишемической болезни сердца и инфарктов), нарушений в иммунной и эндокринной системах, а также сосудистых нарушений. Он оценивает суммарный канцерогенный и неканцерогенный риск при облучении в дозе 1 Зв жителей Хиросимы и Нагасаки за период 1968-1997 гг. равным от 10 до 14 %, а при орбитальных полетах на МКС и при полете к Марсу при накопленных дозах от 2,5 до 2,9 Зв оцениваемый сум-



марный риск превысит 40 %. Механизм неопухолевых эффектов автор связывает с радиационно-обусловленным ускоренным старением.

Представленные выше данные показывают обоснованность новых принятых в России нормативных значений доз для космонавтов, реализующих радиационную безопасность при проведении длительных орбитальных полетов, а также обеспечивающих сохранение здоровья и работоспособности космонавтов в отдаленном периоде после завершения полетов.

### Литература

1. Григорьев Ю.Г., Гуськова А.К., Домшляк М.П., Высоцкий В.Г., Раевская С.А., Маркелов Б.А., Даренская Н.Г., Проблема обоснования допустимых доз ионизирующей радиации для членов экипажа космических кораблей. Доклад на XVI Международном астронавтическом конгрессе, Афины, 13-18 сентября 1965 г., М., Министерство здравоохранения СССР, 1965, 13 с.
2. Григорьев Ю.Г. Радиационная безопасность космических полетов. М., Атомиздат, 1975, 254 с.
3. Ковалев Е.Е. Радиационный риск на земле и в космосе. М.: Атомиздат, 1976, 255 с.
4. Radiobiological factors in manned space flight. Ed. W.H. Langham, National Academy of Sciences, Washington; 1967, 273 p.
5. Шафиркин А.В., Григорьев Ю.Г., Петров В.М. Анализ нормативных документов по проблеме радиационной безопасности космических полетов и предложения по их совершенствованию. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1999, Т.33, № 6, с. 21-32
6. Временные нормы радиационной безопасности при космических полетах (ВНРБ-75), М.: Минздрав СССР, 1976, 8 с.
7. Шафиркин А.В. Исследование эффективности протяженных радиационных воздействий в зависимости от мощности дозы и длительности облучения на основе реакции организма и отдельных его систем в ближайшем пострадиационном периоде. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1998, Т.32, N 3, С. 44-49
8. ГОСТ 25645.219-90 БРЭКАКП. Модель учета влияния пространственной неравномерности радиационного воздействия на обобщенный радиобиологический эффект. М.: Госстандарт СССР, 1991
9. Шафиркин А.В. Радиобиологическое обоснование величин радиационного риска и норм по радиационной безопасности космических полетов. Автореферат дисс. докт. биол. наук М. ГНЦ РФ-ИМБП, 1999
10. ГОСТ 25645.201-83 "Безопасность радиационная экипажа космического аппарата в космическом полете" (БРЭКАКП). Термины и определения М.: Госстандарт СССР, 1984
11. ГОСТ 25645. 203-83 БРЭКАКП. Модель тела человека для расчета тканевой дозы. М.: Госстандарт СССР, 1984
12. ГОСТ 25645.204-83 БРЭКАКП. Методика расчета экранированности точек внутри фантома М.: Госстандарт СССР, 1984
13. РД.50-25645.206-84. БРЭКАКП. Методические указания. Методика расчета ионизационных потерь и пробегов тяжелых заряженных частиц М.: Госстандарт СССР, 1985
14. РД.50-25645.207-85. БРЭКАКП. Методические указания. Методика расчета поглощенной и эквивалентной доз от многозарядных ионов космических лучей. М.: Госстандарт СССР, 1986
15. РД.50-25645.208-86. БРЭКАКП. Методические указания. Методика расчета поглощенной и эквивалентной доз от протонов космических лучей за защитой. М.: Госстандарт СССР, 1986
16. РД.50-25645.210-85. БРЭКАКП. Методические указания. Методика расчета энергетической плотности потоков протонов и нейтронов в космическом аппарате. М.: Госстандарт СССР, 1986
17. ГОСТ 25645.211-85. БРЭКАКП. Характеристики ядерного взаимодействия протонов. М.: Госстандарт СССР, 1986
18. ГОСТ 25645.212-85. БРЭКАКП. Характеристики ядерных взаимодействий многозарядных ионов М.: Госстандарт СССР, 1986
19. ГОСТ 25645.215-85 БРЭКАКП. Нормы безопасности при продолжительности полетов до 3-х лет. М.: Госстандарт СССР, 1986
20. ГОСТ 25645.214-85. БРЭКАКП. Модель обобщенного радиобиологического эффекта. М.: Госстандарт СССР, 1986
21. ГОСТ 25645.134-86 БРЭКАКП. Лучи космические солнечные. Модель потоков протонов М.: Госстандарт СССР, 1986
22. ГОСТ 25645.218-90 БРЭКАКП. Зависимость коэффициента качества космических излучений от линейной энергии М.: Госстандарт СССР, 1991
23. Шафиркин А.В., Григорьев Ю.Г. Методика для оценки опасности радиационного воздействия на космонавтов в условиях длительного космического полета на основе обобщенного дозиметрического функционала // *Радиационная биология, радиоэкология*, 2002, т.42, № 5, с.526-532
24. Шафиркин А.В., Федоренко Б.С. Обоснование зависимости коэффициентов качества излучений от ЛПЭ применительно к оценке ближайших радиобиологических эффектов // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1998, т.32, N 2, С.4-9
25. Радиационная защита. Рекомендация МКРЗ. Публикация № 26 М.: Атомиздат, 1978, 87 с.
26. Источники и эффекты ионизирующих излучений. Отчет НКДАР ООН-2000. Том II, М.: РАДЭКОН, 2002.
27. Федоренко Б.С., Шафиркин А.В., Буденная Н.Н. Морфологические изменения в центральной нервной системе животных в зависимости от дозы и времени после воздействий излучений с различными значениями ЛПЭ. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1998, т. 32, № 3, с. 4-11
28. Абросимова А.Н., Шафиркин А.В., Федоренко Б.С. Вероятность развития помутнений хрусталика и образования зрелых катаракт при действии излучений с различными значениями ЛПЭ. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2000, т. 34, № 3, с.33-41
29. Worgul B., Medvedovsky C., Povers-Risius P., Alpen E. The effect of acceleration iron ions on the murine lens. // *Radiat. Res. Proceed. 8 Intern. Congress Radiat. Res. Edinburg, July 1987, V.1, p. 249*
30. Brenner D.J., Medvedovsky C., Huang G., et al. // *Radiat. Res.*, 1991, V.128, N.1, P.73-81
31. Шафиркин А.В., Венедиктова В.П. Суммарный радиационный риск для космо-

- навов к концу их профессиональной деятельности и за всю жизнь при осуществлении межпланетных и орбитальных космических полетов. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1999, т.33, N5, С. 57-64
32. Shafirkin A.V., Petrov V.M., Kolomensky A.V., Shurshakov V.A. Lifetime total radiation risk of cosmonauts for orbital and interplanetary flights // *Adv. Space Res.*, 2002, V.30. N4., PP. 999-1003..
  33. Шафиркин А.В., Акатов Ю.А., Архангельский В.В., Бондаренко В.А., Коломенский А.В., Митрикас В.Г., Петров В.М. Цетлин В.В. Методика оценки радиационной опасности для членов экипажей орбитальных станций МИР и МКС на основе данных бортового индивидуального дозиметрического Контроля // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2002, т. 36, N1, С. 49-55
  34. Шафиркин А.В., Григорьев Ю.Г., Коломенский А.В. Радиационный риск для космонавтов при осуществлении полета к Марсу // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2004, Т.38, N2, С.3-14
  35. Шафиркин А.В., Григорьев Ю.Г. Радиобиологическое обоснование радиационного риска при осуществлении пилотируемого полета на Марс. Материалы Международных III Сисакьяновских чтений. Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии, Ереван, Армения, 30 мая-3 июня 2004 г., Дубна, 2005, С.155-191
  36. Григорьев Ю.Г., Попов В.И., Шафиркин А.В., Антипенко Ж.Б. Соматические эффекты хронического гамма-облучения. Москва, Энергоиздат, 1986, 196 С.
  37. Шафиркин А.В. Модель радиационной скорости смертности млекопитающих, определяющая отдаленные последствия радиационного воздействия в различных дозах // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1999, т. 33, № 4, с.64-69
  38. Григорьев Ю.Г., Шафиркин А.В., Никитина В.Н., Васин А.Л. Отдаленные эффекты хронического воздействия ионизирующих излучений и электромагнитных полей применительно к гигиеническому нормированию // *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2003,Т.43, N5, С.565-578
  39. Ушаков И.Б. Экология человека опасных профессий. М.- Воронеж: Воронежский государственный университет, 2000, 128 с.
  40. Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука,1972, 122 с.
  41. Мясников В.И., Степанова С.И., Сальницкий В.П., Козеренко О.П., Нечаев А.П. Проблема психической астенизации в длительном космическом полете. М.: Слово 2000, 224 с.
  42. Никитина В.Н. О возможности раннего старения организма с воздействием электромагнитных излучений. // *Клиническая геронтология*, 1997, № 3, С.14-17
  43. Либерман А.Н. Радиация и стресс. Социально-психологические последствия Чернобыльской аварии. С. Петербург, 2002, 159
  44. Сумина М.В., Юрков Н.Н., Ларионова И.К. Неврологические синдромы хронической лучевой болезни в динамике за 30-летний период наблюдения // *Бюлл. рад. мед.* 1983, N3, с.12-17
  45. Юрков Н.Н. Радиационный фактор риска при формировании раннего церебрального атеросклероза у больных в отдаленном периоде ХЛБ. // *Бюлл. рад. мед.*,1983, N3, с.3-7

46. Гуськова А.К., Шакирова И.Н. Реакция нервной системы на повреждающее воздействие ионизирующего излучения. // *Неврология и психиатрия*, 1989, № 2, с.138-142
47. Окладникова Н.Д., Пестерникова В.С., Сумина М.В. Дощенко В.Н. Профессиональные заболевания радиационной природы на первом предприятии атомной промышленности. // *Мед. радиология*,1993, Т.38, №12, с.24-28
48. Азизова Т.В. Состояние нервной системы у лиц, подвергавшихся хроническому профессиональному воздействию ионизирующего излучения (35-45 лет наблюдения). Дисс. канд. мед.наук, М.: ГНЦ РФ-ИБФ, 1999
49. Азизова Т.В., Гуськова А.К. Неврологические синдромы при профессиональном хроническом облучении. // *Вопросы радиационной безопасности*, 2001, № 2, с. 62-71
50. Robertson T.L., Shimizu Y., Kato H. et.al. Incidence of stroke and coronary heart disease in atomic bomb survivors, living in Hiroshima and Nagasaki 1954-1974 // *RERFTR* 12-79, 1979
51. Mine M., Nakamura T., Mori H. et.al Statistical studies on cause of death among A-bomb survivors from 1970-1976 in Nagasaki city. *J. Hiroshima Med. Ass.*,1980, v. 33, p. 401-403
52. Kadama K., Shimizu Y., Sawada H. et.al. Incidence of stroke and coronary heart disease in adult health study sample 1958-1978 // *RERFTR* 22-84, 1984
53. Головченко Ю.И. Радиобиологические аспекты ускоренного старения по данным церебральной гемодинамики Материалы радиобиологического съезда Киев 20-25 сентября 1993г, Пушино, ОНТИ НЦБИ, 1993, с.235-236
54. Иванов В.К., Максютов М.А., Чекин С.Ю. и др. Радиационно-эпидемиологический анализ неонкологической заболеваемости ликвидаторов чернобыльской катастрофы // *Радиация и риск*, 2001, № 12, с.82-98
55. Булдаков Л.А., Лягинская А.М., Смирнова О.В., и др. Эффект раннего старения у участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. // Тез. докладов третьего съезда по радиационным исследованиям. Москва 14-17 октября 1997. Пушино,1997, Т.1, с. 306-307
56. Мешков Н.А., Куликова Т.А. Хроническая цереброваскулярная патология у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС М.: «Комтех-принт», 2006, 204 с.
57. Петров В.М., Акатов Ю.А., Архангельский В.В., Бенгин В.В., Бондаренко В.А., Митрикас В.Г., Коломенский А.В., Цетлин В.В., Черных И.В., Шафиркин А.В., Шуршаков В.А. Обеспечение радиационной безопасности пилотируемых полетов на орбитальной станции "Мир" В кн: Орбитальная станция "Мир". Космическая биология и медицина. Т.1. Медицинское обеспечение длительных полетов, М.: ГНЦ РФ - ИМБП РАН, 2001, С. 187-229.
58. Ограничение облучения космонавтов при околоземных космических полетах (ООКОКП-2004). Методические указания МУ 2.6.1. 44-03-2004. М., 2004, 42 с.
59. Цетлин В.В., Акатов Ю.А., Архангельский В.В. и др. Некоторые результаты мониторинга радиационных условий на борту международной космической станции (2000-2003 гг.)// *Космические исследования*, 2005, Т.43, №5, с.330-334
60. Цетлин В.В., Акатов Ю.А., Архангельский В.В. и др. Результаты мониторинга радиационных условий внутри РС МКС (2000-2005) // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2006, Т.40, № 5, с. 21-26

61. Коломенский А.В., Петров В.М., Шафиркин А.В. Методика оценки радиационных воздействий на космонавтов по показаниям штатного дозиметра при орбитальном полете. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 1998, Т.32, № 4, с. 44-49
62. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99) СП 2.6.1. 758-99, М.: Минздрав России, 1999, 115 с.
63. Yasuda H., Komiyama T., Fujitaka Organ tissue absorbed doses measured with a human torso in the 9-th Shuttle-Mir mission (STS-91) // *Aerospace Env. Med.*, 1999, V.36, p. 105-112
64. Cucinotta F.A., Manuel F.K., Jones J. et al. Space Radiation and Cataracts in Astronauts // *Radiation Research*, 2001, Vol. 156, pp. 460-466
65. Гозенбук В.Л., Кеирим-Маркус И.Б. Дозиметрические критерии тяжести острого облучения человека. М., Энергоатомиздат, 1988, 183 с.
66. Осанов Д.П. Дозиметрия и радиационная биофизика кожи. М.: Энергоатомиздат, 1990, 231 с.
67. Фарбер Ю.В., Шафиркин А.В. Отдаленные последствия воздействия ионизирующего излучения на кожу в зависимости от дозы. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2000, т.34, № 5, с. 38-42
68. National Council on Radiation Protection and Measurement. Recommendations of Dose Limits for Low Earth Orbit. NCRP Report 132. Bethesda MD, 2000
69. Geard C.R., Jenkins-Baker G., Grabham P. et al. Human endothelial cells in 2 D and 3-D system. Noncancer effects and space-related radiations // 4-th International Workshop on Space Radiation Research and 17-th Annual NASA Space Radiation Health Investigators Workshop, Dubna, 2006, pp. 34-35

**ПРОБЛЕМЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В  
ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ, ВЫЗВАННЫХ  
ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО  
ПОЛЕТА**

Штемберг А.С.

*ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва, Россия  
a\_s\_shtemberg@rambler.ru*

Функциональная реакция центральной нервной системы (ЦНС) на облучение в диапазоне доз до 0,5 Зв, которые реально могут быть получены космонавтами во время полета, сводится, главным образом, к усилению генерализованного возбуждения и заметному ослаблению тормозных процессов, по-видимому, в силу ослабления тонуса и снижения работоспособности корковых нейронов (в особенности при длительном хроническом облучении), что в целом характеризует снижение работоспособности ЦНС. Это подтверждает возможную опасность нарушения работоспособности космонавтов в результате радиационного воздействия в процессе дальних длительных полетов.

В настоящее время можно считать доказанным, что ЦНС обладает достаточно высокой чувствительностью к воздействию ионизирующих излучений и способна реагировать даже на очень малые дозы радиации. При этом возбуждение центральной нервной системы, сопровождающееся усилением разнообразных вегетативных функций и повышением обмена веществ, является самой общей неспецифической реакцией организма на любые неблагоприятные для него раздражители (Петров, 1960).

Экспериментальные данные, свидетельствующие о высокой радиочувствительности ЦНС, сводятся к следующему:

- показано, что ионизирующие излучения в самых малых дозах (0,001-0,005 рад) могут служить безусловным раздражителем, способным вызвать у животных реакцию избегания с достаточно точной локализацией источника (Даренская и др., 1962; Горизонтов и др., 1966);
- установлено изменение соотношения активности и метаболических процессов в серотонинергической и норадренергической нейромедиаторных системах мозга (Штемберг и др., 1998);
- зарегистрированы депрессия биоэлектрических потенциалов коры больших полушарий, повышение реактивности к световым раздражителям, усиление колебаний биопотенциалов и другие изменения, свидетельствующие о повышении возбудимости коры при облучении кроликов в дозах от 0,05-1,3 рад (Григорьев, 1963) до 5-25 рад (Королькова, 1959; Court et al 1976);
- установлено изменение функций эмоциогенных подкорковых центров - резкие сдвиги в позитивно-мотивационной системе у крыс при облучении в дозе 150 рад (Арутюнян, Гаспарян, 1974);
- получены данные об изменении поведения, свидетельствующие об усилении генерализованного возбуждения и заметном ослаблении тормозных процессов, по-видимому, в силу ослабления тонуса и снижения работоспособности корковых клеток (в особенности при длительном хроническом облучении) (Малокова, 1958; Самойлова, 1959; Лившиц и др., 1973; Сизан, 1972 и др.).

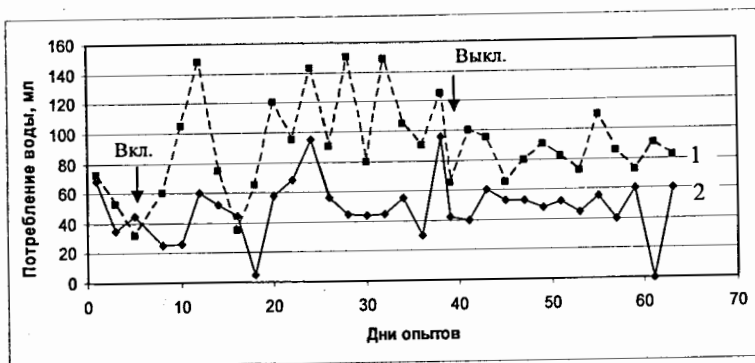


Рис. 1. Потребление воды крысами из поилок, установленных вне зоны облучения (1) и в зоне облучения от источника гамма-излучения (2) ( $N = 1670$  мкр/сек). Стрелками показано время включения и выключения источника (Даренская и др., 1962).

В качестве иллюстрации можно привести данные об избегании крысами поилки, расположенной в зоне действия источника гамма-излучения (рис. 1).

Видно, что с момента включения источника и на протяжении всего времени опыта потребление крысами воды из поилки, находящейся в зоне действия источника, остается значительно ниже, чем из поилки, находящейся в «безопасной» зоне. Следует отметить, что и после выключения источника сохраняется избегание крысами поилки, прежде находившейся в зоне облучения. Эти данные были подтверждены результатами, полученными на других видах животных – мышах, морских свинках и обезьяне.

Другой иллюстрацией могут служить наши экспериментальные данные о динамике выработки условного рефлекса (УР) активного избегания (УРАИ) у крыс в процессе пролонгированного гамма-облучения (выработка УР непосредственно «под лучом») (Штемберг, 2005) (рис. 2).

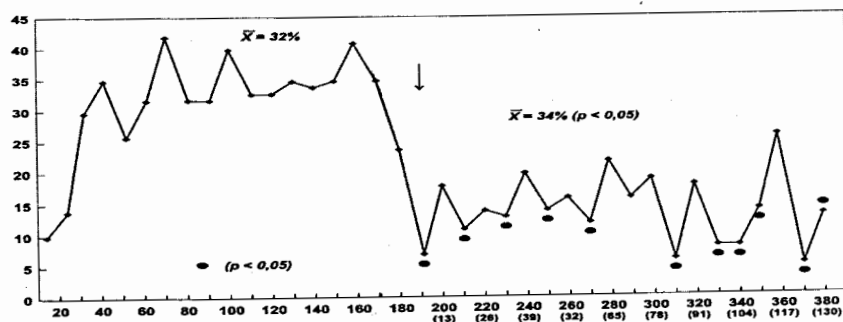


Рис. 2. Динамика числа условнорефлекторных реакций у крыс при непрерывном пролонгированном гамма-облучении. По оси абсцисс – число сочетаний (время после облучения, мин). По оси ординат – среднее число условнорефлекторных реакций, %. Стрелкой показано время начала облучения.  $p$  – достоверность различий (по сравнению с преиррадиационным уровнем).

Видно, что практически сразу после начала облучения число условнорефлекторных реакций достоверно резко снижается и остается таким до конца облучения, сопровождаясь резкими колебаниями, что свидетельствует о высокой радиочувствительности временной связи на ранних этапах ее образования.

К сожалению, экспериментальных данных о нарушениях высшей нервной деятельности (ВНД) при хроническом или приближенных к хроническому режимам облучения, наиболее адекватно моделирующих радиационную обстановку в условиях космического полета, крайне мало, что связано с техническими трудностями и высокой стоимостью проведения таких экспериментов. Имеющиеся данные свидетельствуют о:

- снижении силы и подвижности возбудительного процесса, повышении инертности тормозного процесса, нарушении дифференцировочного торможения в результате трехлетнего хронического облучения, что в целом характеризует снижение функциональной работоспособности ЦНС (фракционированное облучение мышей в течение года в суммарной дозе 150 рад; хроническое облучение собак в суммарной дозе 374 рад) (Сизан, 1972);
- значительном замедлении выработки инструментальных УР и затруднении выработки дифференцировок при длительном фракционированном облучении в малых дозах (Джалагония, Джикидзе, 1969: еженедельное облучение павианов-гамадрилов в течение 64 месяцев в суммарной дозе 1452 рад).

Подобные нарушения могут оказаться существенными для работоспособности космонавтов в длительном полете, особенно при внештатных ситуациях (в частности, во время интенсивных солнечных вспышек). Этот фактор может оказаться одним из критических при планировании полета к Марсу.

Изложенное можно проиллюстрировать также данными о нарушениях цепного УР у собак, полученными в результате проведения уникального хронического эксперимента в 1960-е гг. (рис. 3).



Рис. 3. Динамика цепного УР у собак в процессе хронического гамма-облучения. 1 – контроль; 2 – опыт (Сизан, 1972).

Уже на втором месяце после начала облучения число условнорефлекторных реакций у облучаемых собак достоверно отставало от контрольных значений, несмотря на незначительную накопленную дозу (около 8 рад), и это отставание сохранялось в течение первых 6-ти месяцев опыта.

Одной из наиболее существенных реакций ЦНС на длительное хроническое

облучение в малых дозах является развитие астенического синдрома, которое может привести к нарушениям работоспособности и операторской деятельности космонавтов. Данные, полученные в результате обследования лиц, в течение длительного времени профессионально работавших с источниками ионизирующих излучений, свидетельствуют о следующих функциональных нарушениях в ЦНС при развитии астенического синдрома при облучении в малых дозах, не превышающих 3-5 Бэр в год (Глазунов и др., 1971):

- нарушения болевой и тактильной чувствительности;
- нарушения памяти (в тесте «кривая заученности» по Лурия зарегистрировано 2 типа нарушений: быстрое запоминание с последующими выпадениями памяти; очень медленное запоминание с забыванием отдельных слов);
- ослабление функциональной подвижности зрительного и слухового анализаторов после нагрузки;
- повышенная утомляемость;
- снижение скорости и точности работы: по методу корректурной пробы получено снижение объема работы и увеличение примерно в 2 раза количества ошибок;
- увеличение числа ошибок примерно в 7 раз при полиэффеторном электрофизиологическом обследовании, резкое увеличение и нестабильность ЛП двигательных ответов, тоническая напряженность мышц в покое, тахикардия, аритмия, подавление или ослабление  $\alpha$ -ритма.

Наблюдающиеся нарушения, возникающие в результате развития астенического синдрома, свидетельствуют о снижении функциональной активности ЦНС как результате хронического истощения компенсаторно-приспособительных реакций и развития дистрофических процессов, что может привести к существенным нарушениям работоспособности и операторской деятельности космонавтов в дальних длительных полетах

При этом наиболее всесторонним и адекватным методом оценки функциональных нарушений при астеническом синдроме является полиэффеторное электрофизиологическое обследование с одновременной записью потенциалов мозга, двигательных реакций и других показателей при выполнении заданий, требующих внимания.

В настоящее время для получения более полных и адекватных экспериментальных данных, на основании которых можно было бы судить о возможности нарушений операторской деятельности космонавтов при дальних длительных полетах, а также провести их экстраполяцию на человека и оценить риск этих нарушений в отношении возможных сбоев в выполнении полетного задания необходимо моделирование конкретных видов операторской деятельности и изучение нервных и нейрохимических механизмов обнаруженных нарушений.

Для решения этой задачи целесообразно моделирование в экспериментах на животных следующих элементов операторской деятельности:

- прием информации (формирование перцептивного образа – обнаружение, опознание и различение);
- характеристики кратковременной (оперативной) и долговременной памяти;
- задачи слежения (класс непрерывных перцептивно-моторных задач операторской деятельности);
- задачи выбора (выделение релевантного стимула из шумового потока).

Полученные в результате таких модельных опытов экспериментальные данные позволят сделать выводы об изменении таких показателей операторской деятельности как быстродействие, надежность и точность.

Следует подчеркнуть, что необходима информация о механизмах, лежащих в основе функциональных нарушений в ЦНС на всех уровнях ее организации. Поэтому можно выделить следующие маркеры таких нарушений в эксперименте на животных:

- на нейрохимическом уровне – оценка соотношения активности серотонинергической и катехоламинергической нейромедиаторных систем мозга (параллельное экспериментальное изучение и анализ нейрохимических механизмов, лежащих в основе зарегистрированных нарушений, сопоставление их с поведенческими изменениями и поиск корреляций: исследование содержания основных представителей моноаминов и их метаболитов в различных структурах мозга и периферической крови), а также исследование уровня и активности нейропептидов;
- на функциональном уровне – данные об электрофизиологических изменениях в различных структурах мозга на основе количественного спектрального анализа ЭЭГ по Фурье;
- на интегративном уровне (поведение) – изучение центральных нервных процессов, лежащих в основе элементов поведения, моделирующих соответствующие элементы операторской деятельности.

С нашей точки зрения, может быть предложен следующий алгоритм получения экспериментальных данных, необходимых для оценки радиационных нарушений операторской деятельности в условиях космического полета.

1. Оценка вероятности и характера радиационных нарушений ВВД, регистрируемых в эксперименте по методикам, моделирующим различные виды операторской деятельности.

Критериями данных нарушений могут быть: число правильных реакций, число ошибок, число отказов от выполнения задачи, изменения латентных периодов реакции, число межсигнальных реакций, невротических реакций и др., а также вероятность проявления данных нарушений в зависимости от дозы и режима облучения.

2. Оценка граничных значений уровня сложности предъявляемых задач, при котором возникают существенные нарушения их выполнения, зависимости характера нарушений от уровня сложности и грация возрастания риска нарушений при повышении сложности задач.

3. Зависимость характера и вероятности нарушений от характера усложнения предъявляемых задач.

Критериями данных классов нарушений могут являться: появление тех или иных нарушений выполнения данного класса задач при повышении их сложности в зависимости от дозовых нагрузок и режима облучения, характер этих нарушений, риск возникновения данных нарушений.

4. Анализ характера изменения центральных нервных процессов, лежащих в основе наблюдающихся нарушений, и сопоставление их с данными о нейрохимических и нейрофизиологических изменениях.

Для экспериментальной оценки интегративных функций ЦНС при радиационном воздействии в опытах на животных могут быть применимы следующие

методики:

- методики, направленные на оценку памяти: УРПИ, УРАИ (ранние стадии выработки и закрепления), пробы на угашение УР;
- методики дифференцировочных УР со специальными функциональными пробами (сближение условного и дифференцировочного раздражителей, переделка сигнального значения раздражителей и др.);
- методики, направленные на оценку когнитивных функций мозга – оценка элементов рассудочной деятельности (экстраполяционные рефлекссы по Крушинскому и др.);
- компьютеризованные методики, непосредственно моделирующие элементы операторской деятельности: инструментальные УР различной сложности.

Необходимым элементом оценки функциональных изменений в ЦНС в условиях космического полета является всесторонний учет факторов и условий, модифицирующих радиационный эффект. Их можно разделить на следующие две большие группы.

1. Факторы, формирующие функциональное состояние ЦНС в период радиационного воздействия:

- типологические и индивидуальные особенности ВВД;
- уровень возбуждения ЦНС;
- стресс-факторы, эмоциональное состояние, истощение ЦНС;
- уровень мотивации данной формы поведения;
- степень закрепления навыка (УР);
- хронобиологические факторы.

2. Модифицирующее воздействие внешних физических факторов:
- факторы, связанные с количественным и временным распределением поглощенной дозы (качество излучения, пространственная и временная неравномерность облучения и др.);
  - нерадиационные факторы космического полета (перегрузки, вибрация, невесомость, измененная газовая среда, локомоторная депривация и др.).

Практически все исследователи, занимавшиеся вопросами оценки функциональных нарушений в ЦНС при действии ионизирующих излучений, подчеркивали огромную роль индивидуальных и типологических особенностей ВВД. Поэтому в качестве наиболее яркой иллюстрации значения факторов первой группы можно привести наши данные о динамике нарушений УРАИ у крыс противоположных типологических групп после гамма-облучения в дозе 100 Гр (Штемберг, 1987) (рис. 4). Видно, что, даже при облучении в сверхлетальной дозе, когда, как правило, индивидуальные различия в значительной степени нивелируются, мы наблюдаем инверсивную картину динамики нарушений поведения у крыс с преимущественно тормозным и преимущественно возбуждимым типами ВВД: лучшее сохранение УР у крыс тормозного типа в первой фазе нейрорадиационного синдрома, когда превалирует радиационно-индуцированное возбуждение и, наоборот, более эффективное воспроизведение УР у крыс возбуждимого типа в фазе угнетения. Разумеется, при облучении в малых дозах этот фактор, а также другие факторы первой группы выступают на первый план. К сожалению, таких экспериментальных данных также крайне мало.

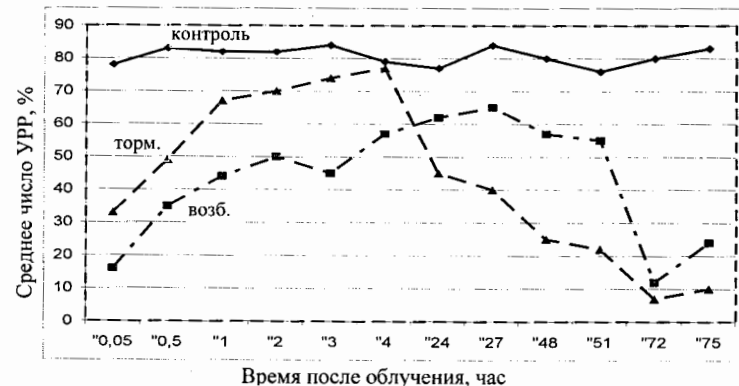


Рис. 4. Динамика УРАИ у крыс разных типологических групп после облучения в дозе 100 Гр.

Значение факторов второй группы можно проиллюстрировать данными о комбинированном действии облучения в дозе 50 рад и одного из факторов космического полета – вибрации – на условнорефлекторную деятельность крыс (Лившиц и др., 1973) (рис. 5).

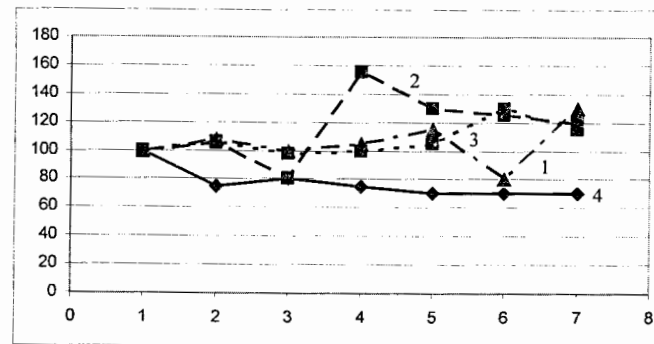


Рис. 5. Влияние облучения в дозе 50 рад (1), вибрации (2) и комбинированного действия этих факторов (3) на среднюю длительность латентного периода дифференцировочного УР на тон+. 4 – контроль (Лившиц и др., 1973).

Представленные на рис. 5 данные демонстрируют сложность комбинированных эффектов радиационного и нерадиационных факторов полета. Видно, что комбинированное их действие далеко не всегда приводит к аддитивному или синергическому эффекту: в данном случае изолированное действие вибрации привело к более выраженному изменению латентного периода УР, чем в сочетании с облучением. Это диктует необходимость глубокого изучения и учета всех перечисленных выше факторов при экспериментальной оценке функциональных изменений в ЦНС применительно к условиям космического полета.

В заключение может быть предложена следующая система ключевых требований к эффективной системе оценки функциональных изменений в ЦНС в условиях космического полета:

- учет индивидуальных функциональных особенностей и функционального состояния ЦНС;
- учет влияния модифицирующих факторов (в т. ч. нерадиационные факторы полета);
- сочетание экспериментальных (на животных) и клинико-физиологических методов;
- подбор адекватного комплекса методик, включающих оценку изменений на всех уровнях организации ЦНС;
- учет характеристик космических излучений;
- вопросы экстраполяции экспериментальных данных на человека.

#### Литература

1. Арутюнян Р.К., Гаспарян Я.А. О состоянии позитивно-мотивационной системы головного мозга белых крыс при лучевом поражении. // 2-й съезд Арм. физиол. о-ва (доклады). Ереван. 1974. С. 192-195.
2. Глазунов И.С., Благовещенская В.В., Мартынова Г.Н., Гинзбург Д.А., Лосев А.А. Методические возможности объективизации астенического синдрома при воздействии малых доз ионизирующей радиации. // Действие малых доз ионизирующей радиации на центральную нервную систему. Мат. Всес. симп. Минск. 1971. С.48-54.
3. Горизонтов П.Д., Даренская Н.Г., Домшляк М.П., Цыпин А.Б. Общие проблемы радиочувствительности организма. // Вопросы общей радиобиологии. М. Атомиздат. 1966. С. 63-89.
4. Григорьев Ю.Г. Лучевые поражения и компенсация нарушенных функций. М. Госатомиздат. 1963.
5. Даренская Н.Г., Цыпин А.Б. К вопросу о зависимости между радиочувствительностью нервной системы и лучевой поражаемостью животных. // Радиобиология. 1962. Т. 2. № 3. С. 468-472.
6. Джалагония Ш.Л., Джикидзе Э.К. Изменение высшей нервной деятельности обезьян после общего хронического гамма-облучения. // Радиобиология. Радиотерапия. 1969. Т.10. №1. С. 102-108.
7. Королькова Г.А. Электрофизиологическое исследование влияния ионизирующей радиации на функциональное состояние коры головного мозга в норме и патологии. // Тр. Ин-та высш. нервн. деят. Сер. патофизиол. 1959. Т. 3. С. 121-335.
8. Лившиц Н.Н., Мейзеров Е.С., Закирова Р.М., Тихая В.А. Исследование действия вибрации, облучений и комплекса этих факторов на условные рефлексы и лабиринтные навыки в опытах на одних и тех же животных. // Функции центральной нервной системы при комбинированном действии стресс-факторов. М. Наука. 1973. С. 51-61.
9. Малокова И.В. Влияние малых доз рентгеновских лучей на угасательное торможение у мышей. // Тр. Ленингр. санитарно-гигиенич. мед. ин-та. Л. 1958. Т. 44. С. 342-349.

10. Петров И.Р. Общие приспособительные реакции при действии сильных неблагоприятных для организма раздражителей. // Физиол. журн. 1960. Т. 46. № 10, С. 1224-1229.
11. Самойлова Л. Г. О некоторых механизмах влияния малых доз хронического общего рентгеновского облучения на высшую нервную деятельность и некоторые вегетативные функции белых крыс. // Мед. Радиология. 1959. Т. 4. № 8. С. 13-17.
12. Сизан Е.П. Цепные двигательные условные рефлексы при длительном гамма-облучении. Дисс. канд. биол. наук. М. 1972.
13. Штемберг А.С., Шафиркин А.В., Короткевич А.О. Критерии прогнозирования индивидуальной радиорезистентности на основе оценки функционального состояния регуляторных систем организма. // "Космическая биология и авиакосмическая медицина". Тез. докл. XI конф. Т. 2. М., 22-26 июня 1998 г. М. 1998. С. 336-339.
14. Штемберг А.С. Роль индивидуальных типологических особенностей высшей нервной деятельности в формировании и радиационной устойчивости упроченных двигательных оборонительных условных рефлексов у крыс. // Известия АН СССР. Сер. биол. 1987. №4. С. 547-557.
15. Штемберг А.С. Нарушения высшей нервной деятельности крыс в процессе длительного гамма-облучения. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2005. Т. 39. №4. С. 50-52.
16. Court L., Dufour R., Bassant M.H., Fatenic M. Modifications de l'active électrique cerebrale spontanée et évoquée chez le lapin adulte soumis à une irradiation gamma globale. // Radioprotection. 1976. V. 11. № 2. P. 87-102.

## THE BRAIN NEUROENDOCRINE IMMUNE SYSTEM: BIOSYNTHESIS OF ANTIBACTERIAL PEPTIDES

Galoyan A.A.

*H. Buniatian Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia galoyan@sci.am*

More and more data appear on the brain immune system availability, which is common with "peripheral" immune system. Cytokines, chemokines and other known factors of intercellular communication are generated not only in blood cells (lymphocytes, macrophages, neutrophils, monocytes) but also in neurons and brain glia along with classical neurotransmitters synthesis. Some of them are expressed in neurons in lesions or in special functional state of neurons. For example, "brain-born" cytokines [1] are expressed in hippocampus during Long Term Potentiation. Electrically active neurons actively suppress MHC inducibility of surrounding glia cells and neurons. After incubation of the neurons, by tetrodotoxin MHC inducibility is restored [2-4]. Thus, electrically active neurons modulate immune reactivity of CNS by down-regulating MHC expression. "The functional significance of the MHC expression was still subject to debate. The conventional wisdom that immune recognition molecules are not present in the CNS has now been challenged by the study of Shatz and colleagues [5] whose data suggest the widespread use of a network of MHC I receptor-ligand systems in electrically active neurons at time when they are undergoing remodeling and synaptic plasticity... The study of MHC I expression in neurons has been planned by large numbers of conflicting reports. Although more sensitive studies using PCR based analysis of gene expression have recently demonstrated MHC I expression in cultured neurons *in vitro* allows consideration of new and unexpected conclusions regarding the relationship between MHC I expression and neuronal activity. Moreover, the study provides new direction to the search for molecular mechanisms underlying complexity in the brain, by suggesting the need to reevaluate whether the mechanisms by which T cell clones generate diversity are also utilized by individual neurons" [6]. Taking into account a large experimental materials, concerning mainly the chemistry and biology of the newly discovered cytokines and other signal molecules of immune system (immunophilin etc.) that are produced by neurosecretory magnocellular nuclei of hypothalamus and very sensitive of NSO and NPV neurosecretory cells to the different neurotransmitters and other chemicals, I wrote: "It becomes evident that in addition to the known intimate structural neurohumoral interaction between the nervous and immune systems some neuronal cells of the brain seem to fulfill the T- and B-lymphocyte functions" (7 p.169). Study of molecular genetic mechanisms of immune response by neuronal cells, elucidation of all components of the brain immune system and mechanisms of their participation in immune response are the main goal of molecular neuroimmunology. It is necessary to gain more information about immunocompetent neural cells as well as about immune molecules in brain neurons.

### System of neurosecretory hypothalamus-endocrine heart

It was shown the neurosecretion of organotropic (cardioactive) neurohormones and their protein carriers by NSO and NPV. Isolation of cardioactive (coronary-dilatory) peptide neuro-hormones from hypothalamus, their specific carriers and precursors can be considered as an important event in this field. Coronary dilatory activities of mammalian hypothalamic extracts were first reported in 1962 [8], and conditionally

named as neurohormones "C" and "K". In 1964 was discovered the first specific proteins of bovine hypothalamus possessing by coronary-dilatory properties. They are the precursors and carriers of substances NC and NK [9-10]. The coronary dilatory activity is involved in lymph flow regulation [11]. Later they were isolated NC and NK from the neurosecretory granules of hypothalamus neurohypophysial system, produced by *N. Paraventricularis* and *N. Supraopticus* [12]. The studies of several physical, chemical and biochemical properties let us to characterize the multiple forms of NC [13]. The cardioactive protein-hormonal complexes are the neurochemical systems of heart coronary circulation [14] as well as blood clotting mechanisms regulation [15]. Neurosecretory peptides of hypothalamus possesses both cardiotropic and immunotropic activities. It was shown that cardioactive neuro-hormones and protein hormonal complexes are produced also by the neurosecretory cells of hypothalamus. They localized mainly in synaptosomes of hypothalamus as well as in neuro-secretory granules of hypothalamus – neurohypophysial system. In 1967 we demonstrated the phenomenon of neuropeptide neurosecretion by atrial ganglionic cells [16]. As indicated "These observations were made prior to the reports of Dr. De Bold and associates regarding the synthesis and storage of atrial natriuretic peptides within the atrium" [17-18]. Later on we isolated from the bovine atrial coronary active peptides as well as novel cardioactive protein hormonal complexes. It was discovered that atrial ganglionic cells and secretory cells of pancreas produces hormones (non insulin, glucagon etc.) which are stimulators (liberins) of hypothalamus coronary dilatory hormones release into general circulation [10, 12]. It is time to consider the neuro-endocrine heart and neurosecretory hypothalamus as the functional system playing an exclusively important role in the adaptation of the organism in general [12, 13, 19]. Organotropic (cardioactive), atrial peptides and signal molecules of brain neuro-endocrine immune system are a coupled system. They are releasing factors for NC and NK as well as signal molecules of neuroendocrine immune system produced by *N. Paraventricularis* and *N. Supraopticus* of hypothalamus (see later).

### New neurosecretory cytokines produced by hypothalamus neuroendocrine cells

Discovery of cytokines secretion by hypothalamus magnocellular nuclei (*N. Paraventricularis* and *N. Supraopticus*) as well as biosynthesis a new class cytokines (proline-rich peptides) (PRPs) illustrates the presence of cytokine genesis neuronal mechanisms in brain neuroendocrine cells along with vasopressin, oxytocin and cardioactive neurohormones. Discovery of strong antibacterial (*in vivo*) and antiviral (*in vitro*) properties of hypothalamic proline rich peptides and immunotropic properties of PRP family cytokines shows the presence of brain protective mechanisms against infection [20] which is an attribute of immune system. In other words, brain immune system specificity consists in the protective neuropeptides production in neurosecretory cells, and these peptides oppose to different infections *in vivo*.

### Discovery of the brain new neurosecretory cytokines

More than 50 years has passed after discovery of a primary chemical structure of vasopressin and oxytocin (produced by neurosecretory cells of hypothalamus) and their synthesis by Nobel Prize winner Vincent Du Vigneaud [22]. However, except for vasopressin and oxytocin, which are synthesized in neurosecretory cells of NSO and NPV of hypothalamus and were isolated from the neurosecretory granules of neurohypophysis it was not known anything more before our investigations.



We have succeeded in the discovery, isolation from neurosecretory granules of bovine hypothalamus and neurohypophysis family of organotropic (cardioactive) neurohormones and their protein carriers [7, 10] as well as a series of novel cytokines, and determination of their primary structure:

PEAK	PEPTIDES		
I.	Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro	(27-36)	PRP-4
II.	Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly	(25-37)	PRP-3
III.	Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val	(25-38)	PRP-2
IV.	Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr	(25-39)	PRP-1
V.	H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub>	(Vasopressin)	
VI.	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub>	(Oxytocin)	

Using the RP300 C18 column we separated six major peptides.

Neurosecretory granules were isolated from bovine neurohypophysis by a modified method described elsewhere [12, 21, 23].

The first time we showed the neurosecretion of interleukins as well as new immuno-modulators from the neurosecretory granules of hypothalamus.

### Antibacterial activity of PRP-1

In our recent publications immunological methods of investigations of antibacterial properties of PRPs were described [24-27] as well as some fundamental biochemical mechanisms of their antibacterial action [28]. Data obtained indicate that PRP-1 is a strong antibacterial. Antibacterial properties of PRP-1 were tested on the following species of bacteria: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella Flexneri*, *Shigella Sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*.

All these highly virulent strains of bacteria were received from I. Metchnikoff Vaccines and Sera Institute (Moscow, Russia) and displayed typical cultural, biochemical, and morphological properties. Before use, microorganisms were cultured in 100 ml of 2.5% Nutrient Broth (Difco Lab., Detroit, MI) for about 18 h at 37 °C. Then the bacteria were collected by centrifugation for 10 min at 1,500 g, washed twice with PBS, and resuspended in gelatin-Hanks-balanced salt solution (HBSS) at a concentration of 1-2 x 10<sup>8</sup> bacteria/ml. 500 µl of each sample dilution was injected i/p into mice. Portions of suitable dilutions were also inoculated onto agar plates for precise enumeration of bacterial cells (colony-forming unit, CFU). Identification of CFU of microorganisms was observed with different type-specific agglutination standard sera. Female pathogen-free BALB/c, C57BL/6J, C3H/HeJ, (CBAXC57BL/6J) F<sub>1</sub> strains of mice at the age of 6-8 weeks (Laboratory of Animals "Stolbowaya" of the RAMS, Moscow) were used in the experiments.

**Determination of lethal doses (LD) of bacteria in mice.** Bacteria of each strain were injected i.p into 10 mice in doses ranging widely in CFU. The surviving mice were counted daily for 21 days, and the 50% and 100% LDs (LD<sub>50</sub> and LD<sub>100</sub>) were calculated counting 21-day survivors using Probit analysis.

**Growth of bacteria in the internal organs of infected mice.** At different time points after bacterial challenge mice were killed by cervical dislocation, and their peripheral blood, liver, spleen, intestinum duodenum, mesenterial lymphatic nodes, intestinum jejunum, and intestinum crassum were obtained aseptically. 100 µl of each tissue homogenate dilution was spread over nutrient agar broth. Colonies of bacteria were counted after 18 h of incubation at 37 °C.

**Determination of antibacterial antibody formation in blood of infected mice.** In blood sera of mice infected with *S. typhimurium* and *S. cholerae suis* the titers of anti-O-antibodies to *Salmonella* O-antigens were estimated by passive hemagglutination test with erythrocyte ultrasound-O-diagnostic system.

**Determination of bactericidal activity of macrophages (MF).** The method of direct measurement of the bactericidal activity of peritoneal macrophages (PMF) was used with minor modifications.

Briefly, 1.0 ml of a suspension of viable *S. typhimurium* in sublethal dose in 0.1% gelatin-Hanks solution with 10% newborn calf serum was injected i/p into mice. After 3 min the mice were killed, and peritoneal cells were collected. To remove the extra-cellular bacteria, the cell suspension was washed three times with ice-cold gelatin-Hanks solution and centrifuged for 4 min at 110 g; the MF concentration was then adjusted to 6 x 10<sup>6</sup> cells/ml. MF containing bacteria were reincubated at 37 °C, and at various time points the number of viable intracellular bacteria was determined by a microbiological assay. PRP-1 was administered 1 h before the challenge of mice with bacteria.

The direct action of PRP-1 on the growth of bacteria in *in vitro* cultures was estimated microbiologically. It was established that PRP-1 did not possess an etiotropic effect. PRP-1 did not change quantitative and qualitative parameters of bacterial growth.

### Effects of PRP-1 on the survival of mice infected with different strains of gram-negative and gram-positive bacteria at lethal doses

It was found that PRP-1 administered into mice as a single bolus dose (10<sup>-8</sup> g/mouse), 24 h before their challenge, enhanced survival of mice infected with lethal doses of bacteria 1.64 - 3.8 times (p < 0.001) and had a pronounced protective effect during the period of infection development (Table 1).

Table 1. Effect of PRP-1 on the change in survival rate of (CBAXC57BL/6J)F<sub>1</sub> mice infected with different bacteria at lethal doses.

Bacteria	Survival rate (%) of infected mice	
	Treated with PRP	Control (without PRP)
<i>Salmonella typhimurium</i>	78.6 ± 1.8	32.2 ± 2.2
<i>Salmonella cholerae suis</i>	70.0 ± 1.8	34.6 ± 1.8
<i>Salmonella typhi</i>	58.2 ± 1.3	26.3 ± 1.3
<i>Escherichia coli</i>	62.4 ± 2.1	28.6 ± 1.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88.2 ± 1.9	23.2 ± 1.2
<i>Shigella Flexneri</i>	44.4 ± 1.4	25.6 ± 1.4
<i>Shigella Sonnei</i>	36.4 ± 1.5	22.2 ± 1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	43.5 ± 1.5	21.5 ± 0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20.0 ± 2.0	9.2 ± 0.6

It was of interest that if mice were treated with PRP-1 14 days before *S. typhimurium* infection at LD<sub>100</sub>, their survival was 25% in the absence of survivors in controls. More detailed investigation showed that the most effective doses of PRP-1 were in the range of 10<sup>-7</sup>-10<sup>-9</sup> g/mouse. The most effective time for PRP-1 administration was within the range 24 - 1 h before infection. It was of interest that protective effect of PRP-1 did not depend on the volume of its injection or on the way of its

injection (i/p or i/v). When carrageenan for blockage of MF was injected into mice, no survivors were observed among either control or PRP-1-treated mice.

#### Effects of PRP-1 on the growth of bacteria in the internal organs of mice infected with *S. typhimurium*

It was established that after PRP-1 administration the duration of the persistence of the microorganisms in the body was reduced and the elimination of bacteria from the body was enhanced. Thus, the number of viable bacteria in internal organs of PRP-1-treated mice was decreased as follows: in blood by a factor of 4.02, in liver by a factor of 1.97-2.34, in spleen the decrease coefficient was 4.04-2.02, in intestinum duodenum it was 2.05-1.57, in mesenterial lymphatic nodes, 2.32-2.74, in intestinum jejunum, 3.4 - 2.16, in intestinum crassum, 1.41-1.8 ( $p < 0.001$ ; the data correspond to day 5 and day 10 of observation, Table 2). No viable bacteria were observed on day 10 in blood and on day 21 in other organs of PRP-1-treated mice, unlike controls.

Table 2. Effect of PRP-1 on the number of viable bacteria in the internal organs of (CBAXC57BL/6J) $F_1$  mice infected with *S. typhimurium*

Organs	Number of viable bacteria per organ ( $M \pm m$ , $lg_{10} \times 4$ )					
	Days after infection					
	5		10		21	
	Control	PRP-treated	Control	PRP-treated	Control	PRP-treated
Blood	2.25 ± 0.04	0.56 ± 0.08	0.53 ± 0.01	0	0	0
Liver	2.58 ± 0.05	1.32 ± 0.03	2.27 ± 0.04	0.9 ± 0.0	0.69 ± 0.01	0
Spleen	2.18 ± 0.03	0.54 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.51 ± 0.01	0	0
Intestinum duodenum	2.26 ± 0.04	1.1 ± 0.02	0.96 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0
Mesenterial lymph. node	2.27 ± 0.04	0.99 ± 0.01	2.58 ± 0.05	0.94 ± 0.01	1.29 ± 0.02	0
Intestinum jejunum	2.28 ± 0.04	0.67 ± 0.01	1.34 ± 0.02	0.62 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0
Intestinum crassum	2.29 ± 0.05	1.62 ± 0.03	1.66 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.98 ± 0.02	0

#### Effects of PRP-1 on anti-microbial antibody production in mice infected with *s. typhimurium* and *s. cholerae suis* in lethal doses

The results of our experiments showed that the injection of PRP-1 enhanced the production of specific antibacterial antibodies (Ab) in infected mice 1.48 - 2.2 times ( $p < 0.001$ ). Thus, the titers of anti-O Ab on 5th, 10th, and 21th days of observation were higher in PRP-1-treated mice infected with *S. typhimurium* or *S. cholerae suis* 2.17 and 2.19, 1.48 and 1.42, 1.84 and 1.66 times, respectively ( $p < 0.001$ ). The highest level of Ab production was observed on day 5. It was of interest that even on day 21 the levels of Ab in PRP-1-treated mice remained 1.84 and 1.66 times higher than those in controls, showing the pronounced immunostimulatory effect of PRP-1 (Table 3).

Table 3. Effect of PRP-1 on the anti-*Salmonella* antibody production in (CBAXC57BL/6J) $F_1$  mice

Treatment	Days after treatment	Titer of anti-O antibodies ( $log_2$ )		Stimulation coefficient
		Control	With PRP	
<i>S. typhimurium</i>	5	1.82 ± 0.2	3.95 ± 0.63	2.17
	10	1.65 ± 0.1	2.44 ± 0.16	1.48
	21	1.16 ± 0.1	2.14 ± 0.13	1.84
<i>S. cholerae suis</i>	5	1.64 ± 0.18	3.6 ± 0.3	2.19
	10	1.46 ± 0.12	2.08 ± 0.13	1.42
	21	1.18 ± 0.1	1.96 ± 0.1	1.66

#### Effect of PRP-1 on bactericidal activity of macrophages

It was shown that PRP-1 enhanced the bactericidal activity of peritoneal MF by means of increasing the intracellular killing of bacteria *in vitro* 1.45 - 2.5 times after phagocytosis *in vivo* ( $p < 0.001$ ) and their clearance from the circulation. PRP-1-caused an increase in bactericidal activity of MF at 30, 60, 90, 120, and 180 min of observation which corresponded to factors of 2.5, 1.8, 1.51, 1.49, and 1.45, respectively ( $p < 0.001$ ) (Table 4).

Table 4. Effect of PRP-1 on the rate of intracellular killing of *S. typhimurium* by peritoneal macrophages

Stimulants	Intracellular killing of bacteria (%) at various time points ( $M \pm m$ ) (min)				
	30	60	90	120	180
Control	24.6 ± 3.1	51.3 ± 4.6	62.2 ± 5.2	66.1 ± 5.4	68.2 ± 5.6
PRP-treated	61.3 ± 4.6	92.3 ± 8.2	94.2 ± 8.4	98.4 ± 8.6	98.8 ± 8.4

#### Effect of PRP-1 on the secretion of interleukin-1 by peritoneal macrophages of mice infected with *s. typhimurium* in sublethal doses

Our studies revealed the block of IL-1 secretion by MF and the ability of PRP-1 to abolish this bacteria-induced dysfunction. PRP-1 increased IL-1 synthesis by peritoneal macrophages (PMF) in mice infected with *S. typhimurium* 3.6 times ( $p < 0.001$ ). Bacteria injected into mice in sublethal doses caused 2.64-fold reduction in macrophage IL-1 ( $p < 0.001$ ). PRP-1 injection stimulated IL-1 synthesis 3.6 times ( $p < 0.001$ ); IL-1 level was 1.36 times higher than its initial level ( $p < 0.001$ ). This observation indicates the immunomodulatory effect of PRP-1.

Observed IL-1 activity was the sum of IL-1 $\alpha$  activity (77.3 - 79.6%) and IL-1 $\beta$  activity (20.4-22.7%). The specificity of the obtained results was confirmed in the presence of anti-IL-1 $\alpha$  and anti-IL-1 $\beta$  antisera, which completely abolished IL-1 activity in this test-system (Table 5).

Table 5. Effect of PRP-1 on the synthesis of IL-1 by macrophages of infected mice

Stimulants	IL-1 synthesis (U)		
	Without antisera	+ anti-IL-1 $\alpha$	+ anti-IL-1 $\alpha$ and anti-IL-1 $\beta$
Control (inactive bact.)	40.1 ± 3.6	40.1 ± 3.6	40.1 ± 3.6
Control (viable bact.)	15.2 ± 1.2	3.4 ± 0.3	0.4 ± 0.05
PRP-treated	54.7 ± 6.3	12.4 ± 1.1	0.9 ± 0.1

#### Effect of PRP-1 on the antigen-presenting function of macrophages in mice infected with *s. typhimurium*

We demonstrated by the method of MF-dependent *Salmonella*-immune T-cell proliferation, that the bacteria affect the Ag-presenting function of MF. In our experiments 1.38-2.2-fold depression of this function was observed ( $p < 0.01$ ). However, the use of PRP-1 not only abolished this defect (the functional activity was elevated 1.8-4.2 times,  $p < 0.001$ ), but also stimulated the manifestation of the function 1.32-1.9 times compared to the initial level ( $p < 0.001$ ). The observed effect of PRP-1 appeared to be independent of macrophage concentration in the samples indicating the correcting ability of PRP-1 (Table 6).

Table 6. Effect of the PRP-1 on the antigen-presenting function of macrophages in infected mice

Stimulants	$[^3\text{H}]$ thymidine incorporation (cpm $\times 10^3$ )			
	Number of macrophages per well			
	$10^3$	$5 \times 10^3$	$10^4$	$5 \times 10^4$
Control (inactive bacteria)	15.1 $\pm$ 0.7	25.6 $\pm$ 1.6	41.7 $\pm$ 2.8	51.7 $\pm$ 3.3
Control (viable bacteria)	6.8 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 0.8	25.3 $\pm$ 1.8	37.3 $\pm$ 2.4
PRP-treated	28.5 $\pm$ 2.1	41.6 $\pm$ 3.2	58.8 $\pm$ 4.1	68.3 $\pm$ 4.8

**Effect of PRP-1 on the accumulation of macrophages in peritoneal cavities of mice infected with *s. typhimurium***

It was established that PRP-1 enhanced the accumulation of inflammatory *Salmonella*-induced MF, but not that of resident MF. The PRP-1 effect was directly dependent on the number of bacteria. Thus, at doses of  $10$  and  $10^2$  bacteria/ml, PRP-1 stimulated MF accumulation 1.82 and 2.3 times, respectively ( $p < 0.001$ ) (Table 7).

Table 7. Effect of PRP-1 on the accumulation of macrophages in peritoneal cavities of infected mice

Stimulants	Number of macrophages/ml ( $\times 10^5$ )		
	Resident	Bacteria ( $10^3$ /ml)	Bacteria ( $10^7$ /ml)
Control	2.3 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.6
PRP( $10^{-8}$ g/mouse)	3.1 $\pm$ 0.2	10.2 $\pm$ 0.4	21.3 $\pm$ 1.3

**Effect of PRP-1 on the viability of macrophages in mice infected with *s. typhimurium***

PRP-1 increased the viability of MF, especially in infected mice. Thus, PRP-1 stimulated the viability of resident MF by a factor of 1.25 ( $p < 0.001$ ). The level of PRP-1 effect in infected mice was directly dependent on the infecting dose of bacteria. At doses of  $10$  and  $10^2$  bacteria/ml, the viability of MF under the influence of PRP-1 increased 1.77 and 2.42 times, respectively ( $p < 0.001$ ) (Table 8).

Table 8. Effect of PRP-1 on the viability of macrophages in infected mice

Stimulants	Number of viable macrophages (%)		
	Resident	Bacteria ( $10^3$ ml)	Bacteria ( $10^7$ ml)
Control	72.6 $\pm$ 1.3	51.4 $\pm$ 0.6	38.2 $\pm$ 0.3
PRP ( $10^{-8}$ g/mouse)	90.5 $\pm$ 1.2	91.2 $\pm$ 1.4	92.8 $\pm$ 1.4

The innate immunity system of vertebrates is based on specialized cells such as epithelial cells or phagocytes (like macrophages, neutrophils, and cytotoxic T and NK cells). These cells produce not only antibacterial peptides as effector molecules, but also a number of intracellular signaling molecules that activate other cells. The activation of genes for peptide antibiotics requires start signals, receptors, and mediators (intermediates). Nitric oxide (NO) or prostaglandins can be involved here, and also cytokines like IL-1, IL-2, IL-6, and TNF- $\alpha$ . With exception of a few cases, signaling pathways in vertebrates are not fully clarified, but they may in the end induce transcription factors involved in the synthesis of peptide antibiotics. NK cells and

cytotoxic T cells also contain a 78-residue antibacterial peptide with a hairpin structure and three disulfide bonds.

Antibacterial peptides are widely distributed as molecular effectors of innate immunity. They share cationic charge at physiological pH and hydrophobicity, factors that facilitate peptide binding and insertion into microbial membranes.

More than 300 different gene-encoded peptide antibiotics have been found in numerous species of animals, plants, and microbes [29-32].

Mature peptide antibiotics, formed by the processing from precursors, usually are composed of 13 - 80 amino acid residues. They can be divided into 3 groups:

Group I. This group consists of linear  $\alpha$ -helical peptides without cysteines. This family includes the cecropins, magainin, and smaller temporins (both from frog).

Group II. To this group belong cysteine-containing peptides from skin secretion: tachyplesins and protegrins from frog. The defensins ( $\alpha$  and  $\beta$ ) are synthesized during hematopoiesis and stored in special granules of neutrophils ( $\alpha$ -defensins), while  $\beta$ -defensins and intensins are formed in the epithelia of the airways [31];

Group III. To this group belong bactericins with the over-representation of one or two amino acids, so far mostly Pro and Arg together, but also peptides rich in Trp or Gly. The shortest in this group are the apidaecins from honeybee.

The multitude of antibacterial cationic peptides has been isolated from a wide variety of animal, plant, and bacterial species [32]. By composition and secondary structure they can be divided into four major groups: 1) cecropins and magainins which exhibit a helical structure in lipid membranes; 2) defensins; 3) bactericin; 4) the fourth group includes peptides that contain a high percentage of specific amino acids such as proline, arginine-rich bovine peptides Bac 5 and Bac 7, and the porcine peptide PR-39 [33-38]. These peptides have been demonstrated to be capable of the permeabilization of the bacterial inner membrane. PR-39 and PR-26 are very potent inhibitors of  $\text{O}_2^-$  generation in the cell-free assay. The finding that PR-39 and PR-26 inhibit both cell-free and whole-cell  $\text{O}_2^-$  production by neutrophils, and that the inhibition require preincubation of cells with peptides for at least 45 min before PMA stimulation, suggest that these peptides act through some intracellular target, such as the NADPH oxidase components themselves. It was found that PR-39 bind to a 47 kDa protein in both human and porcine cytosol preparations. This finding shows that PR-39 binds to 47 Phox and that the binding is specific and implies that PR-39 decreases  $\text{O}_2^-$  with the help of cytosolic component of the NADPH oxidase complex [33-38]. It was established that PR-39 blocks the interaction between p-47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup>.

A proline-arginine (PR)-rich antibacterial peptide, PR-39, kills bacteria by a non-pore-forming mechanism, presumably by interfering with DNA or protein synthesis [29].

Many peptides are considered to act on the lipid matrix of bacterial cell membranes, destroying its barrier property and killing the bacteria.

C. Park and coworkers demonstrated<sup>131</sup> that buforin II kills bacteria without cell lysis and has strong affinity for DNA and RNA, suggesting that the target of buforin II is not the cell membrane but intracellular nucleic acids.

Buforin I is an antimicrobial peptide discovered in the stomach tissue of the Asian toad *Bufo gargarizans* [39]. Interactions of buforin II with phospholipid bilayers in comparison with magainin-2 were studied [31]. These peptides show strong

antibacterial activities *in vitro* against a broad spectrum of microorganisms, including fungi.

The activity of buforin II, a 21-residue cationic peptide containing the residues from Thr<sup>16</sup> to Lys<sup>36</sup> of buforin I, is about two times higher than that of buforin I. The residue proline-11 appears to be a key structural factor for this unique property of buforin II [40]. The authors studied the interaction of buforin II with phospholipid membranes using liposomes as a model membrane system, and the results were compared with those with magainin-2. Efficient translocation of buforin II across the membranes was shown which did not induce significant membrane permeabilization or lipid flip-flop. Buforins show much stronger antimicrobial activities against a broad spectrum of microorganisms compared to magainin-2. Buforin I was reported to have a sequence homology with the N-terminus of histone H2A [41]. Several peptides are also considered to have mechanisms of action other than membrane permeabilization [41, 42]. Even for these peptides the peptide-membrane interactions are important because the peptides should first bind to and then cross the cell membrane to enter the cells. Two major classes of natural antimicrobial peptides are the cathelicidins and defensins. Cyclic defensin is detected in neutrophils and monocytes from macaque rhesus monkey.

Recently, C. Park et al. purified two novel cationic antimicrobial peptides from the skin of frog *Rana nigromaculata*, which were named nigrocin 1 and 2. The amino acid sequences of these peptides were determined. Nigrocin 1 and 2 produce direct effect on a broad spectrum of microorganisms. Nigrocins showed high activities against gram-negative bacteria at a minimal inhibitory concentration of 10 µg/ml. Nigrocin 2 has no proline residues, while short peptides from Ranidae have highly conserved proline residues located in the middle of the helix which are essential for antimicrobial activity [38, 43].

The amphipathic feature of nigrocin 2 is expected to facilitate its interaction with microbial membranes, ultimately leading to disruption of membrane integrity.

Neutrophils represent a first line of defense against infections. These cells possess multiple antimicrobial defense mechanisms, including both oxidative and nonoxidative processes of microbe killing. Antimicrobial peptides protegrins were found in pig neutrophils.

The antimicrobial activity of calcitermin was studied *in vitro*. The amino acid sequence and mass of calcitermin are equivalent to those of 15-mer C-terminal fragment of calgranulin C.

Calgranulins, which belong to the S-100 family, also possess antimicrobial activity. Calgranulin C is a newly described member of the family produced by neutrophils and mono-cytes. Calcitermin, human calgranulin C, and calgranulin A do not contain proline residues (44). Cyclic defensins were detected in neutrophils.

Indolicidin is a cationic antimicrobial peptide isolated from bovine neutrophils. The cytoplasmic membrane is the site of action of indolicidin as assayed in *E. coli* by unmasking of cytoplasmic β-galactosidase due to membrane permeabilization. It was shown that the peptide is capable of increasing the transmembrane current across planar lipid bilayers [36]. Indolicidin possesses an activity against gram-negative and gram-positive bacteria, fungi, and protozoa.

The flies challenged with bacteria produce cecropins and several other peptide antibiotics including the proline-rich peptide drosocin (which is glycosylated), an insect

defensin, and the fungicidal drosomycin. The cecropins cause rapid lysis of bacteria, and thus this property was used for estimation of their biological activity [37]. All cecropins lyse bacterial membranes but not those of eukaryotic cells or mitochondria, while melittin can lyse almost every type of cell membrane. Defensins form multimeric pore-forming complexes in membranes, thereby rendering the membrane permeable. Cecropins isolated from the cecropia moth are active against *E. coli* and several other Gram-negative species [37].

Antimicrobial peptides are amphipathic cationic molecules, frequently in α-helical or β-sheet conformation, which insert into the phospholipid bilayers of microorganisms and form lytic pores. Pore-forming activity of melittin, moth cecropin, and *Xenopus* skin magainin results in the permeabilization of bacterial membranes. These peptides are antimicrobial and hemolytic agents<sup>130</sup>. Ranidae family-produced brevinins, renalexin, and gaegurins also exert direct anti-bacterial effect. Noteworthy that PRP-1 produces antibacterial activity only *in vivo* by increasing the activity of immunocompetent cells.

### Treatment and prophylaxis of anthrax by proline-rich polypeptides

In 1881, Louis Pasteur described the *Bacillus anthracis* vaccine, which plays an important role for the treatment and prophylaxis of anthrax. Currently, treatment for anthrax infection involves the use of several different antibiotics, used in combination with vaccines, which possess potential virulence in white mice and guinea pigs. We discovered several new immunomodulators cytokines (polypeptides) produced by the neurosecretory cells of hypo-thalamus, some of which can be used as drugs for the treatment and prophylaxis of the anthrax. The proline-rich polypeptides, which consist from 10 to 15 amino acids and four proline residues, are of the special interest; one of them (PRP-1), which consist of 15 amino acids and has the following primary structure ALA-Gly-ALA-Pro-GLu-Pro-Ala-GLu-Pro-Ala-GLn-Pro-GLy-Val-Tyr (AGAPEPAEPAQPGVY) possesses antibacterial activity, and a new proline-rich peptide described by Galoyan and called G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub>. Both were tested for treatment against the anthrax bacillus or anthrax strain N55 vaccine in guinea pigs and mice *in vivo*, and *in vitro* preparations. The results of experiments show that these hypothalamic neurosecretory cytokines have a strong prophylaxis and therapeutic properties towards animals infected by episodic strain of anthrax and anthrax vaccine N55. The conventional concepts concerning the function of hypo-thalamic neurosecretion and hypothalamic mechanisms of adaptation have to be reconsidered.

Although unfortunate, biological materials such as bacteria, bacterial spores, and viruses are commonly used as biological agents or lethal toxins to inflict injury and mortality. As such, the strategy of their use is not only to injure, but also to instill terror and disorder into daily life, which may have long-lasting psychological, economic and political consequences. Measures used as a defense, have targeted the generation of free radicals by replacing depleted antioxidants, such as glutathione.

Biological materials that may be used include bacteria, such as *Bacillus anthracis* (anthrax), viruses such as variola major (smallpox), and biological toxins as ricin. *Bacillus anthracis*, the etiological agent of anthrax, is a gram-positive, aerobic, spore-forming, rod-shaped bacterium. These bacilli produce two main virulent factors: poly-D-glutamic acid capsule and toxin. The anthrax toxin is made from three secretory proteins: protector antigen (PA) (subunit binding the receptor), edema factor (EF) and

lethal factor (LF) (45-47). EF is adenylate cyclase (AC), which converts adenosine triphosphate (ATP) into cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and pyrophosphate. The increase of AC activity leads to strong augmentation of cAMP concentration in the cellular cytoplasm, which leads in turn to immune system suppression, preventing phagocytosis [48, 49]. The AC by its amino acid composition and primary structure differs from mammalian AC and other proteins. The molecular mechanisms of EF (AC) action are also different from that of mammalian even though it is also a calcium-calmodulin-dependent enzyme.

The LF protein lyses the macrophages in the cytoplasm and EF hinders the phagocytosis process. LF is a Zn<sup>2+</sup>-dependant metalloproteinase that inhibits mitogen-activated kinase-kinase and acts as an endopeptidase [50-53]. The pathological processes of anthrax infection begin in the organism during the period of introduction of the pathogen; during the vegetative stage these bacilli destroy macrophages (where they develop and accumulate) and eventually flood the entire organism. For example, PA binding to EF produces edema toxin (EdTx) on the cellular membrane. This EdTx induces local edema, and at the same time weakens the polynuclear neutrophils function. The combination of PA and LF leads to anthrax lethal toxin (LeTx) (45-47), which is lethal in case of intravenous infusion.

As mentioned above, the Bacillus anthracis development in macrophages leads to their destruction, during which, the bacilli enter into blood stream and start to replicate and run up to large number [54, 55].

Therefore, possible pharmaceutical intervention against anthrax should be directed to the preservation of the longevity and activity of macrophages, the prevention of their destruction during the bacilli development, as well as, the preservation of polynuclear neutrophils activity favoring the oxygen reactive radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sup>-</sup> and others) production and increasing the immunocompetent cells activity (as blood leukocytes, as well as hypothalamic neurosecretory cells).

Current treatment for possible anthrax exposure includes the use of effective antimicrobial medicines. Although the bacillus anthrax is extremely sensitive to penicillin, penicillin cannot be used by itself because its higher doses lead to the induction of β-lactamase expression in bacilli. The beta-lactamase hydrolyzes the lactam ring of penicillin and other lactam-containing antibiotics and disables their antibiotic activity [(56)].

In addition to penicillin, ciprofloxacin (400 mg, i.v. twice a day) is also used simultaneously [57, 58]. In addition to these drugs, other antibiotics are also administered against the Bacillus Anthracis [59], rifampicin, vancomycin, penicillin, ampicillin, clindamycin and clarithromycin, as well as, imipenem, chloramphenicol, and aminoglycosides [60, 61].

The bacillus anthracis is resistant to the following agents: ceforoxime, cefotaxime, cefaridime, arzeonam, trimethoprim, and sulfamethoxazole. penicillin is recommended for use in combination with ciprofloxacin or doxycyclin [58-60]. In the case of the pulmonary form of anthrax, the treatment lasts 60 days. In the case of severe edema, corticosteroids are also used.

Even with the use of numerous antibiotics, especially for long-term periods, there has been a failure to succeed in the complete treatment of all clinical manifestations of anthrax. Using vaccines, in addition to expensive antibiotics do not prevent the reoccurrence of anthrax bacilli. It is necessary to take into consideration the extreme

harmful influence of large amounts of antibiotics. In this regard, the mobilization of the organism's immune system by new natural compounds could have critical significance for the prophylaxis and treatment of anthrax.

Data obtained by us on the biosynthesis of a number of interleukins and new cytokines (proline-rich peptides) in neurosecretory neurons of hypothalamus (N. Paraventricularis and N. Supraopticus) demonstrate that the neuroendocrine nuclei of the hypothalamus are the center for the neuroendocrine immune system of the brain [62-68].

## Methods

### To test the influence of G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> and PRP-1 on the animals infected by the episodic strain of Bacillus anthracis

Prior to testing the influence of G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> and PRP-1, it was necessary to determine the minimal lethal dose of Bacillus anthracis in guinea pigs. For this purpose, guinea pigs were used. The episodic strain was isolated from parenchymal organs of anthrax episodic strain- infected animals and seeded on Petri dishes plated with agar medium. The sporulation process developed over 4-5 days. After sporulation, the optical density of spore suspension of these microorganisms was measured according to the appropriate standards. The initial concentration of microorganisms was determined with 1mlrd microbes in 1 ml of physiological solution. Thus, in the case of a 10<sup>-9</sup> dilution, one microbial cell should be in 1 ml when seeding.

## Results

Guinea pigs were highly susceptible to the anthrax episodic strain, and all 25 guinea pigs died within 1-2 days after administration of Bacillus anthracis (10<sup>-2</sup> to 10<sup>-9</sup> dilution) (data not shown). The concentration of 10<sup>-9</sup> was determined as the 'minimal' lethal dose, however, for subsequent testing, the 10<sup>-8</sup> dilution was used. It should be mentioned that the anthrax episodic strain possesses the capsule-forming property, because of which, laboratory animals are considered susceptible to the pathogen. Animals were always infected with the sporulated germs of the pathogen. Despite that the spore-forming processes start in bacilli within 24 h after sowing in nutrient medium, for experimental infection, we used 4-5 days sporulated germs, in which the vegetative bacilli form 2-3%.

To test the effect of G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub>, 6 guinea pigs were treated with G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> (15 μg, IM). After 24 h, they were injected with the episodic strain of Bacillus anthracis followed by a second injection of G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> (15 μg, IM). Two animals were used as virulence control of the anthrax pathogen (Table 9).

Table 9 Antibacterial influence of G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> on the anthrax induced by episodic strain of Bacillus anthracis

Group	Number of animals	Weight of animals (grams)	Infection dose dilution	Number of mortalities	Survivors
Experimental	6	350-400	1 × 10 <sup>-8</sup>	0	6
Control	2	350-400	1 × 10 <sup>-8</sup>	2	-

Infections of both groups of guinea pigs were carried out using the 4-day old germinated spore suspension of Bacillus anthracis at 1 × 10<sup>-8</sup> dilution, with the experimental group given G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> (2 × 15 μg IM, 24 h apart). On the second day of

experiment, certain disease symptoms are observed in the guinea pigs, such as depression, movement disturbances, absence of appetite, and a quickly growing and painful edema on the infection site. The experimental animals' general state was within the normal limits. The second administration of  $G_x-NH_2$  was done to preserve this state.

At 40-45 h after infection, all control group guinea pigs died with evident clinical manifestation. Pathology, anatomic and microbiological analyses show that the animals died of the anthrax (Figs. 1, 2).

As we can see from the Fig. 1, the bacilli of the anthrax are present in the blood, whereas after the administration of PRP-1 and  $G_x-NH_2$  preparations, microorganisms in the blood smear of experimental animals are not found (Fig. 2).



Fig. 1. The anthrax pathogen in the blood from the control guinea pigs at death. Romanovski-Gimza, magnification:  $\times 630$

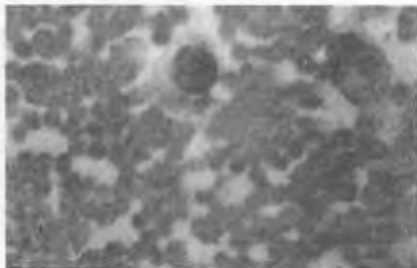


Fig. 2. Microscopic pattern of guinea pigs blood smear treated by  $G_x-NH_2$  Roma-novski-Gimza, magnification:  $\times 630$



Fig. 3. Microscopic pattern of liver smear of guinea pigs treated with the anthrax. Romanovski-Gimza, magnification:  $\times 630$

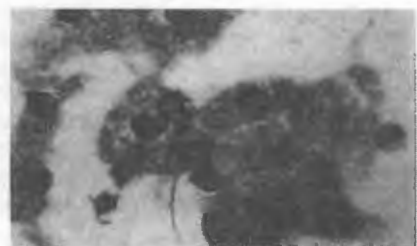


Fig. 4. The absence of anthrax bacilli in the liver of  $G_x-NH_2$  and anthrax treated guinea pigs. Romanovski-Gimza, magnification:  $\times 630$



Fig. 5. Microscopic pattern of spleen smear of guinea pigs treated from the anthrax. Romanovski-Gimza, magnification:  $\times 630$

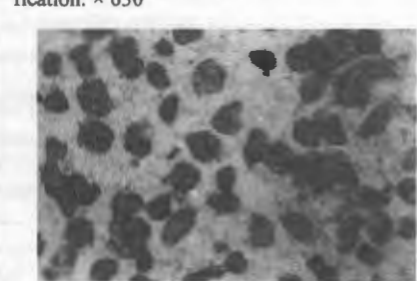


Fig. 6. Microscopic pattern of spleen smear of guinea pigs after  $G_x-NH_2$  and anthrax treatment. Romanovski-Gimza, magnification:  $\times 630$

A huge amount of bacilli accumulated in the liver of control guinea pigs, which were tested for anthrax episodic strain virulence (Fig. 3), whereas after simultaneous administration of PRP-1 and  $G_x$ -NH<sub>2</sub> treatment the disease pathogen was absent in the smears (Fig. 4). Large accumulations of anthrax bacilli in the spleen of guinea pigs infected by virulent pathogen are also observed (Fig. 5). Upon the administration of PRP-1 and  $G_x$ -NH<sub>2</sub> preparations, the disease pathogen is eliminated from the organism (Fig. 6).

Thus, the experimental studies indicate that after the administration of the anthrax episodic strain at a lethal dose, the concurrent administration of  $G_x$ -NH<sub>2</sub> prevents the anthrax particular pathologies.

The results of the study suggest that these new cytokines are powerful prophylaxes and treatment means against the anthrax infection.

The experiments showed that after the infection by the most virulent bacilli, the control animals died within 3–4 days, developing all typical symptoms to the disease, whereas 6 animals from the experimental group survived (Table 9). Although, the  $1 \times 10^{-9}$  dilution of microbial germs preparation is considered as a lethal dose, the experiments were conducted with ten times more dose as it is presented in the Table 9; PRP-1 and  $G_x$ -NH<sub>2</sub> were effective against the infection.

In another set of experiments (Table 10), 5 from 16 guinea pigs were considered as an anthrax pathogen control, and the remaining 11 animals as experimental, for which 1 dose of anthrax pathogen sporulating germ was used. On the infection day, the  $G_x$ -NH<sub>2</sub> and PRP-1 combination (25 µg dose each) was administered to guinea pigs. The second administration was made 24 h after the first one. At 24–48 h after infection, all guinea pigs from the control group died because of severe anthrax intoxication (Table 10).

Table 10. Antimicrobial influence of  $G_x$ -NH<sub>2</sub> + PRP-1 against the anthrax episodic strain

Experimental					
Number of animals	Weight (grams)	Anthrax pathogen dose dilution (S.C)	Dose of hormone (I.M)	Number of mortalities	Survivors
11	400–450	$1 \times 10^{-8}$	Single administration of PRP-25 µg and $G_x$ -NH <sub>2</sub> -25 µg on the infection day, and repeated at 24–48 h	2	9
5	400–450	$1 \times 10^{-8}$	–	5 animals (day 1–2)	–

After infection, by the dose of  $1 \times 10^{-8}$  dilution of the anthrax pathogen virulent germs and administration of  $G_x$ -NH<sub>2</sub> and PRP-1 after 24 h, 9 guinea pigs from the given group survived, and 2 of them died.

Thus, the infection by the dilution  $1 \times 10^{-8}$  of 4–5-days virulent sporulated germs of *Bacillus anthracis*, is accompanied by the death of control animals, whereas  $G_x$ -NH<sub>2</sub> and PRP-1 combination prevents the lethality of experimental guinea pigs.

**Treatment of non-pathogen inbred white mice infected by spores of anti-anthrax strain N55 vaccine by  $G_x$ -NH<sub>2</sub>**

## Growing the anti-anthrax strain N55 vaccine microorganisms in solid and liquid nutrient medium

The virulence of spores of anti-anthrax strain N55 vaccine microorganisms was also tested in white mice. N55 vaccine was grown in meat infusion agar. The sporulation process starts from the 2nd day and usually finishes on 5th day. For the experimental studies relating to white mice infection or passage in nutrient medium, we always used the spore-forming form of the microorganisms. Unlike meat infusion agar, in meat infusion broth the sporulation process takes place more slowly, which depend on the conditions necessary for vegetation.

### Detection of lethal dose of vaccine sporulated germs in white mice

Initially, for studies in mice, the lethal dose (LD) to the pathogen was determined. The experiments were carried out on 30 white mice, which were divided into 6 groups. The pure 5-day sporulated germs in agar were used for infecting. Different groups were infected by different doses of microorganisms from 1mlrd to 10000 cells given subcutaneously.  $G_x-NH_2$  in physiological solution was administered subcutaneous or intramuscular.

Thus lethal dose of the anti-anthrax strain N55 vaccine of the *Bacillus anthracis* is 10 mln (minimal lethal dose (MLD) in mice) (Table 11). Mortality of infected mice was observed on the 2–5th day. Liver, spleen, kidneys and lymphatic nodes were analyzed. The smears prepared from them were subjected to microscopic analysis for studying growth and morphology peculiarities, characteristic to the anthrax pathogen vaccine.

The effect of  $G_x-NH_2$  was carried out in 30 white mice, which were divided into 6 groups. The mice were infected with a 10 mln *Bacillus anthracis* dose. The antigen was administered subcutaneously, in the volume of 0.5 ml physiological solution, and  $G_x-NH_2$  preparation was administered intramuscularly at dose indicated (Table 12). The infection of mice was carried out 24 h after  $G_x-NH_2$  administration.

We can see from the data presented in the Table 11, that the vaccinal microbe dose has virulence; all the mice from the control group died. It is known, that white mice and partially guinea pigs are sensitive to all anthrax vaccines, which are considered as virulent. At 15, 20 and 30  $\mu g$  doses of  $G_x-NH_2$ , 80% of experimental animals survived (Table 12). Thus, 20  $\mu g$  is considered as the antimicrobial dose of the  $G_x-NH_2$  preparation.

Table 11. Detection of the lethal dose in white mice

Groups	Mice number	Infection dose – number of microorganisms	Absolute data	
			Mortality	Mortality (%)
1	5	1 mlrd	5	100
2	5	100 mln	4	80
3	5	10 mln	4	80
4	5	1 mln	2	40
5	5	100,000	1	20
6	5	10,000	0	0



Table 12.  $G_x$ -NH<sub>2</sub> polypeptide titration in white mice (10 mln of vaccine 55 spores)

Groups	Mice number	Hormone dose (µg)	Mortality (days)								Mortality	Survivors	% Survival
			1	2	3	4	5	6	7	8			
1	5	5	--	--	--	1	2	1	--	--	4	1	20
2	5	10	--	--	--	--	1	2	--	--	3	2	40
3	5	15	--	--	--	--	1	--	--	--	1	4	80
4	5	20	--	--	--	--	1	--	--	--	1	4	80
5	5	25	--	--	--	--	1	1	--	--	2	3	60
6	5	30	--	--	--	--	--	--	--	1	1	4	80

In 1883 Tcenkovsky L.S. obtained a vaccine against *Bacillus anthracis* for the treatment and prevention of mass infections of agricultural animals. That vaccine is obtained from the capsulogenic strain of the anthrax and is more virulent against guinea pigs as compared with strain 55, which is not capsulated. Tcenkovsky's vaccine even kills the guinea pig and mice (not shown). While vaccine 55 can kill only mice.

As it is obvious from the Table 11, the lethal dosage of the vaccine 55 is 10 mln of the vaccine microbes, while the lethal dose of the *Bacillus anthracis* is 100,000 microbial bodies. Thus, Tcenkovsky's vaccine is much more virulent in comparison with vaccine 55. However, 25 µg of the PRP-1 and  $G_x$ -NH<sub>2</sub> affective against the infection.

#### Detection of antimicrobial effect of $G_x$ -NH<sub>2</sub> *in vitro*

The experiments were carried out on meat infusion agar in 3 test-tubes. In 2 of them, the vegetative form of anti-anthrax vaccine was sowed, then treated by  $G_x$ -NH<sub>2</sub> preparation (adding 30 µg in each test-tube). The third test-tube was used as a control, was sowed only with the vaccine without  $G_x$ -NH<sub>2</sub>. After incubation in 36-37 °C during 24 h, test-tubes were subjected to microbiological analysis of vaccinal microorganisms growth, specifically in the liquid nutrient medium. White, loose deposits were observed on the bottom of the control test-tube, and the supernatant was clear. After shaking the test-tube, the deposit is destroyed and generated small drops.

In test-tubes with the  $G_x$ -NH<sub>2</sub> preparation, a light turbidity appears along with the deposit. After shaking the test-tube, this turbidity became more evident and flabby unclear drops appeared. In microscopic analysis, vaccinal microorganisms' morphology was observed in the smears prepared from control germs, while modified short bacilli and coccus-like capsules, and rarely agglomerations of tiny objects were observed in the smears from experimental test-tubes (Figs. 7, 8).



Fig. 7. Germs of vaccinal microorganisms strain N55 24 h growth in the agar Romanovski-Gimza, magnification: × 630



Fig. 8. Germs of vaccinal microorganisms strain N55 in agar treated with  $G_x$ -NH<sub>2</sub> stained by Fuchsin, magnification: × 630

Thus, PRP-1 and Gx-NH<sub>2</sub> under in vitro conditions inhibit the activity of B. anthracis and noticeably decreases the sizes.

Nevertheless, the most antibacterial effect of Gx-NH<sub>2</sub> and PRP-1 on anthrax is manifested at their introduction in vivo via mobilizing all the protective immune mechanisms and activation of macrophages, neutrophils, formation of oxidative radicals (oxygen burst). Meanwhile, it is needed to study molecular-genetic mechanisms of action of the indicated peptides on *B. anthracis in vivo*.

Two of plasmids exist in the cytoplasm of Bacillus anthracis PX01 and PX02, which are responsible for B.anthraxis poly-D-glutamic acid capsule-forming genes [28-30]. We cannot refuse the influence of PRP-1 and Gx-NH<sub>2</sub> peptides on these plasmids in vivo and in vitro should be carried out. It is very important to study effects of peptides on the DNA of chromosomes and plasmids.

### Conclusion

The PRP-1 is the regulator of both humoral and cellular immunity, differentiation of thymocytes, and myelopoieses. It possesses strong antiviral (*in vitro*) and antibacterial activity (*in vivo*, against *Salmonella typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. typhi*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella Flexneri*, *Shigella Sonnei*, *St. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, etc.). PRP-1 can be recommended in future for treatment of immunodeficiencies and different infectious diseases.

The PRP-1 and G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> are powerful drugs for treatment and prophylaxis episodic strain of Bacillus anthracis. The G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub> preparation manifests prophylaxis and therapeutic properties against lethal doses of anthrax vaccine strain N55. They can effectively substitute for a number of antibiotics in low doses as well as for vaccines.

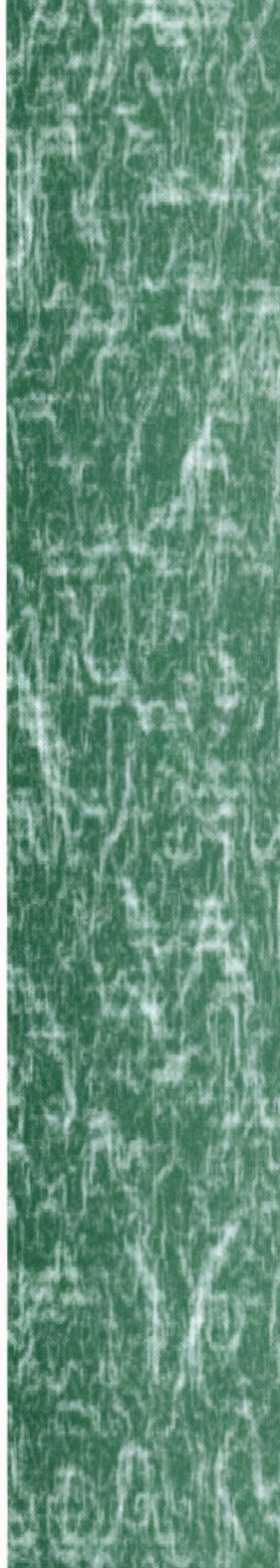
### References

1. Besedovsky H. O., Balschun D., Pitossi F., Schneider H., del Rey A. 2001. Brain-born cytokines affect neuroendocrine functions and the maintenance of long term potentiations. Pages 41-46, in Galoyan A.A. (ed.), Biochemical and Molecular-Biological Aspects of the Brain Immune System. Encyclopedia Armenica Publishing House, Yerevan.
2. Neuman H., Wekerle, H., 1998. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration, J. Neuropathol. Experim. Neurol. 57(1):1-9.
3. Neuman H., Cavalie, A., Jenne, D. E., Wekerle, H., 1995. Induction of MHC class genes in neurons, Science 269:549-552.
4. Neuman H., Boucraut J., Hahel C., Misgeld T., Wekerle H., 1996. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia, Eur. J. Neurosci. 8:2582-2590.
5. Corriveau R.A., Huh G.S., Shatz, C.J. 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. Neuron 21(3): 505-20.
6. Darnell R.B. 1998. Immunologic Complexity in Neurons. *Neuron* 21: 947-950.
7. Galoyan A. A. 1997. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus - Endocrine Heart, Nauka Publishers (in English), Moscow, 240 pages.
8. Galoyan A.A. 1962. Two hormones of hypothalamus acting on the coronary circulation. Dokl. of Armenian Acad. Sci. 34(3): 109-111.
9. Galoyan A.A. 1964. The existence of specific protein of hypothalamus possessing

- by coro-nary-delatory properties. 38(5): 305-308.
10. Galoyan A.A. 1965. Some problems of biochemistry of hypothalamic regulation, Aayastan publisher. Yerevan, 235 p.
11. Srapionian R.M., Sahakian, S.A., Lelekova, T.V., Paronian, Z.Ch., Galoyan, A.A. 1997. Effect of neurospectic cardioactive protein hormonal complexes on lymphatic vessels and vas deferens contraction in rat 16th ISN/28 ASN meeting, Boston S201D.
12. Galoyan A.A., Sahakian F.M. 1971. Isolation of coronary vasodilating hormones from neuro-secretory granules, Dokl. Acad. Nauk USSR 201: 843-845.
13. Galoyan A.A. 1986. Neuroendocrine heart and hypothalamus. Neurochem. Res. 11(6):769-785.
14. Galoyan A.A., Srapionian R. 1983. Protein-hormonal complexes in the hypothalamus as neurochemical systems of regulation. Neurochem. Res. 8(12):1511-1535.
15. Coggin M.H., Srapionian R.M., Brecher A.S., Galoyan A.A. 2002. A potential role for atrial polypeptide and Neurohormone "C" in the blood coagulation cascade. J. Investigative Medicine. 50(5) Suppl. Abst. 129.
16. Galoyan A.A., Rostomian M.A. 1967. The neurosecretion of the heart. Biological Journal Armenii 20(9):3-7.
17. Chobanian A. 2000. Review to A.A. Galoyan' monograph. Neurokhimya 16(3):253-255.
18. Guillemin R. 1999. Review of the reference book A.A.Galoyan "Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus - Endocrine Heart" (M.: Nauka Publishers, 1997). Neurokhimiya (1):70.
19. Galoyan A.A. 1992. Neurosecretory hypothalamus - endocrine heart as a functional system. News in physiological sciences. 12(7):279-283.
20. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 1999. Antibacterial activity of novel hypothalamic polypeptide. Reports of Natl. Acad. Sci. of the Republic of Armenia 99:367-371.
21. Markossian K.A., Gurvits B.Ya., Galoyan A.A., 1999, Isolation and identification of novel peptides from secretory granules of neurohypophysis, Neurokhimiya RAS & NAS RA 16:22-25.
22. Du Vigneaud V., Gish D.T., Kotsyanis P.G. 1954. A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vassopressin. J. Amer. Chem. Soc. 76: 4751.
23. LaBella F., 1968, Storage and secretion of neurohypophyseal hormones, Canad. J. Physiol. Pharmacol. 46(2):335-345.
24. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 1999. Immunocorregating properties of new hypothalamic polypeptide at bacterial pathologies. Medical Science of Armenia. 39(2):23-30
25. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 1999. Immunocorregating properties of new hypothalamic polypeptide at macrophage-associated bacterial dysfunctions. Medical Science of Armenia. 39(4):29-36.
26. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 2000. Hypothalamic polypeptide protects mice death at infection with gram-negative bacteria. Neurochemistry (RAS & NAS RA) 17:60-63.
27. Galoyan A.A. 1997. Biopolymers Peptide Science. Ed by V.T. Ivanov. John Wiley and Sons, 43:135-139.

28. Galoyan A.A. 2004. Brain neurosecretory cytokines; immune response and neuronal survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p 188.
29. Boman H.G., Agerberth B., Boman A. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* 61 (7):2978-2984.
30. Boman H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:61-92. Review.
31. Boman H.G., Brockaert W.F., 1998. *The immunologist*, 6(6):234-238.
32. Hancock R.E., Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16(2):82-88.
33. Ahmad I., Perkins W.R., Lupan D.M., Selsted M.E., Janoff A.S. 1995 Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 26; 1237(2):109-114.
34. Aley S.B., Zimmerman M., Hetsko M., Selsted M.E., Gillin F.D. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.* 62(12):5397-6403.
35. Schluesener H.J., Radermacher S., Melms A., Jung S. 1993. Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T cells. *J. Neuroimmunol.* 47(2):199-202.
36. Falla T.J., Karunaratne D.N., Hancock R.E. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* 271(32):19298-19303.
37. Boman H.G. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. 1998. *Scand. J. Immunol.* 48(1):15-25.
38. Suh J.-Y., Lee K.-H., Chi S.-W., Hong S.-Y., Choi B.-W., Moon H.-M., Choi B.-S. 1996. Usually stable helical kink in the antimicrobial peptide – A derivative of gaegurin. *FEBS Letters*, 392:309-312.
39. Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. 1996. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo* gargazians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5;218(1):408-413.
40. Kobayashi S., Takeshima K., Park C.B., Kim S.C., Matsuzaki K. 2000. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. *Biochemistry.* 25; 39(29):8648-8654.
41. Kim H.S., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. 1996 cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 13; 229(2):381-7.
42. Steiner H. 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters*, 137:283-287.
43. Park S., Park, C.-H., Ahn H.-C., Kim S., Kim, S.S., Lee B.J., Lee B.-J. 1998. *FEBS Letters*, 507:95-100.
44. Cole A.M., Kim Y.-H., Tahk S., Hong T., Weis P., Waring A.J., Ganz T. 2001. Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretion. *FEBS Letters*, 504:5-10.
45. Brossier F., Weber-Levy M., Mock M., Sirard J.C. 2000. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* 68:1781-1786
46. Mourez M., Lacy D.B., Conningham K. et al. 2002. A year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol.* 10:287-293
47. Bradley K.A., Young J.A.T. 2003. Anthrax toxin receptor proteins. *Biochem. Pharmacol.* 65:309-314
48. Leppla S.H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentration in eukaryotic cells. *PNAS USA* 79:3162-3166
49. O'Brien J., Friedlander A.M., Dreier T., Ezzell J., Leppla S. 1985. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect. Immun.* 47:306-410
50. Ross J.M. 1957. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J. Pathol. Bacteriol.* 73:485-494
51. Hanna P. 1998. Anthrax pathogenesis and host response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 225:13-35
52. Lalitha M.K., Thomas M.K. 1997. Penicillin resistance in *Bacillus anthracis*. *Lancet.* 349:1522
53. Chen Y., Succi J., Tenovez F.C., Kochler T.M. 2003. Beta-Lactamase Genes of the Peni-cillin-Cusceptible *Bacillus anthracis* Sterne Strain. *J. Bacteriol.* 185:823-830
54. Swartz M.N. 2001. Recognition and management of anthrax – an update. *N. Engl. J. Med.* 345:1621-1626
55. Ressel G. 2001. CDC updates interim guidelines for anthrax exposure management and anti-microbial therapy. *Am Fam Physician* 64:1901-1902
56. Borg M.A., Tieck W.C. 2001. Responding to anthrax. *J Dent Technol* 18:12-14, 28
57. Brook J. 2002. The prophylaxis and treatment of anthrax. *Inf. J. Antimicrob. Agents* 20(5):320-325
58. Bryskier A. 2002. *Bacillus anthracis* and antibacterial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:467-478
59. Odendaal M.W., Peterson P.M., de Voc V., Botha A.D. 1991. The antibiotic sensitivity patterns of *Bacillus anthracis* isolated from the Kruger National park. *Onderstepoort J. Vct. Res.* 58:17-19
60. Doganaya M., Aydin N. 1991. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. *Scand. J. Infect. Dis.* 23:333-335
61. Ingles T.V., Handerson D.A., Bartlett J.G. et al. 1999 Anthrax as a biological weapon. *JAMA* 128(18):1735-1745
62. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 1999. Immunecorrecting properties of a new hypothalamic polypeptide upon macrophage-associated bacterial dysfunction. *Med. Sci. Armenia* 31(4):29-36
63. Davtyan T.K., Manukyan N.A., Mkrtchyan R., Galoyan A.A. 2005. Hypothalamic Proline-Rich Polypeptide (PRP) is a regulator of human Neutrophils and Monocytes oxidative burst. *Neurochem Res* 3:297-309
64. Galoyan A.A., Aprikyan V.S. 2002. A new hypothalamic peptide is a regulator of myelopoiesis. *Neurochem Res* 27:305-312
65. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 2001. New hypothalamic peptides in regulation of thymocytes differentiation. *Proceeding of the International conference "Biochemical and Molecular-Biological aspects of Brain Immune System.* Encyclopedia Armenica publishing House, Yerevan, pp 183-189
66. Aprikyan V.S., Galoyan A.A. 2000. Hypothalamic polypeptide protects mice from lethal challenge with gram-negative bacteria. *Neurokhimya RAS NAS RA* 17:60-63
67. Galoyan A.A. 2004. Brain neurosecretory cytokines; immune response and neuronal survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p 188
68. Galoyan A.A. 2005. The chemistry and molecular biology of new brain cytokines. *Proceedings of the International Scientific Conference dedicated to the 75th anniversary of YSMU, Yerevan, pp. 135-136.*

**Секция  
«БИОХИМИЯ»**



## РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ КУМАРИНОВ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

<sup>1</sup>Антропова И.Г., <sup>1</sup>Фенин А.А., <sup>2</sup>Ревина А.А., <sup>1</sup>Хашба Е.В.

<sup>1</sup>Российский Химико-Технологический Университет им. Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия, [antropovai@inbox.ru](mailto:antropovai@inbox.ru)

<sup>2</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, г. Москва Россия, [revina@mail333.com](mailto:revina@mail333.com)

В последние десятилетия интерес к кумарину и его производным в биохимии и медицине возрос в особенности при рассмотрении возможности использования их в качестве антиоксидантов и радиопротекторов [1, 2].

Кумарины и их производные проявляют противоопухолевую, противовоспалительную, антиаллергическую активность, а кумарин и 4-гидроксикумарин использовались в качестве экспериментальных лекарств при лечении раковых заболеваний. Кумарины обладают более простым строением и представляют превосходный синтон для конструирования практически любого антиоксиданта [3].

Предполагают, что антиоксидантные свойства кумаринов определяются их способностью нейтрализовать активные формы кислорода и тормозить свободно-радикальные реакции, защищая функционально-важные молекулы в биологических системах от окислительного стресса. Однако объем данных о радиационно-химическом поведении кумаринов в водно-органических системах незначителен.

Цель данной работы заключается в попытке исследования физико-химических свойств и радиационно-химического поведения кумаринов в водно-органических системах. Проблема состоит в изучении связи структура/свойство/активность.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие соединения кумаринов<sup>1</sup>: 4-метилэскулетин, 8-нитрозоэскулетин, имеющие в структуре конденсированное бензольное и альфа-пироновое кольца; данные соединения отличаются в расположении заместителей в кольцах.

Для исследования были выбраны обратно-мицеллярные системы типа АОТ/изооктан/вода, в которых меняя величину  $w$  – мольное соотношение воды и АОТ, можно в широких пределах менять диаметр водного пула. Концентрация АОТ составляла 0,15 М/л, концентрация кумаринов ( $[Qu]=0,01$  г/л) являлась величиной постоянной.

Облучение азрированных образцов проводили на радиационно-химической многокамерной установке РХМ- $\gamma$ -20 РХТУ им. Д.И.Менделеева при мощности поглощённой дозы облучения  $0,26 \pm 0,01$  Гр/с по ферросульфатному дозиметру [4]. Интервал поглощенной дозы кумаринов обратно-мицеллярных системах составлял от 0,23 кГр до 0,5 кГр.

Спектры оптического поглощения исходных и облучённых растворов записывали на спектрофотометре СФ-2000 в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм в диапазоне длин волн от 200-500 нм, раствором сравнения служил 0,15 М раствор АОТ в изооктане.

<sup>1</sup> Кумарины были синтезированы и любезно предоставлены для исследований проф. Э.А. Парфёновым из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

## Обсуждение результатов

Свободно-радикальные процессы окисления вызывают серьезные нарушения в жизнедеятельности живых организмов [3, 5]. Биологическая клетка является гетерогенной системой, где полярная внутриклеточная среда окружена неполярной мембраной. Таким образом, проведение экспериментов в мицеллярных системах позволяет моделировать процессы, протекающие в биологических клетках.

Рассмотрим влияние структуры молекулы кумаринов на исходные спектры оптического поглощения 1 мМ растворов 8-нитрозоэскулетина и 4-метилэскулетина (рис.1).

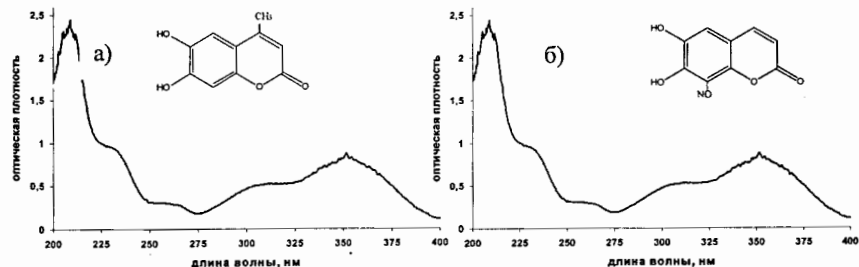


Рис.1. Спектры оптического поглощения исходных спиртовых 1 мМ растворов молекул кумаринов: а) 4-метилэскулетина; б) 8-нитрозоэскулетина

Из рис.1 видим, что спектры оптического поглощения 4-метилэскулетина и 8-нитрозоэскулетина не зависят от природы заместителя.

Заметные изменения наблюдаются в спектрах поглощения мицеллярных растворов кумаринов в зависимости от коэффициента солубилизации.

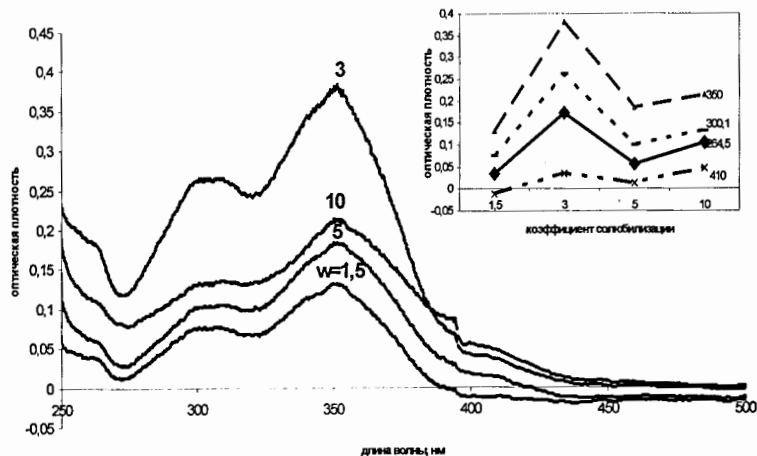


Рис. 2. Спектры оптического поглощения 8-нитрозоэскулетина ( $[Qu]_{тв} = 0,01$  г/л = const) в обратно-мицеллярных системах с разным диаметром водного пула мицелл

На рис. 2 представлено изменение спектров оптического поглощения в зависимости от коэффициента солубилизации  $w$ . Вода в разных состояниях обладает разными поляризационными свойствами, которые влияют на электронные спектры молекул. Известно, что в ядре мицеллы вода находится в трех видах: связанная, свободная и сорбционная. Важно обратить внимание на то, что на графике наблюдается экстремум при  $w = 3$ . По-видимому, один из видов воды оказывает максимальное влияние на молекулу кумарина. Значение коэффициента экстинкции увеличивается с ростом коэффициента солубилизации. В электронных спектрах поглощения 4-метилэскулетина происходит падение оптической плотности с ростом коэффициента солубилизации.

Для биологических систем представляет большой интерес поведение биологически активных соединений в стрессовых условиях. Использовали небольшие дозы облучения порядка 0,5 кГр для обратно-мицеллярных систем.

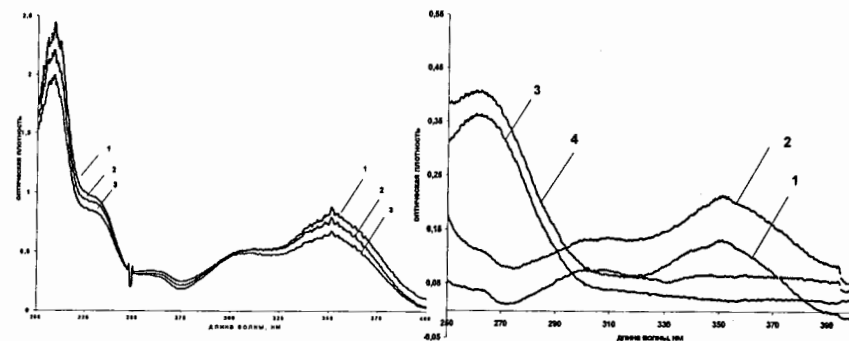


Рис. 3. Спектры оптического поглощения (а) спиртового 1 мМ раствора 8-нитрозоэскулетина от дозы облучения (кГр): 1-исходный; 2-1 кГр; 3-2,5 кГр; (б): в обратных мицеллах в зависимости от коэффициента солубилизации и дозы облучения 0,5 кГр: 1-исходный  $w = 1,5$ ; 2 – исходный  $w = 10$ ; 3 – облученный  $w=1,5$ ; 4 – облученный  $w = 10$

Степень превращения при радиолитзе кумаринов в обратно-мицеллярной системе значительно выше (рис. 3), чем в этиловом спирте, и достигает порядка 70 % для 8-нитрозоэскулетина и 45 % -для 4-метилэскулетина.

Легкость окисления определяет высокую реакционную (биологическую) активность кумаринов, которые защищают от окисления другие соединения или способствуют их восстановлению.

Следовательно, в мицеллярной системе обнаружено влияние заместителей кумарина на спектры оптического поглощения при изменении размера водного пула. Радиационно-химический выход разложения кумаринов в обратно-мицеллярных системах выше, чем в спиртовых растворах.

## Литература

1. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*: Сб. научн. ст. Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова, -М.: Наука, 1992
2. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., Наука, 1975, с. 214

3. Парфёнов Э.А. Физиологически совместимые антиоксиданты. Молекулярно-механистический аспект биологической активности и повышение защитной эффективности природных антиоксидантов в результате химической модификации. // Автореф. дис. докт. хим. наук в форме научного доклада. М.: Моск. гос. акад. тонкой химической технологии, 2000, с.48
4. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. Экспериментальная техника и методы. М.: Наука, 1985.
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006.

## ИССЛЕДОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИТОКСАНТРОНА И АМЕТАНТРОНА С ДНК, ЗАРАНЕЕ ОБЛУЧЕННОЙ МИЛЛИМЕТРОВЫМИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМИ ВОЛНАМИ

Бабаян Ю.С., Тадевосян А.А., Канарян Г.Л., Казарян Р.С., Маркарян А.Ш., Орбелян С.Д.

*Ереванский государственный университет, г. Ереван, Армения, usbaba@ysu.am.*

Спектрофотометрическим методом исследовано связывание противоопухолевых антибиотиков митоксантрона и аметантрона с ДНК, облученными нетепловыми миллиметровыми электромагнитными (МЭМ) волнами с резонансными для водных структур частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц и нерезонансной частотой-48,3 ГГц. Показано, что митоксантрон и аметантрон с облученными и необлученными ДНК связываются одинаковым интеркалирующим способом. Однако с ДНК, облученными МЭМ волнами, резонансных для молекулярных водных структур, аметантрон и митоксантрон образуют более термостабильный комплекс, константа связывания которых на порядок больше, чем константа связывания аметантрона и митоксантрона с необлученной ДНК.

МЭМ излучения слабой интенсивности в настоящее время имеют огромное применение в практической медицине. Обнаружен специфический лечебный характер воздействия МЭМ излучения на организм человека при различных патологических состояниях [1]. Было показано, что одним из способов снижения иммунодепрессивных свойств и токсичности препаратов в процессе химиотерапии опухолей может быть применение химиопрепаратов в комбинации с МЭМ излучением [2].

Целью данной работы являлось исследование особенностей связывания противоопухолевых соединений митоксантрона и аметантрона с ДНК, облученной МЭМ волнами.

### Материалы и методы

В работе использовали ДНК тимуса теленка ("Sigma"). Растворы ДНК были приготовлены в цитратно-солевом буфере 0,1SS С, рН=7,3.

Облучение растворов МЭМ волнами проводилось в специальном стеклянном сосуде. Толщина образца 1,2 мм. Для облучения МЭМ волнами применялись генераторы Г4-142 и Г4-141. Облучение образцов проводилось при комнатной температуре, в режиме амплитудной модуляции с частотой 1 Гц, плотностью потока мощности на образце ~ 50 мк Вт/см<sup>2</sup>. Спектры поглощения молекулы измерялись на спектрофотометре SP 8-100 (Англия).

### Результаты и обсуждения

Аметантрон и митоксантрон взаимодействуют с ДНК в основном интеркалирующим способом [3]. Плоские части молекул аметантрона и митоксантрона внедряются между параллельно расположенными азотистыми основаниями ДНК. Было показано, что вследствие облучения МЭМ волнами с частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц, происходит дегидратация ионов [Na<sup>+</sup>] и нуклеотидов ДНК [4].

Водные растворы ДНК, приготовленные для спектрофотометрического титрования облучались 30 и 90 мин. Кривые титрования получены непосредственно после облучения. Как следует из экспериментальных данных при постоян-

ной концентрации противоопухолевого препарата с увеличением содержания ДНК в растворе, наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения в сторону длинных волн. Опыты показывают, что для облученной и необлученной ДНК наблюдаются одинаковые закономерности изменений поглощения раствора ДНК вследствие связывания аметантрона или митоксантрона.

Следовательно, в исследуемых условиях аметантрон и митоксантрон связываются с облученной и необлученной ДНК в основном интеркалирующим способом. При некоторых значениях  $C_p/C_o$  (где  $C_p$  – концентрация ДНК в расчете на пару оснований, а  $C_o$  – концентрация препарата в растворе) прекращается дальнейшее изменение спектров поглощения – все молекулы находятся в связанном состоянии.

Константа связывания ( $k$ ) и стехиометрия насыщения ( $n$ ) препарата с облученной ДНК рассчитаны из спектров спектрофотометрического титрования. Для расчета из кривых титрования по формулам (1) определяли концентрацию свободного ( $C_f$ ) и связанного ( $C_b$ ) препарата и была построена изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда

$$C_f = \frac{A - A_b}{A_f - A_b} \cdot C_o, \quad C_b = C_o - C_f \quad (1)$$

Здесь  $A_f$  и  $A_b$  – поглощение свободного и связанного препарата,  $A$  – поглощение при промежуточных концентрациях препарата. Связывание исследуемых препаратов с ДНК характеризуется изотермой адсорбции, которую можно описать теоретической зависимостью (2).

$$\frac{r}{C_f} = k(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad \text{где } r = \frac{C_b}{C_p} \quad (2)$$

В таблице 1 приведены значения  $k$  и  $n$  для исследуемых комплексов ДНК-аметантрон и ДНК-митоксантрон.

Таблица 1. Значение параметров связывания ( $k$  и  $n$ ) митоксантрона и аметантрона с ДНК, растворы которых 90 мин. облучались МЭМ волнами.

	ДНК-аметантрон				ДНК-митоксантрон			
	необлуч.	облучен. 48,3 ГГц	облучен. 50,3 ГГц	облучен. 64,5 ГГц	необлуч.	облучен. 48,3 ГГц	облучен. 50,3 ГГц	облучен. 64,5 ГГц
$k(M^{-1})$	$7 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$
$n$	2,1	2,2	2,2	2,1	2,4	2,3	2,4	2,4

Как было показано [4], облучение ДНК резонансными для водных структур МЭМ волнами, приводит к изменению гидратной оболочки ДНК, и вследствие этого, как следует из таблицы, увеличивается константа связывания; митоксантрон и аметантрон образуют с облученной 64,5 и 50,3 ГГц частотах ДНК более стабильный комплекс. При облучении же растворов ДНК МЭМ частотой 48,3 ГГц, параметры связывания облученной ДНК с препаратами по сравнению с необлученной ДНК изменяются незначительно, находятся в пределах погрешности эксперимента.

Следовательно, вследствие облучения ДНК резонансными для водных структур частотами происходят такие изменения в гидратной оболочке ДНК, вследствие чего интеркалирующие противоопухолевые соединения образуют с ними более стабильный комплекс.

#### Литература

1. Лебедев А.Ю. Биомедицина и радиоэлектроника, 1998, N 2, с.49-54
2. Гарибян Д.В., Нерсисян Л.Э., Бабаян Ю.С. Научно-медицинский журнал, 2006, N 3, с. 28-33
3. Бабаян Ю.С., Манзини Д. Молекуляр.биология, 1990, Т.24, N 3, с. 1084-1094
4. Бабаян Ю.С., Акопян С.Н., Казарян Р.С. Биомед. технол. и радиоэлек., 2006, N 11, р. 64-68



## ВЛИЯНИЕ КОГЕРЕНТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА ПЛОТНОСТЬ РАСТВОРОВ ДНК

Бабаян Ю.С., Тадевосян А.А., Канарян Г.Л., Калантарян В.П.  
Ереванский государственный университет, г. Ереван, usbaba@ysu.am

Денситометрическим и спектрофотометрическим методами исследованы плотность и термостабильность водно-солевых растворов ДНК, облученных нетепловыми миллиметровыми электромагнитными волнами с резонансными для водных структур колебаниями с частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц и нерезонансной – 48,3 ГГц. Показано, что с увеличением времени облучения резонансными частотами от 0 (необлученная) до 120 мин. термостабильность ДНК и плотность ее растворов увеличиваются приблизительно на 1°C и  $10^{-4}$  г/см<sup>3</sup>, соответственно. При облучении же нерезонансной частотой 48,3 ГГц увеличение термостабильности ДНК и плотности ее растворов находятся в пределах погрешности эксперимента. Предполагается, что под действием низкоэнергетического излучения миллиметрового диапазона происходит дегидратация ДНК и присутствующих в растворе ионов Na<sup>+</sup>.

Миллиметровые электромагнитные (МЭ) волны нетепловой интенсивности успешно применяются в клинической медицине и в биологии, несмотря на то, что механизмы их действия на биологические объекты пока еще не совсем понятны [1-2]. В настоящее время все большее подтверждение получает концепция, утверждающая, что нетепловое влияние МЭ волн на биосистемы обусловлено влиянием на воду [3]. Показано, что МЭ волны нетепловой интенсивности влияют на свойства водных растворов вследствие изменения структурированности воды вокруг растворенных веществ.

Целью данной работы являлось исследование плотности и термостабильности водных растворов ДНК, облученных низкоэнергетическими МЭ когерентными волнами с частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц, совпадающими с резонансными частотами колебаний гексагональных структур воды [3], и с частотой 48,3 ГГц.

### Материалы и методы

В работе использовали ДНК тимуса теленка ("sigma"). Растворы ДНК были приготовлены в цитратно-солевом буфере 0.1SSC. Плотность воды, 0.1SSC и растворов ДНК определяли на денситометре DMA 4500 Anton Paar (Австрия) с чувствительностью  $10^{-5}$  г/см<sup>3</sup>.

Облучения растворов МЭ волнами проводилось в специальном стеклянном сосуде. Растворы сверху закрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина образца не превышала 1 мм. Для облучения МЭ волнами применялся источник сигналов сверхвысоких частот, генераторы Г4-142 и Г4 141. Облучение образцов проводилось при комнатной температуре, в режиме амплитудной модуляции частот 1 Гц, плотность потока мощности на образце составляла ~ 50 мкВт/см<sup>2</sup>.

Спектры поглощения ДНК при плавлении получены на спектрофотометре UNICAM SP 8-100 (Англия), в термостатируемых ячейках.

### Результаты и их обсуждение

Для выяснения влияния низкоэнергетических МЭ когерентных волн (с

резонансными и нерезонансными частотами колебаний гексагональных водных структур) на ДНК ее растворы облучались по 30, 60, 90 и 120 мин, после чего для облученных и необлученных растворов ДНК определяли плотность и поглощение при 260 нм (в максимуме поглощения) в зависимости от температуры. Для контроля были измерены также плотности бидистиллированной воды и водно-солевого раствора (буфера) до и после облучения. Исследования выявили, что при облучении чистой воды с частотами 64,5 ГГц, 50,3 ГГц и 48,3 ГГц плотность чистой воды практически не меняется, в то время как плотность буфера и раствора ДНК увеличиваются при облучении частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц, совпадающими с резонансными частотами колебаний гексагональных структур воды, и не меняются при облучении частотой 48,3 ГГц (табл. 1). Следовательно, при облучении буфера и раствора ДНК частотами, совпадающими с резонансными частотами колебаний гексагональных структур воды, их плотности увеличиваются. Как показывают экспериментальные данные, основное увеличение плотности растворов происходит до 90 мин. облучения, после чего увеличения плотности становится незначительным. Одновременно, наблюдается практически одинаковая динамика изменения плотностей буфера и раствора ДНК.

Увеличения плотности ДНК и буфера вследствие облучения растворов МЭ когерентными волнами с частотами 64,5 ГГц и 50,3 ГГц совпадающими с резонансными частотами колебаний гексагональных структур воды, по всей вероятности, обусловлено изменением структуры воды вследствие облучения, так как резонансные частоты поглощения ДНК находятся в области от 2 до 9 ГГц [4]. Обобщая выше изложенные экспериментальные данные, можно предположить, что, при облучении буфера и раствора ДНК, по видимому, происходит дегидратация присутствующих в растворе ионов (в основном Na<sup>+</sup>) и ДНК. Часть свободных молекул воды заполняет пустоты гексагональных структур, вследствие чего плотность раствора увеличивается.

Таблица 1. Плотность бидистиллированной воды, буфера и раствора ДНК при облучении в течении 90 мин. МЭ когерентными волнами при 20 °С

Объект исследования	Необлучен. раствор $\rho$ (г/см <sup>3</sup> )	Облучен. раствор при част. 64,5 ГГц $\rho$ (г/см <sup>3</sup> )	Облучен. раствор при част. 50,3 ГГц $\rho$ (г/см <sup>3</sup> )	Облучен. раствор при част 48,3 ГГц $\rho$ (г/см <sup>3</sup> )
Бидистил. вода	0.99820	0.99821	0.99820	0.99822
Буфер	0.99920	0.99926	0.99932	0.99925
Раствор ДНК	0,99923	0.99930	0.99932	0.99925

Примечание. Значения приведенных данных представляют собой средние арифметические из 8 независимых измерений.

Исследовалось так же влияние низкоэнергетических МЭ когерентных волн на водно-солевой раствор ДНК, с помощью плавления ДНК с повышением температуры. Для этого были получены кривые плавления облученных (30, 60, 90 и 120 мин.) и необлученных растворов ДНК и определены параметры температура ( $T_{пл}$ ) и интервал плавления ( $\Delta T$ ). Кривые плавления получены как непосредственно после облучения растворов, так и через 10 и 24 часа после облучения. Исследования показали, что вид кривых плавления, значения  $T_{пл}$  и  $\Delta T$  не проявляют определенную зависимость от длительности постоблученного времени,

поскольку через 10 и 24 часов после облучения эти параметры не изменяются в пределах погрешности эксперимента. При этом было выявлено, что pH растворов ДНК вследствие облучения в пределах экспериментальной ошибки не изменяется. Обнаружено, что в зависимости от длительности облучения растворов ДНК частотой 64,5 ГГц, совпадающей с одной из резонансных частот колебаний гексагональных структур воды, термостабильность  $T_{пл}$  ДНК возрастает. Как следует из экспериментальных данных, с увеличением времени облучения ДНК  $T_{пл}$  увеличивается приблизительно на 1 °С, в то время как  $\Delta T$  немного уменьшается (в пределах погрешности эксперимента).

Так как резонансные частоты поглощения ДНК находятся в области от 2 до 9 ГГц, то мы полагаем, что при частоте 64,5 ГГц изменения в значениях  $T_{пл}$  и  $\Delta T$  обусловлены их опосредованным через воду влиянием на ДНК. Растворы ДНК облучались также при другой резонансной частоте колебаний гексагональных водных структур 50,3 ГГц и частоте 48,3 ГГц. Опыты показывают, что облучая растворы ДНК при частоте 50,3 ГГц  $T_{пл}$  и  $\Delta T$  претерпевают аналогичные изменения, что и при облучении растворов ДНК частотой 64,5 ГГц. Однако, в случае облучения растворов ДНК при частоте 48,3 ГГц, параметры плавления практически не изменяются.

Следовательно, можно полагать, что наблюдаемые изменения в параметрах плавления ДНК обусловлены именно изменениями структуры воды, возникающими вследствие облучения. Следует отметить, что полученные данные по плавлению ДНК находятся в хорошем соответствии с денситометрическими данными. Согласно предложенной версии, вследствие облучения происходит дегидратизация ионов  $Na^+$ , в результате они более эффективно экранируют отрицательно заряженные фосфорные группы ДНК, из-за чего и увеличивается термостабильность ДНК.

#### Литература

1. Makar V.R., Logani M.K., Bhanushali A., Kataoka M., Ziskin M.C. Effect of millimeter waves on natural killer cell activation // *Bioelectromagnetics*, 2005, v. 26, N1., p. 10-19.
2. Belyaev I.Y., Shcheglov V.S., Alipov Y.D., Polunin V.A. Resonance effect of millimeter waves in the power range from 10 to  $3 \times 10$  W/cm<sup>2</sup> on *Escherichia coli* cells at different concentrations // *Bioelectromagnetics*, 1996, v. 17, N4., p. 312-321.
3. Петросян В. И., Сипицын Н. И., Елкин В. А., Девятков Н. Д., Гуляев Ю. В., Бецкий О. В., Лисенкова Л. А., Гуляев А. И. Роль резонансных молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем // *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2001, N 5-6, стр. 62-105.
4. Илларионов В. Е. Концептуальные основы физиотерапии в реабилитологии. Новая парадигма физиотерапии.-М.:ВЦМК "Защита", 1998.

## ТЕМПЫ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И НАСЫЩЕННОСТЬ ГУАНИНОМ И ЦИТОЗИНОМ ЭКЗОНОВ И ИНТРОНОВ ГЕНОВ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ КЛАССА 3 МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э., Линник Ю.И.  
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь  
alexbutv@rambler.ru

Цель исследования: установить насыщенность гуанином и цитозином (ГЦ-насыщенность), а также скорости эволюции экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ класса 3 (АДГ3) мыши и человека.

#### Материалы и методы

Проанализированы последовательности генов АДГ3 мыши (ENSMUSE00000176694, www.ensembl.org), человека (ENSG00000197894, www.ensembl.org), АДГ1С человека (NT\_016354, www.dsi.univ-paris5.fr), соответствующие им последовательности мРНК и аминокислотные последовательности кодируемых белков. ГЦ-насыщенность определена при использовании пакета программ MEGA [7]. Выравнивание последовательностей проведено с помощью программ Clustal W [11]. Эволюционные дистанции и скорости молекулярной эволюции вычислены по методу М. Кимуры [2]. Синонимичная ( $p_S$ ) и несинонимичная ( $p_N$ ) р-дистанции вычислены по модифицированному методу Нея-Годжбори [6, 8]. Характер аминокислотных замен определен по физико-химической дистанции [5]. Конформационная подвижность остова полипептидной цепи вычислена по методу В.В. Поройкова и соавт [3]. Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ №Б06М-060 от 1.04.2006 г.

#### Результаты и обсуждение

Среднее содержание гуанина и цитозина в экзонах гена АДГ3 человека составляет  $45,8 \pm 3,35$  %, что достоверно ( $p < 0,05$ ) выше такового в интронах ( $38,1 \pm 1,43$  %). Установлено, что в данном гене более ГЦ-насыщенные экзоны чередуются с менее ГЦ-насыщенными интронами. Такое строение гена АДГ3 человека за счет различий в содержании водородных связей обеспечивает чередование более термодинамически стабильных участков молекулы ДНК (соответствующих экзонам) и менее стабильных (соответствующих интронам). Средняя скорость эволюции для экзонов гена АДГ класса 3 человека и мыши составляет  $0,51 \pm 0,050$ , а для интронов –  $3,49 \pm 0,355$  замен на нуклеотидный сайт в год (различия достоверны,  $p < 0,001$ ). Между скоростями эволюции экзонов и интронов АДГ класса 3 и их насыщенностью гуанином и цитозином существует достоверная ( $p < 0,05$ ) отрицательная корреляционная связь средней силы ( $r = -0,46 \pm 0,229$ ). Таким образом, большая ГЦ-насыщенность экзонов изучаемого гена АДГ человека (по сравнению с интронами) в процессе эволюции сохраняется благодаря малой скорости их эволюции, что обеспечивает их большую защиту от мутагенов.

Наибольший интерес при изучении генов АДГ человека представляет возможность оценки их эволюционных изменений в связи с появлением новых функций. Поэтому гены АДГ классов 1С, 3 (относящиеся, согласно предложенной нами классификации [1], к разным подклассам) человека послужили объектами для дальнейшего тщательного анализа. Профили ГЦ- и ГЦ3-содержания в экзонах изучаемых генов АДГ отличаются, но достоверные отличия обнаруживаются

лишь при сравнении их пятых экзонов ( $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , соответственно). Выявленные отличия наводят на мысль о важности пятого экзона в структурно-функциональных отличиях АДГ этих двух классов.

Полученные результаты согласуются с таковыми, полученными при построении профилей мутабельности по соответствующим декапептидам участкам мРНК, кодирующим АДГ 1С и 3 человека. Так, установлено наличие двух участков с высокой частотой мутаций. Первый из них (346–375) соответствует части пятого экзона, а второй (886–915) – седьмого экзона. Известно, что наличие переменных участков может быть обусловлено как положительным отбором, так и фиксацией нейтральных замен.

При выравнивании соответствующих пятым экзонам участков аминокислотных последовательностей АДГ 1С и 3-го классов человека установлено, что их вторичная структура несколько различается. Так, в области N-конца участка АДГ3, соответствующего пятому экзону, имеется  $\alpha$ -спиральный фрагмент, который отсутствует в соответствующем участке АДГ1С. Наблюдаемые различия вторичной структуры, безусловно, сопряжены с изменениями третичной структуры и функции. Так, рентгеноструктурным анализом было показано, что аминокислотные остатки, соответствующие пятому экзону, участвуют в связывании субстратов. Остатки, занимающие 116, 117, 140, 141-е положения, входят в состав субстрат-связывающего пакета, а остаток Arg-115 АДГ3 связывает глутатион и омега-гидроксижирные кислоты [4].

С крайней степенью осторожности мы полагаем, что в процессе эволюции происходил положительный отбор мутаций на N-конце соответствующего пятому экзону участка АДГ 1С и 3. Для выявления отбора определены синонимичная и несинонимичная дистанции.

Полученные нами соотношения  $r_N/r_S$  при сравнении всей последовательности изучаемых мРНК и их участков, соответствующих пятым экзонам, равны и являются достаточно низкими (0,38), что согласуется с данными, полученными другими исследователями. Для десяти N-концевых кодонов участков сравниваемых мРНК, соответствующих пятым экзонам, соотношение синонимичной и несинонимичной дистанций значительно выше (0,88). Данное значение, однако, не превышает единицы. Именно по этой причине традиционное определение положительного отбора с помощью доступных селекционных тестов оказалось невозможным из-за их технических недостатков.

В пользу предположения о существовании положительного отбора также свидетельствуют достоверное преобладание многошаговых аминокислотных замен ( $80,0 \pm 13,33\%$ ,  $p < 0,01$ ) и наличие трех высокорадикальных замен аминокислот (нумерация по АДГ1С, направление от АДГ3 к АДГ1С – 116:Arg→Asp, 123:Тре→Лей и 125:Про→Гли). Большое количество фиксированных замен аминокислот на участке 116–125 не могло не повлиять на конформационную подвижность главной цепи. Установлено, что замены аминокислот в положениях 116–118 последовательности АДГ1С привели к росту средней энтропии, а, следовательно, увеличению гибкости остова основной цепи. Появление остатка лейцина в 116-м положении (в результате замены Вал→Лей) позволило дифференцировать доступ и ретенцию различных по размеру субстратов в активный центр АДГ (благодаря наличию его двух конформационных состояний). Вместе с тем объем бокового радикала остатка Лей ( $0,1134 \text{ нм}^3$ ) больше такового остатка Вал ( $0,0863 \text{ нм}^3$ ), что

привело бы к стерическим помехам его с С и D кольцами стероида [10]. Однако данные помехи не возникают, поскольку в результате замен в 115-м (Arg→Asp) и 117-м положениях (Тре→Гли) происходит уменьшение объемов боковых радикалов взаимозаменяемых аминокислотных остатков.

Вместе с тем изоферменту АДГ1С свойственно наличие уникальных функциональных особенностей, а именно способности катализировать реакцию дисмутации. В ходе этой реакции из двух молекул ацетальдегида образуются ацетат и этанол, который может быть вновь окислен как АДГ1С, так и другими АДГ. Учитывая полученные данные о высокой вероятности положительного отбора мутаций в АДГ1С и функциональные особенности данного изофермента, мы предполагаем, что они могут стать основой для разработки метода определения активности АДГ1С для оценки степени тяжести алкоголизма и эффективности проводимого лечения.

Аминокислоты, соответствующие второму переменному участку, не выполняют какой-либо важной функции [9]. Следовательно, большинство возможных аминокислотных замен являются приемлемыми и селективно нейтральными. Поэтому замены нуклеотидов (и, соответственно, аминокислот) в данном участке, по-видимому, происходили в режиме нейтральной эволюции.

## Выводы

1. Насыщенность гуанином и цитозином экзона гена АДГ3 человека достоверно выше, а скорости эволюции достоверно ниже таковой интронов;
2. В последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 1С и 3 человека, существуют 2 гиперварибельных участка (346–375 и 886–915). Эволюционные изменения первого гиперварибельного участка происходили в режиме положительного отбора, а второго – в режиме нейтральной эволюции.

## Литература

1. Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э. Эволюционные взаимоотношения и структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека // Вестник ВГМУ. – Витебск, 2006. – №2. – С. 22–27.
2. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. – М., 1985. – 398 с.
3. Поройков В.В., Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Особенности распределения триплетов аминокислот в первичной структуре глобулярных белков в связи с их конформационными свойствами // Биофизика. – 1980. – Т. 25 (4). – С. 730–732.
4. Engeland K. [et al] Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1993. – Vol. 90. – P. 2491–2494.
5. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution // Science. – 1974. – Vol. 185 (4154). – P. 862–864.
6. Ina Y. New methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions // Mol. Biol. Evol. – 1995. – Vol. 40. – P. 190–226.
7. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment // Brief. Bioinform. – 2004. – Vol. 5. – P. 150–163.
8. Nei M., Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions // Mol. Biol. Evol. – 1986. – Vol. 3. – P. 418–426.

9. Niederhut M.S. [et al] Three-dimensional structures of three human class I alcohol dehydrogenases // *Protein Sci.* – 2001. – Vol. 10. – P. 697–706.
10. Park D.H., Plapp B.V. Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266 (20). – P. 13296–13302.
11. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions – specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4673–4680.

## ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ДЕТЕЙ ЧУКОТКИ

Годовых Т.В., Годовых В.В.

*Российская часть международного научно-исследовательского центра «Арктика»  
ДВО РАН, г. Магадан, Россия, tgog@mail.ru*

Проблема сохранения здоровья населения в условиях Крайнего Северо-Востока России является актуальной. Особенно актуальны вопросы сохранения здоровья растущего организма в экстремальных условиях окружающей среды. Нами проведено исследование липидного и углеводного обмена у детей Чукотки в онтогенетическом развитии от 6 до 17 лет современного исторического периода. Исследовали детей и подростков (в возрасте 7-17 лет) добровольцев в зависимости от групп населения: 1 группа – дети мигрантов, 2 группа – дети аборигенов (505 человек), практически здоровых. Аналитическое определение общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (ХЛВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХЛПНП), триглицеридов (ТГ), глюкозы (Г), лактата (Л), пирувата (П) выполнялось в лаборатории биологической и неорганической химии отдела экологической эндокринологии Института физиологии природных адаптаций УрО РАН г. Архангельска по методикам [1, 2, 3].

Выявлены различия показателей липидного и углеводного обменов в зависимости от возраста, пола и групп населения. У мигрантов мальчиков и девочек выявлено снижение нормальных значений Г за счет роста показателя ниже нормы (от 9 до 68 % у мальчиков и от 7 до 75 % у девочек), одновременно увеличивается количество детей с показателями выше нормы. Также отмечается достоверное снижение среднегодового уровня Г у мигрантов в периоде онтогенетического развития от 6 до 17 лет независимо от пола. У аборигенов выявлена флуктуация показателя Г ниже физиологических норм у мальчиков от 100 % до 87 %, у девочек от 69 % до 87 % в онтогенезе. Среднегодовой уровень Г у мальчиков аборигенов в возрасте 10-14 лет достоверно выше относительно 6-9 и 15-17 лет, у девочек отличий не выявлено. У мигрантов независимо от пола в 6-9 лет среднегодовой уровень Г достоверно больше относительно аборигенов, а в возрасте 10-14 лет Г у мигрантов превышает аборигенов только у девочек. К юношескому периоду различия у групп населения сглаживаются.

Количество обследуемых лиц с повышенными значениями Л у мигрантов в онтогенезе падает у мальчиков от 82 % до 58 %, у девочек от 64 до 49 %. Среднегодовой уровень Л у девочек мигрантов 10-14 лет был выше аналогичного аборигенов и выше чем в возрастной группе 15-17 лет ( $p < 0,01$ ). У мальчиков мигрантов в 15-17 лет отмечено увеличение средних значений Л относительно аборигенов той же группы. У аборигенов наоборот отмечено увеличение количества обследуемых с повышенным уровнем Л в онтогенетическом развитии у девочек от 33 % до 57 %, а у мальчиков снижение от 75 % до 55 %. Среднегодовой уровень Л у девочек и мальчиков аборигенов 10-14 лет был ниже аналогичного мигрантов ( $p < 0,01$ ). У мальчиков аборигенов в 15-17 лет отмечено снижение средних значений Л относительно мигрантов той же группы.

В онтогенезе у мигрантов происходит увеличение нормальных значений П за счет снижения физиологических норм: у мальчиков от 18 до 4 %; у девочек от 14 до 2 %. Среднегодовой уровень П у мигрантов мальчиков в возрасте 10-14 лет

был достоверно ниже чем в возрасте 15-17 лет. У мигрантов девочек отмечено достоверное увеличение среднегодового уровня П с возрастом от 6 до 17 лет. У аборигенов нормальные значения П растут наибольшее количество в юношеском возрасте. Аборигены мальчики 15-17 лет имели достоверное увеличение средних значений П относительно девочек аборигенов, у аборигенов девочек 6-9 лет выявлена тенденция увеличения уровня П относительно аналогичной группы 10-14 лет.

Таким образом, выявлены особенности углеводного обмена у детей Чукотки в онтогенезе в зависимости от групп населения, возраста, пола. У мигрантов отмечается увеличение гипогликемии от 7 до 75 % в онтогенетической динамике. У аборигенов изначально в младших возрастных группах выявлено значительное количество детей со сниженными показателями Г, которые в онтогенетическом развитии стабильно удерживаются. Сниженное количество П у мигрантов и аборигенов с возрастом уменьшается. Повышенное содержание Л изменяется неоднозначно: у мальчиков в процессе роста отмечено его снижение, а у девочек аборигенов – увеличение. Выявлено напряжение углеводного обмена, проявляющееся увеличением гипогликемий во всех возрастных периодах у мальчиков и девочек мигрантов. Уровень Л у мигрантов мальчиков подросткового и юношеского возраста, а также у девочек второго детства выше относительно аборигенов. Выявлены тенденции увеличения П у аборигенов девочек младшего школьного возраста, а также снижения в юношеском возрасте относительно девочек мигрантов. У мигрантов девочек и мальчиков отмечено увеличение П в процессе онтогенетического развития.

Не менее интересным является изучение липидного обмена в онтогенетической динамике у детей Чукотки. Исследовали ОХ у мигрантов: выявлено увеличение у мигрантов с возрастом (у мальчиков повышенных 0-16 % и пониженных значений от нормы 0-10 %; у девочек также с повышенных от 43 до 16 % и с пониженных значений ОХ от 0 до 7 %). Среднегодовой уровень ОХ у мигрантов девочек в 6-9 лет был достоверно выше, чем у мигрантов мальчиков. У мигрантов независимо от возраста отмечено достоверное снижение среднего уровня ОХ в онтогенетическом развитии. У мигрантов девочек 6-9 лет достоверно ОХ повышен относительно мальчиков. У аборигенов мальчиков также в онтогенезе происходит увеличение нормальных значений ОХ за счет снижения лиц с превышающими параметрами норму (33-22 %) и ниже нормы (17-5 %), при этом средние значения среднегодового уровня ОХ с возрастом имеет тенденцию к снижению, а у девочек достоверно снижается. Количество лиц с превышением ЛПОНП у мигрантов снижается от 55 до 6 %, однако незначительно увеличивается число детей с пониженными значениями ЛПНОП (от 0 до 4 %). У аборигенов наибольшее увеличение детей с превышением нормы отмечено в возрасте 10-14 лет от 8 % до 13 %. У мигрантов мальчиков ЛПНП превышающие норму в онтогенезе имеют снижение (от 20 до 3 %), в юношеском возрасте появляются лица со сниженными значениями ЛПНП. У девочек мигрантов тенденция та же, однако, изначальный уровень превышения от нормы количества детей в 3 раза больше, чем у мальчиков. У девочек мигрантов достоверное снижение с возрастом уровня ЛПНП в онтогенезе. У аборигенов мальчиков в основном ЛПНП значения в пределах нормы, у девочек большие нарушения, превышение нормы в начальных и средних классах (13-9 %), снижение от нормы в юношеском возрасте. У мальчиков аборигенов в 15-17 лет среднегодовой уровень ЛПНП достоверно выше

относительно девочек. У девочек мигрантов уровень ЛПНП в возрасте 6-9 лет достоверно выше относительно аборигенов.

У мигрантов мальчиков ЛПВП имеют значительные нарушения, как в сторону превышения нормы, так и снижения от нормы. Превышение от нормы в онтогенезе растет (от 9 до 90 % у мальчиков и от 0 до 18 % у девочек). Среднегодовой уровень ЛПВП у мальчиков не имеет достоверных отличий в онтогенезе, а у девочек достоверное увеличение с возрастом. У аборигенов выявлен рост лиц, имеющих превышение физиологических норм ЛПВП в онтогенезе (от 0 до 95 %), параллельно происходит снижение количества лиц, имеющих снижение физиологических норм (от 50 до 5 %). Среднегодовой уровень ЛПВП у аборигенов девочек в возрасте 10-14 лет достоверно выше, чем у мальчиков той же группы. Девочки аборигены имеют достоверно большие значения уровня ЛПВП в 10-14 лет относительно мигрантов той же группы. У мальчиков и девочек мигрантов 15-17 лет среднегодовой уровень ТГ достоверно больше, чем у аборигенов. Коэффициент атерогенности (КА) прогнозирует развитие атеросклеротических процессов в организме. У мигрантов мальчиков более половины имеют превышение КА физиологических норм. У девочек мигрантов в онтогенезе отмечено достоверное снижение среднегодового уровня КА, у мальчиков достоверных отличий нет. У аборигенов среднегодовые значения КА у девочек в онтогенезе снижаются, у мальчиков отличий нет.

Таким образом, выявлены особенности липидного обмена у детей в зависимости от пола, возраста, групп населения. Нарушения начинаются с 7 летнего возраста, наиболее выраженные изменения происходят в период полового созревания, в основном у девочек, значительно зависят от групп населения. Выявлено снижение активности процесса этерификации холестерина, уровня холестерина липопротеидов высокой плотности и увеличение содержания холестерина липопротеидов низкой плотности, наиболее выраженное у девочек в возрастной группе 10-14 лет, свидетельствующее о нарушении антиатерогенной защиты организма. Нарушения более выражены у девочек Чукотки, нежели чем мальчиков, что требует дальнейшего изучения и разработки профилактических и реабилитационных направлений в северных регионах.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Программы Президиума РАН «Адаптация народов и культур к изменениям природной среды, социальным и техногенным трансформациям» Интеграционного проекта УрО РАН и ДВО РАН в 2007 г.

#### Литература

1. Колб В.Г. Клиническая биохимия: Пособие для врачей-лаборантов / В.Г. Колб, В.С. Камышников. Минск: Беларусь, 1976. 311с.
2. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 365с.
3. Клинические и ферментативные методы диагностики алкоголизма: методические рекомендации / И.Н. Пятницкая, Т.В. Чернобровкина, Н.Г. Найденова и др. М., 1984. 23 с.

# КИНЕТИКА ТЕПЛОВОЙ ИНАКТИВАЦИИ И ДЕНАТУРАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

Голуб Н.В., Маркосян К.А., Шолух М.В., Касилович Н.В., Клейменов С.Ю., Левицкий Д.И., Курганов Б.И.

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, [ngolub@inbi.ras.ru](mailto:ngolub@inbi.ras.ru)  
<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

Митохондриальная аспаратаминотрансфераза (мААТ; L-аспарат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1), пиридоксаль-зависимый фермент, являясь димером, состоящим из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 91 кДа. Каждая субъединица состоит из двух доменов, большого и малого, и содержит активный центр, расположенный в щели между доменами вблизи области контакта субъединиц [1]. В связи с тем, что активный центр одной субъединицы состоит из аминокислотных остатков, принадлежащих обоим субъединицам, только димерная форма мААТ обладает ферментативной активностью. Показано, что при нагревании мААТ в диапазоне температур 25-70 °С фермент необратимо инактивируется [2].

Настоящая работа посвящена сопоставлению кинетики тепловой инактивации и денатурации мААТ из сердца свиньи при различных температурах.

Очистку мААТ из сердца свиньи проводили по методу Varra et al. [3] с небольшой модификацией. Процедура очистки фермента включала ионообменную хроматографию на КМ-целлюлозе (СМ-32). В результате заключительного этапа очистки, включающего тандемную хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе/гидроксипатите, получали препарат фермента, который был гомогенным по данным Ds-Na-электрофореза в ПААГ. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом, используя коэффициент поглощения  $A_{280}^{1\%} = 14,0$  [3].

Ферментативную активность мААТ определяли, проследивая окисление NADH при 340 нм при 25 °С в результате сопряженных реакций трансаминирования L-аспартата и окисления NADH в присутствии малатдегидрогеназы, с использованием спектрофотометра Cary 50 Bio UV/Visible [4]. Удельная активность препаратов составляла не менее  $229 \pm 10$  Е/мг белка.

Для изучения тепловой инактивации мААТ раствор фермента инкубировали при определенной температуре в стеклянной пробирке, плотно закрытой силиконовой пробкой. Через определенные промежутки времени пробирку с образцом охлаждали на льду, осадок удаляли центрифугированием и в супернатанте определяли остаточную ферментативную активность при 25 °С. Контролем служил образец непрогретого фермента.

Тепловую денатурацию мААТ изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (производства Института биологического приборостроения РАН, Пушино). Растворы белка (1,0-1,5 мг/мл) нагревали с постоянной скоростью 1 К/мин в температурном интервале от 5 до 90 °С при постоянном давлении 2,2 атмосферы. Зависимости теплоемкости белка от температуры анализировали с использованием программ Origin (MicroCal Inc, США) и Scientist (MicroMath Scientific Software, США).

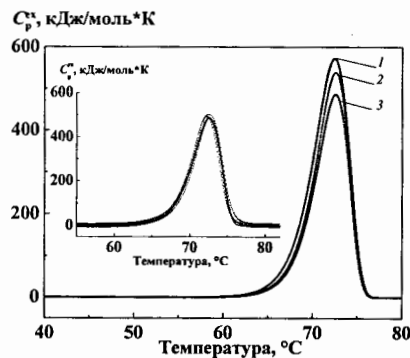


Рис. 1. Тепловая денатурация мААТ (10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,5). Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, полученные при различных концентрациях фермента: 0,2 (1), 1,0 (2) и 3,2 мг/мл (3). Скорость сканирования 1 К/мин.

Величина  $C_p^{ex}$  рассчитана на димер мААТ.

Вставка – температурный профиль при концентрации мААТ 3,2 мг/мл. Точки – экспериментальные данные, сплошная кривая рассчитана при помощи системы уравнений (1).

Зависимости избыточной теплоемкости от температуры, полученные при различных концентрациях белка, представлены на рис. 1. Положение максимума ( $T_{max}$ ) остается неизменным при варьировании концентрации мААТ. Это указывает на то, что кинетическая схема процесса денатурации не содержит кинетически значимой стадии обратной диссоциации димера мААТ на мономеры. Температурные профили избыточной теплоемкости были проанализированы в рамках необратимой реакции первого порядка:  $N \xrightarrow{k_{den}} D$ , где N и D – нативный и денатурированный белок соответственно и  $k_{den}$  – константа скорости денатурации. Для описания зависимости  $C_p^{ex}$  от температуры использовали систему уравнений [5, 6]:

$$\begin{cases} \frac{d\gamma_{nat}}{dT} = -\frac{k_{den}\gamma_{nat}}{v} \\ C_p^{ex} = Q_t \frac{k_{den}\gamma_{nat}}{v} \end{cases} \quad (1)$$

где  $\gamma_{nat}$  – доля нативного белка,  $k_{den}$  – константа скорости денатурации,  $T$  – абсолютная температура,  $v$  – скорость повышения температуры,  $Q_t$  – общая теплота денатурации. Зависимость  $k_{den}$  от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:  $k_{den} = \exp\{E_a^{den}(1/T_1^{den} - 1/T)/R\}$ , где  $E_a^{den}$  – энергия

активации для процесса денатурации,  $T_1^{den}$  – абсолютная температура, при которой  $k_{den} = 1 \text{ мин}^{-1}$ ,  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Вставка на рис. 1 показывает результаты описания зависимости  $C_p^{ex}$  от температуры, полученной при концентрации мААТ 3,2 мг/мл, с помощью системы уравнений (1). Как видно из рисунка, экспериментальные данные удовлетворительно описываются теоретическими уравнениями, что указывает на выполнение кинетической схемы  $N \rightarrow D$  (параметр  $Q_t$  составил  $2376,8 \pm 5,2$  кДж/моль). Средние значения параметров  $E_a^{den}$  и  $T_1^{den}$ , рассчитанные для трех концентраций фермента, составляют:  $546,7 \pm 1,0$  кДж/моль и  $346,82 \pm 0,01$  К соответственно.

На рис. 2 представлена кинетика термоинактивации мААТ при различных температурах. Падение относительной ферментативной активности  $A/A_0$  оказывается линейным в координатах  $\{\ln(A/A_0); \text{время}\}$  ( $A_0$  и  $A$  – начальное и текущее значение ферментативной активности). Это указывает на то, что кинетика инактивации подчиняется экспоненциальному закону:  $A/A_0 = \exp(-k_{in}t)$ , где  $k_{in}$  – константа скорости инактивации.

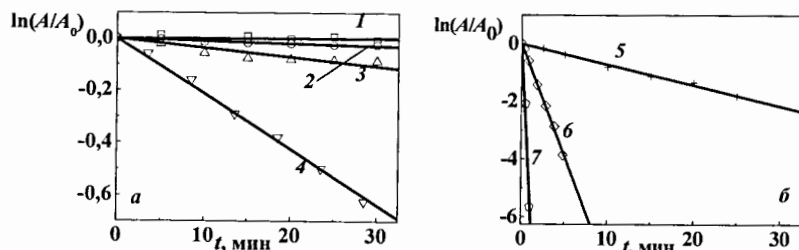


Рис. 2. Кинетика тепловой инактивации МААТ (0,1 мг/мл). Зависимости относительной ферментативной активности  $A/A_0$  от времени в полулогарифмических координатах, полученные при различных температурах: 50 (1), 57,5 (2), 61 (3), 65 (4), 68 (5), 72 (6), 77 °С (7).  $A_0$  и  $A$  – начальное и текущее значение ферментативной активности

Зависимость константы  $k_{in}$  от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:  $k_{in} = \exp\{E_a^{in} (1/T_1^{in} - 1/T)/R\}$ , где  $E_a^{in}$  – энергия активации для процесса инактивации,  $T_1^{in}$  – температура, при которой  $k_{in} = 1 \text{ мин}^{-1}$  (прямая 1 на рис. 3). Параметры  $E_a^{in}$  и  $T_1^{in}$  определены равными  $405,4 \pm 1,5 \text{ кДж/моль}$  и  $345,99 \pm 0,02 \text{ К}$  соответственно. На этом же рисунке прямая 2 соответствует зависимости  $\ln k_{den}$  от  $1/T$ , рассчитанной по данным ДСК. Как видно из рисунка, во всем изученном интервале температур (от 57,5 до 77 °С) константа скорости инактивации превышает константу скорости денатурации. Величина отношения  $k_{in}/k_{den}$  с ростом температуры снижается от значения 28,8 при 57,5 °С до значения 1,3 при 77 °С.

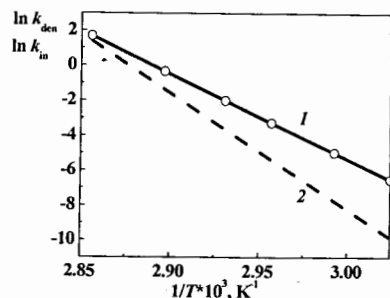


Рис. 3. Сопоставление констант скорости тепловой инактивации и денатурации МААТ. Зависимости констант скорости инактивации  $k_{in}$  (1) и денатурации  $k_{den}$  (2) от температуры в координатах Аррениуса. Точки на прямой 1 – экспериментальные значения  $k_{in}$ . Размерность  $k_{in}$  и  $k_{den}$  –  $\text{мин}^{-1}$ .

Денатурация МААТ сопровождается агрегацией белка. Долю агрегированного белка определяли следующим образом. Раствор МААТ прогревали определенное время при заданной температуре, охлаждали и подвергали центрифугированию при 20000g в течение 30 мин. Для супернатанта определяли оптическую плотность (OD) при длине волны 280 нм. Долю агрегированного белка  $\gamma_{agg}$  рассчитывали как  $(1 - OD/OD_0)$ , где  $OD_0$  – оптическая плотность исходного раствора. Зависимости  $\gamma_{agg}$  от времени инкубации при температурах 60 и 70 °С показаны на рис. 4, а и б соответственно. На этих же рисунках представлены зависимости доли денатурированного белка и доли инактивированного белка от времени, рассчитанные с использованием следующих значений констант  $k_{in}$  и  $k_{den}$ :  $k_{in} = 0,0044$  и  $0,313 \text{ мин}^{-1}$  при 60 и 70 °С соответственно и  $k_{den} = 0,0002$  и  $0,082 \text{ мин}^{-1}$  при 60 и 70 °С соответственно. Как видно из рис. 4, накопление агрегированного белка пол-

ностью совпадает с ходом денатурации МААТ. Этот факт исключает возможность объяснения более быстрой инактивации МААТ по сравнению с денатурацией захватом нативного белка образующимися агрегатами.

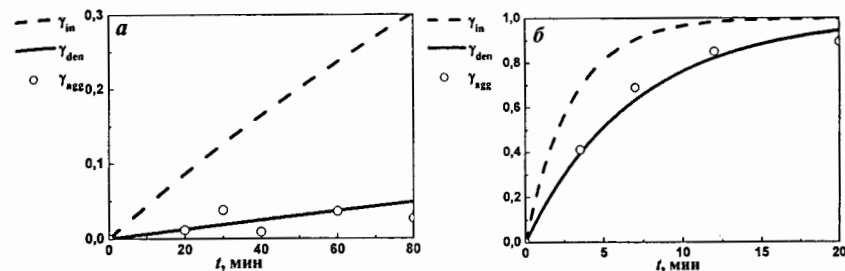


Рис. 4. Изменение доли инактивированного белка ( $\gamma_{in}$ ), доли денатурированного белка ( $\gamma_{den}$ ) и доли агрегированного белка ( $\gamma_{agg}$ ) в ходе инкубации МААТ (0,2 мг/мл) при 60 (а) и 70 °С (б).

Таким образом, инактивация МААТ происходит быстрее, чем полное разворачивание белковой молекулы, что согласуется с гипотезой С.Л. Tsou [7, 8] о более высокой чувствительности активного центра к воздействию денатурирующих факторов по сравнению с белковой глобулой в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 05-04-48691-а и 06-04-39008-ГФЕН а), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы INTAS (грант 03-51-4813).

#### Литература

1. Ford G.C., Eichele G., Jansonius J.N. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2559-2563.
2. Lawton J.M., Doonan S. (1998) *Biochem. J.*, 334, 219-224.
3. Barra D., Bossa F., Doonan S. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 64, 519-526.
4. Karmen A. (1955) *J. Clin. Invest.*, 34, 131.
5. Kurganov B.I., Lyubarev A.E., Sanchez-Ruiz J.M., Shnyrov V.L. (1997) *Biophys Chem.*, 69, 125-135.
6. Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Orlov V.N., Zhou H.M. (1999) *Biophys Chem.*, 28, 199-204.
7. Цю Ч.-Л. (1998) *Биохимия*, 63, 300-307.
8. Tsou C.L. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 864, 1-8.

## СИНТЕЗ БЕЛКА В ПОКОЯЩИХСЯ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЕНАХ КОНСКОГО КАШТАНА

Гумилевская Н.А.<sup>\*</sup>, Азаркович М.И.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва

<sup>\*\*</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Семена конского каштана обладают глубоким покоем и неустойчивы к высушиванию, т.е., относятся к рекальцитрантному типу. После опадения зрелые семена сохраняют высокую влажность и требуют длительного периода холодной (от +2 до +11°C) влажной стратификации для успешного прорастания. Способность семян конского каштана прорасти достигается путем постепенного освобождения от состояния покоя. В настоящее время биохимические процессы, лежащие в основе глубокого покоя и препятствующие прорастанию как ортодоксальных, так и рекальцитрантных семян, не известны, а молекулярные механизмы действия холодовой стратификации, разрешающей прорастание, остаются непонятными.

В то же время хорошо известно, что синтез белка является обязательным атрибутом прорастания и регистрируется у ортодоксальных семян сразу при набухании, т.е. задолго до видимого прорастания или проклевывания. Вопрос о том, обладает ли зародыш рекальцитрантных семян в период глубокого покоя и выхода из него в ходе стратификации способностью синтезировать белки и как это может быть связано с неспособностью покоящихся семян прорасти, долгое время оставался открытым.

В связи с этим нами была оценена *in vivo* белоксинтезирующая способность зародышевых осей и семядолей, изолированных из свежеепавших, стратифицируемых и проросших семян конского каштана. Полученные результаты показали, что изолированные оси способны поглощать меченые аминокислоты и включать их в белки с первых часов инкубации при 28°C. Белоксинтезирующая активность легко регистрируется в осях свежеепавших покоящихся семян, ее уровень не меняется в ходе стратификации и возрастает после проклевывания. Это означает, что длительная холодовая обработка влажных рекальцитрантных семян не влечет за собой усиления белоксинтезирующей активности до тех пор, пока не включится программа видимого прорастания. Иная картина характерна для покоящихся ортодоксальных семян кленов *Acer saccharum* и *A. tataricum*. В обоих случаях начальный синтез белка в изолированных осях при стратификации очень слаб, но затем его скорость линейно возрастает в ходе стратификации семян. Такой же ход развития трансляционной активности описан для осей и семядолей ортодоксальных семян с вынужденным покоем (горох посевной *Pisum sativum*) на ранних этапах прорастания, т.е. в период от начала набухания зародыша до проклевывания [1]. Таким образом, по всей видимости, стратификация каким-то образом способствует усилению белоксинтезирующей активности в клетках набухающих осей ортодоксальных семян с глубоким покоем, но не влияет на трансляцию в осях рекальцитрантных семян, обладающих таким же типом покоя. Различия в динамике белкового синтеза во время стратификации между ортодоксальными и рекальцитрантными семенами можно объяснить тем, что ортодоксальным

семенам необходимо достижение высокого уровня оводненности для усиления синтеза белка, тогда как рекальцитрантные семена имеют высокую влажность и поддерживают ее в течение всей стратификации. Открытым остается вопрос о причинах увеличения скорости белкового синтеза в осях семян каштана при прорастании. Оно может происходить как за счет увеличения объема аппарата трансляции, т.е. числа рибосом в клетках осевых органов, так и за счет увеличения числа доступных для трансляции мРНК.

Синтез белка в изолированных осях подавляется циклогексимидом и нечувствителен к  $\alpha$ -аманитину в ходе стратификации, но подавляется им на 40% при прорастании. Это указывает на присутствие преформированных мРНК, способных участвовать в трансляции, в осях покоящихся рекальцитрантных семян, тогда как в осях, изолированных из проросших семян, синтез белка в значительной степени зависит от транскрипции. Результаты анализа *in vivo* белоксинтезирующей активности находятся в хорошем соответствии с данными по ультраструктуре клеток осей в зрелых покоящихся семенах конского каштана. Так, в клетках зародышевой оси зрелого семени конского каштана (влажность 62-64%) сохраняется хорошо развитая система эндоплазматического ретикулума, много свободных и связанных рибосом [2]. В отличие от рекальцитрантных семян, совершенно иная картина наблюдается в ортодоксальных семенах с вынужденным покоем. При постепенном высушивании созревающих семян в них замедляется синтез белка и РНК, фрагментируются мембраны эндоплазматического ретикулума, прорабатывают имеющиеся полисомы, и в клетке накапливаются свободные рибосомы и не связанные с ними молекулы мРНК. Синтез белка, мРНК и формирование полисом возобновляются одновременно, вскоре после начала гидратации семени. Таким образом, рекальцитрантный характер семян, проявляющийся в необходимости поддержания высокой влажности для последующего перехода к прорастанию, обеспечивает активное состояние аппарата трансляции в клетках осевых органов и семядолей покоящихся семян.

Основная масса белков, синтезируемых изолированными осями, сосредоточена в цитозоле и относится к фракции термолабильных белков. Число и тип синтезируемых изолированными осями полипептидов очень мало изменяются на протяжении всей стратификации, до начала видимого прорастания. Это может означать, что во время стратификации в изолированных осях семян конского каштана экспрессируется постоянный набор генов, мРНК которых были синтезированы в период развития семян и сохраняются в период покоя. Изменения в экспрессии генов на уровне синтеза белка мы наблюдали только при проклевывании и прорастании семян. Наибольшие изменения касались новосинтезированных минорных компонентов фракции термостабильных белков цитозоля. Однако не исключено, что изменения в экспрессии генов во время стратификации все-таки имеют место, но касаются минорных белковых компонентов, для выявления которых требуются иные методы анализа. В отличие от рекальцитрантных семян конского каштана в осях набухающих ортодоксальных семян яблони, груши и двух видов клена в ходе стратификации зарегистрирован ряд специфических изменений в экспрессии генов. По-видимому, у ортодоксальных семян с глубоким покоем продолжительная холодовая обработка при стратификации инициирует более



заметные изменения в экспрессии генов в клетках зародышевой оси, чем у рекальцитрантных семян с таким же типом покоя. Остается неясным, в какой мере эти изменения связаны с преодолением покоя и инициацией прорастания.

Как и в ортодоксальных семенах с вынужденным покоем [3], в семенах каштана белоксинтезирующая способность обнаружена нами не только в зародышевых осях, но и в клетках запасающей паренхимы семядолей. При этом интенсивность белкового синтеза, измеряемая по уровню удельной радиоактивности белка, в семядолях была значительно выше, чем в осях. Фрагменты семядолей, инкубированные в присутствии меченой аминокислоты при 28°C, синтезируют сходный с осями набор полипептидов.

Чтобы оценить, реализуется ли при стратификации потенциальная белоксинтезирующая способность, обнаруживаемая в осях и семядолях, инкубируемых при 28°C, время экспозиции с меткой было увеличено с 4 ч. до 24, 48 и 64 ч. Полученные нами предварительные результаты показали, что оси и семядоли, изолированные из свежесобранных и стратифицируемых семян, способны поглощать меченую аминокислоту и включать ее в белки не только при 28°C, но и при 5°C, т.е., при температуре стратификации. Спектр синтезируемых при этом полипептидов оказался очень сходным. Из этого следует, что во время длительной стратификации в клетках семян может происходить новообразование белков.

Таким образом, впервые охарактеризована *in vivo* белоксинтезирующая способность осевых органов и семядолей зародыша рекальцитрантных семян в период глубокого покоя и при раннем прорастании в условиях стратификации. Полученные результаты говорят о том, что клетки осей и семядолей в зрелых покоящихся семенах конского каштана обладают компетентным аппаратом трансляции, способным обеспечить синтез белка на протяжении всего периода холодной стратификации. Синтез белка, который способны осуществить изолированные оси, не зависит от транскрипции и мало изменяется количественно и качественно в ходе стратификации до начала прорастания. Очевидно, неспособность покоящихся семян прорасти не вызвана дефектом в трансляционной системе, но может быть связана с отсутствием экспрессии определенных генов, кодирующих белки, необходимые для прорастания, или же с экспрессированием генов, ингибирующих прорастание. Для решения этой проблемы требуются дальнейшие исследования.

#### Литература:

1. Гумилевская Н.А., Чумикина Л.В., Арапова Л.И., Зимин М.В., Шатилов В.Р. Физиология растений. 1996. Т. 43. № 2. С. 247 – 255.
2. Мусатенко Л.И., Генералова В.М., Мартин Г.Г. // Укр. бот. ж. 1997. Т. 54. № 1. С. 86 - 91.
3. Гумилевская Н.А., Скаженник М.А., Чумикина Л.В., Ахматова А.Т., Кретович В.Л. // Прикладная биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. № 1. С. 9 – 23.

Работа поддержана РФФИ (грант № 03-04-48156)

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ ДИКОГО И МУТАНТНЫХ ШТАММОВ ЗЕЛеноЙ ВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ПУТЕМ ИХ БИОХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ермохина О.В., Юрина Н.П.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, O\_ermohina83@mail.ru

Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды связана с эффективностью систем репарации и антиоксидантной защитой клеток. У многих видов организмов были обнаружены соответствующие гены, изучается экспрессия генов, ответственных за повышенную репарацию двойных разрывов ДНК в условиях окислительного стресса, и генов, отвечающих за антиоксидантную защиту клеток. Интерес к этим исследованиям возрастает в связи с тем, что человек, животные и растения живут в условиях антропогенного груза, в результате чего накапливаются изменения в геноме, которые необходимо прогнозировать. В этой связи большое значение приобретает вопрос о выяснении механизмов, участвующих в формировании устойчивости с/х растений и водорослей (как модельных объектов) к антропогенному окислительному стрессу.

Окислительный стресс в растениях возникает в результате действия практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, загрязнение воздуха токсическими соединениями. В конечном счете, все виды стрессов сводятся к окислительному стрессу, поэтому роль антиоксидантных систем, снижающих внутриклеточные концентрации активных форм кислорода (АФК), а также систем, ликвидирующих токсические продукты взаимодействия АФК с биополимерами и повышающих устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды, принципиально важна. Общей особенностью различных форм активного кислорода является их способность вызывать окислительные повреждения путем инактивации белков, нуклеиновых кислот и липидов. Кроме того, абнотические стрессы, в частности окислительный стресс, ограничивают способность растений использовать световую энергию при фотосинтезе. У растений основными центрами образования АФК являются хлоропласты и пероксисомы.

Задачей наших исследований явилось обнаружение и изучение биохимических маркеров устойчивости к окислительному стрессу. Была проведена биохимическая характеристика восьми мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, имеющих повышенную устойчивость к окислительному стрессу. Определены пигментный состав (хлорофилл и каротиноиды) и изучен полипептидный состав тилакоидных мембран мутантов и клеток дикого типа.

#### Материалы и методы

Работа проводилась на мутантных штаммах *Chlamydomonas reinhardtii*, обладающих повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному радиацией и ультрафиолетом, полученных в Центральной лаборатории общей экологии Болгарской Академии наук (БАН) [1]. Эти мутанты являются хорошей моделью для изучения механизмов, обеспечивающих адаптацию высших растений к экстремальным факторам окружающей среды.

Экстракцию пигментов и измерения проводили по методу, описанному

Лихтенгаллером [2]. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин, ресуспендировали в 80 %-ном ацетоне, после чего клеточные обломки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. Спектрофотометрию надосадочной жидкости проводили в видимом свете в диапазоне длин волн от 350 до 750 нм.

Тилакоидные мембраны выделяли по ранее описанному методу [3]. Белки тилакоидов фракционировали с помощью электрофореза в 12,5 % ПААГ в присутствии ДДС-Na.

Суммарные белки клеток выделяли, как описано [3], фракционировали в ПААГ в присутствии ДДС-Na, и полученные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, а затем иммунодетектировали с помощью антител к HSP70B и HSP90C.

### Результаты и их обсуждение

При исследовании пигментного состава было показано, что у мутантных штаммов АК9-9 и НЗ содержание хлорофиллов ( $a+b$ ) и каротиноидов в ~ два раза выше, чем у клеток дикого типа. Отношение хлорофиллов  $a/b$  было выше на 15 % у мутантов АК9-9 и НЗ, чем у клеток дикого типа, в то время как по отношению хлорофилл / каротиноиды отличий между мутантами и клетками дикого типа не обнаружено. Таким образом, среди устойчивых к окислительному стрессу мутантов были выявлены мутанты с повышенным содержанием хлорофилла.

При сравнении полипептидного состава тилакоидных мембран мутантов и клеток дикого типа у штамма НЗ были обнаружены отличия в содержании белков светособирающего комплекса фотосистемы II (молекулярная масса 24-27кДа), что возможно связано с повышенной устойчивостью НЗ мутанта к окислительному стрессу по сравнению с контролем. Эти результаты представляют большой интерес, так как штамм НЗ обладает наиболее высокой устойчивостью к радиации среди изученных нами мутантов. Он был получен путем скрещивания радиоустойчивого штамма АК9-9 с мутантным штаммом CW15 без клеточной стенки. Его радиоустойчивость значительно выше, чем у родительского АК9-9.

Тепловой или другие виды стрессов приводят к повышенной экспрессии генов белков теплового стресса (HSP). Это характерно для всех видов организмов. Одним из важных членов семейства белков теплового стресса являются белки HSP70. У эукариот HSP70 обнаруживаются не только в цитоплазме, но и в хлоропластах и митохондриях. Показано, что хлоропластный белок HSP70B имеет прокариотическое происхождение (85% гомологии с соответствующим геном цианобактерий). HSP70B обнаруживается в оболочке хлоропластов и входит в состав аппарата импорта белков в органеллы. Установлено, что экспрессия HSP70B индуцируется не только тепловым стрессом, но и светом, и для его индукции светом используется другой путь передачи сигнала, чем при тепловом стрессе. Мы предположили, что мутанты, отличающиеся повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, могут отличаться и по уровню хлоропластных HSP70B. Для анализа был взят также белок HSP90C, функционирующий вместе с белками HSP70B. Уровень белков теплового шока в клетке может служить биохимическим маркером устойчивости к окислительному стрессу. Для того чтобы выяснить насколько изменение содержания HSP70 чувствительно к различным вариантам теплового стресса и выбрать условия теплового стресса для тести-

рования мутантов был использован штамм CW15. Было проведено сравнение содержания белков теплового шока HSP70B и HSP90C, индуцированных под действием двух различных условий теплового стресса: HS1 (37 °C 30 мин → 4 ч инкубация при комнатной температуре → 37 °C 30 мин → 4 ч инкубация при комнатной температуре) и HS2 (42 °C 5 мин → 4 ч инкубация при комнатной температуре → 37 °C 30 мин → 4 ч инкубация при комнатной температуре). Эти условия теплового шока обычно используются при индукции HSP *Chlamydomonas*. На рис. представлены данные о содержании HSP70B в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* без теплового шока (1-я колонка) и после 1-го и 2-го воздействий. Данные статистически обрабатывали на основе четырех проведенных независимых экспериментов.

Было показано, что в случае HS1 уровень белков теплового шока HSP70B был выше, чем при HS2. Это означает, что на синтез белков теплового шока большее влияние оказывает длительность теплового шока, чем температура воздействия. Эта закономерность была подтверждена и в опытах с другим белком теплового стресса хлоропластов - HSP90C.

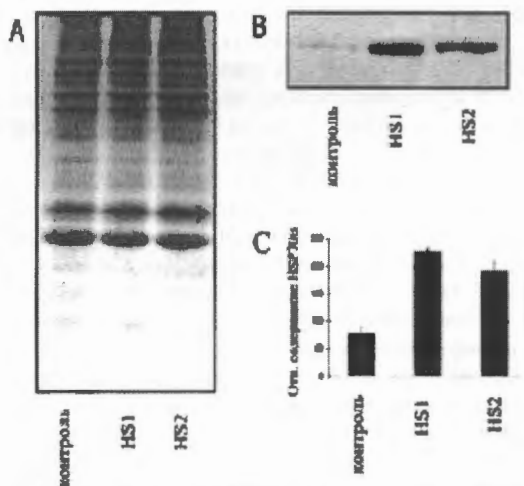


Рис. 1. Содержание белков HSP70B в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* CW15 при тепловом шоке. А – электрофореграмма суммарных белков. В – Вестерн-блоттинг. С – относительное содержание белка теплового шока.

Таким образом, белки теплового шока могут служить одним из биохимических маркеров устойчивости растений к окислительному стрессу.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№06-04-48-923а).

#### Литература

1. Chankova S., Stoyanova-Koleva D., Kapchina-Toteva V., P. Bryant P. Characterisation of new radio resistant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Environmental Protection and Ecology 6. 660-668 (2005).

2. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148. 350-382 (1987).
3. Yurina N.P., Karakashev G.V., Karapetyan N.V., Odintsova M.S. Composition and biosynthesis of thylakoid membrane polypeptides in the red alga *Cyanidium caldarium*: comparison with the thylakoid polypeptide composition of higher plants and cyanobacteria. *Photosynth Res* 30. 15-23 (1991).
4. Willmund F., Schroda M. Heat shock protein 90C is a *bona fide* Hsp90 that interacts with plastidic HSP70B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 138. 2310-2322 (2005).

## ЯВЛЯЮТСЯ ЛИ ФРАГМЕНТЫ БЕЛКОВ ПРИРОДНЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ОЛИГОПЕПТИДАМИ?

<sup>1,2</sup>Замятнин А.А., <sup>1</sup>Борчиков А.С.

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия, aaz@inbi.ras.ru;

<sup>2</sup>Universidad Tecnica Federico Santa Maria, Centro de Biotecnologia, Valparaiso, Chile, alexander.zamyatnin@usm.cl

Природные (эндогенные) регуляторные олигопептиды образуются в результате выщепления из специализированных предшественников и содержат от 2 до 50 аминокислотных остатков [1]. Спектр их функциональной активности многообразен, однако больше всего выявлено олигопептидных регуляторов нервной (нейропептиды) и эндокринной (гормоны) систем, а также антимикробных олигопептидов.

В то же время появляется все больше и больше свидетельств тому, что в живых организмах присутствуют олигопептиды, которые образуются не из специализированных предшественников, а являются фрагментами хорошо известных белков. Среди них – фрагменты гемоглобина [2], казеина [3], лактоферрина [3, 4] и других, в основном пищевых белков. Многие из них, также как и эндогенные олигопептиды, обладают способностью участвовать в регуляции нервной и эндокринной систем, а также проявлять антимикробную и другие типы активности. Однако данные исследования, как правило, проводятся *in vitro* и до настоящего времени нет полной уверенности в том, что эти фрагменты реально участвуют в регуляторных процессах живых организмов.

В связи с этим нами был осуществлен компьютерный структурно-функциональный анализ возможных фрагментов одного из самых изученных белков путем сравнения первичных структур этих фрагментов с аминокислотными последовательностями всех известных к настоящему времени природных олигопептидов.

В качестве объекта исследования нами был взят гемоглобин быка, состоящий из двух типов цепей [5, 6]. На рис. 1 аминокислотные последовательности  $\alpha$ - (141 остаток) и  $\beta$ - (145 остатков) цепей молекулы гемоглобина представлены параллельно, чтобы продемонстрировать их гомологию. Для этого в ряде мест оставлены пробелы, в результате чего одинаковые аминокислотные остатки (выделены жирным шрифтом) расположены друг под другом. Демонстрируемая таким образом гомология составляет всего 37 % (53 совпадающих остатка) и свидетельствует о возможности существования фрагментов с разным функциональным спектром у разных цепей.

В общем случае число возможных белковых фрагментов от 2 (дипептиды) до  $n-1$  рассчитывается по формуле

$$N = \sum_2^{n-1} = \frac{(n-1)n}{2} - 1,$$

где  $N$  – число фрагментов, а  $n$  – число аминокислотных остатков в одном фрагменте. В соответствии с этой формулой полное число возможных фрагментов для  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина составляет соответственно 9869 и 10439.

Предварительные оценки показали, что для решения поставленной задачи целесообразно использовать разбиение аминокислотных последовательностей молекулы гемоглобина на фрагменты, содержащие не менее 4 аминокислотных остатков (тетрапептиды). В случае дипептидов и трипептидов совпадение с участ-

	10	20	30	40	50	
$\alpha$	VLSAADKGNVKA	AWGKVG	HAAEYGAEA	LERMFLS	FPTTKTYFPHF	
$\beta$	MLTAEKAAVTA	FWGKVKV	DEVGGEALGR	LLVVYPWTQR	FESFGDLSTA	
	60	70	80	90	100	
$\alpha$	DLSHGSAQVKG	HGAKVA	AAALTKAVEH	LDLPGALSE	LDLHANKLRVDPV	
$\beta$	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	
	110	120	130	140		
$\alpha$	NFKLLSHSL	LVTLASHL	PSDFTPAV	HASLDKFLAN	VSTVLTSKYR	141
$\beta$	NFKLLGNV	LVVVLARN	FGKEFTPV	LQADFQKVV	AGVANALAHRYH	145

Рис. 1. Гомология аминокислотных последовательностей  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина быка. Цифрами обозначены номера и общее число аминокислотных остатков.

ками природных олигопептидов оказывается настолько частым, что получаемые таким образом результаты представляют собой информационный шум, не поддающийся строгому анализу.

Анализ проводился с помощью специально созданной компьютерной программы, которая для обеих аминокислотных последовательностей проводила выборку тетрапептидных фрагментов, с 1-го аминокислотного остатка до 4-го остатка от конца первичной структуры. В результате этой процедуры, например, в случае тетрапептидных фрагментов, для  $\alpha$ -цепи гемоглобина образовывалось 138 фрагментов, а для  $\beta$ -цепи – 142.

Далее та же компьютерная программа осуществляла сравнение аминокислотных последовательностей каждого из полученных фрагментов со всеми первичными структурами природных олигопептидов, имеющихся в базе данных EROP-Moscow (Endogenous Regulatory OligoPeptides) [7], содержавшей на момент исследования структурно-функциональные данные о 7145 природных олигопептидах. В процессе сравнения ищались участки олигопептидных последовательностей, полностью совпадающие со структурой тестируемого фрагмента молекулы гемоглобина.

Анализ выявил около 100 природных олигопептидов, содержащих тетрапептидные и более длинные фрагменты молекулы гемоглобина. Как и ожидалось, их набор оказался разным при изучении разных цепей. На рис. 2 и 3 жирным шрифтом отмечены функционально значимые участки этой молекулы, относящиеся к проявлению свойств антимикробных олигопептидов (а), нейропептидов (б) и гормонов (с). Во всех случаях во первой строке выделены участки, найденные в природных регуляторных олигопептидах с помощью компьютерного анализа, а во второй – фрагменты, выявленные экспериментально. Их сравнение подтверждает антимикробные, нейропептидные, гормональные и другие (данные не приводятся) свойства целого ряда экспериментально изученных фрагментов и выявляет новые потенциально активные, но еще не исследованные, участки аминокислотных последовательностей.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	
<b>a</b>	VLSAADKGNVKA	AWGKVG	HAAEYGAEA	LERMFLS	FPTTKTYFPHF	DLSHGSAQVKG	HGAKVA	AAALTKAVEH	LDLPGALSE	LDLHANKLRVDPV	PNFKLLSH	LVTLASHL	PSDFTPAV	HASLDKFLAN	VSTVLTSKYR
<b>b</b>	VLSAADKGNVKA	AWGKVG	HAAEYGAEA	LERMFLS	FPTTKTYFPHF	DLSHGSAQVKG	HGAKVA	AAALTKAVEH	LDLPGALSE	LDLHANKLRVDPV	PNFKLLSH	LVTLASHL	PSDFTPAV	HASLDKFLAN	VSTVLTSKYR
<b>c</b>	VLSAADKGNVKA	AWGKVG	HAAEYGAEA	LERMFLS	FPTTKTYFPHF	DLSHGSAQVKG	HGAKVA	AAALTKAVEH	LDLPGALSE	LDLHANKLRVDPV	PNFKLLSH	LVTLASHL	PSDFTPAV	HASLDKFLAN	VSTVLTSKYR

Рис. 2. Сравнение функционально значимых участков  $\alpha$ -цепи гемоглобина, полученных теоретически и экспериментально (подробные объяснения см. в тексте)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	
<b>a</b>	MLTAEKAAVTA	FWGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE
<b>b</b>	MLTAEKAAVTA	FWGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE
<b>c</b>	MLTAEKAAVTA	FWGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE	DAVMNPNKVK	AHGKVKV	DSFNGMKHL	DDLKGTFAAL	SELHCDKLVHDPE

Рис. 3. То же для  $\beta$ -цепи гемоглобина

Для того, чтобы белковые фрагменты могли осуществлять регуляторные функции, они должны образовываться естественным путем, иметь доступ к объектам своего действия (мишеням, например, рецепторам) и обладать способностью взаимодействовать с ними. Обнаружение белковых фрагментов в разных органах и тканях живых организмов подтверждает их эндогенность. Кроме того, многие белки, попадая в организм вместе с пищей (в том числе и гемоглобин), сразу же оказываются в окружении многих протеолитических ферментов, которые их расщепляют, в результате чего образуются экзогенные олигопептиды. Эти структуры в желудочно-кишечном тракте находятся в контакте, в частности, с микрофлорой и, обладая способностью с нею связываться, могут проявлять антимикробную активность. Таким образом, рассмотрение пула олигопептидных регуляторов не должно ограничиваться только эндогенными структурами, а существование как эндогенных, так и экзогенных регуляторов в одном организме служит серьезным подтверждением гипотезы о функционально-непрерывной совокупности (континууме) этих веществ [8].

Представленные данные, а также полученные нами ранее аналогичные результаты исследования фрагментов фермента бромелазина [9], свидетельствуют о том, что фрагменты белков могут осуществлять регуляторные функции наряду с известными регуляторными олигопептидами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” 10П.

### Литература

1. Zamyatnin A.A. Prot. Seq. Data Analysis. v. 4, 1991. v. 4, № 1, 1991, pp. 49-52.
2. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васильковский Б.В., Свиричев В.И., Назимов И.В. Биоорг. Химия, т. 18, № 10-11, 1992, с. 1271-1310.
3. Meisel H. Biopolymers. Peptide Science, v. 43, № 2, 1997, pp. 119-128.
4. Ueta E., Tanida T., Osaki T. J. Pept. Sci. v. 57, № 3, 2001, pp. 240-249.
5. Schroeder W.A., Shelton J.R., Shelton J.B., Robberson B., Babin D.R. Arch. Biochem. Biophys. v. 120, № 1, 1967, pp. 1-14.
6. Schroeder W.A., Shelton J.R., Shelton J.B., Robberson B., Babin D.R. Arch. Biochem. Biophys. v. 120, № 1, 1967, pp. 124-35.

7. Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G., Voronina O.L. Nucl. Acids Res. v. 34, Database issue, 2006, pp. D261-D266.
8. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Биохимия, т. 51, № 4, 1986, с. 531-544.
9. Замятнин А.А., Борчиков А.С. Нейрохимия, т. 24, № 1, 2007, с. 21-29.

## ЯДЕРНАЯ ХИМИЯ В ЭНЗИМОЛОГИИ: НОВОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО ГАММА-РЕЗОНАНСА ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕРМЕНТОВ

Камнев А.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия  
aakamnev@ibppm.sgu.ru

Для изучения особенностей структурной организации активных центров ферментов и других металлопротеинов, помимо традиционных методов молекулярной биологии, все более широкое применение находят спектроскопические методы. Спектроскопия ядерного гамма-резонанса (ЯГР) в традиционном абсорбционном варианте (на ядрах  $^{57}\text{Fe}$ ) имеет достаточно богатую историю применения в биохимии (в основном для изучения Fe-содержащих белков; см., например, недавний обзор [1]). Несмотря на это, эмиссионный вариант спектроскопии ЯГР (ЭС ЯГР; в частности, на ядрах радиоактивного кобальта  $^{57}\text{Co}$ ) до недавнего времени практически не использовался для изучения биологических объектов [2]. В первую очередь это, очевидно, связано с необходимостью введения радионуклида ( $^{57}\text{Co}$ ) непосредственно в исследуемые образцы, что представляет определенные технические трудности. Однако ввиду намного большей чувствительности ЭС ЯГР (на 4 порядка) по сравнению с абсорбционным вариантом, а также учитывая значительную роль катиона кобальта в работе разнообразных ферментов, использование высокоинформативного метода ЭС ЯГР для изучения катионсодержащих активных центров биомакромолекул представляется очень перспективным. Тем не менее, для его применения к исследованию ферментов следовало решить ряд экспериментальных задач, связанных с введением катиона  $^{57}\text{Co}$  в исследуемый образец, а также выбрать надлежащий объект исследования для надежной апробации метода.

В настоящей работе в качестве объекта был выбран ключевой фермент азотного метаболизма – глутаминсинтетаза (ГС; КФ 6.3.1.2), выделенный из азотфиксирующей почвенной бактерии *Azospirillum brasilense* [3]. Помимо наличия двух различных сайтов связывания катиона в каждом из 12 активных центров в молекуле ГС, было показано, что одним из основных активирующих данный фермент катионов является кобальт(II), наряду с традиционными для ГС катионами магния и марганца(II) [3].

С целью замены нативных катионов в ГС на  $^{57}\text{Co}^{2+}$  были проведены исследования, подтвердившие, что обработка фермента раствором ЭДТА (0.005 М) с последующим диализом приводила к потере его активности (т.е. к удалению нативных катионов, без которых фермент активностью не обладает), причем активность восстанавливалась при добавлении к полученной ГС рассчитанного количества  $\text{Co}^{2+}$ . Последнее свидетельствует о связывании добавленного катиона именно в активных центрах ГС, что необходимо для подготовки фермента к изучению методом ЭС ЯГР с применением  $^{57}\text{Co}^{2+}$  в аналогичных условиях [4], поскольку связывание  $^{57}\text{Co}^{2+}$  в иных местах белковой глобулы приводило бы к непредсказуемому усложнению спектра. (Отметим, что преимущественное связывание катиона именно в сайтах активных центров соответствует их намного боль-

ему сродству к катионам по сравнению с другими сайтами связывания в молекуле фермента [3, 5].)

С этой же целью необходимо было, чтобы мольное соотношение  $[^{57}\text{Co}]:[\text{ГС}]$  не превышало 24 (по общему числу катионсвязывающих сайтов в 12 активных центрах на молекулу ГС). Кроме того, учитывая 50-кратное различие в константах связывания катионов для двух типов сайтов в активных центрах ГС, обусловленное различной координацией катиона в каждом из них [6], можно было ожидать, что при мольном соотношении добавляемого  $^{57}\text{Co}^{2+}$  к ГС, обработанной ЭДТА и очищенной диализом (т.е. свободной от нативных катионов), в пределах  $12 < [^{57}\text{Co}]:[\text{ГС}] < 24$  распределение  $^{57}\text{Co}^{2+}$  между данными двумя типами сайтов будет различным. В первую очередь  $^{57}\text{Co}^{2+}$  должен связываться в сайтах с максимальным сродством, составляющих половину всех сайтов активных центров (вплоть до их насыщения при достижении мольного соотношения  $[^{57}\text{Co}]:[\text{ГС}] = 12$ ), тогда как в сайтах с меньшим сродством должны связаться остальные катионы  $^{57}\text{Co}^{2+}$ . При этом количество последних (при условии  $12 < [^{57}\text{Co}]:[\text{ГС}] < 24$ ) будет ниже, чем количество  $^{57}\text{Co}^{2+}$  в сайтах с максимальным сродством. Поскольку метод ЭС ЯГР в принципе позволяет оценить количественный вклад каждой из химических форм кобальта по вкладу соответствующих спектральных компонент, ожидалось, что таким образом можно различить и идентифицировать различные типы сайтов связывания [7].

Результаты экспериментальных исследований образцов ГС, допированных катионами  $^{57}\text{Co}^{2+}$ , методом ЭС ЯГР при тщательном соблюдении вышеописанных условий показали, что в спектрах присутствовали две компоненты, соответствовавшие двум различным исходным координационным формам кобальта(II) [5, 6]. При этом параметры каждой из спектральных компонент и их неравномерное распределение позволили соотнести их с двумя различными типами сайтов. Интересно, что в спектрах как замороженного водного раствора ГС, так и аналогичного высушенного образца параметры соответствующих форм (при  $T = 80$  К) практически совпадали, что указывает на сохранение координации катионов кобальта(II) в активных центрах фермента как в растворе, так и в сухом состоянии [6, 7]. Таким образом, на примере бактериальной ГС было показано, что метод ЭС ЯГР может быть использован для изучения свойств металлосодержащих сайтов сложных биомакромолекул и, в частности, металлоферментов. Важно отметить, что эмиссионный спектр ЯГР дают лишь катионы  $^{57}\text{Co}$ , введенные в образец, тогда как вся органическая часть биомакромолекулы полностью "прозрачна" для гамма-излучения.

Выбранная в качестве объекта бактериальная ГС – сложный по совокупности свойств и механизмам регуляции и в целом недостаточно изученный фермент [3]. Так, до сих пор не доказана возможность присутствия разных катионов в двух сайтах активного центра (известно, что в различных условиях ГС проявляет различную активность в зависимости от природы активизирующего катиона [3]). Применение метода ЭС ЯГР позволило выявить конкурентное связывание катиона  $\text{Mn}^{2+}$  (не дающего вклада в спектр) при его добавлении (вместе с  $^{57}\text{Co}^{2+}$ ) к свободной от катионов ГС. В этом случае в эмиссионном спектре ЯГР образца фермента при введении  $\text{Mn}^{2+}$  наблюдалось перераспределение  $^{57}\text{Co}^{2+}$  между двумя сайтами связывания (по сравнению с аналогичным образцом ГС в присутствии только эквивалентного количества  $^{57}\text{Co}^{2+}$ ) [8]. Данный факт указывает на при-

нципиальную возможность *гетеробиядерного* катализа (с участием двух различных катионов в активном центре ГС) в случае катализа с участием двух катионов ("two-metal-ion catalysis").

Сравнение эмиссионных спектров ЯГР допированных катионами  $^{57}\text{Co}^{2+}$  образцов ГС, различающихся степенью аденилирования субъединиц (как известно, данная ковалентная модификация молекулы фермента является одним из природных механизмов регуляции его активности [3]), показало различия в координационной симметрии катионов в обоих сайтах активных центров [8]. Таким образом, методом ЭС ЯГР впервые получены прямые свидетельства влияния аденилирования субъединиц молекулы ГС на координацию катионов в активном центре, что непосредственно связано с активностью фермента.

В целом полученные результаты указывают на то, что метод ЭС ЯГР может быть чувствителен к особенностям структурной организации активных центров ферментов и ее изменениям под влиянием различных факторов; например, при связывании субстратов, что является ключевым моментом в изучении механизмов действия ферментов.

Наряду с кобальтсодержащими ферментами, принципиально возможно исследование и других металлопротеинов при замещении соответствующих металлов на  $^{57}\text{Co}$ . Отметим, например, что замещение цинка кобальтом(II) в качестве "оптически активного" зонда в оптической спектроскопии применяется для получения структурной информации о Zn-содержащих металлопротеинах благодаря сходным координационным свойствам этих катионов для данного набора лигандов. Таким образом, возможность введения  $^{57}\text{Co}$  как "зонда-заместителя" при высокой чувствительности ЭС ЯГР существенно расширяет границы применения данного метода в биохимии и других областях биологии [2, 9].

Автор благодарен Л.П. Антониюк и В.Е. Смирновой (ИБФРМ РАН, Саратов), Ю.Д. Перфильеву и Л.А. Куликову (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), Э. Кузманну и А. Вертешу (Университет им. Л. Этвеша, Будапешт, Венгрия) за помощь в работе и ценные обсуждения. Различные этапы данных исследований были поддержаны грантами INTAS (проекты 96-1015, YSF 00-160), NATO (LST.CLG.977664, LST.NR.CLG.981092), а также в рамках Соглашений о научном сотрудничестве между РАН и Венгерской академией наук.

#### Литература

1. Krebs C., Price J.C., Baldwin J., Saleh L., Green M.T., Bollinger J.M., Jr. // *Inorg. Chem.* 2005. V. 44, No. 4. P. 742-757.
2. Kamnev A.A. // *J. Mol. Struct.* 2005. V. 744-747. P. 161-167.
3. Antonyuk L.P., Smirnova V.E., Kamnev A.A., Serebrennikova O.B., Vanoni M.A., Zanetti G., Kudelina I.A., Sokolov O.I., Ignatov V.V. // *BioMetals*. 2001. V. 14, No. 1. P. 13-22.
4. Kamnev A.A., Antonyuk L.P., Smirnova V.E., Serebrennikova O.B., Kulikov L.A., Perfiliev Yu.D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372, No. 3. P. 431-435.
5. Камнев А.А., Антониюк Л.П., Смирнова В.Е., Куликов Л.А., Перфильев Ю.Д., Кузманин Э., Вертеш А. // *Докл. РАН*. 2003. Т. 393, № 3. С. 407-411.
6. Kamnev A.A., Antonyuk L.P., Smirnova V.E., Kulikov L.A., Perfiliev Yu.D., Kudelina I.A., Kuzmann E., Vértes A. // *Biopolymers*. 2004. V. 74, No. 1-2. P. 64-68.

7. Камнев А.А., Антонюк Л.П., Куликов Л.А., Перфильев Ю.Д., Кузманн Э., Вергеш А. // Изв. РАН. Сер. физ. 2005. Т. 69, № 9. С. 1389-1392.
8. Kamnev A.A., Antonyuk L.P., Smirnova V.E., Kulikov L.A., Perfiliev Yu.D., Kuzmann E., Vértes A. // FEBS J. 2005. V. 272 (Suppl. 1). P. 10.
9. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Kulikov L.A., Perfiliev Yu.D., Polissiou M.G., Gardiner P.H.E. // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 573-574. P. 445-452.

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ И СОСТАВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ МОРФОТИПОВ *ARTEMISIA LERCHEANA* WEB. EX *STECHEM*. ФЛОРЫ

### ЮГО – ВОСТОКА РОССИИ

<sup>1</sup>Кириченко Е.Б., <sup>2</sup>Орлова Ю.В., <sup>3</sup>Курилов Д.В.

<sup>1</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Россия, Москва, evkir@list.ru;

<sup>2</sup>Волгоградский государственный педагогический университет, Россия, Волгоград;

<sup>3</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, Москва, kur-dv@mail.ru

Польнь Лерхе (*Artemisia lerceana* Web. ex *Stechm.*) – многолетний полукустарник высотой 10-40 см. Вид широко распространен на территории Юго – Востока России и сопредельных государств (Казахстан, страны Средней Азии). В Волгоградской области (равно как и в Астраханской, Саратовской, Самарской областях) польнь Лерхе произрастает в засушливой дерновинно-злаковой, полупустынной и пустынной степях. В сообществах растений полупустынной степи является кодоминантным видом, а в фитоценозах пустынь чаще всего доминантным видом. Растения этого вида отличаются высокой устойчивостью к дефициту влаги в почве и атмосфере, высокой температуре и интенсивности света, засолению и патогенным микроорганизмам.

В надземной части полыни Лерхе содержится эфирное масло, в составе которого, как сообщалось ранее, идентифицированы камфора, борнеол, мирцен, камфен, *n*-цимол, цинеол,  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен, лимонен,  $\gamma$ -терпинен,  $\beta$ -фелландрен, туйон, 1,8-цинеол [1-3]. Однако изучение продукционного процесса у *Artemisia lerceana* и его детерминированности адаптационным потенциалом вида находится на начальном этапе.

Исследования терапевтического действия эфирного масла полыни Лерхе показали, что оно обладает выраженной антибактериальной [4] и противоаллергической [5] активностями. Кроме того, этот вид полыни представляет собой ценную кормовую культуру в природных пастбищных экосистемах Юго-Востока России [6].

Вид *Artemisia lerceana* Web. ex *Stechm.* включает два морфотипа – *f. nutans* и *f. erecta* [7, 8], которые в пределах территории Волгоградской области, совместно произрастают как на светло-каштановой, так и на мало плодородной полупустынной с высоким содержанием мела почвах.

Задачей нашей работы является анализ ресурсного потенциала полыни Лерхе как продуцента физиологически активных соединений, в том числе эфирных масел. В данном исследовании рассмотрены результаты первичной оценки комплекса эфирных масел этого растения.

#### Материал и методы

Исходный опытный материал т.е. надземную часть полыни Лерхе собрали в 2004 г. и 2005 г. на четырех трансектах, расположенных от севера (№1) до юга (№4) Волгоградской области (рис.1 и 2). При этом растения находились на следующих стадиях развития: а) формирование вегетативных органов; б) бутонизация; в) цветение и г) формирование плода (семена). Этот опытный материал был использован для определения содержания суммы эфирных масел. Анализ компонентного состава эфирных масел проводили на материале в стадии бутонизации, собранном в августе-сентябре 2005 г. на трансекте №3 в окрестностях г.



Волгограда на участках со светло-каштановой почвой и на мелах.

Материал высушили на воздухе без доступа прямых солнечных лучей. Все образцы эфирных масел получали из воздушно-сухого сырья посредством перегонки с водяным паром. Компонентный состав образцов эфирных масел анализировали методом хроматомасс-спектрометрии на приборе ThermoFinnigan Polaris. Пробу, растворённую в дихлорметане, вводили в инжектор в режиме деления потока 1:10. Использовали кварцевую капиллярную колонку (0.22 мм x 18 м) с неподвижной фазой DB-5ms (слой 0.25 мкм).



Рис.1. Карта Волгоградской области. Трансекты № 1 – 4 - места произрастания пыльцы Лерхе в природных условиях, где были собраны в 2004 и 2005 годах образцы для определения содержания эфирных масел в органах надземной части растений



Рис. 2. Район Волгоградской области. На переднем плане популяция доминантного вида пыльцы Лерхе

Параметры программирования термостата хроматографической колонки составили: от 50 °С (выдержка 2 мин) до 220 °С со скоростью 5 °С/мин, затем до 260 °С со скоростью 10 °С/мин и выдержка при этой температуре 4 мин. Температура инжектора 200 °С. Температура интерфейса 250 °С. Газ-носитель – гелий, объёмная скорость потока – 1 мл/мин (постоянная).

Условия масс-спектрометрического анализа: ионизация электронным ударом при энергии электронов 70 эВ, сканирование в диапазоне масс ( $m/z$ ) от 41 до 550 со скоростью 1 спектр в 1 сек. Количественное содержание компонентов вычисляли в автоматическом режиме исходя из площадей пиков общей хроматограммы ионов. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, используя библиотеку Wiley GC/M.

### Результаты и обсуждение

Как видно из результатов, представленных в таблице 1 содержание суммы эфирных масел в воздушно-сухой биомассе надземной части растений варьировало в пределах 0,08 - 1,43 %. Чёткой тенденции повышения содержания суммы эфирных масел в 1 г биомассы не проявилось. Вместе с тем, в расчёте на целое растение пул эфирных масел неуклонно увеличивался в активно растущих растениях до фазы цветения.

Таблица 1. Динамика содержания суммы эфирных масел (%) в надземной части растений полыни Лерхе в зависимости от фазы развития, эдафических факторов и условий года вегетации

Место произрастания растений (№ трансекты)	Год вегетации	Фазы развития растений			
		Рост вегетативных органов	Бутонизация	Цветение	Формирование плода
1	2	3	4	5	6
№ 1. Северная часть области	2004	0,08	—	0,16	—
	2005	1,21	1,05	f. erecta: 1,43 f.nutans: 0,21	—
№ 2. Центральная часть области	2004	0,53	—	0,72	—
	2005	0,89	0,98	f. erecta: 0,84; f.nutans: 0,76	f. erecta: 0,45 f.nutans: 0,23
№ 3. Окрестности Волгограда	2004	1,10	0,89	0,50	0,40
	2005	0,74	1,13	0,79	f. erecta: 0,70; f.nutans: 0,51
№ 4. Южная часть области	2004	0,13	0,16	0,67	0,33
	2005	1,32	1,22	—	—

Таблица 2. Результаты хроматомасс-спектрометрической идентификации компонентного состава эфирных масел полыни Лерхе

Компонент	Масс-спектр, m/z (I, %)	Светло-каштановая почва		Меловая почва	
		f. nutans	f. erecta	f. nutans	f. erecta
Количественное содержание (%)					
α-Пинен + β-Пинен	136(7), 121(12), 93(100), 92(53), 91(47), 79(30), 77(37), 67(10), 41(32)	0,06	0,31		
Камфен	136(17), 121(77), 107(30), 93(100), 79(33), 67(23), 41(15)	1,65	6,36	0,18	0,06
7,8-Цинеол	154(80), 139(70), 111(78), 108(90), 93(60), 81(98), 71(70), 55(40), 43(100)	23,93	23,74	21,62	3,06
3,7-Диметил-1,5-октадиен-3,7-диол	134(3), 119(7), 105(5), 91(13), 82(70), 71(100), 67(35), 55(20), 43(42)	0,48	0,94		0,60
2,6-Диметил-3,5-гептадиен-2-ол,	122(20), 107(100), 105(25), 91(85), 79(61), 77(40), 65(20)	0,15	0,13		0,12
Камфора	152(35), 137(5), 108(42), 95(100), 81(63), 69(28), 55(22), 41(27)	55,75	47,63	17,63	14,33
3-Метил-2-(1-метилэтил)-3,5-гексадиеналь	150(3), 135(41), 121(41), 107(67), 91(62), 79(100), 77(65), 53(38), 41(9)	0,96	0,66	1,30	2,05
Борнеол	139(8), 121(6), 110(20), 95(100), 67(8), 55(6), 41(10)	7,98	8,25	15,94	40,23
2-Метил-5-(1-метилэтил)-бицикло [3.1.0]гексан-2-ол	154(3), 139(14), 136(6), 121(29), 111(12), 93(100), 91(62), 79(59), 77(53), 43(35)	1,37	1,07	1,08	3,07
4-(1-Метилэтил)-1,3-циклогексадиен-1-метанол	137(17), 135(5), 121(23), 109(48), 107(22), 105(13), 91(71), 81(59), 79(100), 77(68), 67(42)	0,20	0,19	0,11	0,32
O-Ацетилвербенол	152(5), 134(7), 119(100), 109(16), 105(15), 91(50), 77(24), 43(18)	0,23	0,28	0,54	1,44
O-Ацетилборнеол	154(12), 136(40), 121(45), 110(10), 95(100), 93(45), 80(13), 69(10), 55(10), 43(35)	1,97	3,46	8,85	12,86
Спатуленол	220(3), 205(55), 187(26), 159(62), 119(58), 105(72), 91(100), 93(32), 79(42), 43(16)	0,43	0,35	3,35	3,16
1,2,3,5,6,7,8,8а-октагидро-1,8а-диметил-7-(1-метилэтил)-нафталин	204(48), 189(78), 175(21), 161(100), 147(46), 133(67), 119(48), 105(95), 93(63), 91(75), 79(77), 67(60)	1,12	1,71	2,52	8,19
Прочие минорные компоненты (сумма неидентифицированных соединений)		3,67	4,75	26,88	10,51

Морфологические различия двух морфотипов визуально проявились только в фазе цветения, что позволило дифференциально определить содержание в них эфирных масел на этапе репродуктивного развития. Форма *erecta* отличалась более высоким содержанием суммы эфирных масел по сравнению с формой *nutans*.

В результате хроматомасс-спектрометрического исследования идентифицировано 14 индивидуальных компонентов (таблица 2). Сравнительный анализ состава индивидуальных компонентов эфирных масел ценопопуляций полыни

Лерхе выполнен впервые. Основными общими для двух форм компонентами эфирных масел (%) являлись камфора (14,3 – 55,8), борнеол (8,0 - 40, 2) и 7, 8 – цинеол (3,1–23,9). Наиболее выраженные различия у двух морфотипов проявились по этим компонентам. Выявлена сильная зависимость соотношения компонентов эфирных масел от эдафических факторов и условий года в местах произрастания. Несмотря на то, что специфических компонентов, синтезируемых каждым из двух изученных морфотипов не выявлено, можно констатировать, что продукционный процесс у них отличается отзывчивостью на абиотические факторы и поэтому соотношение индивидуальных компонентов в значительной мере различно. Уровень накопленных не летучих эфирных масел на этапе «бутонизация – цветение» можно считать вполне значимым, а его компонентный состав представляющим ценность и заслуживающим более детального изучения.

Совокупность полученных данных позволяет рассматривать *Artemisia lerceana* как перспективный ресурсный вид. Если до настоящего времени этот ботанический объект привлекал внимание в экономическом плане как полезное кормовое растение, то в дальнейших исследованиях правомерно рассматривать его в качестве потенциального продуцента физиологически активных соединений, включая эфирные масла. Наши предварительные опыты показали, что полынь Лерхе при культивировании в условиях интродукционного эксперимента способна в значительной мере реагировать на обогащение субстрата элементами минерального питания повышением биопродуктивности и усилением продуцирования физиологически активных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Отделения биологических наук РАН (Программа «Биоресурсы России: фундаментальные основы их рационального использования»).

#### Литература

1. Т.П. Березовская, В.П. Амельченко, П.М. Красноборов, Е.А. Серых. *Полыни Сибири*. Новосибирск: Наука. 1991.- 201с.
2. Л.А. Зарубина, Г.И. Калинкина, А.Д. Дембицкий. Химический состав и антимикробные свойства эфирного масла из надземной части *Artemisia glauca* Pall. // *Растительные ресурсы*. 1993.- вып.3.- с.58-60.
3. И.С. Кожина, В.И. Ковалева, Г.Г. Сенченко, Т.В. Букреева. Эфирное масло *Artemisia lerceana* Web.ex Stechm. // *Химия природных соединений*. 1968.- т.4.- с. 321 - 322.
4. Л.П. Цеденова, О.Е. Романов, Т.О. Романова, Е.П. Лаврентьева. Антимикробная активность *Artemisia lerceana* Web.ex Stechm., произрастающей в Калмыкии. // *Растительные ресурсы*. 1999.- Вып. 4. – с. 58.- 60.
5. P.-O. Remberg, L.-O. Bjork, T. Hedner, O. Sterner. Европейский пат., Швеция WO 2002041909 (2002); *Chem. Abstr.*, 136, 395958
6. Г.О. Сусякова. *Биологические особенности полыни (Artemisia lerceana Web.) в естественных условиях и в культуре Северо-Западного Прикаспия*. // Диссертация канд. биол. наук. Москва: ГБС РАН.- 1997,- 150с.
7. Ю.В. Орлова, Е.Б. Кириченко. Экофизиологические особенности ценопопуляций полыни Лерхе, произрастающей на территории Волгоградской области. // *Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию ГБС им. Н.В. Цицина РАН «Ботанические сады как центры сохранения и рациональ-*

ного использования растительных ресурсов». М.: Издание ГБС РАН. 2005.- с. 387 – 388.

8. Kirichenko E.B., Orlova Yu.V., Kurilov D.V., Balnokin Yu.V., Myasoedov N.A. Specificity of ecophysiological status of *Artemisia lercheana* Web. ex Stechm. // XV FESPB Congress of European Societies of Plant Biology. 16 – 22.07.2006. Lyon (France). p. 194.

## КОНФОРМАЦИЯ МОЛЕКУЛ ЦЕРАМИДА 6 И CHAIN-FLIP ПЕРЕХОДЫ В ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЕ ВЕРХНЕГО СЛОЯ КОЖИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ – STRATUM CORNEUM

Киселев М.А.

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия, kiselev@jinr.ru

Дифракция нейтронов от ориентированных мультислойных модельных мембран stratum corneum (SC) позволяет получать информация о внутренней наноструктуре липидного бислоя и его гидратации. Главной особенностью модельных мембран SC, сделанных на основе церамида 6, является чрезвычайно малое межмембранное пространство (1 Å). Обсуждается значение полностью протяженной (FE) конформации молекул церамида 6 в организации наноструктуры липидной матрицы. FE конформация создаёт чрезвычайно сильное межмембранное взаимодействие (armature reinforcement), стягивающее соседние бислои до пространственного контакта друг с другом. Явление chain-flip переходов в конформации молекул церамидов объясняет структурные изменения нативных и модельных мембран SC при их гидратации.

### Введение

Верхний слой кожи млекопитающих - stratum corneum (SC) выполняет роль защитного барьера организма от окружающей среды. Согласно современным представлениям SC состоит из умерших и ороговевших клеток (корнеоцитов) и липидной матрицы. Такая структура похожа на кирпичную стену, в которой роль кирпичей выполняют корнеоциты, а роль цементного раствора – липидная матрица. На сегодня общепризнано, что диффузия вещества через SC определяется его липидной матрицей. Биохимическая природа и физические свойства липидной матрицы SC существенно отличаются от свойств плазматических мембран, основанных на фосфолипидах [1]. Основной компонентой липидной матрицы SC являются девять молекул церамидов. Другими, наиболее важными, компонентами этой матрицы являются холестерин, свободные жирные кислоты, сульфат холестерина. Недавно, методом дифракции нейтронов была впервые получена информация о внутренней наноструктуре модельной мембраны SC с композицией церамид 6 (CER6) /холестерин (Ch) /пальмитиновая кислота (PA) /сульфат холестерина (ChS) [2]. Главной особенностью такой мультислойной мембраны является чрезвычайно малое межмембранное пространство, которое при полной гидратации составляет 1 Å, что является её принципиальным отличием от мембран фосфолипидов, в которых межмембранное пространство составляет 10-30 Å [3]. В работе [2] была высказана гипотеза о том, что такая структура может создаваться за счет полностью протяженной конформации молекул церамида 6. В настоящей работе более детально анализируется роль двух различных конформаций молекулы церамида 6 и переходов между ними (chain-flip переходов) на основе имеющейся экспериментальной информации о структуре модельных и нативных мембран SC.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена длиннопериодная фаза модельной липидной мембраны Stratum Corneum, построенной на основе смеси короткоцепочечных (CER2, CER3, CER5, CER6, CER7) и длинноцепочечных церамидов (CER1, CER4).

Модель «сэндвича» липидной матрицы SC, предложенная в [4], использовалась для объяснения результатов рентгеновских дифракционных экспериментов и экспериментов по электронной микроскопии выполненных на мембранах, выделенных из эпидермального SC животных [5,6].

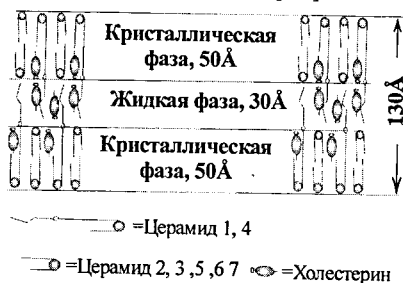


Рис. 1. Модель «сэндвича» длиннопериодной фазы липидной матрицы SC.

По данным рентгеновской дифракции от мультислойных везикул (липосом) в избытке воды, длиннопериодная фаза липидной матрицы SC состоит из трехслойной элементарной ячейки в 130 Å с тремя внутренними слоями 50 Å, 30 Å и 50 Å как показано на рис. 1 [5]. Слои с толщиной 50 Å находятся в кристаллической фазе, а внутренний слой толщиной 30 Å в жидкой фазе. В работе [5] было сделано предположение, что внутренний слой в жидкой фазе должен обладать высокой проницаемостью для молекул воды и, тем самым, диффузия воды идет в латеральном направлении. Важным является вопрос о силах, связывающие слои в жидкой и кристаллической фазе. Стягивающие бислои силы могут возникать за счет проникновения длинной углеводородной цепочки церамида 1 или церамида 4 из кристаллического слоя в 50 Å в жидкий слой толщиной 30 Å, как изображено на рис. 1. Однако, такое объяснение не является достаточным по причине наличия двух двойных связей в длинной углеводородной цепочке церамида 1 (церамида 4). Двойные связи делают цепочку крайне гибкой. Кроме того, хорошо известно, что жидкая фаза углеводородных цепочек препятствует их проникновению друг в друга. Например, взаимопроникновение углеводородных цепочек молекул дипальмитоилфосфатидилхолина под влиянием этанола возможно только в гелевой фазе, когда цепочки находятся в транс-конформации и их структура близка к кристаллической. Такое взаимопроникновение становится невозможным при повышении температуры до уровня плавления цепочек, так как жесткость цепочек оказывается недостаточной для проникновения в соседний слой [7]. В работе [2] было установлено, что у модельных мембраны SC на основе церамида 6 полярные головы молекул соседних бислоев находятся рядом (слипаются друг с другом). Малость межмембранного пространства связана с конформационными особенностями церамидов. Молекулы церамидов могут находиться в полностью протяженной FE конформации (FE – fully extended), когда их углеводородные хвосты направлены в противоположные стороны, а полярная голова находится в центре (см. рис. 2). В частности, CER6 состоит из двух стереометрических форм D-CER6 и L-CER6 [8]. D-CER6 существует в FE конформации. В [2] была высказана гипотеза о том, что

FE конформация D-CER6 является основой адгезии полярных голов липидов соседних бислоев. Такая структура является чрезвычайно устойчивой. Например, замена в мембране с композицией CER6/Ch/PA/ChS пальмитиновой кислоты (длина цепочки C16:0) на кислоты с более длинными цепочками C18:0, C22:0, C24:0, C26:0 не приводит к увеличению толщины бислоя [9].

Представленная на рис. 2а, структура мультислойной мембраны CER6/Ch/PA/ChS в частично гидратированном состоянии (относительная влажность окружающего воздуха 60 %-99 %) является прочной именно за счет FE конформации молекул церамида 6. Образно, можно сказать, что FE конформация является арматурой удерживающей липидные бислои от их раздвижки в процессе гидратации. Такое арматурное укрепление (armature reinforcement) липидной матрицы SC может осуществляться и другими короткоцепочечными молекулами церамидов, для которых возможна FE конформация.

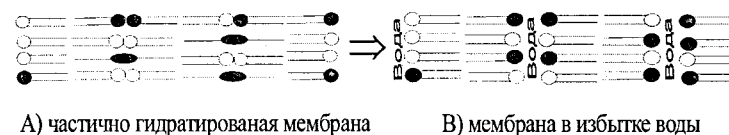


Рис. 2. Изменения структуры мембраны CER6/Ch/PA/ChS при её гидратации избытком воды за счет chain-flip перехода молекул D-CER6 из FE конформации в OS конформацию. Обозначения: ○ — L-CER6, ● — OS конформация D-CER6, ◐ — FE конформация D-CER6. Для простоты молекулы PA, Chol и ChS не изображены.

При физиологических температурах углеводородные хвосты короткоцепочечных церамидов находятся в гелевой фазе, и поэтому их проникновение в соседний бислой возможно. FE конформация церамидов является основополагающей в формировании устойчивой структуры липидной матрицы. Изменение толщины частично гидратированной мембраны не превышает 2 Å при значительной вариации содержания её компонент, от 5 до 10 % [1].

Вторым важным вопросом является вероятность существования молекул церамида 6 в односторонней OS (one-sided) конформации, типичной для большинства липидных молекул с двумя углеводородными цепочками. Переход из FE в OS конформацию возможен за счет chain-flip перехода, когда одна из цепочек совершает поворот своей оси на 180 градусов. Такой переход энергетически возможен, так как на него требуется примерно половина энергии flip-flop перехода, при котором молекула липида из одной части бислоя переходит в его противоположную часть [10]. FE конформация молекул D-CER6 является энергетически предпочтительной при полном отсутствии воды в межмембранном пространстве, как показано на рис. 2а. При увеличении гидратации мультислойной мембраны требуется энергия для гидратации углеводородных цепочек. Поэтому молекуле церамида более выгодно минимизировать свою энергию за счет chain flip перехода из FE в OS конформацию, в которой углеводородная часть молекулы будет менее гидратирована. Схематично chain flip переход представлен на рис. 2. На рис. 2а молекулы L-CER6 и молекулы D-CER6, находящиеся в OS конформации, образуют повторяющиеся липидные бислои. Молекулы D-CER6,

находящиеся в FE конформации, стягивают соседние бислои так, что полярные головы двух соседних бислоев оказываются рядом. Возникает адгезия соседних бислоев и исчезает межмембранное пространство. Такая структура аналогична границе между слоями толщиной 50 Å и 30 Å на рис. 1, а FE конформация молекул церамида 6 объясняет физическую суть отсутствия межмембранного пространства между ними. При гидратации мембраны CER6/Ch/PA/ChS молекулы D-CER6, находящиеся в FE конформации, переходят в OS конформацию. Происходит раздвижка соседних бислоев и возникает межмембранное пространство как показано на рис. 2b. Дополнительным доказательством явления chain-flip перехода является возможность создания однослойных везикул из многослойных. Существование молекул церамида 6 в FE конформации в многослойных везикулах делает невозможным создание из них однослойных везикул без изменения FE конформации в OS конформацию. Однако, эксперименты по созданию однослойных везикул на основе четырехкомпонентных систем типа CER6/Ch/PA/ChS показали, что создание таких везикул возможно в широком диапазоне вариации компонент. Например, в [11] было показано, что экструзия многослойных везикул CER6/Ch/PA/ChS = 55/20/15/10 при температуре 75°C через поры диаметром 500 Å приводит к образованию однослойных везикул с толщиной липидного бислоя 48±10 Å.

Явление chain-flip перехода в конформации молекул церамидов объясняет не только экспериментальные результаты, полученные на модельных мембранах, но и результаты полученные на нативном SC, выделенном из кожи поросенка [12]. Нейтронные дифракционные эксперименты на таких образцах показали, что структура SC имеет слабовыраженную ламеллярную организацию с периодом 57 Å при относительной влажности 100 %. Помещение образца в избыток D<sub>2</sub>O увеличивает период повторяемости до 62 Å, последующее набухание в течение 15 часов увеличивает период повторяемости до 70 Å. После 8 дней нахождения в D<sub>2</sub>O происходят существенные изменения в структуре SC – исчезает первый порядок отражения, но остается второй порядок. Аналогичные наблюдения были сделаны методом дифракции рентгеновских лучей на SC кожи человека, структура которого состоит из двух фаз: длиннопериодной фазы с периодом повторяемости 134 Å и короткопериодной фазы с периодом повторяемости 64 Å. При гидратации липидной матрицы SC кожи человека наблюдается исчезновение длиннопериодной фазы [13]. Это исчезновение может быть объяснено chain-flip переходом молекул церамидов из FE конформации, стягивающей внутренние слои в 50 Å и 30 Å, в OS конформацию под действием гидратации. После этого происходит разрушение длиннопериодной фазы.

#### Выводы

Проведен анализ дифракционных данных по изменению структуры нативных и модельных мембран липидной матрицы stratum corneum при их полном гидратировании. Показано, что явление chain-flip переходов в конформации молекул церамидов объясняет как структурные изменения и свойства модельных мембран, так и экспериментальные результаты по изменению структуры нативных мембран в процессе их гидратации.

#### Литература

1. Wertz P.W., Bergh V.D.B. // Chem. Phys. Lipids 1998. V91. P85.
2. Kiselev M.A., Ryabova N.Yu., Balagurov A.M., et al. // European Biophys. J. 2005. V34. P1030.
3. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. // Biochem&Biophys. Acta. 2000. V1469. P159.
4. Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J. et al. // J. Invest. Dermatol. 1989. V92. P251.
5. Bouwstra J., Pilgram G., Gooris G., et al. // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2001. V14. P52.
6. Hill J.R., Wertz P.W. // Biochem&Biophys. Acta. 2003. V16. P121.
7. М.А. Киселев, А.М. Киселев, Ш. Борбелу и др. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2006. V6. P67.
8. Raudenkorb S., Wartewig S., Neubert R.H.H. // Chem. Phys. Lipids 2005. V133. P89.
9. Ruttinger A., Kiselev M.A., Otto D. // BENSCh experimental report BIO-01-1888. 2006.
10. Contreras F.-X., Basanez G., Alonso A., et al. // Biophys. J. 2005. V88. P348.
11. Zemlyanaya E.V., Kiselev M.A., Zbytovska J., et al. // Crystallography reports, 2006. V51. Suppl. 1. Ps22.
12. Charalambopoulou G.C., Steriotis T.A., Hauss Th., et al. // J Applied Physics A. 2002. V74 suppl. PS1245.
13. Bouwstra J.A., Gooris G.S., van der Spek J.A. et al., // J. Invest. Dermatol. 1991. V97. P1005.

**СПЕЦИФИКА ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

Маргарян А.С., Овсепян Л.М., Бадалян Б.Р., Симонян А.А.

Институт Биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, г. Ереван, Армения, 141278@mail.ru

В последние годы значительная роль в патогенезе метаболических и структурных состояний при целом ряде патологий отводится интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах и мембранах субклеточных структур [2, 4, 7, 8, 9]. Процесс ПОЛ, сопровождающийся выходом значительного количества веществ мембранотоксического, мембранолитического действия, по современным представлениям, может проявляться как в виде стимулирования, так и ингибирования активности течения метаболических процессов на различных уровнях клеточных образований. Избыточное накопление продуктов ПОЛ может служить причиной некроза клеток, нарушения физико-химических свойств их мембран, образования в них ионных каналов. ПОЛ-зависимые изменения каталитических свойств мембранно-связанных ферментов обычно обуславливаются изменением состояния и состава фосфо-липидного компонента мембраны, модификацией белковых молекул фермента за счет окисления тиоловых групп взаимодействием продуктов ПОЛ со свободными аминогруппами белков [5, 6]. С отмеченной точки зрения, особого внимания заслуживает изучение интенсивности процесса ПОЛ в крови, мозге и печени крыс при  $CCl_4$ -индуцированном циррозе и корригирующем действии антиоксидантных факторов -  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -ТФ) и тиосульфата натрия (ТСН) на эти процессы.

Опыты были поставлены на беспородных белых крысах-самцах массой 150-200 г. Цирроз печени вызывали введением крысам внутривенно (в/в)  $CCl_4$  в дозе 0,15 мг/100 г веса два раза в неделю в течение 20-и дней. Животные были разделены на 6 групп (по 5 в каждой): I – интактные; II – с экспериментальным  $CCl_4$ -индуцированным циррозом; III – интактные животные, которым в/б вводили ТФ в дозе 1 мг/100 г веса; IV – животные с циррозом, которым в/б вводили ТФ в дозе 1 мг/100 г веса; V – интактные животные, которым в/б вводили ТСН в дозе 0,15 мг/100 г; VI – животные с циррозом, которые в/б получали ТСН. Во всех вариантах животным ТФ и ТСН вводили 2 раза в неделю в течение 20 дней.

Об активности перекисного окисления судили по образованию малонового диальдегида (МДА) и регистрировали спектрофотометрически при длине волны 535 нм [3]. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке. Достоверность полученных результатов определяли методом десятичной вариационной статистики Стьюдента-Фишера [1].

Как показали результаты наших исследований, приведенные в таблице, экспериментальный цирроз печени (ЦП) сопровождается накоплением большого количества перекисей липидов в исследуемых тканях.

Внутрибрюшинное введение  $\alpha$ -ТФ и ТСН стабилизирует динамическое равновесие между системами про- и антиоксидантной направленности. Эти данные еще раз подтверждают важную антиоксидантную роль  $\alpha$ -ТФ и ТСН. Содержание малонового диальдегида (МДА) в контрольной группе животных составило

5,5, 7,0 и 6,32 нмоль/мг белка в крови, мозге и печени соответственно, а при  $CCl_4$ -индуцированном циррозе – 9,24, 8,21 и 15,85 нмоль/мг белка. Из полученных данных видно, что наиболее выраженное активирование интенсивности течения процессов ПОЛ регистрируется в печеночной ткани. Очевидно, это связано с тем, что в первую очередь при ЦП поражается печень. В несколько меньшей степени сдвиг аналогичной направленности обнаруживается в цельной крови. Чуть большая активность процессов ПОЛ, регистрируемая в цельной крови, по сравнению с данными полученными при изучении активности процессов ПОЛ в головном мозге можно объяснить тем, что после поражения печени часть синтезированных продуктов ПОЛ при циркуляции крови из печени попадает в кровь. Интенсификация процессов ПОЛ в исследованных биологических тканях при ЦП – это результат активирования реакций деацилирования ФЛ-глицеридов, главным образом, фосфатидилхолинов (ФХ), приводящего к образованию лизофосфатидилхолинов (ЛФХ) и незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК) полиенового ряда в виде гидроперекисей, моно-, ди- и триеновых конъюгатов, соединений типа Шиффа и конечного продукта этого многоэтапного процесса – МДА. ЛФХ, НЭЖК и комплекс липидных перекисей выступают в качестве одного из основных патогенетических факторов любого болезненного процесса, в том числе, и ЦП. Подтверждением вышеизложенного является то, что введение  $\alpha$ -ТФ и ТСН экспериментальным животным мобилизует эндогенные системы антирадикальной защиты клетки при экспериментальном ЦП. Так, при введении ТСН процесс ПОЛ ингибируется, приближаясь к данным контроля. При введении  $\alpha$ -ТФ ингибирование процесса ПОЛ выражено более интенсивно. Один из наиболее реальных механизмов его благоприятного воздействия объясняется тем, что  $\alpha$ -ТФ мобилизует эндогенные системы антирадикальной защиты клетки, являясь основным действующим началом антирадикальной системы в организме.

Таблица 1. Изменение интенсивности течения процесса перекисного окисления липидов (в нМ МДА/мг белка) в крови, головном мозге и печени белых крыс при  $CCl_4$ -индуцированном циррозе печени под воздействием  $\alpha$ -ТФ и ТСН

	Кровь	Мозг	Печень
Контроль	5,50±0,002	7,00±0,002	6,32±0,002
$CCl_4$	9,24±0,002 p<0,001 +68 %***	8,21±0,002 p<0,001 +17 %***	15,85±0,002 p<0,001 +151 %***
$\alpha$ -ТФ	5,23±0,009 p<0,001	6,33±0,009 p<0,001	5,25±0,009 p<0,001
$CCl_4$ + $\alpha$ -ТФ	6,83±0,002 ** p <sub>1</sub> <0,001 -26 %****	6,78±0,002 ** p <sub>1</sub> <0,001 -17 %****	9,64±0,002 ** p <sub>1</sub> <0,001 -39 %****
ТСН	6,12±0,01 p<0,001	6,53±0,01 p<0,001	6,31±0,01 p<0,001
$CCl_4$ + ТСН	7,22±0,002 p <sub>1</sub> <0,001 -22 %****	7,12±0,002 p <sub>1</sub> <0,001 -13 %****	10,28±0,002 p <sub>1</sub> <0,001 -35 %****

Примечания: n = 6; \* p – в сравнении с контролем; \*\* p<sub>1</sub> – в сравнении с группой, получившей  $CCl_4$ ; \*\*\* (+ -) – изменение интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов в сравнении с контролем; \*\*\*\* (+ -) – изменение интенсивности течения процесса свободнорадикального окисления липидов в сравнении с группой, получившей  $CCl_4$ .

Таким образом, при  $\text{CCl}_4$ -индуцированном ЦП имеет место активация процессов ПОЛ. Механизм токсического действия  $\text{CCl}_4$ , по всей видимости, связан с его повреждающим действием через образование свободных радикалов, таких как  $\text{CCl}_3^{\cdot}$  и  $\text{Cl}^{\cdot}$ . Продукты перекисления липидов, формирующиеся на различных уровнях биологических систем организма в ответ на действие  $\text{CCl}_4$ , стимулируют различные тонкие молекулярно-биологические и биохимические механизмы процессов ПОЛ, что служит серьезным основанием к более обстоятельному изучению этих механизмов.

#### Литература

1. *Бессмертный Б.С.* Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. // М. – 1967.
2. *Бурлакова Е. Б.* - Роль липидов в передаче информации в клетке. В кн. "Биохимия липидов и их роль в обмене веществ". М. "Наука". 1981. С. 23-26.
3. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* - Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. "Наука". 1982. С. 223-227.
4. *Осинов А. Н., Азизов О. А., Владимиров Ю. А.* - Успехи биологической химии. 1990. Т. 31. С. 180-208.
5. *Halliwell B.* - Free. Radic. Res. 1999. V. 31. P. 261-272.
6. *Richter C., Schweizer M.* - Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. 1997.
7. *Camps J., Bargallo T., Gimenez A., Alie S., Caballeria J., Pares A., Joven J., Masana L., Rodes J.* Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration // Clin. Sci. (Lond). – 1992. – V. 83, N 6. – P. 695-700.
8. *Li C.X., Li L., Lou J., Yang W.X., Lei T.W., Li Y.H., Liu J., Cheng M.L., Huang L.H.* The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, han-dan-gan-le, on  $\text{CCl}_4$ -induced liver fibrosis in rats // Am. J. Chin. Med. – 1998. – V. 26, N 3-4. – P. 325-332.
9. *Serviddio G., Pereda J., Pallardo F.V., Carretero J., Borrás C., Cutrin J., Vendemiale G., Poli G., Vina J., Sastre J.* Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress // Hepatology. – 2004. – V. 39, N 3. P. 711-720.



## ЭКЗОЛИСАХАРИДЫ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

<sup>1</sup>Маркосян Л.С., <sup>1</sup>Паронян А.Х., <sup>1</sup>Оганесян Р.С., <sup>2</sup>Мамян С.С.  
<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН РА, Армения, г. Ереван, Lmark@sci.am  
<sup>2</sup>Центр исследований строения молекул НАН РА, Армения, г. Ереван

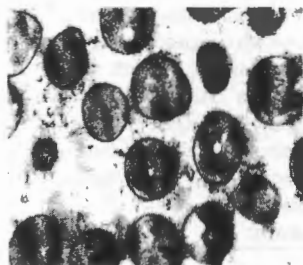
Микроорганизмы являются продуцентами разнообразных внеклеточных олиго- и полисахаридов. Обнаружены сотни микроорганизмов относящиеся к различным родам, продуцирующие экзополисахариды [1-10]. Указанные соединения играют важную биологическую роль. Внеклеточные полисахариды определяют взаимодействие клеток в популяции, взаимодействие патогенных бактерий с хозяином в процессе адгезии и защищают клетки. Многие микробные полисахариды используются в пищевой, фармацевтической, косметической и текстильной промышленности, в флотационных процессах, при добыче нефти и в других областях. Сахара со стабильным изотопом углерода (<sup>13</sup>C) успешно применяются в диагностике заболеваний желудочно кишечного тракта. Фототрофные микроорганизмы представляют большой интерес для получения различных биологически активных соединений: витаминов, каротиноидов, органических кислот, ферментов и других. Однако биосинтез и свойства олиго- и полисахаридов фототрофных бактерий изучены весьма слабо.

Целью настоящих исследований является изучение свойств экзоолигосахарида, продуцируемого фототрофной бактерией.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила культура фототрофной бактерии из рода *Rhodobacter sphaeroides* условно обозначенная как А-1 и выделенная из минеральных источников Армении (Арзни и Джермук) гидрокарбонатного типа со степенью минерализации 3.5-5.0г/л с рН 7.2. Штамм *Rh. Sphaeroides-A1* культивировали в стационарных условиях при освещенности 2500-3000 люкс, температуре 30 °С, в течении восьми суток в несколько измененной питательной среде Ормеруда: (гр/л)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0.6,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0.9,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0.08,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.012, Na-ацетат - 7.0; биотин - 15 мг., микроэлементы - 1 мл., рН - 7.0. Общее количество сахаров определяли антроновым методом [12]. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре MERCURY 300Vx фирмы Varian с резонансной частотой 300.077 и 75.465 МГц на ядрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C соответственно. В качестве растворителя использована тяжелая вода. В спектре ЯМР <sup>13</sup>C сигнал СН3 группы метанола использован в качестве внутреннего стандарта.

### Результаты и обсуждение



Исследования морфо-физиологических и биохимических особенностей *Rhodobacter sphaeroides-A1* показали, что выделенный штамм является грамотрицательным. Способен расти как в анаэробных условиях на свету, так и в аэробных условиях в темноте на средах с органическими субстратами. Электронно-микроскопические исследования пока-

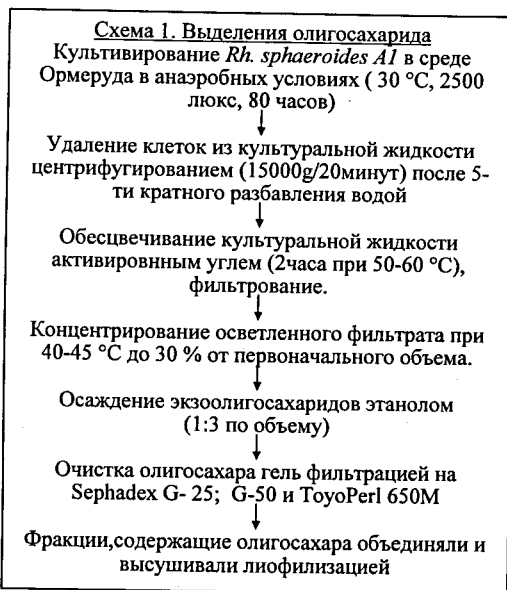
Рис. 1. Электронная микрофотография штамма *Rh. sphaeroides-A1*, Увеличение x 15600.

зали, что клетки исследуемой фототрофной бактерии имеют сферическую форму (2.0-2.5 на 1.3-1.мк, рис.1). Хороший рост указанных культур наблюдается в присутствии в среде культивирования солей органических кислот: ацетата, пирувата, лактата, малата, fumarата, сукцината, а также глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы и других сахаров. Для нормального роста требуются также факторы роста, содержащиеся в дрожжевом экстракте (тиамин, биотин, никотиновая кислота). В качестве источника азота используются соли аммония и мочевины. В качестве единственного источника углерода был использован Na-ацетат – 7 гр/л. Показано, что спустя 24 часа уже наблюдается рост культуры, а максимум количества биомассы обнаруживается на 72 часу роста культур (таблица 1). Параллельно росту культуры меняется и pH среды, составляя на 72 часу роста 9.3-9.5. Далее изменения незначительны. Микроскопические наблюдения показали,

Таблица 1. Биомасса *Rh. sphaeroides* и изменение pH КЖ в процессе анаэробного роста

штамм	часы					
	0	24	48	72	144	192
<i>Rh.sphaeroides</i>	оптическая плотность при 660 нм					
	0.025	0.18	0.62	0.65	0.58	0.53
	pH					
	6.9	7.8	8.5	9.5	9.7	9.7

максимума на 72 часу культивирования, что совпадает с максимумом роста культуры. При дальнейшем культивировании уровень сахаров аналогично биомассе не меняется. Проводились исследования химической природы экзосахаридов. Олигосахарид выделялся по схеме 1.



что клетки бактерий в процессе роста образуют слизистую капсулу.

Исследования динамики синтеза экзосахаридов показали, что содержание их достигает

Известно, что некоторые олиго- и полисахариды проявляют определенную биологическую активность. Проведенные нами исследования по влиянию выделенного нами олигосахаридов на рост некоторых штаммов микроорганизмов: *E. coli*, *B. Subtilis*, *Candida albicans* не выявили антимикробной активности.

Изучение состава выделенных олигосахаридов после их кислотного гидролиза с помощью тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) показало, что мономером олигосахаридов штамма *Rh. Sphaeroides* A-1 является глюкоза.

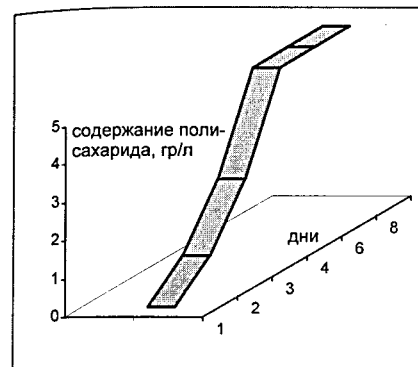


Рис. 2. Синтез экзоолигосахаридов в процессе роста *Rh. sphaeroides*

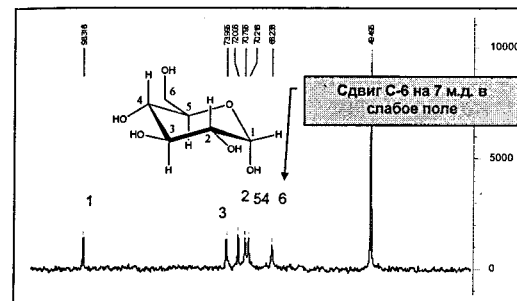


Рис. 3. <sup>13</sup>C ЯМР Спектр олигосахаридов

значительно различаются. Это свидетельствует о том, что основу олигосахаридов составляет α-глюкоза, а гликозидные остатки соединены между собой в положениях 1 и 6 (рис. 4).

Анализ протонных спектров указанного олигосахаридов (рис. 5) хорошо согласуется с вышесказанным. Во-первых, дублетный сигнал аномерного атома водорода с константой спин-спинового взаимодействия  $J = 3.6$  Hz указывает на α-конфигурацию моносахарида. Во-вторых, детальный анализ мультиплетной структуры и определение константы спин-спинового взаимодействия между ядрами 1 и 2, 2 и 3, 3 и 4, 4 и 5 свидетельствует о том, что моносахаридный остаток представляет из себя α-глюкозу. Молекулы α-глюкозы присоединены между собой по положениям 1 и 6 и образуют циклическую структуру с определенными элементами симметрии (рис. 6). Следует отметить, что спектры

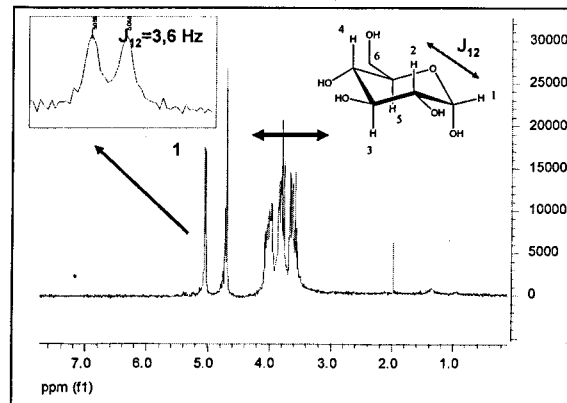


Рис. 4. <sup>1</sup>H ЯМР Спектр олигосахаридов

Структурные особенности указанного экзоолигосахаридов изучали с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ядер атомов водорода и углерода.

В спектре ЯМР <sup>13</sup>C олигосахаридов штамма *Rh. sphaeroides* A-1 (рис. 3) наблюдаются шесть сигналов поглощения от шести неэквивалентных атомов углерода. При сравнении этого спектра со спектром ЯМР <sup>13</sup>C α-глюкозы наблюдается хорошее совпадение химических сдвигов сигналов для атомов углерода в положениях 2 – 5, тогда как сигналы атомов углерода в положениях 1 и 6

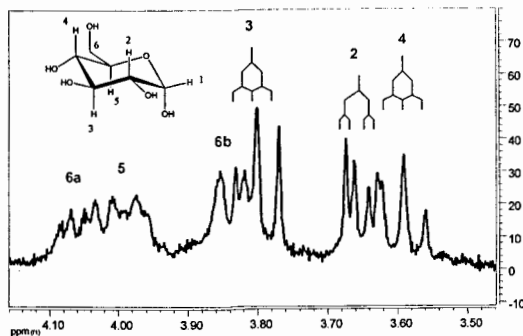


Рис. 5.  $^1\text{H}$  ЯМР Спектр олигосахарид, область протонов 2-6

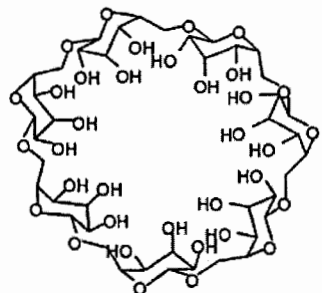


Рис. 6. Структура циклического 1,6-олигосахарид

олигосахарид с линейной структурой и, следовательно, отсутствием элементов симметрии, должны были быть намного сложнее от наблюдаемых спектральных картин. В частности, спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  такого олигосахарид должен был состоять из двух, трех десятков сигналов.

Таким образом впервые выделен и изучен состав, свойства и структурные особенности экзоолигосахарид, синтезируемый фототрофной бактерией из рода *Rh. Sphaeroides*. Возможность синтеза олигосахаридов фототрофными бактериями с использованием ацетата в качестве единственного источника углерода создает предпосылки для создания биотехнологии синтеза  $^{13}\text{C}$ -сахаров, а также других соединений со стабильным изотопом углерода, применяемых в диагностике заболеваний и при исследовании процессов метаболизма.

### Литература

1. Ботвинко И.В. Успехи микробиологии, 20, 79-123, 1985.
2. Kenne L., Lindberg V. The polysaccharides. Academic Press, v. 5, 287-363, 1983.
3. Kong R.S., Veeder G.T., Gottrell J.W. Industrial Microbiology, 18, 231, 1983.
4. Barbara A.B., Linhardt R.J., Daniels L. Applied and Environmental Microbiology, 51, 6, 1304-1308, 1986.
5. Полисахариды. Промышленная микробиология. ст. 389-413, 1989.
6. Бекер М.Е., Лицепыш Г.К., Райтулис Е.П. Внеклеточные полисахариды. Биотехнология. Москва, 230-232, 1990.
7. Веремеенко С.Н., Здоровенко Г.М. Микробиология, 69, 3, 362-369, 2000.
8. Горленко В.М. Микробиология, 73, 5, 633-643, 2005.
9. Веремеенко С.Н., Здоровенко Г.М., Здоровенко Э.Л., Затонский Г.М. Микробиология, 74, 5, 633-641, 2005.
10. Варбанец Л.Д., Здоровенко Э.Л., Останчук А.Н., Здоровенко Г.М. Микробиология, 74, 4, 466-474, 2005.
11. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев, Наука Думка 37-38, 1982.

### МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ $\alpha$ -КРИСТАЛЛИНОМ

<sup>1</sup>Маркосян К.А., <sup>1</sup>Голуб Н.В., <sup>1</sup>Ханова Е.А., <sup>2</sup>Муранов К.О., <sup>2</sup>Островский М.А., <sup>3</sup>Асриянц Р.А., <sup>3</sup>Муронец В.И., <sup>4</sup>Касилович Н.В., <sup>4</sup>Шолух М.В., <sup>5</sup>Юдин Ю.К., <sup>1</sup>Курганов Б.И.

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, markossian@inbi.ras.ru, boris@kurganov.com

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН, г. Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

<sup>4</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

<sup>5</sup>НИИ нефти и газа РАН, г. Москва, Россия

$\alpha$ -Кристаллин, основной белок хрусталика глаза млекопитающих, является представителем семейства малых белков теплового шока, которые образуют устойчивые растворимые комплексы с денатурированными белками и, таким образом, подавляют их агрегацию [1-3]. В хрусталике глаза  $\alpha$ -кристаллин подавляет агрегацию  $\beta$ - и  $\gamma$ -кристаллинов, поврежденных в результате ультрафиолетового облучения и окислительного стресса, и предотвращает помутнение хрусталика и развитие катаракты [4]. Повышенная экспрессия  $\alpha$ -кристаллина наблюдается также во многих других тканях в условиях стресса и при различных патологиях. В связи с обнаружением того факта, что  $\alpha$ -кристаллин обладает шапероноподобной активностью *in vitro*, появились многочисленные работы по изучению его влияния на тепловую денатурацию и агрегацию различных белков и ферментов [1-3, 5]. Однако, механизм подавления тепловой агрегации белков  $\alpha$ -кристаллином оставался невыясненным.

Настоящая работа посвящена изучению механизма тепловой агрегации олигомерных белков и установлению механизма подавления агрегации белков  $\alpha$ -кристаллином. Для решения этих задач была изучена кинетика тепловой агрегации  $\beta$ -кристаллина из хрусталика глаза быка, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) из скелетных мышц кролика и митохондриальной аспартатаминотрансферазы (мААТ) из сердца свиньи. Исследования проводили в широком диапазоне температур и концентраций белка с использованием метода динамического светорассеяния, позволяющего оценивать размер белковых агрегатов.

Анализ соотношения между интенсивностью светорассеяния и гидродинамическим радиусом ( $R_h$ ) для тепловой агрегации  $\beta$ -кристаллина, ГАФД и мААТ (рис. 1) показал, что в момент начального прироста интенсивности светорассеяния в системе присутствуют довольно крупные частицы, которые мы назвали *стартовыми агрегатами*. Наши исследования показали, что гидродинамический радиус стартовых агрегатов ( $R_{h,0}$ ) не зависит от концентрации белка и практически не зависит от температуры.

На рис. 2 представлены зависимости  $R_h$  от времени для тепловой агрегации мААТ при 60 °С. Зависимости включают начальный линейный участок, описываемый линейной функцией  $R_h = R_{h,0} [1 + (t - t_0)/t_{tr}]$ , и следующий за ним участок (при  $t > t^*$ ), описываемый степенной функцией  $R_h = R_h^* [1 + K_1(t - t^*)]^{1/\alpha}$ , где  $t_0$  – длитель-

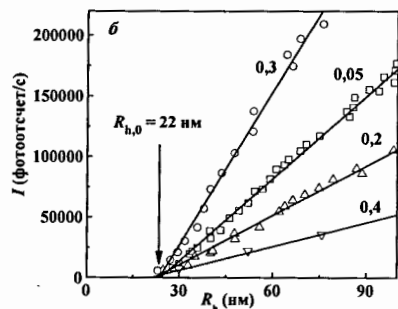
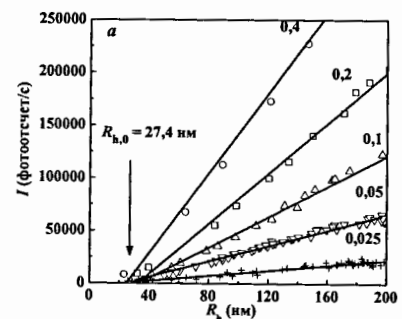
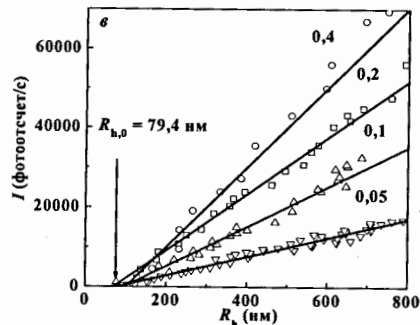


Рис. 1. Соотношение между интенсивностью светорассеяния ( $I$ ) и гидродинамическим радиусом ( $R_h$ ) для тепловой агрегации (а)  $\beta_L$ -кристаллина (60 °С, 40 мМ Na-фосфатный буфер, рН 6,8, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ NaN<sub>3</sub>), (б) ГАФД (55 °С, 10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,5) и (в) МААТ (60 °С, 10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,5). Цифры около прямых соответствуют концентрации белков в мг/мл



ность латентной стадии, на протяжении которой происходит образование стартовых агрегатов,  $t_{2R}$  – интервал времени, на протяжении которого гидродинамический радиус увеличивается от значения  $R_{h,0}$  до значения  $2R_{h,0}$ ,  $R_h^*$  значение  $R_h$  при  $t = t^*$ ,  $K_1$  – константа и  $d_f$  – фрактальная размерность, являющаяся структурной характеристикой агрегатов. Для кинетических кривых тепловой агрегации белков параметр  $d_f$  близок к 1,8. В соответствии с теорией агрегации коллоидных частиц [6] подобное значение фрактальной размерности указывает на выполнение кинетического режима, при котором скорость агрегации лимитируется диффузией взаимодействующих частиц (“diffusion-limited cluster-cluster aggregation”; DLCA). Вероятность слипания взаимодействующих частиц равна единице.

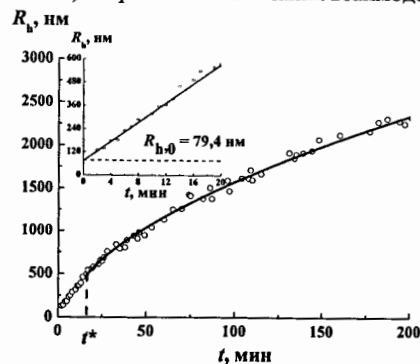


Рис. 2. Зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) от времени для тепловой агрегации МААТ (0,2 мг/мл) при 60 °С (10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,5). На вставке показан линейный участок зависимости  $R_h$  от времени

На основании полученных нами данных предложен новый механизм агрегации белков, включающий стадию разворачивания белковой молекулы, стадию образования стартовых агрегатов и стадию роста агрегата путем слипания стартовых агрегатов [7, 8] (рис. 3).

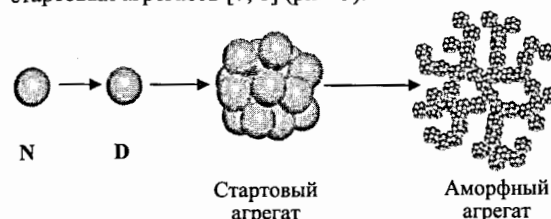


Рис. 3. Механизм агрегации белков, включающий стадию образования стартовых агрегатов (N и D – нативная и денатурированная формы белка)

На рис. 4 показано влияние  $\alpha$ -кристаллина на тепловую агрегацию МААТ. В присутствии  $\alpha$ -кристаллина при достаточно высоких значениях времени инкубации популяция агрегатов расщепляется на два компонента. Начальный участок зависимости  $R_h$  от времени описывается экспоненциальной функцией  $R_h = R_{h,0} \{ \exp[\ln 2(t - t_0)/t_{2R}] \}$ , что указывает на переход процесса агрегации из кинетического режима diffusion-limited cluster-cluster aggregation в кинетический режим reaction-limited cluster-cluster aggregation (RLCA), при котором вероятность слипания при соударении частиц становится меньше единицы.

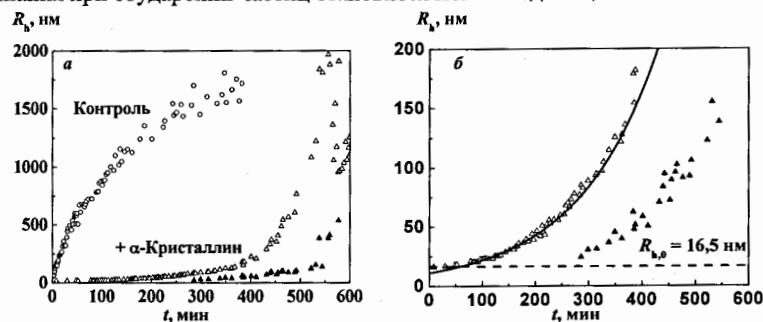


Рис. 4. Влияние  $\alpha$ -кристаллина на тепловую агрегацию МААТ. (а) – зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) от времени для агрегации МААТ (0,2 мг/мл) при 60 °С в отсутствие (контроль) и в присутствии  $\alpha$ -кристаллина (0,1 мг/мл). (б) – зависимость  $R_h$  от времени для агрегации МААТ в присутствии  $\alpha$ -кристаллина в координатах  $\{R_h; t\}$  с растянутой осью ординат. Сплошной линией обозначен участок зависимости  $R_h$  от времени, описываемый экспоненциальной функцией

Подавление тепловой агрегации белков в присутствии  $\alpha$ -кристаллина обусловлено уменьшением размера стартовых агрегатов, увеличением длительности латентного периода, на протяжении которого происходит образование стартовых агрегатов, и переходом процесса агрегации из кинетического режима DLCA в режим RLCA (путь 1 на рис. 5) [9]. При относительно высоких концентрациях  $\alpha$ -кристаллина происходит полное подавление агрегации белков. В этих

условиях образуются комплексы  $\alpha$ -кристаллина с денатурированным белком, не проявляющие склонности к дальнейшей агрегации (путь 2 на рис. 5).



Рис. 5. Механизм агрегации белков в присутствии  $\alpha$ -кристаллина. Путь 1 – агрегация белка при относительно низких концентрациях  $\alpha$ -кристаллина. Путь 2 – комплексообразование  $\alpha$ -кристаллина с денатурированным белком при относительно высоких концентрациях  $\alpha$ -кристаллина

Понимание механизмов агрегации белков необходимо для разработки эффективных методов предотвращения агрегации, а также для анализа результатов изучения шапероноподобной активности малых белков теплового шока и других агентов, обладающих шапероноподобной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 05-04-48691а и 06-04-39008-ГФЕН а), Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, Программы INTAS (грант 03-51-4813).

#### Литература

1. Horwitz J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10449-10453.
2. Wang K., Spector A. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 13601-13608.
3. Кривандин А.В., Муранов К.О., Островский М.А. (2004) *Мол. Биол.* 38, 3-15.
4. Bloemendal H., de Jong W., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C., Tardieu A. (2004) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 86, 407-485.
5. Putilina T., Skouri-Panet F., Prat K., Lubsen N. H., Tardieu A. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 13747-13756.
6. Weitz D.A., Lin M.Y. (1986) *Phys. Rev. Lett.*, 54, 1416-1419.
7. Khanova H.A., Markossian K.A., Kurganov B.I., Samoilov A.M., Kleimenov S.Yu., Levitsky D.I., Yudin I.K., Timofeeva, A.C., Muranov K.O., Ostrovsky M.A. (2005) *Biochemistry*, 44, 15480-15487.
8. Markossian K.A., Khanova H.A., Kleimenov S.Yu., Levitsky D.I., Chebotareva N.A., Asryants R.A., Muronetz V.I., Saso L., Yudin I.K., Kurganov B.I. (2006) *Biochemistry*, 45, 13375-13384.
9. Khanova H.A., Markossian K.A., Kleymenov S.Yu., Levitsky D.I., Chebotareva N.A., Golub N.V., Asryants R.A., Muronetz V.I., Saso L., Yudin I.K., Muranov K.O., Ostrovsky M.A., Kurganov B.I. (2007) *Biophys. Chem.*, 125, 521-531.

## ДНК-ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ НОВОГО СТ АНТИГЕНА BORIS ЗАЩИТИТ ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ ОТ РМЖ

Мкртычян М.

Институт Молекулярной Медицины, Калифорния, США, mikayel@immed.org

### Введение

Несмотря на то, что классические методы лечения опухолевых заболеваний, такие как хирургия, радио- и химиотерапия, уже применяются довольно долгое время, качественных успехов в лечении опухолевой патологии с помощью этих методов до сих пор добиться не удалось. В настоящее время прогресс в лечении онкологических заболеваний связан с существенным прорывом в иммунологии, молекулярной биологии и понимании причин возникновения опухолевой клетки.

Использувавшиеся ранее способы иммунизации основаны на введении в организм животного или человека соответствующих антигенов. Однако в последние годы возникло новое направление, связанное с введением в организм нуклеиновых кислот (ДНК или РНК, так называемые ДНК- или РНК-вакцины), кодирующих эти белки [1-4].

ДНК-вакцины представляют собой генетическую последовательность, которая кодирует опухолевый антиген. Она встроена в систему доставки (плазмида, вирусный вектор и т.д.) и содержит промотор, обеспечивающий экспрессию экзогенного белка в эукариотических клетках. В результате активации введенного гена повышается локальная концентрация необходимого антигена, и, вследствие этого, развивается иммунный ответ на него [5].

В последнее время были разработаны различные вакцины против РМЖ на основе различных, так называемых опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) с использованием различных моделей животных [6-8]. Начиная с 1980-х годов были идентифицированы и клонированы различные ОАА [9], и сегодня известно более 60 человеческих ОАА [10].

Ген *BORIS* был обнаружен и описан в 2002-ом году и относится к семейству так называемых Cancer Testis (CT) генов. Он (ген) экспрессируется только в семенниках на определенной стадии развития и в опухолевых клетках [11, 12]. У женщин этот белок практически отсутствует. Молекула *BORIS* была охарактеризована как ДНК-связывающий белок, который имеет 11 повторяющихся доменов (Zing Fingers (ZF)), которые сходны с доменами другого белка – CTCF (фактор транскрипции), но отличается от него N- и C-концами [11]. Факт экспрессии молекулы *BORIS* в опухолевых клетках и его отсутствие в нормальных тканях позволяет надеяться на его успешное использование в иммунотерапии опухолей.

### Материалы и методы

Восьми-десятидневные самки мышей BALB/c были приобретены из Jackson Laboratories (Мериленд, США) и содержались в виварии Института старения мозга и деменции при Университете Калифорнии Ирвайн согласно требованиям IACUC. Линия раковых клеток 4T1 была приобретена из ATCC, Вирджиния, США. Плазмиды, кодирующие молекулярные адьюванты IL12 и IL18, были приобретены из компании Ivivogen (Калифорния, США), адьювант QuilA из Sigma (Миссури, США). Плазмида, кодирующая мутированный антиген *BORIS*, была сконструирована как описано ранее [13]. Рекомбинантный белок mBORIS очищался как описано [14].

Мыши иммунизировались раз в две недели (четыре иммунизации) с помощью генной "пушки" (Gene Gun). Вкратце, плазмиды, кодирующие mBORIS, IL12 и IL18, были посажены на золотые частицы (диаметр – 1 микрон (Bio Rad, Калифорния, США)), как описано [14], и нанесены на пластиковые трубки. Пластиковые трубки были порезаны на "пули" и использованы для иммунизации. Каждая мышь бомбардировалась тремя "пулями" в предварительно побритый живот.

Через 10 дней после последней иммунизации мышам в молочную железу было имплантировано  $7 \times 10^3$  4T1 клеток в 50 мкл фосфатно-солевого буфера. Объем опухоли измерялся с помощью линейки каждые 2-3 дня после введения 4T1- клеток в молочную железу и рассчитывался по формуле:  $L \times (W^2)/2$ , где L – длина, а W – ширина опухоли. Мыши были терминированы методом газовой ( $CO_2$ ) асфиксии, когда объем опухоли достигал  $1.5 \text{ cm}^3$ .

Все статистические параметры, включая средние значения, стандартные отклонения, статистическая достоверность рассчитывались с помощью программы GraphPad Prism 3.0. Статистическая достоверность между группами рассчитывалась с использованием теста One-way ANOVA (значение P меньше 0.05, принималось как статистически достоверное). Выживаемость животных представлена в виде кривой Каплана-Мейера.

### Результаты и обсуждение

Как было показано нами [14] белковая и ДНК- вакцины на основе антигена BORIS способны индуцировать антиген-специфическую Т клеточную пролиферацию с выраженным Т хелперным типа 1 (Th1) и Т хелперным типа 2 (Th2) цитотоксическим профилем соответственно. Белковая вакцина индуцировала значительный уровень антиген-специфических антител в иммунизированных животных (титры антител от 1:150,000 до 1:280,000) и Th2 тип клеточного ответа (больше клеток продуцирующих интерлейкин IL4, чем  $IFN\gamma$ ) без генерации цитотоксических Т лимфоцитов (CTL). В отличие от белковой вакцины, ДНК кодирующая модифицированный антиген BORIS отдельно и в смеси с молекулярными адьювантами IL12 и IL18, индуцировала Th1 тип Т клеточного ответа и сильную цитолитическую активность (10-15 % и 25-30 % убийств немодифицированных клеток 4T1 мышинного РМЖ соответственно) без генерирования значительного количества антител.

В этой работе мы проанализировали противоопухолевый потенциал белковой и ДНК вакцин на основе модифицированной молекулы BORIS (mBORIS) в мышинной модели РМЖ. В этой модели мы использовали BALB/c мышей и немодифицированные 4T1 опухолевые клетки. Важно отметить, что эта клеточная линия природно экспрессирует молекулу BORIS, как мы показали ранее, используя методы RT-PCR и проточной цитометрии [13, 14], тем самым представляя собой идеальную модель для тестирования противоопухолевого потенциала наших вакцин. Более того, эта модель очень близка ситуации РМЖ у человека, хотя и основана на очень агрессивных, неиммуногенных и метастазирующих клетках 4T1 [15-19].

ДНК-вакцина была сконструирована как описано ранее [13] и основана на плазмиде, кодирующей мутированный антиген BORIS (pmBORIS), в котором удалена природная ДНК-связывающая функция.

Две экспериментальные группы мышей BALB/c (8 мышей в группе) были иммунизированы с помощью генной "пушки" (gene gun) антигеном pmBORIS (9 мкг/мышь) или антигеном pmBORIS в смеси с плазмидами, кодирующими молекулярными адьювантами IL12 и IL18 (pmBORIS/pIL12/IL18 – 9мкг/3мкг/3мкг на мышь), как описано ранее [13, 14, 20]. Другая экспериментальная группа мышей (n=8) подкожно иммунизировалась рекомбинантным протеином mBORIS (100 мкг/мышь) в смеси с адьювантом QuilA. Контрольным группам мышей (n = 8) вводилась плазида, кодирующая молекулярные адьюванты (pIL12/IL18) или адьювант QuilA. Еще одна контрольная группа мышей оставалась неиммунизированной. Мыши из всех групп иммунизировались четыре раза с интервалом в две недели. Через 10 дней после последней иммунизации, все мышам в молочную железу было введено  $7 \times 10^3$  клеток 4T1 на мышь, и производился мониторинг роста опухоли и выживаемости животных.

ДНК-вакцины pmBORIS и pmBORIS/pIL12/IL18 индуцировали статистически достоверную защиту животных от опухоли 4T1, хотя иммуноген pmBORIS/pIL12/IL18 защищал животных больше (рис. 1 и 2).

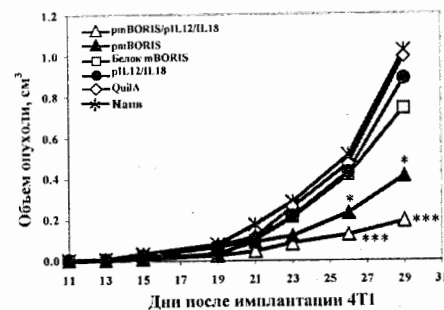


Рис. 1. Иммунизация иммуногенами pmBORIS и pmBORIS/pIL12/IL18 статистически достоверно ингибировала рост опухоли в BALB/c мышах (\*P < 0,05 и \*\*\*P < 0,001 соответственно по отношению к контролям) на 26 и 29 дни после имплантации  $7 \times 10^3$  4T1 клеток, когда все мыши во всех группах были живы. Рекомбинантный белок mBORIS не ингибировал роста опухоли

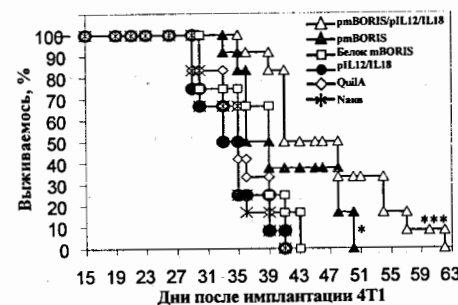


Рис. 2. Иммунизация иммуногенами pmBORIS и pmBORIS/pIL12/IL18 статистически достоверно увеличивала выживаемость мышей (\*P < 0,05 и \*\*\*P < 0,001 соответственно по отношению к контролям) после имплантации  $7 \times 10^3$  4T1 клеток. Рекомбинантный белок mBORIS не улучшал показателя выживаемости

Хотя у всех экспериментальных животных образовался РМЖ, 50% мышей из группы pmBORIS/pIL12/IL18 и 37,5 % из группы pmBORIS были живы на 41-ый день после имплантации опухоли, когда все животные из всех контрольных групп погибли от РМЖ (Рис. 2). Неудивительно, что иммунизация рекомбинантным белком, которая индуцирует высокий титр антител и Th2 тип клеточного

ответа и не индуцирует цитотоксической активности [14], не приводила к защите животных от опухоли.

### Заключение

В приведенной работе мы протестировали противоопухолевый эффект белковой и ДНК-вакцин на основе нового СТ антигена BORIS в очень сложной и агрессивной мышинной модели РМЖ. Ранее была проанализирована способность этих вакцин индуцировать иммунный ответ и была показана Th1 направленность ДНК и Th2 направленность белковой вакцин. Исследования по защите вакцинированных животных от РМЖ показали, что белковая вакцина, хотя и индуцирует высокий титр BORIS-специфичных антител и выраженный Th2 тип Т клеточного ответа, но не защищает животное от опухоли. В отличие от белковой, ДНК-вакцина, индуцирующая Th1 тип Т клеточного ответа и выраженную цитолитическую активность, статистически достоверно ингибирует рост опухоли у иммунизированных животных и статистически достоверно повышает их выживаемость в агрессивной мышинной модели РМЖ, что говорит о необходимости индукции цитотоксического Т клеточного иммунного ответа для успешной терапии опухолевых заболеваний.

### Литература

1. Maxwell-Armstrong CA, Durrant LG, Scholefield JH. Colorectal cancer vaccines. *Br J Surg* 1998; 85: 149-154.
2. Gluckman JC, Canque B, Chapuis F, Rosenzweig M. In vitro generation of human dendritic cells and cell therapy. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997; 3: 187-196.
3. Moelling K. DNA for genetic vaccination and therapy. *Cytokines Cell Mol. Ther.* 1997; 3: 127-135.
4. Weber LW *et al.* Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1258-1264.
5. Wolff JA *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-1468.
6. Yang S *et al.* Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. *Int. J. Cancer* 1999; 83: 532-540.
7. Abrams SI *et al.* Adoptive immunotherapy as an *in vivo* model to explore antitumor mechanisms induced by a recombinant anticancer vaccine. *J. Immunother* 1997; 20: 48-59.
8. Chen L *et al.* Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 523-532.
9. Knuth A *et al.* Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 2804-2808.
10. Van den Eynde B, Van der Bruggen P. T-cell defined tumor antigens. <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>, 2004.
11. Loukinov DI *et al.* BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 6806-6811.
12. Klenova EM, Morse HC, 3rd, Ohlsson R, Lobanenko VV. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2002; 12: 399-414.
13. Loukinov D *et al.* Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem.* 2006.
14. Ghochikyan A *et al.* Epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS is widely expressed TAA inducing anti-tumor specific T cell responses. *J Immunol.* 2007; 178: 556-573.
15. Miller FR, Miller BE, Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 1983; 3: 22-31.
16. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992; 52: 1399-1405.
17. Lelekakis M *et al.* A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 163-170.
18. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.* 1998; 58: 1486-1493.
19. Pulaski BA *et al.* Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res.* 2000; 60: 2710-2715.
20. Ghochikyan A *et al.* Generation and characterization of the humoral immune response to DNA immunization with a chimeric beta-amyloid-interleukin-4 minigene. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 3232-3241.

## СТАБИЛЬНОСТЬ Х-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ И ЕГО БЕЛКА ОБОЛОЧКИ: ДЕЙСТВИЕ РАЗУПОРЯДОЧИВАЮЩИХ АГЕНТОВ

<sup>1,2</sup> Немых М.А., <sup>2</sup> Добров Е.Н.

<sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия, [nemykh@belozersky.msu.ru](mailto:nemykh@belozersky.msu.ru)

Среди всех групп спиральных вирусов растений группа потексвирусов является одной из наиболее изученных. Тем не менее, вторичная и третичная структура белка оболочки (БО) типового представителя этой группы – Х-вируса картофеля (ХВК) в составе вириона остается до сих пор неизвестной. Выделенный из вирионов БО ХВК характеризуется рядом аномальных свойств: не образует спиральных агрегатов, вступает *in vitro* только в неспецифическую самосборку с собственной РНК [1, 2] и претерпевает глубокую структурную перестройку («ремоделирование») в составе вирионов после взаимодействия с кодируемым вирусом неструктурным ТБ1-белком [3, 4]. Весьма вероятно, что эти особенности белка оболочки ХВК могут отражаться на его физико-химических свойствах. В 70-е годы было опубликовано несколько работ, посвященных изучению физико-химических характеристик свободного БО ХВК и БО в составе вирионов (см. например [5]), но ни в одной из этих работ не исследовалась стабильность этого белка по отношению к действию различных разупорядочивающих агентов. Мы предприняли такое исследование.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) определены температуры денатурации БО и вирионов ХВК (рис. 1). По данным ДСК кооперативное «плавление», выделенного соевым методом, БО ХВК, происходило уже при 33.5 °С, а «плавление» вирионов ХВК – при 62 °С. В обоих

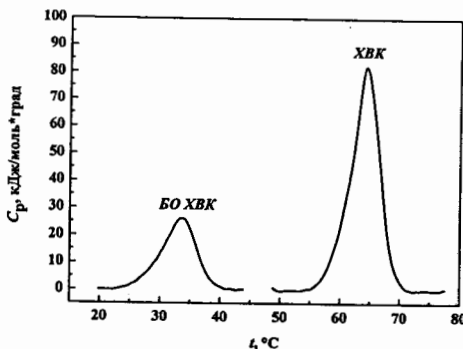


Рис.1. Кривые теплопоглощения ХВК и БО ХВК в 10 мМ Нерес-NaOH, pH 7,5. Скорость сканирования 1 град/мин. Концентрация препаратов 1 мг/мл

случаях процесс денатурации был необратимым. Таким образом, из данных ДСК следует, что БО ХВК, с одной стороны, при комнатной температуре еще находится в некоем частично структурированном состоянии, характеризующемся кооперативным теплопоглощением при термической денатурации, а с другой стороны, обладает чрезвычайно низкой стабильностью.

Молекула БО ХВК содержит 5 остатков триптофана и 2 остатка тирозина, и поэтому является весьма удобным объектом для изучения методами собственной флуоресценции и «ближней» КД-спектроскопии. БО ХВК отличается от подавляющего большинства других белков

отрицательными величинами КД в этой области. Однако и в случае этого белка, наблюдалось полное исчезновение сигнала КД в этой области в ходе термической денатурации уже при 35 °С, и температура «плавления» по этому критерию оказалась близкой к температуре «плавления» этого белка по данным ДСК. При этом нагревание до 35 – 40 °С не приводило к изменениям в «дальнем» спектре КД. Из этого следует, что наблюдаемая «денатурация» является лишь частичной и затрагивает только третичную структуру субъединиц, не затрагивая их вторичной структуры.

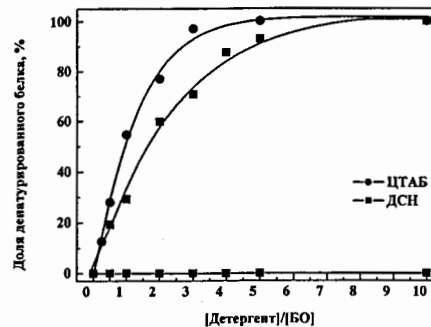


Рис. 2. Денатурация БО ХВК по действию ДСН и ЦТАБ в 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 при 25 °С. Процент денатурированного БО ХВК вычислялся из спектров КД в «ближнем» и «дальнем» УФ-свете

Далее мы изучили воздействие на БО ХВК анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) и катионного детергента цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ). Оказалось, что эти агенты уже при 25 °С и в микромолярных концентрациях разрушают третичную структуру этого белка. Из рисунка 2 видно, что практически полное исчезновение сигнала КД БО ХВК в «ближнем» УФ свете наблюдается уже при

молярном соотношении ДСН:БО равном 5:1 и молярном соотношении ЦТАБ:БО равном 3:1. Такие соотношения соответствуют 140 мкМ и 84 мкМ детергентов. При этом эти детергенты даже в миллимолярных концентрациях не изменяли исходного спектра «дальнего» КД БО ХВК (рис. 2), из чего следует, что эти агенты не вызывают изменений в содержании  $\alpha$ -спиральных участков в молекулах свободного БО ХВК. Детергенты (и, прежде всего ДСН) часто используются для дезагрегации и денатурации белков. Но эти эффекты обычно проявляются при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования, то есть в 40 и более раз высоких, чем в нашем случае.

Тот факт, что примерно одинаковые и весьма низкие концентрации ЦТАБ и ДСН вызывают быстрое разрушение третичной структуры БО ХВК, говорит о том, что, это разрушение происходит за счёт гидрофобного связывания хвостов двух - трех молекул детергентов с каким-то одним и тем же гидрофобным сайтом на субъединице белка.

Препараты вируса по данным «ближнего» и «дальнего» КД разрушались 5.4 мМ ДСН при 25 °С за 30 минут, и при этом положение первого пика при 208 нм не изменялось, и его интенсивность возрастала на ~ 20 %, а второй пик сдвигался с 228 нм к 222 нм (как на свободном белке). За то же время интенсивность спектра «собственной» флуоресценции снижалась до 50 % от исходной, а положение максимума сдвигалось от 328 нм (цельный вирус) до 335 нм (свободный БО), что говорит о переходе белка в состояние сходное с состоянием свободного БО в таких же условиях.



Следует отметить, что спектр «дальнего» КД БО в составе вириона резко отличается от спектра свободного белка (вклад РНК в спектр КД ХВК в области 198 - 250 нм крайне незначителен). Спектр КД вирионов ХВК имеет меньшую интенсивность и, кроме того, второй отрицательный пик в спектре цельного ХВК располагается при 228 нм, а не при 222 нм как у других белков с высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей. Основываясь на сумме всех имеющихся данных, мы полагаем, что «дальний» спектр КД вирионов ХВК имеет искаженную природу. Это искажение связано либо с дифференциальным рассеянием право- и левополяризованного света, либо с межсубъединичными взаимодействиями в цельных вирусных частицах. Предположение об артефактном характере спектра КД цельного ХВК впервые было высказано ещё Гомером и Гудмэном в 1975 году [5].

Хорошо известно, что ЦТАБ эффективно осаждает свободные нуклеиновые кислоты [6]. Мы инкубировали препараты ХВК в 10 мМ Трис-НСI, pH 7,5 с различными концентрациями ЦТАБ при 25 °С в течение 60 минут, центрифугировали смеси при 15000 g, измеряли спектры поглощения супернатантов и осадков и рассчитывали количество содержащихся в них БО и РНК. Результаты экспериментов такого рода представлены в таблице. Оказалось, что вирионы ХВК значительно менее устойчивы к действию ЦТАБ, чем к действию ДСН. ЦТАБ вызывал полное разрушение ХВК уже при концентрации 160 мкМ. В 80 мкМ ЦТАБ наблюдалось частичное разрушение. К сожалению, даже эти концентрации ЦТАБ оказываются намного выше концентраций (24 -72 мкМ), вызывающих разрушение третичной структуры свободного БО ХВК. Любопытно, что точно такая же концентрация ЦТАБ вызывала полное разрушение при 25 °С и вирионов считающегося значительно более стабильным ВТМ (табл. 1). Столь эффективное разрушение вирионов ХВК (и ВТМ) под действием ЦТАБ наверняка определяется высоким сродством катионов ЦТАБ к фосфатным группам РНК. Соотношение ЦТАБ:БО равно 20:1, соответствует его соотношению с фосфатными группами РНК равному 4:1. (В частицах ХВК на одну субъединицу БО приходится 5 нуклеотидов).

Таблица 1.

молярное соотношение ЦТАБ:БО	Процент от содержания в исходном образце			
	супернатант от центрифугирования при 15000 g		осадок растворенный в 0.1 % ДСН	
	белок	РНК	белок	РНК
ЦТАБ:ХВК = 10:1	40	15	45	56
ЦТАБ:ХВК = 20:1	67	0	30	62
ЦТАБ:ВТМ = 20:1	70	0	24	59

Таким образом, вся сумма полученных данных говорит о высокой лабильности третичной структуры свободного БО ХВК. Включение субъединиц БО в состав вирионов ХВК приводит к существенной стабилизации их структуры. В то же время, вторичная структура этого белка характеризуется значительной стабильностью. Сочетание лабильной укладки и стабильной вторичной структуры, вполне может являться структурным основанием способности этого белка находиться в составе вирионов в двух разных состояниях. Такое сочетание и должно

быть характерно для молекул белков, которые могут легко изменять свою третичную структуру.

#### Литература

1. Tollin, P & Wilson, H. R. 1988. Particle structure. In: *The Plant Viruses: The Filamentous Plant Viruses*. Ed. Milne R.C. N.Y.: Plenum Press. 4,51-83.
2. Dobrov E.N, Atabekov J.G. 1989.Reconstitution of plant viruses. In: *Plant Viruses*. Ed. Mandahar C.L. Boca Raton, Florida: Inc.: CRC Press, 173-205.
3. Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. 2003. *Journal of Molecular Biology*. 333, 565-572.
4. Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V. Yu. 2000. *Virology*. 271, 259-263.
5. Homer R.B., Goodman R.M. 1975. *Biochim. Biophys. Acta*. 378, 296-304.
6. Zhu D.M., Evans R.K. 2006. *Langmuir*. 22, 3735-3743.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕФЕНЗИНОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM KIHARAE* DOROF. ET MIGUSCH

<sup>1</sup>Одинцова Т.И., <sup>2</sup>Егоров Ц.А., <sup>1</sup>Коростылева Т.В., <sup>1</sup>Козловская Г.В.,  
<sup>1</sup>Пухальский В.А.

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия  
<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия  
odinsova2005@rambler.ru

При взаимодействии растения и патогена включается цепь процессов, направленных на преодоление инфекции. К ним относится первичное взаимодействие между R-генами растения и Avr-генами патогена, которое приводит к активации сигнальных путей с участием активных форм кислорода, оксида азота, салициловой и жасмониновой кислот и этилена, что в свою очередь приводит к индукции защитных реакций в растениях, к которым относятся: сверхчувствительная реакция, повышение уровня экспрессии гена фенилаланин-аммиак лиазы, синтез соединений, укрепляющих клеточную стенку, а также разнообразных антимикробных соединений, таких как фитоалексины, PR-белки и антимикробные пептиды.

Дефензины относятся к одному из классов цистеин-богатых антимикробных пептидов, обнаруженных как в животном, так и в растительном царстве (1, 2). Они обладают антифунгальной, антибактериальной и инсектицидной активностями, что было продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и при исследовании трансгенных растений. Поиск новых высокоактивных дефензинов представляет большой интерес для создания трансгенных растений устойчивых к патогенным микроорганизмам, а также для разработки новых лекарственных препаратов в качестве альтернативы традиционно используемым антибиотикам.

Цель настоящей работы состояла в изучении дефензинов семян пшеницы *Triticum kiharae*, обладающей высокой устойчивостью к основным патогенам пшеницы. Для выделения дефензинов из этого вида был разработан оригинальный метод, включающий кислотную экстракцию семян и различные типы высокоэффективной жидкостной хроматографии (аффинную, гель-проникающую и обращенно-фазовую) в сочетании с масс-спектрометрией (3). Выделенные пептиды секвенировали путем автоматической деградации по Эдману на секвенаторе Procise модели 492 (Applied Biosystems). Молекулярные массы пептидов определяли путем MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре M@LDI-LR (Micromass, Великобритания).

В результате из семян пшеницы *T. kiharae* Dorof. et Migusch. было впервые выделено и секвенировано 13 дефензинов, которые по гомологии N-концевых последовательностей были подразделены на 3 группы (I-III) (Таблица 1).

Группа I включала 8 новых дефензинов, названных D дефензинами, для которых были определены полные аминокислотные последовательности (Табл. 1). D дефензины различались как по длине молекулы, так и по заряду. Как и большинство антимикробных пептидов, все они, кроме D1.1, положительно заряжены. При сравнении аминокислотных последовательностей D дефензинов была выяв-

лена высокая гомология структуры. Более вариабельными, как по длине, так и по аминокислотной последовательности, оказались C-концевые фрагменты молекул,

Таблица 1. Аминокислотные последовательности дефензинов семян *T. kiharae*

Пептид	Аминокислотная последовательность	Мол. масса (Da), изм./выч.
<b>Дефензины (группа I, D дефензины)</b>		
Tk-AMP-D1	RTCQSQSHKFKGACFSDTNCDSVCRTEFPRGQCQNHHVERKCYCERDC	5735/5736
Tk-AMP-D2	RTCESQSHKFKGPCFSDSNCAVCRTEFPRGQCQNHHVERKCYCERSC	5691/5691
Tk-AMP-D1.1	RDCESDSDSHKFKGACFSDTNCANVCQTEGFTAGKCVGVQRHCHCTKDC	5130/5130
Tk-AMP-D5	RECRSESKKFVGLCVSDTNCASVCLTEFPPGGKCDGYRRCFCTKDC	5151/5152
Tk-AMP-D6	RDCRSQSKTFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDGYRRCFCTKDC	5089/5091
Tk-AMP-D6.1	RECRSQSKQFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDGYRRCFCTKDC	5130/5132
Tk-AMP-D3	RDCCKSDSHKFKGACFSDTNCANVCQTEGFTRGKCDGINCHCIKDC	4970/4971
Tk-AMP-D4	RDCTSQSHKFKVGLCLSDRNCASVCLTEYFTGGKCDHRRRCVCTKGC	4980/4982
<b>Дефензины (группа II)</b>		
Tk-AMP-γ1	KICRRRSAGFK <sup>10</sup> ...	5250
Tk-AMP-γ2	KVCRQRSAGFK <sup>10</sup> ...	5141
Tk-AMP-γ3	KICRQRSAGFK <sup>10</sup> ...	5265
<b>Дефензины (группа III)</b>		
Tk-AMP-ω1	RICTGKSQNH <sup>10</sup> ...	5346
Tk-AMP-ω2	RVCTGKSQNH <sup>10</sup> ...	5342

в частности петля, соединяющая бета-2 бета-3 тяжи вторичной структуры. Интересно, что по имеющимся данным именно с этим участком связывают функции дефензинов. Выявленные нами различия в аминокислотных последовательностях этого участка молекулы, по всей видимости, свидетельствуют о различных функциях D дефензинов. Сравнение аминокислотных последовательностей D дефензинов с дефензинами других злаков по программе CLUSTAL W (Таблица 2) показало наибольшую гомологию с TAD1 – дефензином, индуцированным в пшенице при холодовой адаптации, что свидетельствует о том, что обнаруженные нами D дефензины также могут принимать участие в ответе растения на стрессовые факторы окружающей среды. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей также выявил определенную гомологию с дефензинами других представителей семейства Poaceae: *Sorghum bicolor* и *Zea mays*. В то же время сходства с дефензинами других семейств значительно меньше (Таблица 1).

Группа II состояла из 3 гомологичных пептидов, два из которых были ранее обнаружены в семенах твердой пшеницы *Triticum durum* (Таблица 1) (4).

В группе III оказались 2 новых пептида гомологичные омега-гордотининам (дефензинам) ячменя (Таблица 1) (5).

Обращает на себя внимание тот факт, что уровень экспрессии дефензинов трех выделенных групп различен, для дефензинов группы I он примерно на порядок ниже, чем для двух других групп. Можно предположить, что дефензины группы I являются индуцибельными компонентами защитной системы растения, синтез которых активируется при различных стрессовых воздействиях, в то время как дефензины групп II и III конститутивно образуются в семенах. Не исключено также, что для выделенных дефензинов характерна тканеспецифичная экспрессия.

Таким образом, в настоящей работе на примере одного вида пшеницы впервые продемонстрирован высокий внутривидовой полиморфизм дефензинов семян, значение которого пока остается неясным. Возможно, он связан с различной



## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена электрофореграмма белков нуклеоидов хлоропластов *Arabidopsis thaliana* (молекулярные массы, соответственно, 67, 40, 18 и 14 кДа), взятых для масс-спектрометрии.

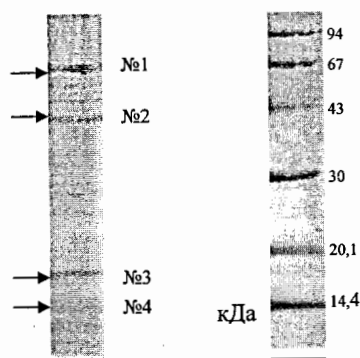


Рис. 1. Распределение белков нуклеоидов хлоропластов *Arabidopsis thaliana* при электрофорезе в ДДС-Na-ПААГ. Стрелками обозначены белки, взятые для масс-спектрометрического исследования. Правая колонка – метчики

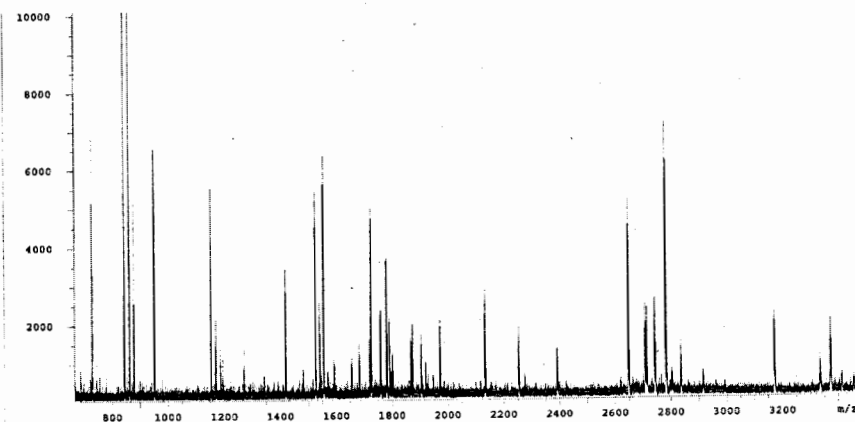


Рис. 2. MALDI-TOF масс-спектр триптических пептидов белка №1 нуклеоидов хлоропластов *Arabidopsis thaliana*. По оси абсцисс – массовые числа ( $m/z$ ), по оси ординат – относительная интенсивность сигнала

На рис. 2 приведен масс-спектр белка № 1 нуклеоидов хлоропластов *Arabidopsis thaliana*. Число триптических пептидов, по которым вели поиск, равнялось 32.

После проведения масс-спектрометрического анализа были получены данные о гомологии исследованных нами белков с известными полипептидами. Эти данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. Идентификация белков нуклеоидов хлоропластов *Arabidopsis thaliana*

Идентификационный номер белка	Масса белка, кДа	Сколько пептидов совпало/общее число пептидов	Белок	Растение
Белок №1				
gi 1732570	60	20/32	Бета-глюкозидаза	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Белок №2				
gi 15217460	38	7/25	Гипотетический белок	—//—
Белок №3				
gi 1208644	15	4/24	Гистон Н3	<i>Dumasia villosa</i>
Белок №4				
gi 224293	11	5/27	Гистон Н4	<i>Triticum aestivum</i>

Возможное наличие в составе белков нуклеоидов хлоропластов гороха гистонов или гистоноподобных белков было показано ранее [6, 8]. При электрофорезе в ПААГ белков основного характера, экстрагированных из нуклеоидов 0,4 н. серной кислотой, были обнаружены 2–3 белка, совпадающие по электрофоретической подвижности с гистонами Н2А+Н2В и Н3 клеточных ядер гороха [6]. При анализе белков тритон-нерастворимой фракции хлоропластов гороха методом масс-спектрометрии среди широкого спектра белков также были выявлены гистоны Н3 и Н2В. Однако неясно, являются ли эти белки нуклеоидов истинными гистонами или НУ-подобными белками клеточных органелл [4].

Среди белков нуклеоидов нами была обнаружена также  $\beta$ -глюкозидаза. Возможно, что этот фермент участвует в упаковке нуклеоидов хлоропластов подобно сульфит-редуктазе [3].

Настоящая работа является одним из этапов изучения протеома нуклеоидов хлоропластов.

Работа частично финансировалась из гранта РФФИ 06-04-48923а.

### Литература

- Oleskina Y.P., Yurina N.P., Odintsova T.I., Egorov Ts.A., Otto A., Wittmann-Liebold B., Odintsova M.S. *Biochem. and Mol. Biol. Int.* 1999. V. 47. P.757–763.
- Sato N., Albrieux C., Joyard J., Douce R., Kuroiwa T. *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 555–561.
- Chi-Ham C.L., Keaton M.A., Cannon G.C. and Heinhorst S. *Plant Mol. Biol.* 2002. V. 49(6). P. 621–631.
- Phinney B.S. and Thelen J.J. *J. Protein Res.* 2005. V. 4. P. 497–506.
- Da Costa E. Silva, O., Lorbiecke R., Garg P. et al. *The Plant J.* 2004. V. 38(6). P. 923.
- Юрина Н.П., Белкина Г.Г., Пожидаева Е.В., Турищева М.С., Одинцова М.С. *Мол. биология.* 1988. Т. 22(1). С. 117–124.
- Говорун И.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В. и др. *Биохимия.* 2003. Т. 68(1). С. 52–60.
- Белкина Г.Г., Юрина Н.П., Одинцова М.С. *Биохимия.* 1991. Т. 56(10). С. 1822–1831.

# ВЛИЯНИЕ РЕТРОГРАДНЫХ СИГНАЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ СТРЕССОВОГО БЕЛКА ПЛАСТИД *Elip* И ГЕНОВ БЕЛКОВ ФОТОСИНТЕЗА *Lhcb 1*, *RbcS*

Осипенкова О.В., Юрина Н.П.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, [osipenkova.olga@mail.ru](mailto:osipenkova.olga@mail.ru)

Координация экспрессии генов хлоропластных белков, кодируемых двумя клеточными геномами, достигается путем обмена информацией между ними, в котором участвуют специфические регуляторные сигналы, идущие как от ядра к пластидам, так и от пластид к ядру. Большое значение приобретают исследования ретроградных (пластидных) сигналов, «запускающих» синтез кодируемых ядром пластидных белков, необходимых для функционирования этих органелл. К настоящему времени показано участие пластидных сигналов в регуляции экспрессии генов белков фотосинтеза, таких как белок малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*RbcS*) и белок периферической антенны ФСII (*Lhcb1*) [1].

Известно, что свет является не только источником энергии при фотосинтезе и активным морфогенетическим сигналом для растений, но и главным источником стрессовых повреждений растительной клетки. У растений существует несколько систем защиты от стрессовых воздействий. Одной из них является индукция белков *Elip* (Early Light-Inducible Proteins), которые синтезируются в растениях на ранних этапах зеленения этиолированных проростков, а также в условиях светового стресса, засухи и действия низких температур [2]. У высших растений белки, относящиеся к мультигенному семейству *Elip*, кодируются ядром, синтезируются на цитоплазматических рибосомах и в форме предшественников пост-трансляционно поступают в хлоропласты [3]. Обнаружено два мультигенных семейства *Elip*: высокомолекулярные белки – 17 кДа и низкомолекулярные – 13 кДа. Изучение участия хлоропластов в регуляции экспрессии именно этих белков представляет большой интерес, так как стрессовые белки играют важную роль в защитных реакциях растительной клетки.

В настоящее время с помощью ингибиторного анализа и исследования мутантов обнаружены пять возможных путей передачи сигналов от хлоропластов к ядру (пять классов ретроградных сигналов). Один из этих путей зависит от продукта(-ов) пластидного синтеза белков; второй – связан с синглетными формами кислорода; в третьем пути участвует перекись водорода, генерируемая хлоропластами; четвертый сигнальный путь контролируется редокс-состоянием электрон-транспортной цепи фотосинтеза и в пятом участвуют интермедиаты биосинтеза тетрапирролов [4]. Эти пластидные сигналы являются частью сложной сигнальной сети, связывающей функциональное и физиологическое состояние хлоропластов с экспрессией ядерных генов.

В нашей работе мы попытались оценить участие трех классов пластидных сигналов в регуляции транскрипции ядерных генов низкомолекулярного хлоропластного белка *Elip*. Было исследовано участие промежуточных продуктов биосинтеза тетрапирролов, продуктов синтеза пластидных белков и редокс-состояния электрон-транспортной цепи хлоропластов в регуляции экспрессии этих генов у ячменя. Исследовали экспрессию генов *Elip* в проростках ячменя, содержащих фотоповрежденные хлоропласты. Фотодеструкция использовалась для того,

чтобы заблокировать функциональную активность хлоропластов и выяснить экспрессируется ли ген *Elip* в этом случае. Маркерными генами служили ядерные гены белков фотосинтеза (*Lhcb*, *RbcS*). Показано, что в условиях фотодеструкции хлоропластов, вызванной норфлуразоном (NF), ингибитором фитоиндесатуразы, в пластидах отсутствуют фотосинтетическая активность, тилакоидные мембраны и рибосомы. Однако ДНК и оболочка органелл повреждаются сравнительно мало.

При сравнении экспрессии четырех ядерных генов – генов стрессовых белков пластид *Elip* и *Hsp32* и генов белков фотосинтеза *Lhcb* и *RbcS*, в проростках ячменя, содержащих фотоповрежденные хлоропласты, с помощью нозерн-гибридизации показано, что ген *Hsp32* экспрессируется на 90-95 % в обработанных NF проростках, тогда как содержание транскриптов гена *Elip* составляло 50-70% от контроля. Гены *Lhcb1* и *RbcS* не транскрибируются у NF-обработанных растений. Из этого следует, что транскрипция генов белков фотосинтеза наиболее чувствительна к пластидному сигналу. Уровень транскрипции гена *Elip* снижен у фотоповрежденных растений. Это указывает на то, что хлоропласты контролируют экспрессию данного гена [5].

Чтобы изучить участие тетрапирролов в регуляции транскрипции ядерного гена *Elip*, а именно – роль Mg-протопорфирина IX (Mg-прото IX) и его монометилового эфира (Mg-прото IX-Me) в регуляции экспрессии ядерного гена низкомолекулярного пластидного белка *Elip*, были проведены опыты с 2,2'-дипиридиллом. Дипиридил блокирует биосинтез тетрапирролов, локализованных в хлоропластах, на стадии превращения Mg-прото IX-Me в протохлорофиллид, что приводит к накоплению в хлоропластах Mg-прото IX-Me [6].

В результате анализа данных ОТ-ПЦР (обратной транскрипции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией) было обнаружено, что уровень экспрессии гена белка светового стресса хлоропластов в проростках, обработанных 2,2'-дипиридиллом, ~ на 50 % ниже, чем в контрольных растениях.

Для выявления корреляции между уровнем экспрессии гена белка светового стресса и редокс-состоянием фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов использовали специфический ингибитор ФСII – 3-(3', 4'-дихлорфенил)-1,1'-диметилмочевину (DCMU), который блокирует транспорт электронов от ФСII к пулу пластохинонов, что предотвращает восстановление последнего. Известно, что именно пул пластохинонов и определяет редокс-состояние хлоропластов. Изменение редокс-состояния пула пластохинонов приводит к снижению транскрипции гена *Elip* примерно на 80 %.

При введении ингибитора с помощью инфльтрации наблюдается сильное снижение транскрипции гена *Elip*. Содержание транскриптов *Elip* у обработанных растений составляло всего 5 % от контроля. Результаты получены при оценке содержания транскриптов гена *Elip* методом ОТ-ПЦР.

Таким образом, в регуляции экспрессии гена хлоропластного белка светового стресса у ячменя участвуют не только тетрапирролы, но и другой класс пластидных сигналов, который определяется окислительно-восстановительным состоянием пула пластохинонов. Также показано, что редокс-состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов оказывает большее влияние на уровень транскрипции гена *Elip*, чем Mg-протопорфирин IX и его монометиловый эфир.

На основании вышеизложенного, нами предложена схема регуляции хлоропластами экспрессии ядерного гена хлоропластного белка светового стресса *Elip*. Накопление промежуточных соединений биосинтеза хлорофилла в оболочке хлоропластов приводит к снижению уровня экспрессии гена *Elip*. Экспрессии этого гена регулируется также с участием редокс-равновесия электрон-транспортной цепи фотосинтеза [7].

Таким образом, можно говорить о функционировании при регуляции экспрессии гена *Elip* двух классов пластидно-ядерного взаимодействия. Первый класс предполагает участие Mg-прото IX и Mg-прото IX-Me в инициации процессов, приводящих к изменению транскрипции этого гена. Поскольку в настоящее время не обнаружены последующие этапы пластидно-ядерного взаимодействия с участием тетрапирролов, их можно считать «медиаторами» пластидного сигнала. Второй класс пластидно-ядерного взаимодействия осуществляется при непосредственном участии электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Ингибирование транспорта электронов от ФСII к пулу пластохинонов в хлоропластах ячменя, в результате чего пул остается окисленным, вызывает понижение уровня транскриптов гена *Elip*.

Функционирование указанных двух классов пластидно-ядерного взаимодействия, приводящее к снижению уровня экспрессии ядерного гена белка светового стресса *Elip*, позволяет говорить о негативной регуляции экспрессии данного гена.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 06-04-48-923а).

#### Литература

1. Pfannschmidt T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. Trends Plant Sci. 2003. V. 8. P. 33-41.
2. Adamska I., Kruse E., Kloppstech K. Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll *a*. J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 8582-8587.
3. Montane M.H., Kloppstech K. The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? Gene. 2000. V. 258. P. 8.
4. Beck C.F. Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. Planta. 2005. V. 222. P. 743-756.
5. Юрина Н.П., Погульская Е.Н., Карапетян Н.В. Действие фотодеструкции пластид из норфлуразон-обработанных проростков на экспрессию ядерных генов, кодирующих стрессовые белки хлоропластов ячменя. Биохимия. 2006, Т. 71. № 4. С. 533-540.
6. Погульская Е.Н., Юрина Н.П., Карапетян Н.В. Участие тетрапирролов в регуляции экспрессии ядерного гена низкомолекулярного пластидного белка ELIP. Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. №3. С. 390-395.
7. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы растений: пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов. Принято в журнал Физиология растений. 2007.

#### ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ХИТОЗАНОМ

<sup>1</sup>Останина Е.С., <sup>1</sup>Варламов В.П., <sup>2</sup>Яковлев Г.И.

<sup>1</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва, Россия, katrine\_kzn@mail.ru

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва, Россия

Нарушение липидного метаболизма в организме человека может привести к развитию таких заболеваний как атеросклероз, диабет, ожирение и др. [1]. Это определило интерес к изучению молекулярного механизма действия липолитических ферментов и поиску соединений, влияющих на липидный обмен. Ингибиторы липаз (2-бис-оксоамид триацилглицерол, платикодин, тиазопонин, тетрагидролипостатин, пропроналол) широко используются как для структурно-функционального исследования ферментов, так и для изучения биологических эффектов подавления активности.

В последние годы в мировой и отечественной практике стали применять хитозан в качестве основного компонента в различных пищевых добавках, обладающих биологической активностью. Хитозан обладает гипохолестеринемическим и гиполипидемическим действием. Однако молекулярный механизм действия ещё полностью не ясен.

Хитозан представляет собой полисахарид, полимерная цепь которого в основном состоит из остатков D-глюкозамина и небольшого количества звеньев N-ацетилглюкозамина, связанных β-(1-4)-связями. Высокомолекулярный хитозан плохо растворим в водных растворах, но его растворимость существенно повышается при уменьшении молекулярной массы за счет расщепления β-гликозидных связей под действием кислот или ферментных препаратов [2]. Мы предположили, что положительно заряженный хитозан будет связываться с остатками дикарбоновых кислот (Glu/Asp) в активном центре липаз, тем самым блокируя ферментативную активность.

Изучение ингибирования хитозаном липолитической активности было выполнено на липазе из *Candida rugosa* и проростков пшеницы.

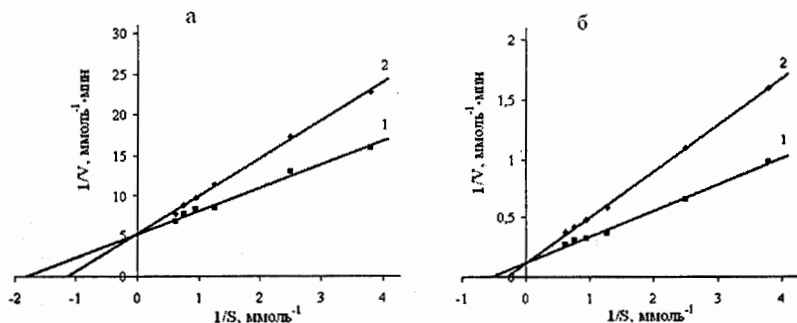
Из высокомолекулярного крабового хитозана был получен низкомолекулярный водорастворимый хитозан с использованием ферментного комплекса *Streptomyces kurssonovii* в условиях ранее подобранных для проведения ферментативного гидролиза: 1 М Na ацетатный буфер, pH = 5,2 ; 45° С [3]. Фермент-субстратное соотношение в данном опыте составляло 1:200; длительность процесса 1 ч. Молекулярную массу полученных низкомолекулярных хитозанов определяли методом капиллярной вискозиметрии на вискозиметре Убеллоде [4].

Таким образом, в результате деполимеризации высокомолекулярного хитозана (мол. вес 700 кДа, степень деацетилирования 85 %) был получен низкомолекулярный хитозан (мол. масса 5,2 кДа). Липолитическую активность измеряли спектрофотометрически [4], используя паранитрофенил пальмитат в качестве субстрата при t° = 30 °С; pH=7, t<sub>реак.</sub> = 10 мин.

Для оптимизации условий измерения констант ингибирования липаз хитозаном первоначально оценивали оптимальное время преинкубации фермента и ингибитора перед началом ферментативной реакции. Известно, что в растворах молекула липазы *C.rugosa* имеет две конформации [6]. В одной из них активный

центр фермента закрыт пептидным фрагментом молекулы, а в другой – открыт, что делает его доступным для связывания субстрата и других лигандов. В водных растворах липаза находится преимущественно в неактивной конформации с закрытым активным центром. При нахождении липазы в зоне раздела липид – вода ее активность резко возрастает за счет изменения равновесия между двумя конформациями в сторону значительного преобладания открытой конформации. Поэтому время установления концентрационного равновесия в растворе липазы после добавления ингибитора будет определяться характеристическим временем перехода между закрытой и открытой конформациями фермента. Степень ингибирования обеих липаз зависела от времени преинкубации вплоть до 30 мин, после чего оставалась примерно постоянной. Поэтому далее величина времени преинкубации соответствовала 30 мин. Максимальная активность ферментов при использовании в качестве субстрата паранитрофенил пальмитата достигалась при pH раствора равного 7,0.

На рисунке 1 приведена зависимость в обратных координатах начальных скоростей гидролиза паранитрофенил пальмитата липазой *C. rugosa* (а) и проростков пшеницы (б) от концентрации субстрата в отсутствии (прямые 1) и в присутствии хитозана (прямые 2).



Найденные значения константы скорости  $k_{cat}$ , константы Михаэлиса  $K_m$  и константы ингибирования  $K_i$  липаз хитозаном представлены в таблице 1.

Источник липазы	$k_{cat}$ , сек <sup>-1</sup>	$K_m$ , М	$k_{cat}/K_m$ , М <sup>-1</sup> ·сек <sup>-1</sup>	$K_i$ , М
<i>Candida rugosa</i>	2,0	$6 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Зародыши пшеницы	0,5	$5 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^2$	$0,9 \cdot 10^{-3}$

Эффективность гидролазного действия растительной липазы на паранитрофенил пальмитат, выражаемая бимолекулярной константой  $k_{cat}/K_m$ , в 33 раза ниже, чем для липазы *C. rugosa*. Это обусловлено различиями в величинах как  $k_{cat}$ , так и  $K_m$ . Величина  $K_i$  грибной и растительной липаз хитозаном близки между собой и равны  $1,4 \cdot 10^{-3}$  М и  $0,9 \cdot 10^{-3}$  М соответственно. Такая величина  $K_i$  типична для большинства известных ингибиторов.  $K_i$  платикодином панкреа-

тической липазы человека составляла  $0,2 \cdot 10^{-3}$  М [7], а панкреатической липазы свиньи пропранололом –  $0,6 \cdot 10^{-3}$  М [8].

С целью выяснения вклада электростатических взаимодействий положительно заряженных групп хитозана с отрицательно заряженными группами белка при образовании комплексов были изучены зависимости констант ингибирования липолитической активности хитозаном от концентрации добавленного в раствор хлорида натрия. Для расчета числа аминогрупп хитозана, образующих ионную пару с отрицательно заряженной группой белка, использовали уравнение  $\partial \log K_i / \partial \log [Cl^-] = -n$  [9]. Было найдено, что величина  $n$  имела значение 0,44 для липазы *C. rugosa* и 0,28 для липазы проростков пшеницы. Низкие значения величины  $n$  для обеих липаз свидетельствует о незначительном вкладе в свободную энергию комплексообразования электростатических взаимодействий зарядов хитозана и белка.

Таким образом, низкомолекулярный хитозан подавлял активность липазы *C. rugosa* и проростков пшеницы в гомогенных водных растворах со значениями  $K_i$  порядка 1 мМ. Величина эффекта ингибирования зависела от времени преинкубации хитозана с липазами и достигала максимума при времени преинкубации 30 мин. Хотя хитозан является поликатионом, вклад электростатических взаимодействий в его комплексообразование с липазами незначителен.

#### Литература

1. Poirier P., Thomas D., Bray G.A. // Circulation. 2006. V. 113. № 6. P. 898–918.
2. Muzzarelli R.A.A. // Chitin Handbook / Eds R.A.A. Muzzarelli, M.G. Peter Atec: Eur. Chitin Soc., 1997. P. 165–170.
3. Ильина А.В., Татарнинова Н.Ю., Тихонов В.Е., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 2. С. 173–177.
4. Gamzazade A.J., Shlimac V.M., Skljir A.M., Stykova E.V., Pavlova S.A., Rogosin S.V. // Acta Polymerica. 1985. V. 36. № 8. P. 420–424.
5. Hung T.H., Giridhar R., Chiou S.H., Wen-Teng W. // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2003. V. 26. № 1. P. 69–78.
6. Pernas M.A., Lopez C., Rua M.L. // FEBS Lett. 2001. V. 501. № 1. P. 87–91.
7. Kotsovolou S., Chiou A., Vergu R. // J. Org. Chem. 2001. V. 66. № 3. P. 962–967.
8. Zhao H.L., Kim Y.S. // Arch. Pharm. Res. 2004. V. 27. № 10. P. 968–972.
9. Park C.B., Raines R.T. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. № 46. P. 11472–11479.

## РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КОМПЛЕКСАХ С АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-I В ПРОЦЕССАХ РЕГЕНЕРАЦИИ

Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И.

ГУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия, gimolga@soramn.ru

В пучковой зоне коры надпочечников синтезируются активные глюкокортикоиды (кортизол, кортизон и кортикостерон), участвующие в регуляции углеводного и жирового обмена. Метаболиты глюкокортикоидов – тетрагидросоединения считались биологически неактивными [1]. Исследования, проведенные нами, показали, что данные метаболиты принимают участие в усилении экспрессии многих генов. Механизм их участия имеет сложную природу и связан с процессами внутриклеточной регенерации [2, 3].

В сетчатой зоне коры надпочечников синтезируется группа стероидных гормонов, относящихся к андрогенам. В нее входят эпиандростерон, дегидроэпиандростерон (ДЭА) и дегидроэпиандростерон-сульфат (ДЭАС). Очень важным метаболитом эпиандростерона, в равной степени, как и тестостерона, является андростерон [1]. Роль этих гормонов в организме до конца не ясна. Известно, что ДЭА и ДЭАС обладают рядом важных биологических эффектов: антионкогенным, антидиабетическим, антиатерогенным, иммуностимулирующим [1] и т.д. Наши данные указывают на участие ДЭА и ДЭАС в увеличении скорости синтеза иммуноглобулинов лимфоцитами селезенки крыс [4]. Было также показано участие этих гормонов в усилении биосинтеза ДНК в гепатоцитах [5]. Однако молекулярные механизмы этого эффекта до сих пор неизвестны. Принципиально важным является то, что андростерон, ДЭА, ДЭАС и тетрагидрокортизол (ТГК) содержат восстановленную  $\Delta^4$ , 3-кетогруппу в А-кольце, что позволяет объединить эти гормоны в одну группу с общим механизмом действия. К настоящему времени нами установлено, что аполипопротеин А-I (АпоА-I) в комплексах с ТГК, АС и ДЭАС стимулирует биосинтез белка в клетках печени [5]. Показано, что комплекс стероид-АпоА-I (где стероид - ТГК, АС, ДЭА, ДЭАС) при связывании с изолированной нативной ДНК изменяет ее вторичную структуру образуя однонитевые участки вблизи сайтов связывания [2, 6]. Этот процесс был подробно изучен. Показано, что вновь образованные однонитевые участки способны кооперативно взаимодействовать с РНК-полимеразой [6]. А также была показана сайт-специфичность взаимодействия комплекса стероид-АпоА-I (ТГК, ДЭАС) с нативной ДНК (рис. 1). Последовательности вида  $CC(GCC)_n$  оказались наиболее предпочтительными участками прочного связывания этих комплексов в составе ДНК.

На рис. 1 видно, что олигонуклеотид  $CC(GCC)_3$  дозозависимо конкурирует с ДНК за связывание с комплексом ТГК-АпоА-I независимо от порядка добавления компонентов (дорожки 4-6 и 7-9). Видно, что при увеличении концентрации олигонуклеотида уменьшается количество расщепленных нуклеазой S1 однонитевых участков, которые образуются под влиянием комплекса ТГК-АпоА-I, как было показано ранее [2]. АТ-богатый олигонуклеотид практически не влияет на связывание этого комплекса с ДНК, т.к. картина расщепления однонитевых участков нуклеазой S1 почти не меняется при увеличении концентрации комплекса, а количество расщепленных фрагментов остается сопоставимым с контролем (дорожки 10-12 сравнить с дорожкой 3), где олигонуклеотиды не добавляли.



Рис.1. Конкурентное ингибирование взаимодействия комплекса АпоА-I-ТГК с ДНК крыс в присутствии олигонуклеотидов  $CC(GCC)_3$  (ON1) и АТ-богатого (ON2). Электрофоретическое разделение ДНК, инкубированной с 0,35 Е.А./мл нуклеазой S1 [7], в 1 % агарозном геле. Гель окрашен бромистым этидием, фотография в УФ-свете на пленку Микрат Изопан.

- 1 - нативная ДНК,
- 2 - ДНК + S1 нуклеаза,
- 3 - ДНК + [АпоА-I-ТГК] + S1 нуклеаза,
- 4-6 - (ДНК + [АпоА-I-ТГК]) + 0,12; 1,2; 12,0 нг ON1+ S1 нуклеаза,
- 7-9 - ДНК + ([АпоА-I-ТГК] + 0,12; 1,2; 12,0 нг ON1) + S1 нуклеаза,
- 10-12 - ДНК + ([АпоА-I-ТГК] + 0,12; 1,2; 12,0 нг ON2) + S1 нуклеаза,
- 13 - ДНК  $\lambda$ Hind III

В качестве контроля молекулярных масс использовали рестриктные фрагменты ДНК  $\lambda$ Hind III (23,1; 9,4; 6,7; 4,4; 2,3; 2,0 т.п.н.).

Были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие GCC/GGC, с Ap и Tn ( $n = 0, 3, 6$ ) на 5'- и 3'-концах комплементарных последовательностей, имитирующих сайты связывания комплекса ТГК-АпоА-I на ДНК. На 5'-конец олигонуклеотидов вводили  $P^{32}$ -метку по стандартной процедуре [7]. Для подтверждения «расплетающего» действия комплекса ТГК-АпоА-I на двунитевую ДНК олигонуклеотидные дуплексы  $ApCC(GCC)_3 \cdot (GGC)_3GGTn$  ( $n = 0,3,6$ ) инкубировали с этим комплексом и затем подвергали реакционные смеси электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. На рис. 2 представлен радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом разделении смесей, содержащих олигонуклеотиды  $A_6CC(GCC)_3$  (Г1А) и  $(GGC)_3GGT_6$  (Г2Т) а также их дуплекс, после взаимодействия с указанным комплексом и ферментами: панкреатической ДНКазой I [7] и нуклеазой S1.

На рис. 2 видно, что взаимодействие дуплекса  $A_6CC(GCC)_3 \cdot (GGC)_3GGT_6$  с комплексом АпоА-I-ТГК приводит к появлению однонитевых олигонуклеотидов, совпадающих по электрофоретической подвижности с исходными  $A_6CC(GCC)_3$  и  $(GGC)_3GGT_6$  (дор. 7 срав. с дор. 8 и 9). Комплекс АпоА-I-ТГК, связываясь с олигонуклеотидами Г1А и Г2Т или комплементарным дуплексом Г1А-Г2Т, защищает их от действия нуклеаз (дор. 1-6), но в разной степени в зависимости от концентрации этого комплекса. При действии ДНКазы I на аддукт Г1А-Г2Т-АпоА-I-ТГК появляется олигонуклеотид, защищенный комплексом АпоА-I-ТГК от ее действия. По-видимому, это минимальный участок связывания комплекса АпоА-I-ТГК с ДНК. Видно, что его длина меньше, чем длина исходных Г1А и Г2Т, составляющая 17 остатков нуклеотидов (рис. 2, дор. 1, 2 срав. с дор. 8 и 9). Было показано, что Tn, где  $n = 3$  или 6, не отщепляется ДНКазой I от GC-содержащего



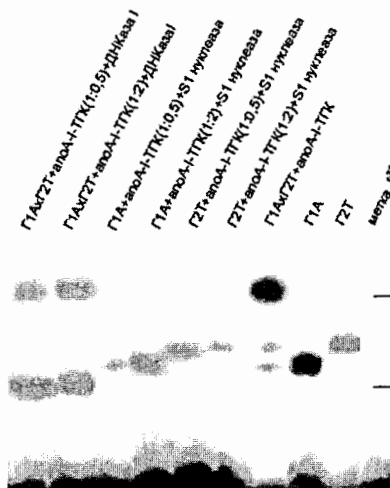


Рис. 2. Радиоавтограф 15 % ПААГ в 6М мочеvine. Красители: ХС- ксиленицианол, ВР- бромфеноловый.

1. Дуплекс Г1А:Г2Т + АпоА-I-TГК (1:0,5 моль/моль) + ДНКаза I
2. Дуплекс Г1А:Г2Т + АпоА-I-TГК (1:2) + ДНКаза I
3. Г1А + АпоА-I-TГК (1:0,5) + S1 нуклеаза
4. Г1А + АпоА-I-TГК (1:2) + S1 нуклеаза
5. Г2Т+АпоА-I-TГК (1:0,5)+S1 нуклеаза
6. Г2Т+АпоА-I-TГК (1:2)+ S1 нуклеаза
7. Дуплекс Г1А:Г2Т + АпоА-I-TГК
8. Г1А;
9. Г2Т;
10. Метка  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-АТР

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

«кора»), в отличие от Ap (данные не приведены). Минимальный сайт связывания комплекса АпоА-I-TГК представляет собой GC-«кор» с T<sub>n</sub> (n = 3-6) на 3'-конце общей длины 12 ± 1. Разное воздействие этого же комплекса на одноцепочечные олигонуклеотиды Г1А и Г2Т наблюдали при гидролизе нуклеазой S1 (рис. 2, дор. 3-6). Г1А в большей степени защищается от действия нуклеазы S1 при увеличении концентрации комплекса АпоА-I-TГК (дор. 3 и 4), тогда как Г2Т гидролизуется тем больше, чем больше концентрация комплекса в реакционной смеси (дор. 5 и 6). Аналогичные результаты были получены для A<sub>3</sub>CC(GCC)<sub>3</sub> и (GGC)<sub>3</sub>GGT<sub>3</sub>. Из литературных данных известно об образовании сложных вторичных структур, а именно, G-квадруплексов в GCC/GGC-содержащих олигонуклеотидах [8]. Следует сделать вывод, что комплекс АпоА-I-TГК «разворачивает» и самокомплементарные GC-структуры, и G-квадруплексы, которые были стабилизированы 3'-Tn (но не 5'-An) в исходном олигонуклеотиде.

Таким образом, комплекс АпоА-I-TГК эффективно связывается *in vitro* как с одноцепочечными, так и с двуцепочечными последовательностями вида CCG/GGC, «расплетая» вторичную структуру и делая ДНК более доступной действию нуклеаз или защищая от гидролиза нуклеазами в зависимости от концентрации. Способность АпоА-I в комплексе с метаболитом стероидного гормона воздействовать на вторичную структуру ДНК эукариот подобна роли некоторых [9] транскрипционных факторов в экспрессии генов.

#### Литература

1. Сергеев П.В. Стероидные гормоны. М.: Наука. 1984. 240 с.
2. Гимауддинова О.И., Панин Л.Е., Кузнецов П.А. и др. // Молек. биол. (2002) Т.36, С.103-105.
3. Панин Л.Е., Усынин И.Ф., Трубицына О.М. и др.// Биохимия (1994) Т.59, С.353-359.

4. Панин Л.Е., Костина Н.Е., Проняева Т.Р. // Иммунология (2003) Т.24, С.203-204.
5. Панин Л.Е., Хощенко О.М., Усынин И.Ф. // Проблемы эндокринологии. (2002) №6, С.45-48.
6. Panin L.E., Tuzikov F.V., Gimautdinova O.I. // J. Steroid Biochem. and Mol. Biol. (2003) V.87, P.309-318.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis J. Molec. Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989) P.583.
8. Simonsson T. // Biol. Chem. (2001) V. 382, P.621-628.
9. Вингендер Э. // Молек. биол. (1997) Т. 31, С.584-600.

## ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS*, ШТ. Д-6

Паронян А.Х., Маркосян Л.С.

Институт микробиологии НАН РА, г. Ереван, Армения, *jilvayan\_1@yahoo.com*

Среди природных биологически активных соединений, обладающих антимутагенными свойствами и иммуномодулирующей активностью, особое место занимают каротиноидные пигменты [1]. В последние годы эти пигменты вызывают у медиков особый интерес в связи их высокой антиоксидантной активностью. Биологическая активность каротиноидов объясняется их способностью взаимодействовать с активными формами кислорода или же возникающими в процессе свободнорадикальных реакций соединениями. Особый интерес, помимо  $\beta$ -каротина, вызывает ликопин. Ликопин в виде различных форм используют как радиопротекторное средство, антиканцерогенный препарат [2].

В микробиологической промышленности в качестве продуцентов каротиноидов, в том числе  $\beta$ -каротина, используются мицелиальные грибы [3]. Однако по разнообразию каротиноидов они уступают фототрофным микроорганизмам, в том числе фототрофным бактериям. Каротиноиды фототрофных бактерий отличаются от каротиноидов растений и водорослей [4]. Фототрофные бактерии синтезируют ациклические каротиноиды, многие из них содержат метоксильные группы. У фототрофных бактерий описаны более 30 различных каротиноидов. Использование в качестве продуцентов каротиноидных пигментов фототрофных бактерий позволит получать препарат более дешевым и эффективным способом, так как культивирование последних не требует дорогостоящего или дефицитного сырья.

Имеющиеся данные по изучению динамики образования каротиноидов растущими культурами пурпурных бактерий подтверждают, что количество и состав пигментов в значительной степени зависят от интенсивности света, присутствия или отсутствия  $O_2$  и  $CO_2$ , от фазы роста и др. [5]. Однако в литературе мало данных о влиянии источников азота на биосинтез каротиноидов фототрофных бактерий. В связи с этим представляло интерес изучение влияния ряда аминокислот на рост и накопление каротиноидов у фототрофных бактерий.

В работе использовали несерную пурпурную бактерию *Rhodospseudomonas palustris*, шт. Д-6, выделенный нами из гидрокарбонатных минеральных источников Джермука (рис.1).



Рис. 1. *Rh. palustris*, шт. Д-6. Фазовый контраст,  $\times 2000$

Штамм депонирован в Республиканском Центре депонирования микробов под номером ИНМИА Б-6506. Выделенный штамм является фотоорганотрофным, факультативно анаэробным организмом. Оптимальная температура роста  $30^\circ C$ . Оптимальный pH роста 7,0-7,2. Слабо галотолерантный, выдерживает в среде до 2 % NaCl. Штамм растет в анаэробных условиях на свету и в аэробных – в темноте. На свету рост наблюдается также и в микроаэрофильных условиях. Фотосинтетический мембранный аппарат ламеллярного строения,

ламеллы расположены параллельно к цитоплазматической мембране.

При росте в анаэробных и микроаэрофильных условиях на свету спектр поглощения целых клеток культуры с максимумами поглощения при 468, 498 и 527 нм свидетельствуют о наличии в клетках каротиноидных пигментов нормальной спириллоксантиновой серии с содержанием главных пигментов спириллоксантина, ликопина и родопина (рис. 2), что подтверждается также и результатами хроматографического анализа экстракта каротиноидов, полученного методом Иенсена [6]. Следует отметить, что спириллоксантин и родопин являются производными ликопина.

Будучи фотогетеротрофным организмом аминокислоты для штамма могут служить одновременно источниками углерода, азота и донорами электронов.

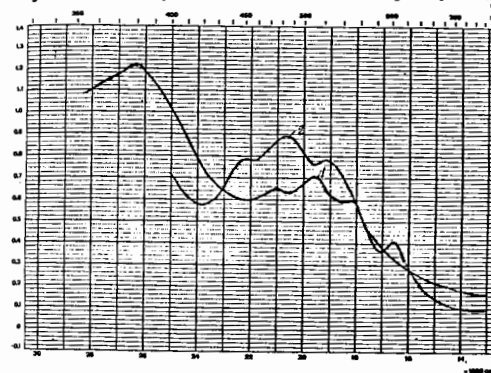


Рис. 2. Спектры поглощения целых клеток (1) и экстракта каротиноидов (2) *R. palustris*, шт. Д-6, выращенный в анаэробных условиях на свету

Однако возможности бактерии в отношении использования отдельных аминокислот не широки. С другой стороны изучаемая нами культура по отношению к тому или иному источнику азота несколько отличается от типовой культуры. Полученные данные показывают, что не все из использованных аминокислот усваиваются культурой и хороший рост наблюдается на средах, где источником азота служат лизин, метионин и аргинин. Следует отметить, что указанные аминокислоты обеспечивают рост культуры также и в аэробных условиях в темноте. Однако скорость их ассимиляции на свету более высокая, чем в темноте. Данные также свидетельствуют, что качественный состав каротиноидов был сходен на исследуемых аминокислотах. При этом в некоторых случаях корреляция между накоплением биомассы и биосинтезом каротиноидов не было обнаружена. Так, при культивировании клеток культуры с аргинином, лизином выход биомассы составляет 1,8 г/л сухого вещества, а общее количество каротиноидов не превышает 1,2 мг/г сухой массы клеток, где спириллоксантин составляет 90 %, ликопин – 4,8 %, а родопин – 4,1 %. Из более двадцати использованных аминокислот на биосинтез каротиноидов благоприятное влияние оказывали аспарагиновая, глутаминовая кислоты, лейцин и аргинин. С их использованием накопление биомассы составляет в среднем 1,35 г/л, а суммарное содержание каротиноидов – 3,5 мг/г, где в среднем на долю спириллоксантина приходится 80 %, ликопин составляет 9,8 %, а родопин – 9,1 % (табл. 1).

Таблица 1. Влияние некоторых аминокислот на биосинтез каротиноидов при фотосинтетическом росте *Rh. palustris*, шт. Д-6

Аминокислоты	Биомасса, г/л сух. веса	Каротиноиды, мг/г сух. биомассы		
		Спириллоксантин	Ликопин	Родопин
Аспарагиновая кислота	1,35	1,104	0,135	0,125
Аланин	1,35	1,13	0,154	0,045
Аргинин	1,8	1,11	0,053	0,049
Глутаминовая кислота	1,38	1,096	0,134	0,124
Лейцин	1,33	1,08	0,048	0,072
Лизин	1,8	0,99	0,051	0,055

Указанные аминокислоты влияют не только на общий выход каротиноидов, но и на биосинтез отдельных пигментов. Так, если аспарагиновая, глутаминовая кислоты заметно влияют на образование ликопина и родопина, то аланин способствует биосинтезу ликопина и несколько подавляет образование родопина. Все использованные аминокислоты пригодны для биосинтеза спириллоксантина. Полученные данные дают основание сделать вывод, что с использованием различных аминокислот можно направленно увеличить накопление того или иного каротиноида у несерных пурпурных бактерий.

Благоприятными для каротиногенеза оказались также микроаэрофильные условия выращивания и 1500-2000 люкс освещения.

#### Литература

1. Сергеев А.В., Самохвалов Т.И., Вакулова Л.А., Шапкина М.Я. Каротиноиды в онкологии // Материалы симпозиума.- М.: 1992, Онкологический научный центр, РАМН. - С. 4-8.
2. Yu Ji'an, Ye Yongjun, Lan Zhixin, Lan Xiande, Fan Xiaobing. Influence of the carotenoids of photosynthetic bacteria on peroxide oxidation of lipids // J. Shanghai Jiaotong Univer.- 1998.- V. 32, № 3.- P. 107-110.
3. Феофилова Е.Н. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование (Обзор) // Прикл. биохимия и микробиология.- 1994. - Т. 30, № 2. - С. 181-195.
4. Schmidt K. The Photosynthetic Bacteria. Plenum Press.-1995.-V.2.- P.729-750.
5. Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants // Europ. J. Biochemistry.- 1994.- V. 223, № 1.- P. 7-24.
6. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Trondheim.- 1962.- P. 104-118.

## РОЛЬ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ В РАСТЕНИИ

Проценко М.А., Буза Н.Л., Буланцева Е.А., Кораблева Н.П.  
Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, protsenko@inbi.ras.ru

Белковый ингибитор полигалактуроназы (БИПГ; polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP) выявлен в растительных тканях по его действию на полигалактуроназу (ПГ; поли-[1,4- $\alpha$ -D-галактуронид]гликаногидролаза; КФ 3.2.1.15) – фермент, секретируемый фитопатогенными грибами, и являющийся одним из основных патогенных факторов [1]. БИПГ считается важным компонентом системы защитных реакций растения. Он относится к группе белков, содержащих повторности, обогащенные лейцином (leucine-rich repeats – LRR), в которую входят также многие белки, участвующие во взаимодействии молекул в живом организме, в том числе, связанном с патогенными воздействиями (pathogenesis-related proteins – PR proteins).

БИПГ локализуется в апопласте, где он находится в растворе или связан с деметилированными участками гомогалактуронана в составе клеточной стенки. Гомогалактуронановый эпитоп молекулы пектина присутствует в местах адгезии и разделения клеток в тканях растения – в растущих апексах, в тканях формирующихся плодов, в тканях пестика и пыльцевых трубках. Поскольку БИПГ способен связываться с деметилированными участками гомогалактуронана, логично предположить, что он играет важную роль в формировании клеточной стенки путем соединения молекул пектина. По-видимому, пектин является природным лигандом для БИПГ, связываясь с которым он выполняет еще не оцененную функцию наряду с такими белками клеточных стенок как экстенсины и лектины.

В задачу исследования входило определение содержания БИПГ в плодах яблоны, изучение его действия на ПГ фитопатогенных грибов и анализ изменения его содержания в результате действия ингибиторов биосинтеза этилена, влияющих на темпы созревания плодов.

#### Методика

Для экспериментов использовали яблоки (*Malus domestica* Borkh.) зимнего сорта Мантуанское (Молдова) и распространенного в средней полосе России сорта Антоновка. Препараты, содержащие ПГ, получали путем осаждения сульфатом аммония из культурального фильтрата после выращивания грибов в течение 7 сут на качалке в жидкой среде с пектином [2]. Активность ПГ определяли спектрофотометрически по изменению  $D_{600}$ , свидетельствующему об изменении количества редуцирующих групп (РГ) в зависимости от времени [3]. Интенсивность поражения тканей плодов при искусственном заражении оценивали по шкале, в которой 0 – отсутствие поражения, 3 – максимальное поражение, когда гриб распространяется по всей поверхности среза плода и вызывает размягчение ткани. Препараты БИПГ получали из гомогената паренхимной ткани плодов путем экстрагирования 20 мМ ацетатным буфером pH 5.2, содержащим 2 мМ меркаптоэтанол («Sigma», США) и 0,2 %  $Na_2S_2O_5$ . Из экстракта материал осаждали при 90 %-ном насыщении  $(NH_4)_2SO_4$ .

Интенсивность ингибирования ПГ препаратами БИПГ определяли по сниже-

нию активности фермента, полученного из культурального фильтрата исследуемых грибов [2]. На графиках действие БИПГ выражено в % к активности ПГ того же гриба в отсутствие БИПГ.

В процессе хранения определяли содержание этилена в плодах для оценки их физиологического состояния и соотносили с результатами анализа активности БИПГ. При этом плоды обрабатывали аминоэтоксивинилглицином и  $\text{CoCl}_2$ , ингибирующими на разных стадиях биосинтез этилена и задерживающими созревание плодов [4]. Этилен в пробах определяли методом ГЖХ на приборе Стом-4 (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором.

### Результаты и обсуждение

Как видно из рисунка (рис. 1), БИПГ из яблок двух сортов по-разному ингибировал ПГ фитопатогенных грибов. При этом, интенсивное ингибирующее действие, как правило, коррелировало со слабым поражением тканей плодов, что подтверждает участие БИПГ в повышении устойчивости растений к заболеваниям. В процессе хранения плодов яблони максимальное выделение этилена совпадало с понижением накопления БИПГ в тканях (рис. 2). Обработки, ингибирующие биосинтез этилена, вызывали одновременное повышение содержания БИПГ. Следовательно, в комплексе биохимических процессов, развивающихся при созревании плодов, БИПГ играет важную роль.

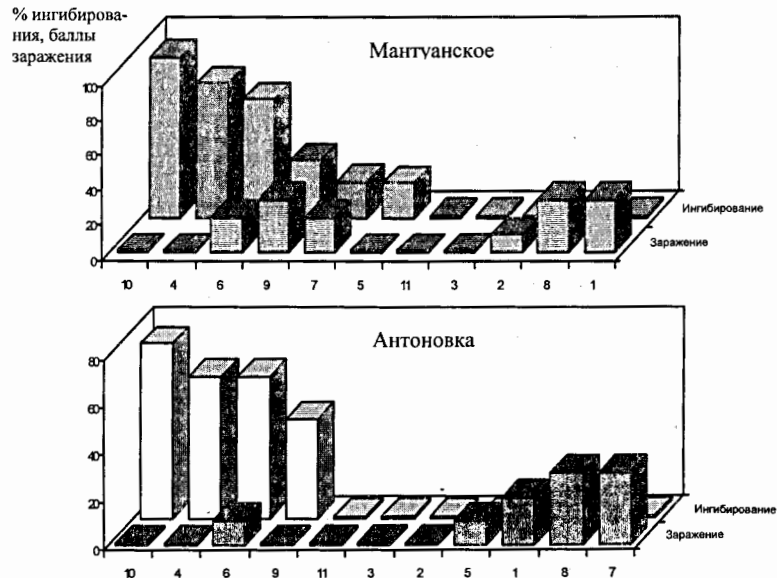


Рис. 1. Действие БИПГ из яблок на ПГ разных фитопатогенных грибов и интенсивность поражения яблок этими грибами. Виды грибов обозначены номерами в соответствии с алфавитным списком: 1. *Alternaria* sp. (томат); 2. *Botrytis cinerea* (лук); 3. *B. cinerea* (малина); 4. *Fusarium graminearum*; 5. *Fusarium* sp. (картофель); 6. *Fusarium* sp. (томат); 7. *Monilinia* sp.; 8. *Penicillium* sp.; 9. *Septoria nodorum*; 10. *V. dahliae* (хлопчатник); 11. *Verticillium* sp. (картофель)

Присутствуя в клеточной стенке, БИПГ может препятствовать действию ПГ патогенов. Кинетика ингибирующего действия БИПГ на фермент варьирует в отношении конкуренции за субстрат. Это дает основание сомневаться в том, что единственной мишенью ингибитора действительно является ПГ фитопатогенных организмов. Вероятно, что связываясь с гомогалактуронаном БИПГ блокирует участки, подверженные действию ПГ, снижая, таким образом, его эффективность. Необходимо получить дополнительные данные, чтобы оценить возможности и способы использования его для повышения устойчивости растений к воздействию патогенных организмов и других неблагоприятных факторов.

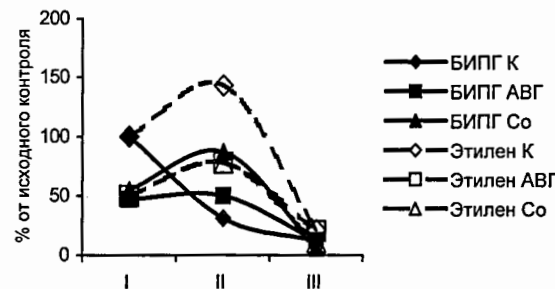


Рис. 2. Содержание этилена и БИПГ в плодах яблони сорта Мантуанское в разные сроки хранения

### Литература

1. De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2001, v. 39, pp. 313-335.
2. Гладких Т.А., Васильева К.В., Метлицкий Л.В. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1978. Т. 14. № 6. С. 833-848.
3. Milner Y., Avigad G. // *Carbohydr. Res.* 1967. V. 4. № 4. P. 359-361.
4. Салькова Е.Г., Буланцева Е.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1988. Т. 24. № 5. С. 698-702.

## ПРИКЛАДНЫЕ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

Скрипников А.Ю., Газарян И.Г.

Кафедра химической энзимологии, химический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

Пероксидаза является наиболее широко распространённым ферментом растений [1], активность которого была впервые описана ещё в XIX веке [2]. Она была обнаружена в животных, микроорганизмах и во многих растениях, принадлежащих к разным систематическим группам. Каталитическая активность нативного фермента повышается на многие порядки по сравнению с простетической группой. Благодаря этому свойству пероксидаза является одним из самых эффективных из известных ферментов [3,4]. Пероксидаза хрена в настоящее время удерживает позиции важнейшего ферментативного компонента биоаналитических систем [1]. Однако во всем мире на протяжении последних 10-15 лет ведется интенсивный поиск альтернативных источников пероксидаз с новыми физико-химическими характеристиками. Потенциальным биотехнологическим ресурсом пероксидазы могут стать культивируемые клетки растений [5,6]. Исследование пероксидазного статуса клеток растений в культуре имеет фундаментальное значение для установления механизмов каталитической активности пероксидазы и ее роли в физиологии развития растений [7].

Нами была получена культура клеток люцерны, которая существенно отличается от интактных растений по активности и по изоферментному составу пероксидазы. Клетки люцерны в культуре характеризуются десятикратным повышением уровня синтеза пероксидазы по сравнению с исходными растениями. В полученных нами культурах клеток, суперпродуцирующих пероксидазу, сохранялась способность к образованию эмбрионов как в суспензионных, так и каллусных линиях. В некоторых культурах клеток-суперпродуцентов процесс эмбриогенеза продолжался в течение 1 года. Эмбрионные культуры клеток обладали более высокой пероксидазной активностью, чем те, в которых регенерационные процессы затухают, хотя деление и рост клеток продолжают (Табл. 1).

Таблица 1. Активность пероксидазы в культуре клеток, тканей и растениях люцерны (в скобках указан возраст культуры клеток или растений)

Источник фермента	Удельная активность пероксидазы, Е/мг
Интактные растения, размножаемые черенкованием <i>in vitro</i> (3 недели)	0,50-0,56
Эмбрионный каллус (1 месяц)	5,00-6,00
Неэмбрионный каллус (1 месяц)	3,00
Суспензионная культура (2 недели)	5,00
Растения-регенеранты (3-6 недель)	1,50-2,00
Растения-регенеранты, высаженные в грунт (3 месяца)	0,70
Растения регенеранты перед цветением (4 месяца)	0,30-0,50

Растения-регенеранты в первые 3-6 недель выращивания на искусственной среде сохраняли высокую пероксидазную активность (1,5-2,0 Е/мг). После посадки растений-регенерантов в почву уровень пероксидазной активности снижался (0,7 Е/мг) и во время цветения был на том же уровне, что и у растений, которые постоянно поддерживаются в лабораторных условиях при размножении черенками (0,3-0,5 Е/мг).

Введение в культуру клеток вызывает значительные изменения в изоферментном спектре пероксидаз. Десятикратное повышение их синтеза связано с суперсинтезом щелочных и щелочно-нейтральных изоформ. В культуре клеток доминируют изоформы пероксидазы с рI 9,2 и 9,3, которые составляют более половины от всех остальных изоформ. Эмбрионный и неэмбрионный каллусы различаются по содержанию щелочных изоформ при значительном содержании кислых изоформ. Эмбрионный каллус содержит преимущественно кислые изоформы и следовые количества щелочных изоформ. Неэмбрионный каллус содержит как кислые, так и щелочные изоформы, причем содержание последних ниже, чем кислых.

Обобщая полученные данные, можно предполагать, что образование каллусных тканей и суспензионных культур приводит к включению биосинтеза щелочных и щелочно-нейтральных пероксидаз, и, по-видимому, изменяет их посттрансляционную модификацию, поскольку в исходном растении детектируются 2 щелочные изоформы (рI 9,2, 9,3), а в каллусной ткани – целый ряд изоформ. Культивирование же клеток в жидкой среде приводит к еще большему сдвигу в сторону щелочных изоформ. Каллусная ткань при дифференциации продуцирует большее количество кислых изоформ, синтез же щелочных изоформ подавляется.

При сравнении препарата щелочной пероксидазы, полученного из клеток люцерны, с препаратом пероксидазы хрена фирмы "Sigma", США (табл. 2) видно, что оба препарата пероксидаз близки по физико-химическим свойствам.

Таблица 2. Сравнение свойств щелочных изоформ пероксидаз из культуры клеток люцерны и корней хрена

Свойства	Культура клеток люцерны	Корень хрена
Молекулярная масса, кДа	48	44
Изоферментный состав, рI	8,9; 9,2; 9,3	7,2; 8,7; 9,05
RZ	2,5	3,0
$K_d \cdot 10^{12}, M^{-1}$	8,5	5,0
$K_m \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}, 50^\circ C$	3,65	1,2
$K_m \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}, 65^\circ C$	4,41	1,5

В экстракте целого растения основными являются кислые изоформы пероксидазы. Установлено, что кислые изоформы пероксидаз растений непосредственно участвуют в процессе лигнификации [8], который в культивируемых клетках практически отсутствует. Следствием этого в культуре клеток люцерны является сдвиг изоферментного спектра в сторону щелочных и щелочно-

нейтральных изоформ. Таким образом, переход клеток люцерны к росту в популяции клеток на искусственной питательной среде ведет к включению регуляторных клеточных механизмов, приводящих к сверхсинтезу пероксидазы с преобладанием щелочных и щелочно-нейтральных форм. Обратный процесс – регенерация растений – выключает эти механизмы и приводит растение к нормальному пероксидазному статусу.

При сравнении препарата щелочной пероксидазы, полученного из клеток люцерны, с препаратом пероксидазы хрена фирмы "Sigma", США (табл. 2) видно, что оба препарата пероксидаз близки по физико-химическим свойствам. Сходство свойств выделенной пероксидазы люцерны и пероксидазы хрена позволяет предложить пероксидазу клеток люцерны в качестве нового препарата пероксидазы для использования в иммуоферментном анализе. Благодаря высокому содержанию пероксидазы в культуре клеток люцерны (5 Е/мг белка или 400-600 Е/г сухой массы) с 1 г сухой биомассы удается получить 0,25 – 0,30 мг гомогенного препарата щелочной пероксидазы люцерны. Таким образом, культура клеток люцерны может быть предложена в качестве потенциального альтернативного источника пероксидазы для биотехнологической и фармацевтической промышленности.

Изменение пероксидазного статуса клеток растений в культуре по сравнению с тканями интактных растений затрагивает такой важный процесс, как синтез и модификация компонентов клеточных стенок, в котором пероксидаза играет ключевую роль [9]. Каталитическая активность пероксидаз растений недавно признана бифункциональной: она связана с такими важнейшими физико-химическими процессами, как утилизация перекиси водорода и генерация активных форм кислорода на протяжении всего жизненного цикла организма [10,11]. В ростовых процессах высших растений пероксидаза играет ведущую роль, которая названа парадоксальной [11] вследствие того, что фермент участвует как в сборке клеточной стенки, так и в её разрыхлении за счёт «расшивки» связей между компонентами полисахаридного матрикса при участии активных форм кислорода, генерируемых пероксидазой [10,11]. Для изучения роли активных форм кислорода в механизмах каталитической активности пероксидаз обычно используют незембрионные культуры клеток растений как биохимически гомогенный материал [7]. Полученные нами эмбрионные культуры клеток, суперпродуцирующие пероксидазу, могут быть использованы для установления новых биохимических механизмов морфогенеза высших растений с участием пероксидазы.

#### Литература

1. Газарян И.Г. Пероксидазы растений // Итоги науки и техники. Серия биотехнология. / М. ВИНТИ, 1992. - С. 4-28.
2. Бах А.Н. Химизм дыхательных процессов // Журнал Русского Физико-Химического Общества. - 1912. - V. XLIV. - С. 1-73.
3. Кобозев В.И. Избранные труды. Т. 1. М. Изд-во Московского университета, 1978. - 423с.
4. Ким Б.Б. Механизм действия пероксидазы // Итоги науки и техники. Серия биотехнология. / Ed. А. М. Егоров. - М. ВИНТИ, 1992. - С. 126-146.

5. Урманцева В.В. Пероксидазы культивируемых клеток растений // Итоги науки и техники. Серия биотехнология. / Ред. А. М. Егоров. - М. ВИНТИ, 1992. - С. 54-70.
6. Spenser M.E., Ashton S.V.M., Scollick S.J. Characterization of novel peroxidases from plant cell cultures: evidence of widely different substrate specificities // Plant peroxidases: biochemistry and physiology / Eds. K. G. Wellinder, S. K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin. - Geneva: University of Geneva, 1993. - P. 435-440.
7. Kawano T., Muto S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // Journal of Experimental Botany. - 2000. - V. 51. - P. 685-693.
8. Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H. Peroxidases in plant growth, differentiation, and development processes // Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases / Eds. J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel, T. Gaspar. - Genève: Université de Genève, 1991. - P. 249-280.
9. Hagege D., Kevers C., Crevecoeur M., Tollier M.T., Monties B., Gaspar T. Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells // Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases / Eds. J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel, T. Gaspar. - Genève: Université de Genève, 1991. - P. 281-290.
10. Schopfer P., Liszky A., Bechtold M., Frahy G., Wagner A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth // Planta. - 2002. - V. 214. - P. 821-828.
11. Passardi F., Penel C., Dunand C. Performing paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // Trends in Plant Science. - 2004. - V. 9. - P. 534-540.

## НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КАРДИОАКТИВНЫЕ БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ, БИОРЕГУЛЯЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Срапионян Р.М., Паронян З.Х.

Институт Биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, г. Ереван, Армения, galoyan@sci.am

Изучение молекулярных механизмов биорегуляции, действующие посредством пептидно-белковых гормонов основывается, прежде всего, на всестороннем их исследовании. На протяжении более 4-х десятков лет нами изучается широкий спектр структурных, функциональных, гормональных возможностей трех новых кардиоактивных, идентифицированных в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса человека и ряда животных белок-гормональных комплексов [1, 2].

Исследования велись по следующим направлениям:

1. Изучение тканеспецифичности, региональной и субклеточной локализации на основе разработанных иммунохимических и радиоиммунологических методов;
2. Исследование макромолекулярных, структурных, функциональных свойств, диссоциированных из белок-гормональных комплексов (БГК) высокомолекулярных гликопротеинов, носителей ранее обнаруженных кардиотропных нейрогормонов А.А. Галояном, условно обозначенных <<K>>, <<C>>, <<Г>> и идентификация их множественных форм;
3. Изучение модельного процессинга исследуемых гликопротеинов с целью выяснения их домено-функциональной организации и идентификации образующих при этом рядом физиологически активных, в том числе кардиоактивных соединений.

Исследование субклеточной локализации искомым БГК в мозгу выявило преимущественное их содержание в синапсоммах гипоталамуса и коры больших полушарий мозга, а также в нейросекреторных гранулах.

Иммуногистохимическое исследование свидетельствовало об их наличии в клетках Пуркинье мозжечка, супрахиазматическом ядре гипоталамуса, цитоплазме, нервных отростках.

Доказана миграция аксональным током кардиоактивных БГК в составе нейросекреторных гранул и последующая секреция в кровяное русло. Однако сопоставление величин БГК, выявляемых в ряде висцеральных органов свидетельствовало об их выраженной нейроспецифичности на три порядка выше по сравнению с наличием в безнервных тканях. Лабильный электростатический тип связи нейрогормонов и их носителей в комплексе обеспечивает при физиологических значениях рН структурное интегрирование – целенаправленного транспорта гормонов в соответствующие органы-мишени, в особенности, в сердце. С учетом высокой активности физиологического действия исследуемых БГК (расширение коронарных сосудов, стабилизация кровяного давления, усиление кровотока, повышение проницаемости капилляров) становилось необходимым изучение возможного участия этих комплексов при ишемическом состоянии сердца. Используя модель экспериментального инфаркта миокарда (ИМ), удалось выявить у крыс с коронароокклюзивным ИМ резкое уменьшение иммунореактивных БГК в различных регионах мозга с одновременным, многократным (от 20 до 170-ти раз) увеличением в сердце, селезенке и периферической крови. В

сыворотке инфарктных больных увеличение составило от 8 до 12 раз [3]. Учитывая реальное участие БГК в метаболических процессах сердца, в особенности, при рубцевании зоны некроза, о чем свидетельствовали данные морфогистологических исследований по выяснению их возможного влияния на выживаемость торакодорзальных лоскутов после их ишемии и реперфузии оказалось возможным считать БГК маркерами поврежденных остовов миокарда. Кроме непосредственного влияния на работу сердца кардиоактивные БГК способны изменять активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. Местом приложения их действия является как сократительный миокард, так и внутрисердечные ганглии, о чем свидетельствовали результаты экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. Данные электро-физиологического анализа выявили дозозависимое и разнонаправленное изменение различных популяций внутрисердечных нейронов в зависимости от места их приложения [4].

Коррелирующим феноменом с вышеизложенным явилось выяснение участия кардиоактивных БГК в системе гемостаза, функциональные нарушения которого являются, как известно, основой возникновения патологических процессов. Исследование действия одного из кардиоактивных БГК – белок-нейрогормон "С" (БНС) комплекса на агрегационную способность тромбоцитов в плазме крови человека выдвинуло необходимую принципиальную задачу – изучение роли БНС в регуляции метаболизма ключевого фермента гемокоагуляции – маркера общего коагуляционного пути Ха с его ингибитором, антитромбином III (АТ III). Было выявлено эффективное участие БНС в этом процессе на уровне, связывающем обе системы (внутренний и внешний механизмы), объединяющиеся на стадии образования X/Ха, демонстрирующего наличия нового альтернативного пути метаболизма Ха [5].

Учитывая тесную связь между нарушением кровотока и состоянием активности структур мозга, а также специфическую направленность воздействия кардиоактивных БГК на сосудистую систему, было исследовано также протекторное действие последних при острых и хронических токсикозах в условиях интоксикации змеиными ядами. Результаты однозначно свидетельствовали о воспроизводящем протекторном эффекте БГК, а именно, стабильном восстановлении исходного уровня вызванной электрической активности нейронов. Биохимическое же исследование сдвигов уровней регулятора метаболизма активных форм кислорода – про- и антиоксидантных металлопротеинов крови и ряда органов и тканей при этой патологии, а также острой нейродегенерации травматического происхождения выявили антиоксидантную функцию БГК, способность опосредованного регулирования метаболизма важнейших металлопротеинов, влияющих на обмен O<sub>2</sub> и предотвращающих развитие деструктивных процессов в крови и тканях [6].

Вышеизложенный спектр исследований позволяет не только выяснить регуляторные функции эндогенных кардиоактивных БГК, и открывает новые этапы в их теоретической трактовке, но и создает принципиально новые возможности в поисках путей направленной коррекции патогенетической терапии ряда тяжелых, в особенности, сердечно-сосудистых заболеваний и центральных двигательных нарушений.

## Литература

1. Galoyan A.A. and Srapiionian R.M. (1983). Protein – hormonal complexes in the hypothalamus as neurochemical systems of regulation. *Neurochem. Res.* V.8, N12, PP.1511 – 1535.
2. Срапионян Р.М. (1987). Специфические гликопротеины гипоталамической области мозга. *Нейрохимия*, т.6, N1, стр.109 – 116.
3. Срапионян Р.М., Абелян Ж.Г., Галоян А.А. (1991). Сравнительная оценка эффективности количественного содержания нейроспецифического белок-гормонального комплекса в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс. *Эксперимент. и клинич. Медицина*, т.31, стр. 72 – 77.
4. Galoyan A.A., Srapiionian R.M., Rakesh C. Arara and Armour J.A. (2001). Responsiveness of intrinsic cardiac neurone to novel atrial and hypothalamic cardioactive peptides. *Autonomic Neuroscience Basic and Clinik.* V.92, P.11 – 20.
5. Galoyan A.A., Srapiionian R.M., Goggin M.H., Brecher A.S. (2006). The hypothalamic – mic and atrial coronary – dilatory hormones in the mechanism of blood coagulation. *Нейрохимия*, т.23, N3, стр. 244-253.
6. Срапионян Р.М., Симонян М.А., Галоян А.А. и сопр. (2004). Исследование индивидуального и сочетанного влияния гипоталамо – нейрогипофизарных гормонов и яда змеи на уровне про – и антиоксидантных металлопротеинов в крови и ряде органов крыс. *Нейрохимия*, т.21, N2, стр. 125 – 128.

## ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ ОТ ХЛОРОПЛАСТОВ К ЯДРУ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И ВОДОРΟΣЛЕЙ

Юрина Н.П., Одинцова М.С.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, nyurina@inbi.ras.ru*

Исследования пластидных сигналов, как и многие другие исследования хлоропластов, базируются на открытиях, сделанных в середине 50-х годов. Нораир Мартиросович Сисакян одним из первых начал изучение биохимии клеточных структур растительной клетки, главным образом хлоропластов. Исследования хлоропластов, выполненные в лаборатории Нораира Мартиросовича, позволили обнаружить в них нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК. Затем были обнаружены и выделены рибосомы, аминоксил-тРНК-синтетазы, тРНК. Показан синтез белка и липидов в хлоропластах.

Утвердилось новое представление, что в клетках растений сосуществуют три согласованно функционирующих генома. Наличие трех ДНК-содержащих органелл в эукариотической клетке водорослей и высших растений требует координированной экспрессии генов в этих компартментах. В настоящее время активно изучается роль хлоропластов в регуляции экспрессии генов пластид и ядра.

Первоначально предполагали наличие одного «пластидного сигнала» или «пластидного фактора», однако позднее было установлено, что в клетке функционирует множество сигнальных путей, координирующих экспрессию ядерных генов в зависимости от потребностей этих клеточных органелл [1, 2]. Один из этих путей зависит от синтеза белка в хлоропластах. Была обнаружена корреляция между синтезом белка в пластидах и экспрессией некоторых ядерных генов белков пластид. Обработка растений специфическими ингибиторами трансляции в хлоропластах, такими как линкомицин, эритромицин или стрептомицин, приводила к снижению уровня экспрессии кодируемых ядром белков фотосинтеза. По-видимому, синтез белка в пластидах генерирует сигнал, предшествующий экспрессии ряда ядерных генов. Эти гены кодируют компоненты пластид, а также белки, локализованные в других клеточных компартментах. Однако до сих пор нет данных о том, как ингибирование синтеза белка в пластидах приводит к снижению экспрессии ядерных генов.

Обнаружено, что источниками хлоропластных сигналов могут являться активные формы кислорода. У растений активные формы кислорода образуются непрерывно как побочные продукты различных метаболических путей, протекающих в различных клеточных компартментах, но, в основном, в хлоропластах. Генерируемый в пластидах синглетный кислород влияет на экспрессию ряда ядерных генов. Так, показано, что у *Arabidopsis thaliana* синглетный кислород усиливает экспрессию 70 и подавляет экспрессию 9 ядерных генов. Совсем недавно был идентифицирован белок EXECUTER, который, как предполагают, либо воспринимает этот сигнал, либо участвует в его передаче.

Перекись водорода – другая форма активного кислорода, образуемая хлоропластами. Она накапливается при переносе растений с умеренного на интенсивный свет. В отличие от синглетного кислорода, большая часть которого остается в хлоропластах благодаря его высокой реакционной способности (короткому времени жизни – 200 нс и расстоянию переноса до 10 нм), избыток перекиси



водорода может легко диффундировать через оболочку хлоропластов в цитоплазму. Показано, что обработка растений перекисью водорода может индуцировать экспрессию ядерных генов, связанных с ответными реакциями растений на стрессовые воздействия. Это обнаружено на примере гена цитоплазматической аскорбатпероксидазы. Как и где действует перекись водорода, генерируемая пластидами, неизвестно. Считают, что перекись водорода, как и вода, свободно диффундирует через биологические мембраны и поэтому может непосредственно взаимодействовать с внепластидной системой передачи сигнала.

Таким образом, можно заключить, что, по крайней мере, два вида активных форм кислорода, генерируемые хлоропластами, синглетный кислород и перекись водорода участвуют в передаче специфических сигналов от пластид к ядру. Обнаружено, что обе формы вызывают различные ответные реакции на уровне экспрессии генов и, по-видимому, относятся к разным путям передачи пластидных сигналов.

Еще одним интенсивно изучаемым источником пластидных сигналов является редокс-состояние компонентов электрон-транспортной цепи фотосинтеза (ЭТЦ) [3]. Изменения редокс-состояния компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи, индуцированные окружающими условиями, действуют как сигналы, регулирующие экспрессию генов в хлоропласте и ряда генов в ядре. Это означает, что фотосинтез служит источником информации, необходимой для регуляции экспрессии ядерных генов, которая не воспринимается цитоплазматическими фоторецепторами, а сам хлоропласт является сенсором качества и количества света и таким образом может индуцировать физиологические реакции акклиматизации. Можно сказать, что фотосинтез сам себя регулирует. Роль редокс-состояния ЭТЦ как источника хлоропластных сигналов, поступающих в ядерный компартмент клетки, была недавно подтверждена анализом более трех тысяч ядерных генов *Arabidopsis thaliana* (3292). Обнаружено, что 286 генов из них непосредственно регулируются редокс-сигналами фотосинтетических ЭТЦ. Первоначально рассматривали эту регуляторную систему в качестве общего механизма адаптации фотосинтетического аппарата к изменениям интенсивности освещения и различным формам стресса, вызванным условиями окружающей среды. В настоящее время экспериментально доказано только влияние редокс-состояния пула пластохинонов на экспрессию ядерных генов. Обнаружено, что у высших растений редокс-состояние пула пластохинонов играет, по-видимому, меньшую, чем у зеленых водорослей, регуляторную роль при экспрессии ядерных генов. Механизмы, с помощью которых редокс-состояние тилакоидной мембраны передает сигнал ядру, еще неизвестны. Если сенсором служит пул пластохинонов, в передаче сигналов может участвовать каскад реакций фосфорилирования [4].

Показано, что в регуляции экспрессии одного гена могут участвовать разные классы пластидных сигналов. Недавно обнаружены две стадии в индукции гена аскорбатпероксидазы цитоплазмы клеток табака. Ранняя стадия индуцируется восстановленным пулом пластохинонов, поздняя – клеточным уровнем перекиси водорода. Эти данные означают, что два сигнала могут быть разделены во времени.

Наряду с редокс-состоянием компонентов ЭТЦ в регуляции ядерных генов участвует также редокс-состояние компонентов стромы пластид, таких как система ферредоксин – тиоредоксин, или глутатион.

Физиологические и генетические данные указывают на то, что роль пластидных сигналов могут выполнять тетрапирролы. Участие предшественников биосинтеза хлорофилла – Mg-протопорфирина IX и его монометилового эфира в передаче пластидного сигнала было показано на клетках зеленой водоросли *Chlamydomonas*. Mg-протопорфирин IX может заменить действие света при индукции HSP70. Добавление Mg-протопорфирина IX к культурам, росшим в темноте, достаточно для индукции экспрессии генов HSP70. Наконец, повреждение специфических ферментов биосинтеза тетрапирролов ведет к потере пластидного контроля над экспрессией ядерного гена *Lhcb*.

В последнее время достигнуты успехи в выяснении последовательностей-мишеней пластидных сигналов (тетрапирролов). Исследования светочувствительных промоторов генов белков фотосинтеза, которые контролируются пластидным сигналом, показало, что свет и пластидный сигнал регулируют экспрессию ядерных генов через одни и те же *cis*-элементы. Хотя роль тетрапирролов в передаче сигналов от пластид к ядру очевидна, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что сигнальная сеть, в которой участвуют эти соединения, является сложной.

В процессе эволюции перенос огромного числа генов из клеточных органелл в ядро привел к перераспределению генов в клеточных компартментах и возникновению координированной экспрессии ядерных и органелльных генов. Поскольку экспрессия ядерных генов пластид и митохондрий должна была быть связана с функциональным состоянием этих органелл, в ходе эволюции возник направленный от органелл к ядру контроль экспрессии органелльных генов, кодируемых ядром. Пути передачи этого сигнала мало изучены. Неизвестно, каким образом пластидный сигнал проходит через оболочку органелл, какие сигнальные молекулы находятся в цитоплазме или ядре, действуют ли они непосредственно или опосредованно на регуляторные белки клеточного ядра.

Таким образом, в клетках существует сложная сеть сигналов, направленных как от ядра к хлоропластам, так и от хлоропластов к ядру, необходимая для функционирования эукариотической клетки, роста и развития растений. Уникальная регуляторная сеть, функционирующая в хлоропластах, геномы которых несут про- и эукариотические черты, должна привести к открытию регуляторных связей, свойственных другим биологическим системам.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 06-04-48923а).

#### Литература

1. Beck Ch.F. *Planta*. 2005. V. 222. P. 743-756.
2. Юрина Н.П., Одинцова М.С. *Физиология растений*, 2007, в печати.
3. Pfannschmidt T., Schutze K., Brost M., Oelmüller R. *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 36125–36130.
4. Nott A., Jung H.-S., Koussevitzky S., Chory J. *Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling Annu. Rev. Plant. Biol.* 2006. V. 57. P. 739-759.

## POSSIBLE MECHANISM OF YAWNING AND ITS INFECTIVENESS

Ispirian K.A., Ispiryan R.K.

Yerevan Physics Institute, Yerevan, Armenia, karo@mail.yerphi.am

For long time it was conventionally accepted that yawning is a process providing fresh portion of oxygen to weary brain. However some experiments using O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> have shown that there is no relation between yawning and breathing. Other experiments have confirmed the fact that yawning precedes periods of activity or when brain prepares to change gears. Recent observations with ultrasonic scans of fetus allow to assert that yawning is necessary for the development of lung of unborn babies, but have no purposes for adults, i.e. it is a redundant phenomenon which is widely spread among animals and fishes. Everybody knows the contagiousness of yawning. However, some experiments using video of mouth, eyes, etc. did not permit to determine what part of a yawning face is responsible for contagiousness. It can be infected not only by pictures, talking, but also excited by irritations in the sub thalamus region of the brain. Though the time and frequency of yawning depends on various factors, such as tiredness, sleepiness etc, nevertheless, it is evident that there is a common process, which takes place in brain resulting in the known consequences. In spite of the fact that many properties and accompanying processes of the yawning are well known the mechanism of the yawning process at the molecular level is not studied. In this work taking into account the well-known properties of yawning it is proposed a hypothetical mechanism for yawning connected with cosmic ray radiation and experiments which can prove or decline the proposed mechanism.

Careful observations show that in public places sometimes one can see two persons who are yawning almost simultaneously during a short time. Sometimes they stand back to back and can not infect each other by the above mentioned mechanisms. Since such coincidences are not accidental one can make conclusion that there is another reason which influences the rate of coincidences. This conclusion was experimentally verified recording the yawning coincidences between two groups of people in two rooms separated by a wall taking into account the physiological delay and dead times.

The proposed hypothesis is: Let us assume, that if not all, a large part of cases of yawning events is initiated either by high density energy deposition or high linear energy transfer (high LET) or by sudden doses of low LET of the extended air showers (EAS) of high energy cosmic ray particles in some region of brain of human and animal organisms. These low and high LET can form small and large brain micro lesions which usually are not detectable and washed out after some time. However, if the organism is preliminary "prepared" by visual, physical or psychological "infection" lowering the detection threshold of the lesions, then a yawning can take place. Indeed, it is well known that LET above some threshold value, about 50-100 keV/ $\mu$ m, can produce DNA or other molecule lesions and other effects which manifest or not themselves after some time of biochemical and other processes. As an example one can mention the lightnings in eyes observed by cosmonauts (see ref. [4]). Many experiments carried out in cosmos and using heavy ion beams from the accelerators have shown that the observed lightnings are the result of high LET. On the other hand, it has been shown [5] that certain doses of low LETs also can result in biological effects. Taking into account these facts one can assume that processes of yawning and its contagiousness is initiated by EAS particles.

With the help of such hypothesis one can explain, for instance, the frequency of a single man yawning and its contagiousness. The relativistic singly charged particles, mainly muons and , electrons and protons at high altitudes above sea level, give the main composition of the cosmic ray flux about 0.5 particle per minute per cm<sup>2</sup> at sea and mountain altitudes. In contrast to the heavy particles which can produce high LET, but make a negligible fraction of the cosmic ray flux, the singly charged particles produce very small quantity of high LET mainly as a result of stopping of secondary  $\delta$ -electrons with energy higher than 50 keV and a small number of low LET. The probability of production of such  $\delta$ -electrons in 1 cm thick of water by passing relativistic particle is about 0.1. Therefore the probability of production of necessary quantity of low and high LETs in the brain volumes by single particles during the recovery time is very small. However, this probability increases drastically when a part of EAS (depending on the EAS energy and distance from the EAS axis) passes through the brain. Few high LET and large number of low LET can be formed in sensitive parts of living organisms simultaneously giving a start of yawning of single and some neighboring organisms. The frequency of such EAS on earth is about 1 EAS per 5-20 minutes per m<sup>2</sup> depending on the EAS energy or particle flux density coincides roughly with the yawning frequency of a single man (more accurate estimates seem not reasonable because of the absence of details of dependence of readiness of the organism to yawning). If the above picture is correct one can understand why the yawning is infectious and even estimate the infection probability.

The above given hypothesis can be confirmed or declined unambiguously by the following experiments. Let a few blocks of scintillation counters allowing to detect the passage of EAS with particle density higher than certain values are installed just above or under a group of people. During a certain time interval after each event of passage of an EAS it is recorded the time of EAS passage and the yawning persons with the help of a camera. It is convenient to carry out such measurements during cinema, concert or other shows. It remains to look for a correlation between the EAS passage and yawning times: the distribution of the events upon the time difference between the passage of EAS particles and yawning of persons will have maximum at time difference corresponding to the physiological delay between the production of low and high LET and yawnings if the proposed mechanism is correct. The use of multiwire proportional counters can improve the coordinate resolution, while the coincidences between the events for groups isolated by walls can exclude completely the reflexus imitation explanation. One can carry out such experiments also using short, not dangerous pulses of many particles or fully striped ions with high atomic numbers from high energy accelerators.

### References

1. New Scientist, 19.12.1998, p.72.
2. New Scientist, 10.04.1999, p.9.
3. Bolshaya Meditsinskaya Entsiklopedia, Publishing House Sovetskaya Entsiklopedia, Moscow, 1978, v.8, p. 431.
4. Schimmerling, W. Radiobiological problems in space. An overview, Rad. Environ. Biophys., 31,197-203 (1992).
5. Vazques, M.E. & Carry, N.G. Effect of X-ray irradiation on neuritogenesis in retinal explant Anat. Rec., 226, 106-109, (1990).

## THE OXIDATIVE STRESS AS A POSSIBLE REGULATOR OF ADA2 ACTIVITY

Sargisova Y.G., Andreasyan N.A., Harutyunyan H.A., Hairapetyan H.L.  
H. Buniatyán Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Yerevan  
Republic of Armenia, [biochem@ipia.sci.am](mailto:biochem@ipia.sci.am)

The effect of oxidative stress on adenosine deaminase 2 (ADA2) was studied. The  $H_2O_2$ ,  $NaNO_2$  or sodium nitroprusside as oxygen radicals generating compounds were used at treatment of purified enzyme and activated cells. Human monocytes and activated peritoneal macrophages, Kupffer cells of infected mice, normally producing some ADA2 activity, demonstrated significant increase of activity in the experimental oxidative stress conditions.

**Introduction.** Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) which catalyses the deamination of (deoxy) adenosine to (deoxy) inosine in living organisms is presented by two different isoforms, ADA1 (34-41 kDa) and ADA2 (110 kDa). ADA2, the predominant isoenzyme in the serum of healthy subjects, differs from ADA1 in kinetic and immunochemical properties. ADA2 activity is significantly increased in serum and other body fluids at strong infectious diseases, indicating that enzyme may be involved in the development of immune system response to pathogens [1, 2]. Recent publications revealed that ADA2 belongs to a novel family of ADA related growth factors (ADGF), found in many organisms [3, 4], but a specific role for ADA2 has yet to be demonstrated. However, limited information is available about the molecular characteristics of ADA2 [3, 5, 6], and nothing is known about the enzyme regulation in organism. The releasing of reactive oxygen species (ROS) by cells is one of the most important biological responses which phagocytes use against invading microorganisms. The inflammation often is accompanied with the increase of ADA2 level. Hence, we proposed that ROS, produced in abundance at inflammation, can be the real factors influencing the ADA2 activity. Some ROS-generating compounds were used in present work for treatment the purified enzyme, and ADA2 producing cells from human blood, and infected laboratory mice.

**Materials and methods.** Human peripheral blood from healthy volunteers was used for enzyme purification (using the method described earlier [6]) and monocytes isolation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated according to Boyum [7]. Male laboratory mice were used in our experiments. Kupffer cells (KC) of mouse liver were isolated by two-step collagenase IV digestion, according to the method of Seglen [8]. Peritoneal lavage cells were obtained from the mouse peritoneal cavity flushed with PBS and washed three times. ADA activity assay included the measurement of the combined (ADA<sub>total</sub>) and ADA2 activity [9]. The ADA2 activity had been measured in the presence of 40  $\mu$ M EHNA, a specific inhibitor of ADA1, thus unmasking ADA2 activity. One unit of ADA activity was defined as the amount of enzyme, generating 1 nmol of ammonia per hour per mg of protein under experimental conditions. In the case of cell suspension, the activity is expressed in units per number of cells. As sources of active oxygen radical, the  $H_2O_2$ ,  $NaNO_2$  and other compounds solutions were used, as described in [10]. Cell suspension was previously incubated with 1mM  $NaN_3$  for 10 min at 37°C for inhibiting the catalase activity; then the cells were incubated at increasing concentrations of the used reagents for 15 min at 37°C in the thermostat, and the ADA2

activity was assayed. As controls, the cells incubated with buffer only were used.

**Results and discussion.** In the present work, the effects of some ROS-generating compounds on activity of ADA2 are described. The incubation of purified ADA2 with NO radical source, sodium nitroprusside, brought to the increase of the enzyme activity by 20 % (Fig. 1).

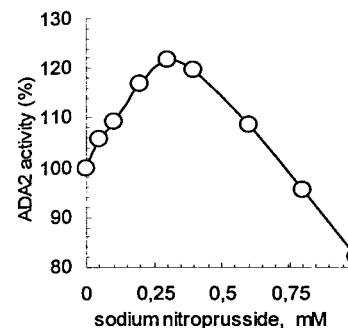


Fig. 1. Effect of sodium nitroprusside on ADA2, purified from human peripheral blood

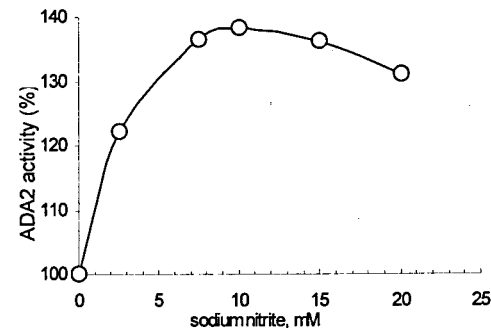


Fig. 2. Effect of  $NaNO_2$  on ADA2 activity human PBMC activated with *Salmonella typhimurium*. Cells were preliminary incubated during 6-hour at 37°C in suspending medium (HBSS, buffered with 20 mM HEPES, pH 7.35) to produce initial level of ADA2

ADA2 activation plot formed peak with the maximum near 250  $\mu$ M, but the further increase of reagent concentration brought to the reduction of activity. A short-time exposure of cells to reagents was sufficient for ADA2 activation, suggesting that oxygen radicals may be directly responsible for the enzyme activation. Other ROS-generating systems, such as  $H_2O_2$ , iron- $H_2O_2$  and iron-ascorbate showed a poor ability of oxidative stress to alter activity of purified enzyme in the used conditions. Some used SH-reagents also had not effect (plots not shown), suggesting that sulfhydryl groups of protein are not responsible for the observed activation. Fig. 2 presents the curve of human blood monocytes ADA2 activation at incubation with  $NaNO_2$ . As ADA2 activity in freshly prepared monocytes is very low, practically undeterminable, the isolated cells were then activated by incubation with *Salmonella typhimurium*. The activated monocytes were exposed to reagents. At incubation with  $NaNO_2$  the increasing of activity by 40 % over initial level was observed.

Fig. 3 and Fig. 4 present the plots of ADA2 activity versus  $NaNO_2$  concentration for peritoneal lavage cells (Fig. 3) and Kupffer cells (Fig. 4) of mice infected with *Salmonella typhimurium*. This infection allowed receiving of activated macrophages with well-expressed ADA2 activity. The  $NaNO_2$  - dependent oxidative stress brought to increase of ADA2 activity at 10-20 mM of  $NaNO_2$ .  $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ , or  $Fe^{2+}$ -ascorbate used as ROS-generating agents showed a poor effect on ADA2 activity of these cells. The obtained results allow us suggesting that the ADA2 is activated by NO radicals in our experimental conditions.

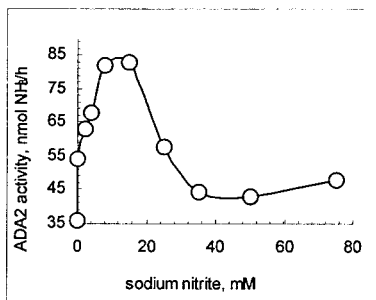


Fig. 3. Effect of NaNO<sub>2</sub> on ADA2 activity of peritoneal lavage cells of mouse infected with *Salmonella typhimurium*

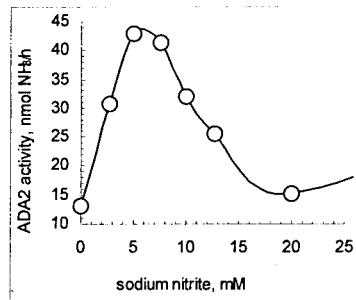


Fig. 4. Effect of NaNO<sub>2</sub> on ADA2 activity of Kupffer cells of mouse liver infected with *Salmonella typhimurium*

The plots of ADA2 activation show that a short exposure of cells to the oxygen radical generating reagents was sufficient for ADA2 activation. This observation allows suggesting that oxygen radical probably are directly responsible for the enzyme activation, and could be considered as a possible regulator of ADA2 activity.

#### References

- Valdes L., Pose A., San Jose E., Martinez Vazquez J.M. Eur. J. Intern. Med. 14(2): 77-88, 2003.
- Conlon B. A. & Law W. R. Clin. Exp. Immunol. 138: 14-20, 2004.
- Zavialov A. V. and Engstrom A. Biochem J., 391: 51-57, 2005.
- Zurovec M., Dolezal T., Gazi M. Pavlova E. and Bryant P. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 99: 4403-4408, 2002.
- Iwaki-Egava S., Namiki C., Watanabe Y. Comp. Biochem. Physiol. Part B 137: 247-254, 2004.
- Andreasyan N.A., Hairapetyan H.L., Sargisova Y.G. and Mardanyan S.S. FEBS Letters, 579 (3): 643-647, 2005.
- Lymphocytes. A practical approach. Ed. by J. Klaus (Russian, 1990, Moscow)
- Seglen P.O. J. Toxicol. Environ. Health, 5: 551-560, 1979.
- Andreasyan N.A., Hayrapetyan H.L., Sargisova Y.G., Mardanyan S.S., Badalyan L.T., Khanoyan A.S. Medical Science Monitor, 8(10): CR 708, 2002.
- Tavazzi B., Amorini A.M., Fazzina G., Di Pierro D., Tuttobene M., Giardina B. and Lazzarino G. J. Biol. Chem. 276 (51): 48083-92, 2001.

## MOSS PROTOPLAST IS A BIOPHYSICAL MODEL TO STUDY THE MECHANISMS OF ORIENTATION OF PLANT CYTOKINETIC APPARATUS

<sup>1,2</sup>Skripnikov A. and <sup>1</sup>Zrýd Jean-Pierre

<sup>1</sup> Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, Lausanne CH-1015

<sup>2</sup> Department of Chemical Enzymology, Moscow State University, Moscow 199992

In many plant cell types the plane of cell division is oriented perpendicularly to the cell axis. Transverse divisions are crucial to plant development. They occur during development of the zygote [1,2] and play important role in apical meristem morphogenesis [3]. For over 100 years, one of the best-studied developmental systems is the zygote of brown algae *Fucus*. It has been established that unidirectional light affects the orientation of rhizoid outgrowth from the spherical zygote. The first cell division is asymmetric and always perpendicular to an axis through rhizoid [4]. As a developmental model, moss protoplast is rather similar to the *Fucus* zygote. In this system, outgrowth from the spherical protoplast is also oriented by lateral light, forming a pear-shaped protoplast [5]. Subsequently, the plane of the first division is oriented roughly at 90° to the pear-shaped cell long axis. Based on the above observations, it is believed that unidirectional light orients not only the direction of outgrowth of *Fucus* zygote and moss protoplast but also the planes of their first divisions. Hence, it has been apparent that in brown algae and moss protoplast the spindle aligns parallel to the direction of light propagation and that division plane is oriented by light as the result of orientation of the mitotic apparatus. However, this has never been proven by instrumental methods including immunofluorescent observations of the cytoskeleton. The orthogonal nature of plant spindle where the axis lies at right angles to the equator does not mean that the plane of cell division is to be perpendicular to the axis connecting spindle poles [6,7]. Moreover, real-time observations of cytokinesis in *Arabidopsis* cells using GFP reveal the dramatic displacement of spindle and phragmoplast during cell division [8]. It remains unknown if light plays direct role in orientation of spindle and phragmoplast. Here, we propose to examine the direct influence of light on orientation of cell division plane in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. protoplasts.

To study the possibility of involvement of photoreceptors in orientation of spindle and phragmoplast, we observed in detail the microtubules reorganisation in the moss *Physcomitrella patens* protoplasts before and during the first division. We used the protoplast culture characterised by spindle assembly before the formation of outgrowth on spherical cell. We used polarised light that orients the growth of protonema filaments from protoplasts along the electrical vector whereas in non-polarised light protonemata grow in all directions. We tested the hypothesis that mitosis in geometrically spherical moss protoplasts in polarised light may be accompanied by orientation of spindle and phragmoplast with respect to the electrical vector.

The mitotic spindle and early phragmoplast mainly occupy the centre of spherical protoplasts. In moss protoplasts dividing in polarised light the equatorial planes of the spindle and phragmoplast are aligned perpendicular to the electrical vector, whereas in non-polarised light they are oriented in all directions (Fig. 1).

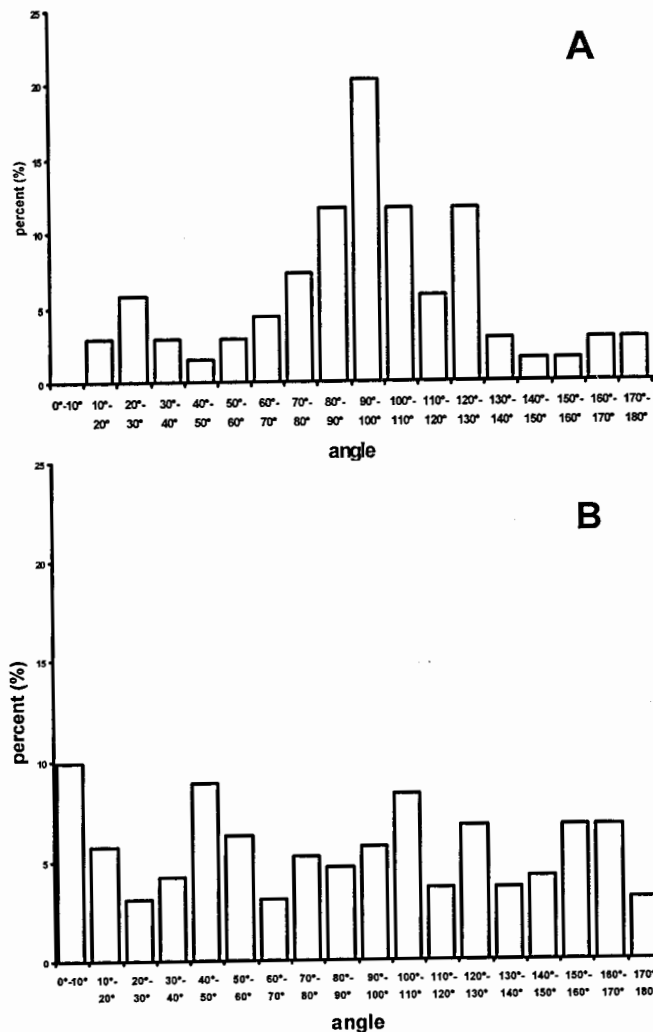


Fig. 1. Percentage distribution of orientations of equatorial plane of phragmoplast in moss protoplasts during the first division in plane-polarised light (A) and non-polarised light (B). The angle between equatorial plane of spindle or phragmoplast and electrical vector has been plotted at 10° intervals

The axis connecting two daughter nuclei separated by the early phragmoplast should be logically parallel to the electrical vector in polarised light, because the complex of the early phragmoplast and daughter nuclei is symmetrical, and the axis connecting the nuclei is perpendicular to the equatorial plane of the phragmoplast at the beginning of cytokinesis (Fig. 2). One or two daughter cells divide to give rise to

protonemal filaments growing along the electrical vector with the cross-walls oriented normal to the regeneration axis. Our observations suggest the involvement of dichroic pigment systems in the process of transduction of a vectorial light signal to the cytokinetic apparatus.

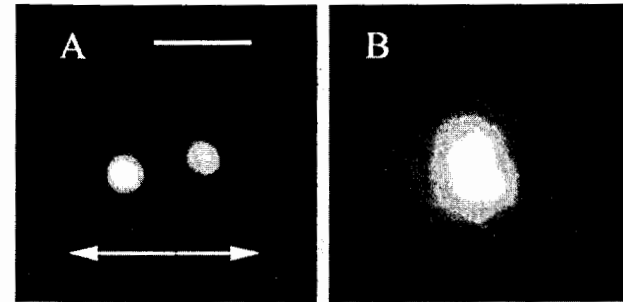


Fig. 2. Fluorescent observation of nuclei stained with Hoechst (A) and early phragmoplast microtubules labelled with antibodies (B) during division of moss protoplast in polarised light. Scale bar 10 µm. Double arrowhead shows the direction of electrical vector.

In our experiments, we used polarised light that is suitable for studying the mechanisms of orientation of the plane of cell division, a key issue in plant developmental biology. Instead of lateral illumination, using polarised light as the orienting factor allows one to exclude the asymmetrical action of unidirectional light due to attenuation and/or refraction inside the cell [9]. Phototropic responses of moss [10,11] and fern [12,13] cells are dichroically mediated by phytochrome that is distributed in an ordered manner at the cell periphery. Studies of tropic growth responses of the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. [11] and the fern *Adiantum capillus-veneris* L. [12,14] protonemal apical cell show that the transition dipole moment of red light absorbing form of phytochrome is oriented parallel to the cell surface and that of far-red light absorbing form is oriented perpendicular to the cell surface. Light signal transduction during phototropic growth response mediated by phytochrome may involve reorganization of the cytoskeleton. Phytochrome transduces the light signal to actin filaments [15] and MTs [16] in maize seedlings. We put forward the hypothesis that phytochrome, anchored in a cortical area of moss *Physcomitrella patens* protoplast, mediates the alignment of other cytoskeletal arrays, such as those associated with the spindle and phragmoplast. To test this hypothesis further, fluorescence observation of the cytoskeleton during moss protoplast division in polarised light will be useful.

#### References

1. Soueges R. Exposes d'embryologie et de morphologie vegetales. VII. Les lois du developpement // Actualites scientifiques et industrielles. - 1937. - V. 521. - P. 1-94.
2. Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Zygote // Embryology of Flowering Plants. Terminology and Concepts / Ed. T. B. Batygina. - St. Petersburg: World and Family, Russian Academy of Sciences, 1997. - P. 307-321.

3. Green P.B. Connecting gene and hormone action to form, pattern and organogenesis: biophysical transductions // *Journal of Experimental Botany*. - 1994. - V. 45 Special Issue. - P. 1775-1788.
4. Quatrano R.S., Shaw S.L. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos // *Trends in Plant Science*. - 1997. - V. 2. - P. 15-21.
5. Cove D.J., Quatrano R.S., Hartmann E. The alignment of the axis of asymmetry in regenerating protoplasts of the moss, *Ceratodon purpureus*, is determined independently of axis polarity // *Development*. - 1996. - V. 122. - P. 371-379.
6. Sinnott E.W. Cell polarity and the development of form in cucurbit fruits // *American Journal of Botany*. - 1944. - V. 31. - P. 388-391.
7. Green P.B., Selker J.M.L. Mutual alignment of cell walls, cellulose, and cytoskeletons: their role in meristems // *The cytoskeletal basis of plant growth and form* / Ed. C. W. Lloyd. - London: Academic Press, 1991. - P. 303-322.
8. Culter S.R., Ehrhardt D.W. Polarized cytokinesis in vacuolate cells of *Arabidopsis* // *PNAS*. - 2002. - V. 99. - P. 2812-2817.
9. Kraml M. Light direction and polarisation // *Photomorphogenesis in plants - 2nd Edition* / Eds. R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg. - Dordrecht: Kluwer, 1994. - P. 417-446.
10. Meske V., Hartmann E. Reorganization of microfilaments in protonemal tip cells of the moss *Ceratodon purpureus* during the phototropic response // *Protoplasma*. - 1995. - V. 188. - P. 59-69.
11. Esch H., Hartmann E., Cove D., Wada M., Lamparter T. Phytochrome-controlled phototropism of protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*: physiology of the wild type and class 2 ptr-mutants // *Planta*. - 1999. - V. 209. - P. 290-298.
12. Kadota A., Wada M., Furuya M. Phytochrome-mediated polarotropism of *Adiantum capillus-veneris* L. protonemata as analysed by microbeam irradiation with polarized light // *Planta*. - 1985. - V. 165. - P. 30-36.
13. Wada M., Sugai M. Photobiology of ferns // *Photomorphogenesis in plants - 2nd Edition* / Eds. R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg. - Dordrecht: Kluwer, 1994. - P. 783-802.
14. Furuya M., Song P.-S. Assembly and properties of holophytochrome // *Photomorphogenesis in plants - 2nd Edition* / Eds. R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg. - Dordrecht: Kluwer, 1994. - P. 105-140.
15. Waller F., Nick P. Response of actin microfilaments during phytochrome-controlled growth of maize // *Protoplasma*. - 1997. - V. 200. - P. 154-162.
16. Fischer K., Schopfer P. Interaction of auxin, light, and mechanical stress in orienting microtubules in relation to tropic curvature in the epidermis of maize coleoptiles // *Protoplasma*. - 1997. - V. 196. - P. 108-116.

## THE NETWORK ASSEMBLING OF THE REDOX SIGNALING PATHWAYS: SIGNAL ROLE OF THE OXYGEN PHOTOREDUCTION IN CHLOROPLAST

Strizh I.G.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, irina.strizh@mail.ru

Studies on signaling pathways and modeling of the regulatory cell networks are crucial to understand the functionality of the cell and the entire organism. Reactive oxygen species (ROS) such as  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ , play a key role in plant metabolism, cellular signaling and defense. The oxygen photoreduction via the Mehler reaction in chloroplast is considered to be a focal point of redox signaling in leaf cells. To assemble the entire cell redox signaling network, we should use all benefits of classical biochemical and biophysical approaches with cooperation of the modern molecular biological and bioinformatics technologies.

### Introduction

Living in an oxygenic world forced the cell to continually balance the use of oxygen as a source of energy against its potential as a source of cellular injury. Chloroplasts are the major site of ROS generation in leaf cells [1]. Oxygen reduction in chloroplasts under illumination in the Mehler reaction [2] has been studied for more than half a century in different laboratories and among the first studies in this area several works were made by Academician N.M. Sissakian and colleagues in his laboratory [3]. Current data on wide range of plant responses triggered by  $H_2O_2$  accumulated in chloroplasts under stress conditions allow to propose that  $O_2$  photoreduction in photosynthetic electron transport chain (PETC) plays an important role in stress sensing and redox signaling. In the present work, an attempt is made to summarize the majority of the already known Mehler reaction-associated cell and plant responses. Still, one of the main obstacle in modeling the signal transduction and metabolite pathways is lack of comprehensive knowledge on these topics. Study of the ROS signaling pathways from chloroplast reveals that there remain appreciable gaps in the understanding of plant acclimation to environmental stresses, and highlights the need for the new investigative approaches. Availability of complete *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Physcomytrella patens* genome sequences, together with molecular recourses of functional genomics and proteomics, as well as involvement of the Systems biology approaches, e.g. mathematical simulation and analysis of cellular metabolism and regulation, in assistance with contemporary computer facilities and Information Technologies should revolutionize our understanding of ROS signaling network in plants.

### Oxygen photoreduction in chloroplasts as source of cellular redox signals

Most of the already known Mehler reaction-associated cell responses are summarized in Fig. 1. The systemic redox changes in the proximity of Photosystem (PS) II and  $H_2O_2$  accumulation in chloroplasts were supposed to be the key determinants of the systemic acquired acclimation [4] and in the regulatory network, controlling biotic and abiotic stress responses in the cell [5]. Involvement of the photoproduced  $H_2O_2$  and redox events in the vicinity of PS II and/or PS I in the global changes of the metabolism, e.g. in regulation of  $C_3$ -CAM transition, was shown in  $C_3$ -Crassulacean acid metabolism (CAM) intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* [6].

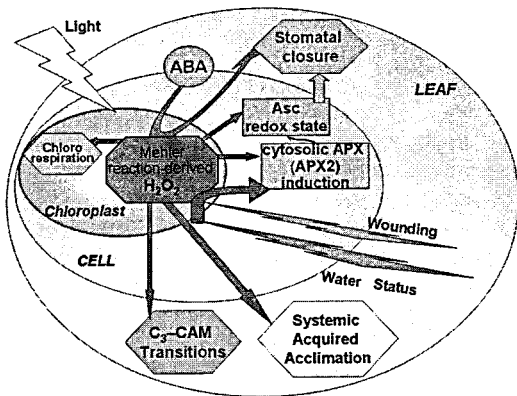


Fig. 1. Cell responses associated with the Mehler reaction-derived hydrogen peroxide accumulation

regulates LHC II protein phosphorylation *in vivo*, was suggested to depend on the steady-state level of ROS production in chloroplast [10]. The role of the Mehler reaction in state 2-to-state 1 transition, that requires the oxidation of PQH<sub>2</sub> to inactivate the LHC II kinase and to activate the protein phosphatase, was demonstrated recently in *Chlamydomonas reinhardtii* cells [11].

Evidence that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated in chloroplasts is involved in stomata closure, probably as an intermediate in abscisic acid (ABA) signaling, was revealed in *Vicia faba* guard cells [12]. The photoproduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may directly alter the ascorbic acid (Asc) redox state in guard cell, thus controlling stomata movements [13]. Photosynthetic electron transport to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the bundle sheath cells in *Arabidopsis* leaves under high light stress induced a rapid expression of the gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase (APX) [14]. Transgenic tobacco plants with enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging ability in their chloroplasts due to ectopic expression of bacterial catalase or thylakoids-bound APX showed that the photosynthetic electron transport through the plastoquinone (PQ) pool contributes to cytosolic APX induction at an early stage of photooxidative stress exposure, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evolution is associated with the prolonged induction of the gene [15]. Accumulation of photoproduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in chloroplast could be a signal for APX induction in wounded leaves also [16]. Bearing in mind that the central role of the ROS gene network of *Arabidopsis* was attributed to the APX1 [17] one may conclude that the O<sub>2</sub> photoreduction in chloroplast via the Mehler reaction is one of the main process controlling the ROS gene network. Obviously, that each arrow in the Fig.1 should include a number of intermediates, involved in signal transduction. Based on the number of reviews and research papers [18-22] a general scheme showing the possible candidates for the signal transduction from the chloroplast could be proposed (Fig. 2), however the definite pathway schemas remain to be elucidated.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the action of superoxide dismutase on O<sub>2</sub><sup>-</sup> generated by the Mehler reaction may serve as a substrate and as a signal inductor for chlororespiration [7]: it mediates the induction of chloroplastic Ndh complex [8] and stimulates the phosphorylation of the NDH-F subunit [9]. Amongst a number of unanswered questions of great importance one should note the role of the Mehler reaction in light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHC II) protein phosphorylation. The functional state of the LHC II kinase that

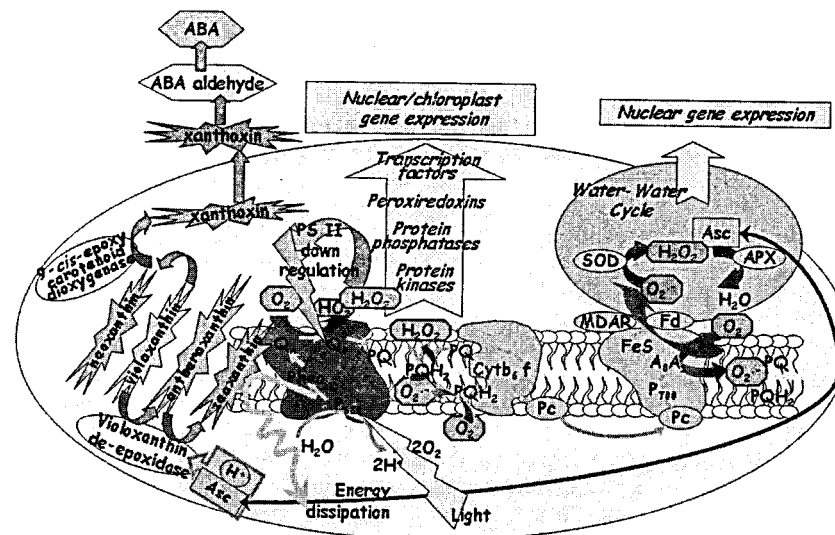


Fig. 2. The hypothetical schema of the Mehler reaction-associated initiation of the signal transduction pathways

#### Methods and technologies that should facilitate assembling of the redox signaling pathways

Recent advances in large-scale and high-throughput techniques such as DNA microarray analysis, mass spectrometry-based proteomics and forward/reverse genetics provide a tremendous amount of information on ROS and redox signaling pathways and the bioinformatics tools have facilitated integration of the experimental data into a computational framework, thereby allowing structured and systematic processing of information [see 23 for references]. The names of the transcription factors as well as number of genes involved in ROS network in *Arabidopsis* could be already listed [17, 24], however their integration into the pathway remains the main obstacle. Each large-scale analysis of the cell transcriptome by means of cDNA microarray technology results in identification of numerous expressed sequence tags (ESTs). To understand any process and ROS signaling in particular, it is necessary to merge and compare every EST profile. However direct comparison of the results obtained in diverse studies and in various cells is not straightforward, because frequently different platforms are used [24]. Therefore the implementation of the new integrative approaches is required for pathways modeling.

To integrate a discovery science with hypothesis-driven science, a new scientific approach has arisen in biology – the systems biology [25]. The aim of the systems biology is to achieve a mechanistic understanding of the functional components of cells and of the entire organism including their development by predicting their properties from numerical data that arise from interaction analyses of many system elements. Metabolic modeling as a tool to analyze the network of redox reactions composing the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione cycle in chloroplast have been proposed

several years ago [26] and nowadays this method could be successfully used as the step towards modeling of the ROS signal transduction pathway in the framework of systems biology.

The contemporary state of knowledge allows us to perform the highly-effective hypothesis-driven science: we are able to formulate a number of rules/hypothesis that should help to model process. To elucidate, for instance, key regulatory proteins (transcription factors) that influence the expression of specific genes, it is crucial to identify cis-regulatory elements in the genome. One of the most useful approaches is so-called footprinting: the aligning orthologous regions flanking a gene from multiple species, i.e. conserved noncoding sequence motifs. Another area where global scale information is under processing is the prediction of protein-protein interaction networks. Systems comparative studies are required to elucidate ROS-induced signal transduction pathways as well. For instance, the sequences Cys-X-X-Gly-X-X-Arg-Ser/Thr and Cys-X-X-Cys are the signature motifs in certain protein tyrosine phosphatases and cellular thioredoxins, consequently that could be oxidized directly by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comparative systematic searching of sequenced genomes has the potential to identify many unappreciated proteins that share such motifs and, therefore, mediate ROS signal transduction [27].

However, there is an inherent danger in computer-based integrative approach in that it may lead to over-interpretation of the data and conclude misleading predictions. To avoid this, expert knowledge should be involved in systems analysis. Ontologies were proposed as one of the most promising approaches that enable knowledge sharing and re-evaluation in biology [28]. They facilitate semantic integration of diverse data into a coherent machine-interpretable model and provide support for formulation of a testable hypothesis. The ability to link an expert's knowledge that could be formalized into ontology, with the data and information stored in databases could bring us to a more comprehensive knowledge about a particular domain in biology.

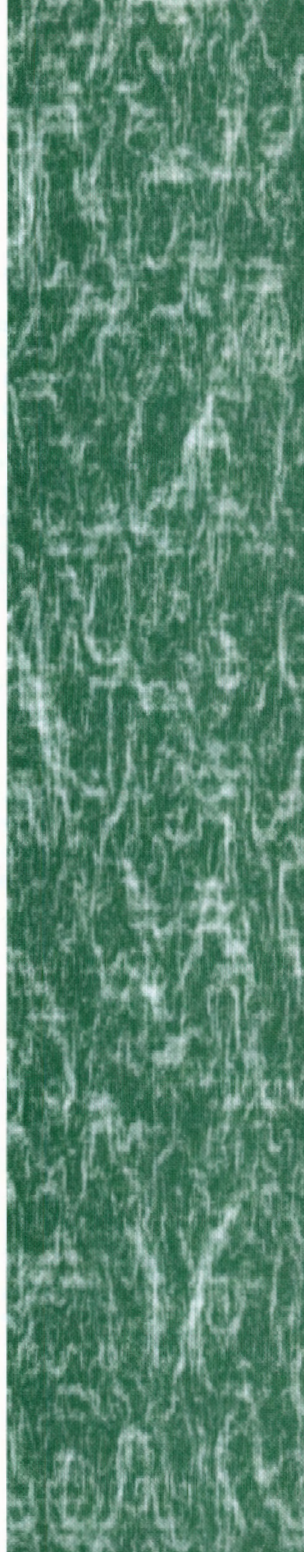
Yet, many questions related to the oxygen photoreduction in chloroplasts via the Mehler reaction remain unclear and unanswered, thus representing challenge for future. One of the problems is how to discriminate signaling networks initiated by the Mehler reaction from the others, initiated by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated outside the chloroplast. To clarify the picture, we should use the combination of classical biochemical and biophysical approaches with the modern molecular biological and bioinformatics technologies as well.

#### References

1. Asada K. (2006) *Plant Physiol* 141: 391–396
2. Mehler A.H. (1951) *Arch Biochem Biophys* 33: 65–77
3. Mosolova I.M., Bekina R.M., Mikhailova E.S., Sisakian N.M. (1965) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 164:1179-82
4. Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B. et al. (1999) *Science* 284: 654–665
5. Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., et al. (2003) *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 390–396
6. Slesak I., Karpinska B., Surowka E., et al. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44: 573–581
7. Casano L.M., Zapata J.M., Martin M. and Sabater B. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 942–948
8. Casano L.M., Martin M. and Sabater B. (2001) *Plant Physiol.* 125: 1450–1458
9. Lascano H.R., Casano L.M., Martin M., Sabater B. (2003) *Plant Physiol.* 132: 256–262
10. Breitholtz H.L., Srivastava R., Tyystjärvi E., Rintamäki E. (2005) *Photosynth. Res.* 84: 217–223
11. Forti G. and Caldiroli G. (2005) *Plant Physiol.* 137: 492–499
12. Zhang X., Zhang L., Dong F., et al. (2001) *Plant Physiol.* 126: 1438–1448
13. Chen Z. and Gallie D.R. (2004) *Plant Cell* 16: 1143–1162
14. Fryer M., Ball L., Oxborough K., Karpinski S. et al. (2003) *Plant J.* 33: 691–705
15. Yabuta Y., Murata T., Yoshimura K. et al. (2004) *Plant Cell Physiol.* 45: 1586–1594
16. Chang C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R. et al. (2004) *Plant J.* 38: 499–511
17. Davletova S., Schlauch K., Coutu J., Mittler R. (2005) *Plant Physiol.* 139: 847–856
18. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem V. (2004) *Trends Plant Sci.* 9: 490–498
19. Baier M. and Dietz K.-J. (2005) *J. Exp. Bot.* 416: 1449–1462
20. Fey V., Wagner R., Brautigam K., Pfannschmidt T. (2005) *J. Exp. Bot.* 56: 1491–1498
21. Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B. (2006) *BBA* 1757: 1496–1503
22. Hancock J., Desikan R., Harrison J., et al., (2006) *J. Exp. Bot.* 57: 1711–1718
23. Kotchoni O.S., Gachomo E.W. (2006) *J. Biosci.* 31: 389–404
24. Vandenabeele S., Van Der Kelen K., Dat J., Gadjev I., et al. 2003. *PNAS* 100:16113–16118.
25. Ideker T., Galitsky T., Hood L. (2001) *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 2: 343–372
26. Polle A. (2001) *Plant Physiology* 126: 445–462
27. Strizh I., Jutchkov A., Tverdokhlebov N., Golitsyn S. (2007) *FGCS* 23: 428–434
28. Strizh IG (2006) *BioEssays* 28: 199–210



**Секция  
«КОСМИЧЕСКАЯ  
БИОЛОГИЯ  
И МЕДИЦИНА»**



# ХАРАКТЕР АДАПТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ, АНОМАЛИЙ ЯДРА БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СДВИГОВ У ЛЕТЧИКОВ С РАЗЛИЧНЫМ СТАЖЕМ

Алчинова И.Б.

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия,  
alchinovairina@yandex.ru

Основная проблема оценки биологического риска антропогенных и иных воздействий в условиях современной авиации относится к дозам, не превышающих предельно допустимый уровень, или незначительно его превышающих. Именно в этом диапазоне ответ организма на действие изучаемых факторов предельно персонафицирован. Биологические последствия таких воздействий могут быть выявлены только с помощью многоуровневых исследований. В нашей работе мы попытались оценить адаптивные способности организма летчиков с помощью ряда методик: постановки одной из схем адаптивного ответа на лимфоцитах периферической крови, учета аномалий ядра в буккальном эпителии и лазерной корреляционной спектроскопии биологических жидкостей. В процессе работы было выделено три группы: контрольная группа А, сюда вошли люди без часов налета, но по роду своей деятельности имеющие отношение к авиации, и в зависимости от часов налета: группа Б с общим налетом до 1000 и группа В - свыше 1000 часов.

Для оценки функционального состояния организма [1] и оценки влияния факторов окружающей среды использовались клетки слизистой оболочки ротовой полости. Критерием оценки служила частота встречаемости цитогенетических нарушений: клеток с пикнозом, кариорексисом, кариолизисом и другими аномалиями ядра (АЯ) [2].

В клетках буккального эпителия выделенных групп наблюдается двукратное увеличение клеток с пикнозом у летчиков по сравнению с контролем, значительное возрастание клеток с кариорексисом и снижение клеток с кариолизисом. С увеличением часов налета процент клеток с кариорексисом падает, а кариолизисом возрастает (Рис.1).

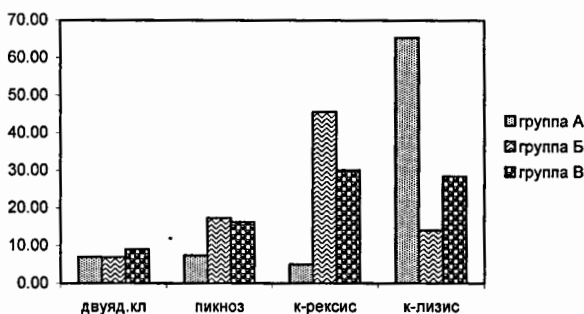


Рис. 1. Частота встречаемости аномалий ядра в буккальном эпителии летчиков в зависимости от часов налета. По оси ординат – средняя частота встречаемости АЯ.

Поскольку обнаруженные различия получены на группе здоровых людей, проходящих регулярные медицинские осмотры для допуска к летной работе, можно предполагать, что они обусловлены действием факторов полета, к числу которых относится и радиация.

Для оценки адаптивных возможностей организма была использована одна из схем адаптивного ответа на ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови. Схема адаптивного ответа включала нанесение адаптирующей дозы (0,05 Гр)  $\gamma$ -облучения в стадии G<sub>0</sub> и повреждающей дозы (0,5 Гр) на стадии G<sub>2</sub>. Адаптивный ответ (АО) – радиобиологический феномен, заключающийся в увеличении радиостойкости биологических объектов к большим, повреждающим дозам облучения после предварительного воздействия ионизирующей радиации в малых, неповреждающих дозах облучения [3]. Известно также, что возникновение адаптивного ответа зависит от ряда факторов, и развивается не у всех членов популяции. В нашей работе адаптивный ответ наблюдался в контрольной группе, у большинства в группе Б, и не наблюдался в группе В. Возникновение адаптивного ответа не зависело от возраста обследованных (от 19 до 48 лет).

Развитие адаптивного ответа, несомненно, связано с изменениями в клеточном метаболизме, и поэтому интерес представляет среда, в которой находятся культивируемые клетки. Эта жидкость была исследована методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), который позволяет регистрировать гидродинамические размеры частиц находящихся в любых биологических жидкостях [4]. Сравнивались ЛК-спектры летчиков клетки которых давали адаптивный ответ и клетки которых его не давали.

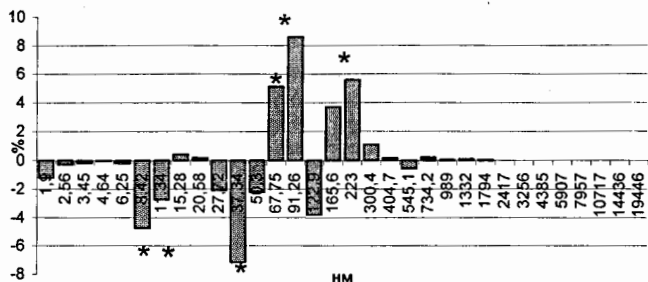


Рис. 2. Разница между ЛК- гистограммами культуральной жидкости в группе летчиков без АО и с АО. \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney

Показано, что в культуральной среде при адаптивном ответе наблюдается увеличение частиц размером от 8,42 – до 11,34 и 37,72 нм и одновременно уменьшение частиц размером от 67,75 – до 91,26 нм и от 165,60 – до 223,03 нм (Рис. 2).

Представляло интерес попытаться выяснить возможные механизмы наблюдаемых сдвигов. В следующей серии экспериментов были исследованы изменения в составе культуральной жидкости, возникающие при моделировании “bystander”-эффекта на выделенных лимфоцитах [5]. Видно, что инкубация лимфоцитов в среде и облучение приводит к увеличению вклада в светорассеяние частиц размером 91,26 – 223,03 нм (Рис. 3).

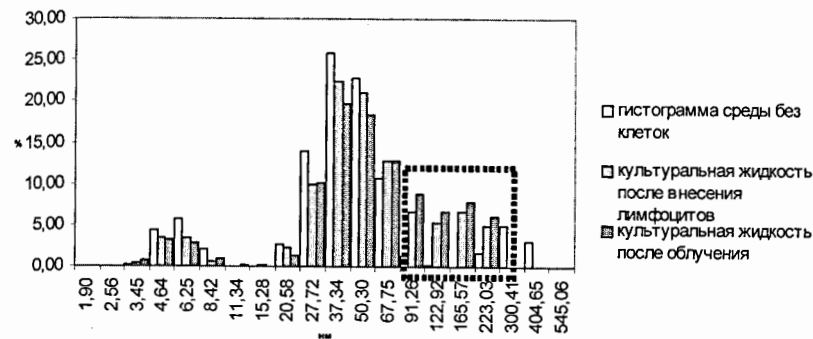


Рис. 3. ЛК-гистограммы среды и культуральной жидкости лимфоцитов крови в опытах по эффекту “bystander”

Внесение интактных лимфоцитов в исследуемую среду приводит к снижению вклада в светорассеяние этой фракции и появлению крупных частиц (300-500 нм), которые не регистрировались ранее (Рис. 4). Из данных литературы известно, что размеры РНП- и ДНП-частиц составляет 80-100 нм.

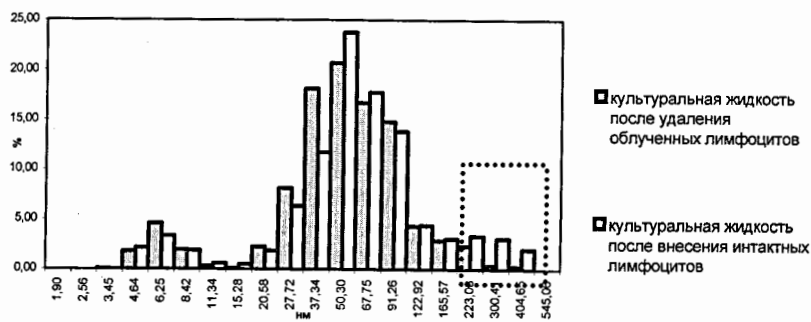


Рис. 4. ЛК-гистограмма культуральной жидкости лимфоцитов крови после опытов по эффекту свидетеля после внесения интактных лимфоцитов

По-видимому, облучение приводит к накоплению в среде фактора с размером около 90 нм, который при действии на интактные лимфоциты вызывает появление в культуральной жидкости частиц размером 300-500 нм (возможно, крупные фрагменты ДНП или продукты разрушения клеток).

В серии опытов с культуральной жидкостью от лимфоцитов крови летчиков также показано нарастание вклада в светорассеяние частиц размером 91,26 у группы с отсутствием адаптивного ответа. В то же время не было зафиксировано появления субфракции крупных частиц, являющейся, как мы полагаем, проявлением эффекта “bystander”. Последнее обстоятельство может быть объяснено отсутствием в пробе интактных клеток, поскольку все они подверглись действию радиации.

Наблюдаемые нами эффекты являются результатом многофакторных воздействий. Наряду с общими закономерностями изменений в сывороточном и

клеточном гомеостазе, нами обнаружены отдельные проявления повышенной индивидуальной чувствительности.

Можно полагать, что дальнейшее изучение особенностей клеточных реакций и метаболических сдвигов под действием факторов полета и, прежде всего, радиации, позволит выработать критерии индивидуальной чувствительности к ним.

#### Литература

1. Titenko-Holland N., Jacob R.A., Shang N., Balaraman A., Smith T. 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutation Res.*, 417: 101-114.
2. Tolbert P.E., Shy C.V., Allen J.W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.*, 271:69-77.
3. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. Одесса: Друк, 2002, 400 с.
4. Радиация и патология / Под ред. Цыба А.Ф., М.: «Высшая школа», 2005, 340с
5. Вейко Н.Н., Ермаков А.В., Еголина Н.А. и др. Активация транскрипции тотальной и рибосомной РНК при воздействии адаптирующих доз ионизирующей радиации, индуцирующих изменение координат локусов хромосом в ядрах G0 – лимфоцитов человека// Радиационная биология. Радиоэкология, 2004, том 44, №5, с. 501-508

## НЕКОТОРЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ КОСМИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ

Африян Э.К.

Национальная Академия наук Армении, г. Ереван, Армения

Н.М. Сисакян придавал важное значение решению микробиологических проблем обеспечения безопасности космических полетов. В бытность моей работы в Москве, в Институте микробиологии и особенно в период работы в Париже в Институте Пастера, мне посчастливилось часто встречаться с ним и убедиться в его исключительно широкой эрудиции в этой области.

Вопросы микробных повреждений материалов, в частности синтетических полимеров, используемых в космической технике, заслуживают особого внимания. Основные работы в этой области выполнены в Советском Союзе и успешно развиваются в Институте медико-биологических проблем РАН и других российских организациях. Важность их все более возрастает в связи с длительными космическими полетами и повышенными требованиями безопасной и надежной эксплуатации используемых материалов.

В середине 70-х Институт микробиологии АН Армении был активно вовлечен в программу работ по изучению микробных обрастаний и повреждений полимерных материалов, применяемых в космической технике. В сотрудничестве с другими учреждениями был выполнен большой комплекс микробиологических, физико-химических исследований, выделены и изучены различные микробные деграданты из многих образцов натуральных и климатических испытаний полимерных материалов в разнообразных эколого-географических регионах. После распада Союза правопреемником этих разработок явился созданный в 1993 г. на базе Института Республиканский Центр депонирования микроорганизмов НАН Армении (РЦДМ). Указанные работы получили дальнейшее развитие в наших работах в рамках Проекта МНТЦ на 2002-05 гг., финансируемого США (НАСА) и ЕС. Основной задачей Проекта являлось создание Коллекции Культур с базами данных биодegradантов полимерных материалов космического назначения. На различных этапах реализации Проекта был привлечен ряд ведущих специалистов: Н.Д. Новикова (ГНЦ РФ – ИМБП РАН – микробиология), А.В. Кураков (МГУ им. Ломоносова – микология), О.Н. Рева (Институт микробиологии и вирусологии им. Заболотного, Киев – информатика, БД) и сотрудники Кафедры молекулярной физики Ереванского государственного университета (физико-химия полимеров).

В данном сообщении отмечу лишь наиболее важные результаты некоторых наших работ, выполненные в основном в рамках упомянутого Проекта МНТЦ.

Характерной особенностью микробных повреждений материалов и оборудования в гермозамкнутых зонах является то, что помимо нарушения их целостности, ведущего к изменению функций, создаются очаги инфицирования среды, могущие исключить их обитание. Данный вывод подтвержден работами многих авторов, а также нашими исследованиями, которыми установлено развитие в микробиоте биоповреждений материалов различных видов условно-патогенных микроорганизмов и их токсичных форм. В условиях длительного воздействия

космических факторов не исключено и появление разнообразных мутантов и других более опасных форм микроорганизмов.

Следует подчеркнуть, что в микробиологических исследованиях процессов биоповреждений и биоразрушений материалов, в частности используемых в космической технике, недостаточно изучались экстремофильные формы микробов. В этих целях нами применялась методика тотального микробиологического анализа, позволяющая охватить подобные формы, а использование накопительных культур обеспечивало выделение микроорганизмов в случае, если они присутствовали в обследуемых образцах в единичных количествах. Выбор питательных сред и условий культивирования обеспечивал и выделение разнообразных групп микроорганизмов (неспорозные и спорозные бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты и хемолитотрофные бактерии), а также их экстремофильных форм, а именно: ацидофилов, развивающихся при pH 2-4, алкалофилов с оптимумом роста при pH 9 и более, галофилов, развивающихся при концентрации NaCl 15 % и выше, психрофилов, растущих при +5 +10°C, термофилов – факультативных (45-55°) и облигатных (56° и выше). Основные этапы работ по выделению и характеристике культур представлены на рис. 1.

В итоге 30-летних работ у нас создана коллекция грибных деградантов, включающая более 1000 штаммов. Поддерживаемые в коллекции биодеграданты отражают большое разнообразие полимерных материалов (полиамиды, полиимиды, полиэфир, резинотехника, кремнийорганика, углепластик, искусственная кожа и др.), а также резкие контрасты эколого-географических и почвенно-климатических условий (Арктика, тундра, субтропики, тропики, акватории Индийского океана и др.).

На основе сравнительной оценки биообрастания определенных полимеров нами разработаны новые наборы грибов для оценки грибостойкости синтетических полимерных материалов космического назначения. В отличие от используемых наборов, они укомплектованы исключительно штаммами грибных деградантов, выделенными из ОК "Мир" и других биоповрежденных полимеров, используемых в космической технике. Несмотря на то, что эти наборы составлены



Рис. 1. Схема микробиологических исследований образцов и характеристики микробных деградантов

из малого числа биодеградантов, они превышают активность применяемых ныне стандартных наборов.

В течение многих лет нами изучались методы консервации грибных деградантов, при которых они сохраняют свои исходные агрессивные свойства. Этот вопрос имеет существенное значение в проблеме биоповреждений полимеров, поскольку поддержание этих особенностей культур в течение длительного времени является необходимым условием для их использования при биотестировании материалов. Помимо периодических пересевов культур на соответствующих агаризованных питательных средах, в наших исследованиях использовался ряд методов длительного хранения культур микроорганизмов, как-то: криоконсервация в различных концентрациях глицерина (-20, -40, -60, -100 °) при температурах -10°, -40° и -60°; криоконсервация в жидком азоте (-196°), лиофилизации с предварительным замораживанием и хранение культур под вазелиновым маслом. Изучалась также и консервация на разнообразных естественных субстратах (песок, смесь почва/песок 10:1, цеолит).

Сравнительная оценка испытанных методов позволяет заключить о больших преимуществах консервации культур с использованием жидкого азота. Слабой степенью репродукции характеризовались штаммы *Chaetomium globosum*, *Aureobasidium pullulans*, *Ulocladium botrytis*.

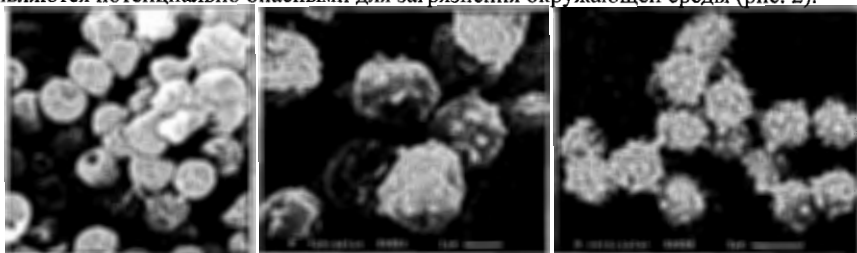
Инициация биоповреждений материалов во многом обусловлена обнаруживаемой у них микрофлорой в природных и эксплуатационных условиях. Этот вопрос прорабатывался нами многие годы, причем обследовались самые разнообразные полимерные материалы на фоне натуральных, климатических и прово-

Таблица 1. Жизнеспособность видов грибов после обработки наборами (репродукция после хранения 2 и 15 лет в процентах к *A. niger* – 100 %)

Обработанные полимерные пленки, сроки хранения	Кол-во изученных образцов	Испытанные наборы грибов-деградантов	
		ГОСТ, % жизнеспособности в изученных образцах	«Комиссионный», % жизнеспособности в изученных образцах
Пленки фторопласта, 2 года	15	<i>Aspergillus niger</i> , 100 <i>Trichoderma viride</i> , 20 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , 47 <i>P. chrysogenum</i> , 20 <i>Chaetomium globosum</i> , 13	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. ustus</i> , 47 <i>A. flavus</i> , 7 <i>P. funiculosum</i> , 13
Пленки фторопласта, 15 лет	3	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. terreus</i> , <i>A. flavus</i> , 30 <i>P. aurantiogriseum</i> , 70 <i>Ch. globosum</i> , 35 <i>Paecilomyces variotii</i> , 30	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. ustus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>P. funiculosum</i> , 30 <i>A. puniceus</i> , <i>A. flavus</i> , 20 <i>P. chrysogenum</i> , 10
Полиамиды, 15 лет	4	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. puniceus</i> , 20	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. puniceus</i> , <i>A. alternata</i> , 10
Поливинилхлориды, 15 лет	1	<i>A. niger</i> , 100	<i>A. niger</i> , 100
Полиэфиры, 15 лет	1	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. flavus</i> , 20 <i>P. aurantiogriseum</i> , 10	<i>A. niger</i> , 100
Полиакрилаты, 2 года	4	<i>A. niger</i> , 100 <i>P. chrysogenum</i> , 100 <i>P. aurantiogriseum</i> , 50	<i>A. niger</i> , 100 <i>A. ustus</i> , <i>P. funiculosum</i> – менее 20

кационных испытаний в течение 15-20 и более лет. С использованием 10 наборов грибов нами изучалась репродукция жизнеспособности отдельных штаммов грибов. Выборочные данные опытов, представленные в табл. 1, показывают, что разные культуры и виды биодеградантов характеризуются различной выживаемостью и репродукцией после их высевов с поверхности полимеров.

Штаммы испытанных наборов полностью сохранили свои биоповреждающие свойства после их длительного хранения на полимерных материалах. Доминантными на изученных полимерных материалах являлись культуры *Aspergillus niger*, *A. ustus*, *Cladosporium herbarum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium aurantio-griseum*, *P. chrysogenum*, *P. funiculosum*, *P. melinii*, *Scopulariopsis brevicaulis*. Культуры *A. niger* являются наиболее жизнеспособными и репродуцируемыми после многолетнего хранения на различных полимерах. Споры данного вида благодаря морфологическим особенностям, обладают слабыми адгезивными свойствами и являются потенциально опасными для загрязнения окружающей среды (рис. 2).



*Aspergillus niger*

*A. fumigatus* (OC Mir)

*A. versicolor* (OC Mir)

Рис. 2. Споры грибных деградантов в сканирующем электронном микроскопе

В качестве типичных представителей (эталонных штаммов) наиболее распространенных видов грибных деградантов на полимерных материалах отобраны и хорошо охарактеризованы 12 штаммов, выделенных в основном из ОК «Мир». Их морфологические, физиолого-биохимические особенности обобщены в изданной нами в 2005 г. книге «Грибные деграданты полимерных материалов: Базы данных и Коллекция культур с Атласом».

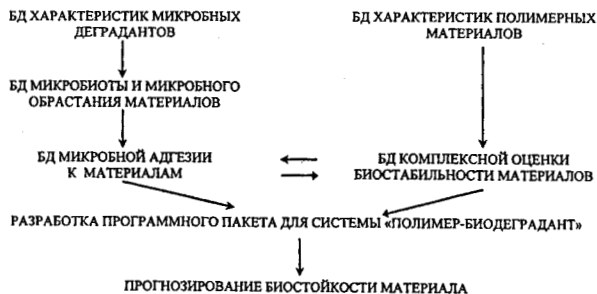


Рис. 3. Взаимодействие баз данных для прогнозирования биостойкости полимерных материалов

Важной задачей комплекса работ, выполненных в рамках упомянутого Проекта МНТЦ, являлась разработка методологических подходов для прогнозирования биостойкости полимерных материалов. В результате обобщения большого массива данных были созданы БД микробных деградантов (рис. 3) и разработана программа автоматической обработки и диалоговой передачи информации с использованием программных языков PHP и Java Script, а общий межсетевой интерфейс CGI обеспечивал компьютерные программы в режиме HTML (рис. 4).

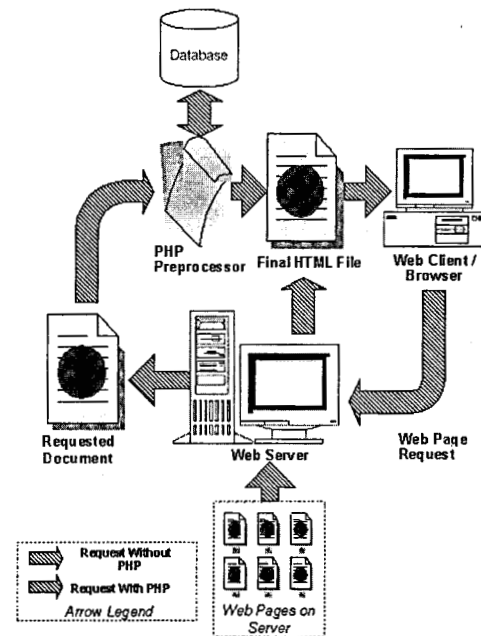


Рис. 4. Схема функционирования PHP и CGI

Создан выводной формат структуры микробной БД для NTSYSpc (Numerical Taxonomy System – Нумерическая Таксономическая Система), использованный нами для кластерного анализа и дифференциации микроорганизмов в программной среде

Большое разнообразие грибных деградантов синтетических полимерных материалов требует введения статуса штамма сравнения / эталона в качестве типичного представителя определенной таксономической группы грибных деградантов. Введение и утверждение статуса подобных штаммов грибных деградантов имеет большое значение для развития работ по изучению биоповреждений и биоразрушений полимерных материалов. Помимо их важности для систематики, идентификации грибных деградантов и выяснения их филогенетических связей, такие штаммы могут иметь решающее значение для внедрения информационных технологий при решении многих проблем процессов биоповреждения. Они могут

служить в качестве индикаторных организмов для создания эффективных систем дистанционного и автоматизированного контроля и регулирования процессами биоразрушений материалов.

По нашим данным, в определенной степени *Aspergillus niger* может считаться эталонным видом для индикации грибной диссеминации и оценки безопасности обитаемых герметических зон.

В итоге выполненных нами исследований:

- Создана коллекция культур грибных деградантов (~ 1000 штаммов)
- Разработаны новые наборы культур микроорганизмов для оценки биостойкости синтетических полимерных материалов
- Обосновано использование микробной адгезии как критерия оценки надежного и безопасного применения полимерных материалов
- Получены новые штаммы микробов для переработки и утилизации отходов полимерных материалов, в том числе целлюлозных.
- Разработаны базы данных для характеристики биодеградантов и полимерных материалов, микробного обрастания полимерных материалов, адгезивных свойств биодеградантов к полимерным материалам и интегрированной оценки биостойкости полимеров.

#### Литература

1. Алехова Т.А., А.А. Александрова, Т.Ю. Новожилова, Л.В. Лысак, Н.А. Загустина, А.М. Безбородов (2005). Мониторинг микроорганизмов деструкторов на пилотируемых орбитальных комплексах // Прикладная биохимия и микробиология, 4 (41), 435-443.
2. Африкян Э.К. (ред.) (2006.). Грибные деграданты полимерных материалов: Базы данных и Коллекция культур с Атласом. Абовян, 250 с.
3. Кураков А.В., Н.Д. Новикова, С.М. Озерская, С.А. Геворкян, В.Б. Гогинян (2006). Условно-патогенные и токсигенные микроскопические грибы среди деструкторов синтетических полимерных материалов // Проблемы медицинской микологии, 2 (8), 54-58.
4. Кураков А.В., С.М. Озерская, С.А. Геворкян, В.Б. Гогинян, Э.Г. Африкян (2007). Разнообразие и особенности состава микроскопических грибов на синтетических полимерных материалах // Прикладная биохимия и микробиология, (принята к печати).
5. Новикова Н.Д. (2001). Основные закономерности формирования микрофлоры среды обитания орбитального комплекса «Мир» // Авиакосмическая и экологическая медицина, 4 (35), 32-40.
6. Gu J.-D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. Int. Biodeter. Biodegr., 52, 69-91.
7. Klintworth R., H.J. Reher, A.N. Viktorov, D. Bohle (1999). Biologically induced corrosion of materials II: new test methods and experiences from MIR station. Acta Astronaut, 44, 569-578.
8. Kurakov A.V., Novikova N.D., Goginyan V.B., Afrikan E.G. (2005) Fungal Degradants of Polymeric Materials from Space Technique: Biodiversity and Creation of Culture Collection // Abstracts and Poster sessions, 3<sup>rd</sup> International Workshop on Space Microbiology, 22-25 May, SCK-CEN, Mol, Belgium.
9. La Duc M.T., Kern R., Venkateswaran K. (2004). Microbial monitoring of spacecraft and associated environments. Microb. Ecol., 47, 150-158.
10. La Duc M.T., Sumner R., Pierson D.L., Venkateswaran K. (2004). Evidence of pathogenic microbes in the International Space Station drinking water: reason for concern? Habitation, 10, 39-48.
11. Novikova N.D. (2004). Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft. Microb. Ecol., 47, 127-132.
12. Novikova N.D., Deshevaya E.A., Polykarpov N.A., Rakova N.M., Poddubko S.V. (2005) Microbial Community Analysis of the International Space Station // Abstracts and Poster sessions, 3<sup>rd</sup> International Workshop on Space Microbiology, 22-25 May, SCK-CEN, Mol, Belgium.
13. Reva O.N., Astsatryan H.V., Afrikan E.G. (2005) Computer based approaches for microbial collection database: maintenance, species identification and assessment of the deteriorative activity of fungal and bacterial degradants from space technique // Abstracts and Poster sessions, 3<sup>rd</sup> International Workshop on Space Microbiology, 22-25 May, SCK-CEN, Mol, Belgium.

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ КРАТКОСРОЧНЫХ ПОЛЕТАХ

Воейкова Т.А., Табаков В.Ю.

ГосНИИ Генетики и Селекции Промышленных Микроорганизмов (ГосНИИгенетика), Москва, Россия, voaikova@genetika.ru

## Введение

Факторы космического полета (ФКП), такие как микрогравитация, изменение электромагнитных полей, различные виды излучений, могут оказывать значительное воздействие на выживаемость, морфогенез, метаболизм, эффективность обмена генетическим материалом у микроорганизмов [1,2]. При экспозиции микроорганизмов в открытом космосе можно получить информацию о воздействии ФКП на жизнеспособность и уровень мутабельности клеток и оценить риск для человека в будущих длительных космических экспедициях [3,4].

Настоящая работа была проведена в нескольких экспедициях на орбитальной станции «Мир» и непилотируемом аппарате «Фотон-М2». Задачи работы: изучение влияния ФКП на рост, дифференциацию, синтез антибиотиков и уровень мутабельности у стрептомицетов и бацилл. Исследование влияния электромагнитных полей (ЭМП) на эти организмы. Оценка влияния открытого космоса на выживаемость, физиологические и генетические изменения стрептомицетов. Определение эффективности конъюгативного переноса плазмидных ДНК из штаммов кишечной палочки в штаммы стрептомицетов. Исследование стабильности и экспрессии плазмидных генов на примере автономной мультикопийной плазмиды pIJ702 в штамме *Streptomyces lividans*.

## Материалы и методы

**Эксперименты на станции «Мир».** В феврале 1996 г., в феврале и августе 1997 г. микроорганизмы различных таксономических групп экспонировали внутри орбитальной станции «Мир» в течение 6-14 суток. Были исследованы штаммы: *Bacillus licheniformis* – продуцент антибиотика бацитрацина; *Escherichia coli* S17-1 (pTO1) и *E. coli* S17-1 (pIH6), содержащие конъюгативные плазмиды pTO1 и pIH6, соответственно, *Streptomyces aureofaciens* – продуцент антибиотика хлортетрациклина. Колонии микроорганизмов на питательной среде в чашках Петри были помещены в контейнеры Биоконт и Биомагнестат. Биомагнестат представляет собой контейнер, защищающий биообъекты от действия ЭМП. До запуска корабля чашки термостатировали при +4 °С, на станции «Мир» при температуре 22-30 °С. Мутабельность определяли по уровню образования мутантов, устойчивых к стрептомицину и тиострептону.

**Эксперимент Экзобиология.** В 1999 г. с февраля по август в течение 6 месяцев на внешней поверхности станции «Мир» экспонировали в четырех кассетах споры штамма *S. fradiae* – продуцента антибиотика тилозина в глицероле. По окончании эксперимента в каждую кассету добавляли стерильную воду и полученную суспензию переносили на питательную среду.

**Эксперимент Фотон – М2.** В 2005 г. с 31 мая по 16 июня на непилотируемом летательном аппарате Фотон-М2 экспонировали штамм *S. lividans* 66 с мульти-копийной автономной плазмидой pIJ702. Полетная температура 15-20 °С. Проведен рестрикционный анализ плазмидной ДНК.

## Результаты и обсуждение

Штаммы *B. licheniformis*, *S. aureofaciens* и *S. fradiae* были использованы для изучения влияния ФКП, включая действие ЭМП (табл.1 и 2). Как следует из результатов, ФКП влияют на рост, дифференциацию и продукцию антибиотиков всех штаммов, но в различной степени. У всех штаммов был понижен уровень синтеза антибиотиков. Наиболее слабый эффект был получен для *B. licheniformis*. Эти данные коррелируют с результатами, полученными для *B. brevis* на борту Салют-6 [5]. Более значимые изменения были обнаружены по ряду признаков у стрептомицетов. Однако все параметры возвращались к норме после одного пасажа штаммов в лабораторных условиях. Уровень мутабельности стрептомицетов и бацилл не увеличивался при экспозиции штаммов внутри корабля в течение 6-14 суток как в защищенном от ЭМП, так и в незащищенном контейнерах. Это указывает, что ФКП не вызывают мутаций, затрагивающих гены, ответственные за синтез вторичных метаболитов, но изменяют их экспрессию. Изменения морфогенеза были отмечены у стрептомицетов при росте в Биоконте. У значительного числа колоний *S. fradiae* наблюдали выщепление атипичных звездчатых вариантов. Эксперименты в Биомагнестате продемонстрировали влияние ЭМП на синтез антибиотиков и морфогенез как в наземных условиях, так и в космосе. В полетных экспериментах синтез антибиотиков у *B. licheniformis* и *S. aureofaciens*, а так же рост колоний у *S. aureofaciens* усиливался при защите объектов в биомагнестате. Однако, изменения, вызванные влиянием ЭМП, так же были обратимыми, что указывает на отсутствие мутационных изменений в генах, ответственных за эти процессы. Действие магнитных полей на *E. coli* было показано ранее в наземных экспериментах [6].

На Фотоне-М2 в Биоконте была изучена стабильность и экспрессия генов автономной мультикопийной плазмиды pIJ702 в штамме *S. lividans* 66. Рестрикционный анализ этой плазмиды, выделенной из полетных и наземных образцов не выявил структурных изменений ДНК (делеций или амплификаций). Это указывает, что экспозиция в течение 14 суток *S. lividans* 66 (pIJ702) в условиях космического корабля не приводит к значительным изменениям в генетической структуре плазмиды.

При изучении конъюгативного переноса плазмид из *E. coli* S17-1 в штамм *S. aureofaciens* было показано увеличение выживаемости донорного штамма и частоты передачи плазмиды в полетных условиях. Ранее было показано увеличение частоты конъюгативного переноса хромосомной и плазмидной ДНК в штаммах *E. coli* [6].

В эксперименте Экзобиология (табл. 4) произошли значительные изменения в морфогенезе и продукции антибиотика у *S. fradiae*, который был экспонирован 6 месяцев на внешней стороне станции «Мир». Колонии штамма были атипичной формы, отсутствовала споруляция, синтез тилозина составлял 0-20 %. Эти признаки не восстанавливались после культивирования в лабораторных условиях. Это указывает на мутационные изменения в ДНК, которые возникли в результате действия космической радиации при длительной экспозиции штамма на внешней стороне космического аппарата. Аналогичные результаты были получены при наземных экспериментах, имитирующих полетные условия [7].



Таблица 1. Влияние ФКП и ЭМП на ряд признаков штамма *B. licheniformis*

Признак	Лабораторный контроль		Полетный эксперимент	
	Биоконт	Биомагнестат	Биоконт	Биомагнестат
Форма и диаметр колонии (мм)	Типичная D=5.6	Типичная D=5.4	Типичная D=5.7	Типичная D=5.5
Количество клеток в колонии	1.9x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>7</sup>	1.8x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>
Уровень спорообразования (%)	50	53	45	47
Частота образования Sp <sup>R</sup> мутантов	6.4x10 <sup>-6</sup>	5.7x10 <sup>-6</sup>	5.5x10 <sup>-6</sup>	5.9x10 <sup>-6</sup>
Уровень синтеза бацитрацина (%)	100	92	78	90
Уровень синтеза бацитрацина после 1 пассажа в лаборатории (%)	100	100	94	98

Таблица 2. Влияние ФКП и ЭМП на ряд признаков штамма *S. aureofaciens*

Признак	Лабораторный контроль		Полетный эксперимент	
	Биоконт	Биомагнестат	Биоконт	Биомагнестат
Форма и диаметр колонии (мм)	Типичная – споруляция только в центре колонии. D=8.6	Типичная D=8.9	Атипичная – споры расположены по всей поверхности, рост субстратного мицелия усилён. D=10.2	Ближе к типичной, споры расположены в виде колец, рост субстратного мицелия усилён. D=9.8
Количество спор в колонии	2.4x10 <sup>5</sup>	3.0x10 <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	2.7x10 <sup>6</sup>
Частота образования Th <sup>R</sup> мутантов	1.2x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>-7</sup>	1.8x10 <sup>-7</sup>	2.2x10 <sup>-7</sup>
Уровень синтеза ХТЦ (%)	100	93	40	72
Рост мицелия в жидкой среде	Типичный – густая мицелиальная сетка, биомассы много	Рост слабее, чем в био-контке, мицелий образует клубки, биомассы меньше.	Атипичный – очень слабый рост, единичные клубки мицелия, биомассы очень мало.	Похож на рост в Биомагнестате на Земле
Уровень синтеза ХТЦ после 1 пассажа в лаборатории (%)	100	100	67	95
Рост мицелия в жидкой среде после 1 пассажа в лаборатории	Типичный – густая мицелиальная сетка, биомассы много	Типичный – густая мицелиальная сетка, биомассы много	Атипичный – рост слабый, но число клубков мицелия увеличивается, биомассы мало	Рост улучшается, биомассы больше, но не достигает нормы

Таблица 3. Влияние ФКП на эффективность конъюгативного переноса плазмид из штамма *E. coli* S17-1 в штамм *S. aureofaciens*

Признак	Лабораторный контроль		Полетный эксперимент
	Биоконт		Биоконт
Выживаемость <i>E. coli</i> S17-1 (pTO1) (кл/мл)	<10		10 <sup>2</sup>
Выживаемость <i>E. coli</i> S17-1 (pH6) (кл/мл)	<10		10 <sup>7</sup>
Наследование плазмидных ДНК pTO1 и pH6 в штамме <i>E. coli</i> S17-1 (%)	pTO	82	75
	pH6	94	95
Эффективность конъюгативного переноса плазмид pTO1 и pH6 из штамма <i>E. coli</i> S17-1 в штамм <i>S. lividans</i> 66 (число эксконъюгантов/чашку)	pTO1	1-2	240
	pH6	2-5	1500

Таблица 4. Влияние ФКП на ряд признаков штамма *S. fradiae* при экспонировании его внутри и вне космического корабля

Признак	Лабораторный контроль	Экспозиция штамма внутри корабля	Экспозиция штамма в открытом космосе
	Биоконт	Биоконт	Ячейки планшета
Форма и диаметр колонии (мм)	Типичная – поверхностный рост колоний. D=8.4	Усиление роста субстратного мицелия. D=9.0	Атипичная – колонии неспорулирующие, неправильной формы. D=6.5
Количество спор в колонии	2.2x10 <sup>6</sup>	1.6x10 <sup>6</sup>	Споры отсутствуют
Частота выщепления колоний с нетипичным морфотипом	1.0 - 5.0 % «звездчатых» колоний	25 % «звездчатых» колоний	Не отмечено других морфотипов
Частота образования Th <sup>R</sup> мутантов	6.4x10 <sup>-6</sup>	5.5x10 <sup>-6</sup>	Не определяется ввиду отсутствия спорообразования
Уровень синтеза тилозина (%)	100	67	Не определяли
Рост мицелия в жидкой среде	Типичный – густая мицелиальная сетка, биомассы много	Атипичный – слабый рост, единичные клубки мицелия, биомассы очень мало.	Не определяли
Уровень синтеза тилозина после 1 пассажа в лаборатории (%)	100	83	20
Рост мицелия в жидкой среде после 1 пассажа в лаборатории	Типичный – густая мицелиальная сетка, биомассы много	Рост улучшается, биомассы больше, но не достигает нормы.	Рост практически отсутствует, биомассы очень мало.

### Литература

1. Horneck G., et al. Microorganisms in space environment, *J. Photochem. Photobiol.* V.11, 69-80, 1991.
2. Hotchin J., et al. Survival of microorganisms in space, *Nature*, v.206, 442-445, 1965.
3. Memec M., et al. The effect of hipergravitation on metabolic activity in bacteria cells of *Staphylococcus aureus*, *Folia Fac. Sci. Univer.* V.24, 57-63, 1983.
4. Bouloc P, D'Ari R. *Escherichia coli* metabolism in space, *J. Gen. Microbiol.* V.137, 2839-2843
5. Жарикова Г. и др. Выживаемость бактерий и архитектура колоний, *Биологические исследования на орбитальных станциях «Салют»*, Наука, 29-33, 1984.
6. Зеров Ю. И др. Передача и обмен генетического материала при бактериальной конъюгации в наземных экспериментах, имитирующих условия орбитального полета, *Авиакосмическая и экологическая медицина*, Т.34, №5, 51-58, 2000.
7. Калинин Ю.Т. и др. Модельная система для изучения стабильности эукариотических генов и экспрессируемых белков в условиях длительного космического полета, *Авиакосмическая и экологическая медицина*, Т.34, №2, 61-70, 2000.

**ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ ИЗЛУЧЕНИЙ,  
МОДЕЛИРУЮЩИХ РАДИАЦИОННОЕ ПОЛЕ В УСЛОВИЯХ  
АВИАЦИОННЫХ И КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ, НА МЫШАХ *IN VIVO***  
<sup>1</sup>Заичкина С.И., <sup>1</sup>Розанова О.М., <sup>1</sup>Ахмадиева А.Х., <sup>1</sup>Аптикаева Г.Ф., <sup>1</sup>Смирнова Е.Н.,  
<sup>1</sup>Сорокина С.С., <sup>1</sup>Романченко С.Н., <sup>1</sup>Вахрушева О.А., <sup>2</sup>Пелешко В.Н.  
<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Россия,  
 rozanova@mail.ru  
<sup>2</sup>ГНЦ РФ Институт физики высоких энергий, Протвино, Россия

В последние годы большой интерес вызывают исследования биологического действия низкоинтенсивных излучений с высокой линейной передачей энергии, встречающихся в условиях авиационных и космических полетов, а также при работе персонала на ускорителях [1-4]. Целью настоящей работы было изучение особенностей действия длительного низкоинтенсивного излучения, формирующегося за верхней бетонной защитой Серпуховского ускорителя заряженных частиц, а также малых доз острого вторичного излучения от протонов с энергией 70 ГэВ и пи-мезонов в биологическом канале ускорителя, в костном мозге мышей *in vivo* с помощью микроядерного теста.

**Материалы и методы**

В экспериментах использовались 2-месячные самцы мышей линии SHK. Облучение проводилось в поле излучения за верхней бетонной защитой Серпуховского ускорителя протонов с энергией 70 ГэВ (У-70 ИФВЭ) круглосуточно в течение 15, 24 и 31 сут, что соответствовало дозам 11,5, 21,5 и 31,5 сГр. Были изучены дозовая зависимость и радиационный адаптивный ответ (РАО).

Мониторинг облучения проводился нейтронным детектором РМ58 системы радиационного контроля ускорителя, измеряющим эквивалентную дозу нейтронов с энергией до 20 МэВ, и термолюминесцентными дозиметрами ИКС, измеряющими поглощенную дозу фотонов и протонов. По компонентному составу доза нейтронов с энергией до 20 МэВ в точке измерения составляет половину полной дозы нейтронов с энергией от тепловой и до 500 МэВ. Многозарядных ионов за бетонной защитой нет.

Нейтронные спектры за бетонной защитой на Серпуховском ускорителе оказались похожи на спектры нейтронов, измеренные за бетонной защитой ускорителя CERN в Женеве [5], и близки к расчетным спектрам и спектрам нейтронов, измеренных на высотах 12 и 16 км в атмосфере [6, 7]. Еще более близок к спектру за бетонной защитой ускорителя спектр нейтронов, измеренный на высоте 3 км на горе Цугшпитце (Бавария) [5]. Это позволило нам использовать радиационное поле за бетонной защитой У-70 в экспериментах на животных для моделирования радиационных условий авиаполетов на высотах от 3 до 16 км.

Для изучения возможности индукции РАО при действии малых доз острого вторичного излучения от протонов (ВИП) с энергией 70 ГэВ и потока пи-мезонов, генерируемых на У-70, мышей облучали в дозе 10 сГр в биологическом канале ускорителя. ВИП состоит из частиц разных сортов: протонов, нейтронов, пионов, мезонов. Диапазон ЛПЭ этих частиц составляет 0,2-500 кэВ/мкм, с максимумом в 50-60 кэВ/мкм, что позволяет их использовать для моделирования действия космического излучения.

Через 24 ч после облучения соответствующие группы животных облучались выявляющей дозой 1,5 Гр (1 Гр/мин)  $\gamma$ -излучения. В каждом опыте на экспериментальную точку использовалось не менее 5 мышей. Для определения уровня цитогенетического повреждения через 28 ч после выявляющего облучения животные забивались методом цервикальной дислокации, и по стандартной методике были приготовлены цитологические препараты костного мозга [8]. С каждого препарата анализировалось не менее 2000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) для подсчета клеток с микроядрами (МЯ). При проверке статистической достоверности различий между группами использовался критерий Стьюдента.

**Результаты и обсуждение**

В табл. 1 представлены результаты определения ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных разными дозами хронического облучения за верхней бетонной защитой. Видно, что облучение мышей в течение 15, 24 и 31 сут приводит к значительному увеличению уровня цитогенетических повреждений, по сравнению с уровнем спонтанного повреждения. Для сравнения две другие группы мышей хронически облучались  $\gamma$ -лучами дозами 10 сГр (1 сГр/сут) и 50 сГр (5 сГр/сут). Следует заметить, что примерно одинаковые поглощенные дозы высокоэнергетического излучения и  $\gamma$ -излучения индуцировали близкие уровни ПХЭ с МЯ.

Аналогичные данные о росте повреждений при облучении малыми дозами низкоинтенсивного излучения с высокой ЛПЭ, по сравнению с уровнем спонтанных повреждений, были получены и другими исследователями с помощью различных методов: хромосомного анализа в лимфоцитах периферической крови человека, индукции опухолей, репарации двунитевых разрывов ДНК [1, 3, 9]. Было также показано влияние малых доз излучений с высокими ЛПЭ на центральную нервную и иммунную системы [10, 11] и геномную нестабильность [12].

Таблица 1. Выход ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей в зависимости от дозы низкоинтенсивного излучения за верхней бетонной защитой У-70

Доза	Кол-во мышей	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	ПХЭ с МЯ, %	ПХЭ с МЯ без фона, %
0	15	60000	198	0,33±0,02	
11.5 сГр (15 сут)	10	38000	208	0,55±0,03*	0,22
21.5 сГр (24 сут)	10	38000	337	0,89±0,06**	0,56
31.5 сГр (31 сут)	10	26000	243	0,94±0,07**	0,61
10 сГр ( <sup>60</sup> Co) (10 сут)	10	20300	133	0,66±0,04*	0,33
50 сГр ( <sup>60</sup> Co) (10 сут)	10	20295	173	0,85±0,06**	0,52

\*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

При исследовании возможности индукции радиационного АО у мышей, облученных за верхней бетонной защитой ускорителя, нами было обнаружено, что предварительное облучение животных всеми исследованными дозами не приводило к уменьшению выхода цитогенетического повреждения после облучения выявляющей дозой 1,5 Гр, то есть АО не индуцировался (Табл. 2).

Таблица 2. Выход ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных низкоинтенсивным излучением за верхней бетонной защитой У-70 и  $\gamma$ -излучением в дозе 1,5 Гр

Воздействие	Кол-во мышей	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	ПХЭ с МЯ, %
11,1 сГр + 1,5 Гр	10	40000	2771	6,90±0,38
1,5 Гр	10	40000	2743	6,69±0,39
21,5 сГр + 1,5 Гр	10	25000	1590	6,40±0,46
1,5 Гр	10	31000	1951	6,30±0,45
31,5 сГр + 1,5 Гр	10	37000	2330	6,30±0,40
1,5 Гр	10	43000	2729	6,30±0,51
10 сГр ( $^{60}\text{Co}$ ) + 1,5 Гр	5	9870	378	3,90±0,30**
50 сГр ( $^{60}\text{Co}$ ) + 1,5 Гр	5	10059	269	2,66±0,38***

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с группой, облученной только в дозе 1.5 Гр.

В отличие от этого, предварительное облучение мышей в дозах 10 и 50 сГр хронического  $\gamma$ -излучения, значительно уменьшало выход цитогенетического повреждения, индуцируя адаптивный ответ. Это говорит о том, что в индукции АО определяющее значение, вероятно, может иметь не только и не столько количество, сколько качество индуцированных повреждений.

При исследовании возможности индукции радиационного АО у мышей, предварительно облученных острой дозой 10 сГр пи-мезонов и ВИП от протонов с энергией 70 ГэВ, также не было обнаружено уменьшения количества ПХЭ с МЯ, по сравнению с облучением только одной дозой 1,5 Гр (табл. 3). В отличие от этого облучение мышей в адаптирующей дозе 10 сГр (0,125 Гр/мин)  $\gamma$ -лучей индуцировало АО, несмотря на то, что адаптирующие дозы всех использованных излучений вызывали одинаковый уровень цитогенетического повреждения. Эти результаты дополняют известные данные на культурах клеток о неспособности излучений с высокими ЛПЭ, индуцировать РАО [2, 13].

Таблица 3. Выход ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных ВИП и  $\pi$ -мезонами в биологическом канале У-70 и  $\gamma$ -излучением в дозе 1,5 Гр.

Воздействие	Кол-во мышей	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	ПХЭ с МЯ, %
0	5	30276	165	0,51±0,17
10 сГр (ВИП)	5	8142	122	1,49±0,22
10 сГр ( $\pi$ -мезоны)	5	5201	90	1,42±0,13
10 сГр ( $\gamma$ -облучение)	5	18727	273	1,46±0,16
1,5 Гр ( $\gamma$ -облучение)	10	15475	912	5,90±0,45
10 сГр (ВИП)+1,5 Гр ( $\gamma$ )	5	13674	751	5,50±0,46
10 сГр ( $\pi$ -мезоны)+1,5 Гр	5	5212	306	5,90±0,34
10 сГр( $\gamma$ )+1,5 Гр ( $\gamma$ )	5	12290	450	3,50±0,40

Выявленные в нашей работе особенности действия малых доз высокоэнергетических излучений на мышцах *in vivo* могут быть использованы для оценки радиационных рисков долговременных высотных авиapolетов, при подготовке пилотируемых космических полетов, а также для разработки теоретических основ адаптационной медицины.

Работа выполнена при поддержке Президиума РАН в рамках Программы фундаментальных исследований «Фундаментальные науки – медицине».

## Литература

1. Ando K. // Physica Medica. 2001.V. XVII, Suppl 1. P.292-295.
2. Wu H., George K., Willingham V., Cucinotta F.A. // Physica Medica. 2001.V. XVII. Suppl.1. P. 229-231.
3. Edwards A.A. // Physica Medica. 2001.V. XVII. Suppl 1. 147-152
4. Cucinotta F.A. // Physica Medica. 2001.V. XVII. Suppl.1. P. 5-11.
5. Санников А.В. Развитие методов спектрометрии нейтронного излучения на больших протонных ускорителях. Автореф. дис. ...канд. ф.-м. наук. Протвино. 2006. 21 с.
6. Goldhagen P. // Health Phys. 2000. V. 79. P. 526-544.
7. Goldhagen P., Reginatto M., Kniss T., Wilson J.W. et al. // Nucl. Instr. and Meth. A. 2001. (in press).
8. Schmid W. // Mutat. Res. 1975. V. 31. P. 9-15.
9. Fry R.J.M., Powers-Risius P., Alpen E.L., Ainsworth E.J. // Radiat.Res. 1985. V. 104. №1. P. 188-195.
10. Todd P. // Adv. in Space Res. 1989. V. 9 (10). № 1. P. 31-34.
11. Gridley D.S., Pecaut M.J., and Nelson A.G. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. V. 282. № 3. P. 677-688.
12. Ullrich R.L., Ponnaiya B. // Int. J. of Radiat.Biol. 1998. V.74. № 3. P.747-754.
13. Pross H.D., Casares A., Kiefer J. // Radiat Res. 2000. V. 153. № 2. P.521-525.

## ПОЛИСИСТЕМНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЗДОРОВЬЯ ЛЕТНОГО СОСТАВА ВВС

Карганов М.Ю., Панкова Н.Б., Ежова О.А., Комаров А.В.  
 ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия,  
 mkarganov@mtu-net.ru

Методы саногенетического мониторинга (спироартериокардиограмма, оценка психомоторной координированности) успешно применяются для выделения групп риска у работников предприятий ядерно-топливного цикла [1], оценки эффективности клинического [2, 3] и санаторно-курортного [4] лечения взрослых, а также здоровьесберегающей составляющей школьных педагогических технологий [5]. В настоящем исследовании расширена область применения данного подхода – на выявление особенностей функционирования организма людей, чья профессиональная деятельность связана с риском для жизни. Исследование проведено с привлечением военнослужащих ВВС (офицеры, находящиеся на действительной военной службе,  $n = 30$ , средний возраст  $32,9 \pm 1,45$  лет), военнослужащих, выполняющих задачи, не связанные с авиацией (прапорщики ФСБ,  $n = 34$ , средний возраст  $27,59 \pm 0,83$  лет), и здоровых мужчин, чья профессиональная деятельность не связана с риском для жизни (рабочие московского деревообрабатывающего комбината № 3 – станочники, электрики, грузчики,  $n = 22$ , средний возраст  $29,05 \pm 1,11$  лет).

Тестирование психомоторной координированности проведено при помощи приборного комплекса КИД-3 («компьютерный измеритель движения» – вариант кинематографа Жуковского). Показано, что для офицеров ВВС характерно стремление к более точному выполнению задания, хотя и не в ущерб скоростным показателям. Ошибка сенсорной коррекции флексоров у офицеров ВВС достоверно ниже, чем в контрольных группах (рис. 1). Различия между группами по показателю сенсорной ошибки экстензоров уровня статистической достоверности не достигают, хотя и направлены в ту же сторону. Следует отметить, что показатели контрольных групп, хотя и несколько хуже, чем у офицеров ВВС, но не выходят за границы поло-возрастной нормы (2-8 %). По остальным протестированным психофизиологическим показателям – уровню внимания, длительности моторной памяти и уровню сенсомоторной реактивности на стимулы разной модальности – различий между военнослужащими, выполняющими разные задачи, и контрольными испытуемыми, в нашем исследовании не обнаружено.

Состояние сердечно-сосудистой системы оценивали при помощи приборного комплекса САКР («спироартериокардиограф»). Оценивали: амплитудно-временные показатели сердечного комплекса, вариабельность сердечного ритма (с использованием статистических, геометрических и спектральных показателей), периферическое систолическое и диастолическое АД и их вариабельность, показатели гемодинамики, расчетную величину чувствительности барорефлекса, а также максимальные показатели дыхательной системы и ее показатели в покое. Обнаружено, что у здоровых испытуемых разных групп не наблюдается различий по основным показателям сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Однако у офицеров ВВС была повышена относительная мощность диапазона очень низких частот (VLF) в спектрах вариабельности как САД (рис. 2), так и ДАД, что обычно связывают с активацией регуляторных процессов



Рис. 1. Ошибка сенсорной коррекции флексоров (%)

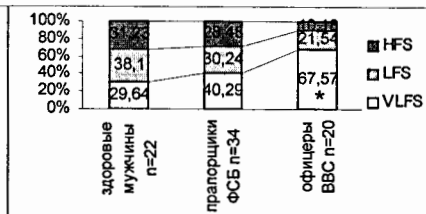


Рис. 2. Относительная мощность (%) диапазонов спектра вариабельности систолического периферического АД. \* – отличия от группы прапорщиков ФСБ

на межсистемном уровне. Возможно, этот факт отражает более высокий вклад психогенной составляющей в регуляцию АД у офицеров ВВС.

Для оценки функциональных резервов сердечно-сосудистой системы организма общепринятым методом является применение тестов, или функциональных проб – именно при повышенной нагрузке становится ясно, может ли организм успешно адаптироваться в нагрузкам, многократно превышающим обычные. В настоящей работе в качестве функциональных проб использованы методы контролируемого дыхания (с частотой 6 дыхательных циклов в минуту без учета глубины дыхания) и смешанной гипоксии/гиперкапнии в легкой степени, создаваемой при тестировании в специальной маске. При выполнении этих тестов активируются все звенья регуляторных механизмов сердечно-сосудистой системы, что отражается в изменении спектральных показателей вариабельности сердечного ритма и периферического АД.

При сравнении результатов пробы с регулируемым дыханием у офицеров ВВС и у прапорщиков ФСБ выявлено, что в обеих группах военнослужащих при выполнении теста, по сравнению с результатами тестирования при произвольном дыхании, мало меняются показатели сердечной производительности, и не меняются показатели периферического АД. Спектр вариабельности сердечного ритма меняется единообразно в обеих группах – возрастает общая мощность спектра, в основном за счет возрастания мощности диапазона низких частот (LF) в 7-12 раз, мощность диапазона высоких частот (HF) возрастает в 3-7 раз. Изменения спектральных показателей вариабельности САД также одинаковы у испытуемых обеих групп, тогда как в спектре вариабельности ДАД выявлено более выраженное возрастание относительной мощности диапазона LF у офицеров ВВС (рис. 3), что может отражать более выраженную активацию симпатических влияний на тонус периферических сосудов. Несмотря на то, что изменения мощности разных диапазонов вариабельности сердечного ритма в разных группах не различаются, расчетная величина LF/HF, отражающая баланс вегетативных влияний на ритм сердца, в большей степени возрастает у офицеров ВВС (рис. 4), что также свидетельствует об усиленной активности симпатической системы их организма.

При проведении тестирования в маске было показано, что у офицеров ВВС, в отличие от здоровых штатских мужчин, снижается периферическое АД (у 23,8 % испытуемых более чем на 15 % от уровня тестирования без маски). При

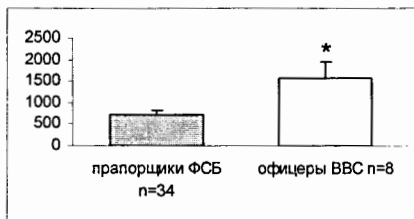


Рис. 3. Изменение относительной мощности диапазона низких частот спектра variability ДАД при выполнении дыхательной пробы (в % относительно тестирования с произвольным дыханием)

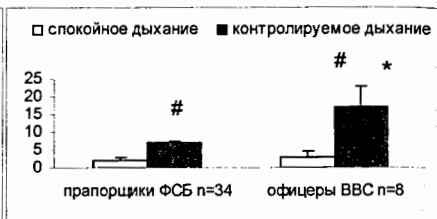


Рис 4. Изменение величины вегетативного баланса (LF/HF) в том же тесте. # - отличия от тестирования с произвольным дыханием, \* - отличия от группы прапорщиков ФСБ.

этом у офицеров ВВС более выраженное, чем в контроле, возрастание суммарной мощности спектров variability сердечного ритма, САД и ДАД происходит не за счет возрастания мощности диапазона высоких частот, а за счет возрастания диапазона очень низких частот (рис. 5).

Полученные факты свидетельствуют о том, что при повышенной нагрузке у офицеров ВВС в большей степени возрастает активность надсегментарных механизмов контроля состояния сердечно-сосудистой системы, чем у военнослужащих, не связанных с авиацией, и штатских испытуемых. Вероятно, это является следствием адаптивных перестроек в их организме, формирования определенного вегетативного стереотипа реакции на стрессовую ситуацию.

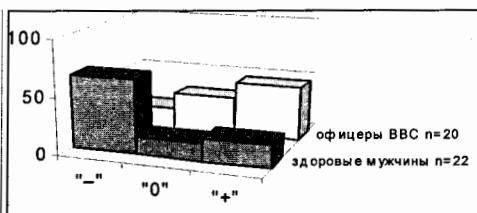


Рис. 5. Изменение мощности диапазона очень низких частот спектра variability сердечного ритма при тестировании в маске (в % по сравнению с тестированием без маски). Справа - доля испытуемых с разной реакцией на пробу: «->» - снижение показателя более чем на 20 %, «+>» - возрастание более чем на 20 %, «0» - отсутствие реакции. \* - отличия от группы здоровых мужчин

### Литература

1. Носкин Л.А., Пивоваров В.В., Хомич М.М., Довгуша В.В., Карганов М.Ю. Полисистемная оценка состояния здоровья работников предприятия ядерно-топливного цикла. Анализ функционального состояния сердечно-сосудистой, дыхательной и психомоторной систем // Радиационная биология. Радиоэкология, 2004. - Т. 44, № 3. - С.269-277.
2. Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Курнешова Л.Е., Пивоваров В.В. Спироартериокардиоритмография - новый метод изучения состояния сердечно-сосудистой системы // Патогенез, 2003. - Т. 1, № 2. - С. 84-88.

3. Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Слезко В.Н., Хоркин Н.Н., Виноградов В.И., Курнешова Л.Е., Ланда С.Б. Применение компьютерного измерителя движений КИД-3 для исследования психомоторной координации и сенсомоторной реактивности больных заболеваниями позвоночника // Патогенез, 2003. - Т. 1, № 1. - С. 86-89.
4. Панкова Н.Б., Труханов А.И., Мещеряков В.А., Краснова В.П., Дмитриева О.С., Карганов М.Ю. Полисистемная оценка восстановления адаптивных ресурсов организма в условиях санаторно-курортного лечения // Вестник восстановительной медицины, 2004. - № 3 (9). - С. 11-17.
5. Полисистемный саногенетический мониторинг / Ред. Комаров Г.Д., Кучма В.Р., Носкин Л.А. - М.: МИПКРО, 2001. 343 с.

# RADIATION EFFECTS ON SMALL INTESTINE EPITHELIUM SYSTEM: MATHEMATICAL MODELING

O.A. Smirnova

Research and Technical Center of Radiation-Chemical Safety and Hygiene, Russia

## Introduction

One of the critical systems in organism of mammals exposed to radiation is the small intestine epithelium [1]. The damage of this system basically determines the ultimate effects of high level acute/chronic irradiation on mammals. By now, considerable amount of experimental data concerning the radiation effects on this vital body system are accumulated. However, some questions remain and it is useful to develop mathematical models to test biological concepts used, interpret available experimental data and provide predictive models for the future. It is the development and investigation of a biologically motivated mathematical model which describes the dynamics of the small intestine epithelium system in acutely/chronically irradiated mammals that the paper is devoted to.

## Mathematical model

The small intestine epithelium consists of a great number of villi and crypts. The cells of crypts and villi form a unit system of the renewal of small intestine. Basic (columnar) cells prevail in this system. Taking these facts into account, we consider the population of basic (columnar) cells in the small intestine epithelium system (SIES) as the object of the modeling studies.

Our model is based on conventional theoretical concepts and available experimental data. The originative cells of the population of columnar cells are stem cells. They are located near the bottom of the crypt. Stem cells are capable of self-maintenance and of production of progeny that differentiate in the direction of dividing maturing crypt cells. These dividing maturing cells move from the lower region to the upper region of crypt in the process of maturation. In the upper region of crypt the cells stop dividing and form a pool of maturing cells. The matured cells (enterocytes) are displaced onto the villous and migrate from its bottom to the top where they exfoliate into the intestinal lumen.

In the model we divide the cells of the SIES into three compartments according to the degree of maturity and differentiation, namely:  $X$ , dividing precursor cells from the stem cell to the dividing maturing cell of crypt;  $Y$ , nondividing maturing cells of crypt;  $Z$ , functional villous cells.

Taking into account that only  $X$  cells of the crypt are radiosensitive, whereas  $Y$  cells of the crypt and  $Z$  cells of the villous are radioresistant, we divide  $X$  cells into two groups with respect to their response to irradiation:  $X_{ud}$ , undamaged cells;  $X_d$ , damaged cells.

To describe the radiation-induced damage of the radiosensitive cells in the SIES, we apply the one-target-one-hit theory. According to this approach, the damage rate of radiosensitive cells is proportional to the dose rate of irradiation  $N$ .

To reproduce the regulation mechanism of the cell division in the SIES, we use the chalone theory. According to this theory, the reproduction rate of capable of

dividing crypt cells is controlled by a specific inhibitor, a chalone, which is a product of cell vital activity and cell death.

As the model variables, we take the concentrations of  $X_{ud}$ ,  $X_d$ ,  $Y$ , and  $Z$  cells, namely:  $x_{ud}$ ,  $x_d$ ,  $y$ , and  $z$ . The dynamics of these concentrations is described by the following differential equations:

$$\frac{dx_{ud}}{dt} = Bx_{ud} - \gamma x_{ud} - \frac{N}{D_0} x_{ud}, \quad \frac{dy}{dt} = \gamma x_{ud} - Fy, \quad \frac{dz}{dt} = Fy - Ez, \quad \frac{dx_d}{dt} = \frac{N}{D_0} x - \nu x_d$$

(1)

Here the parameter  $B$  is the reproduction rate of undamaged by irradiation cells  $X_{ud}$ . The coefficients  $\gamma$ ,  $F$ , and  $E$  are the specific rates of cell transition from group  $X_{ud}$  to compartment  $Y$ , cell displacement from crypt onto villous, and cell exfoliation from villous into the intestinal lumen, respectively. The coefficient  $\nu$  is the specific death rate of  $X_d$  cells. The parameter  $D_0$  is equivalent to the experimentally measured dose  $D_0$  after exposure to which the number of cells remaining undamaged is  $e$  times less ( $e=2.718\dots$ ) than their initial level. The parameter  $D_0$  characterizes radiosensitivity of the cells at hand.

The reproduction rate  $B$  is given by the formula derived by making use of the Jerusalimsky equation:  $B = \alpha / [1 + \beta(x_{ud} + \phi x_d + \theta y + \vartheta z)]$ . Here  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\phi$ ,  $\theta$ , and  $\vartheta$  are constants. This formula takes into account different contributions of  $X_{ud}$ ,  $X_d$ ,  $Y$ , and  $Z$  cells to the specific chalone production and, ultimately, to the feedback loop control mechanism.

The model accounts for the peculiarities of the motion of cells over the crypt and villous. It was found experimentally that the specific rates of cell displacement from crypt onto villous,  $F$ , and of cell exfoliation from villous into the intestinal lumen,  $E$ , increase as the mitotic activity of  $X_{ud}$  cells grows, i.e., as the parameter  $B$  increases. The exact form of these relationships was not determined. We assume them to be linear:  $F = \delta(1 + B/\lambda)$ ,  $E = \psi(1 + B/\eta)$ . Here  $\delta$ ,  $\lambda$ ,  $\psi$ , and  $\eta$  are constants.

The initial conditions for solving Eqs. (1) are the pre-irradiation concentrations of the above-mentioned cells. In the case of irradiation of a healthy organism, that has not been exposed to radiation earlier, the initial concentrations of undamaged cells  $X_{ud}$  of the compartment  $X$ , radioresistant  $Y$  and  $Z$  cells are equal, respectively, to the stationary concentrations of  $X$ ,  $Y$  and  $Z$  cells at the normal conditions, and the initial concentration of damaged cells  $X_d$  of the compartment  $X$  is zero:  $x_{ud}(0) = \bar{x}$ ,  $y(0) = \bar{y}$ ,  $z(0) = \bar{z}$ ,  $x_d(0) = 0$ .

To simulate the effect of acute exposure on the SIES, one can employ the model (1) in the present form or its simplified version as well. The latter is derived with regard for a short-term duration of acute irradiation. As a result, the postirradiation dynamics of the SIES is defined by Eqs. (1) with  $N=0$ . The initial conditions for their solution

are the following:  $x_{ud}(0) = \bar{x} \exp(-D/D_0)$ ,  $y(0) = \bar{y}$ ,  $z(0) = \bar{z}$ ,  $x_d(0) = \bar{x}[1 - \exp(-D/D_0)]$ . Here  $D$  is the dose of acute irradiation.

Equations (1) can be represented in terms of dimensionless concentrations of  $X_{ud}$ ,  $Y$ ,  $Z$  and  $X_d$  cells, namely:  $\bar{x} = x_{ud}/\bar{x}$ ,  $\bar{y} = y/\bar{y}$ ,  $\bar{z} = z/\bar{z}$ ,  $\bar{x}_d = x_d/\bar{x}$ . In this form, the model describing the dynamics of the SIES in irradiated mammals includes 4 nonlinear differential equations which are completely specified by 11 independent parameters.

## Results

The developed model was used to simulate the dynamics of the SIES in small laboratory animals (rats, mice). Identification and verification of the model were performed by making use of the experimental data available in the literature. Computer studies show that the model provides qualitative and quantitative description of two possible dynamic regimes in the SIES during chronic irradiation: (1) total injury of the SIES at dose rates exceeding a certain critical value; (2) setting up a new homeostasis in the SIES when the dose rates are lower (Fig. 1 A). The new stable equilibrium is characterized by stationary concentrations of villous functional cells and crypt precursor cells. These concentrations decrease as the dose rate of chronic radiation grows. The critical dose rate for the SIES only depends on radiosensitivity of precursor cells capable of dividing and on the proliferation potential of these cells. Recovery of homeostasis in the SIES is achieved through intensified mitotic activity of crypt cells in compensation for those crypt cells that have been killed by chronic radiation. These predictions of the model are supported experimentally. The model also reproduces, qualitatively and quantitatively, depletion of the SIES at high radiation doses of acute irradiation and simulates the damage and recovery processes in this system after doses that are not so high (Fig. 1 B).

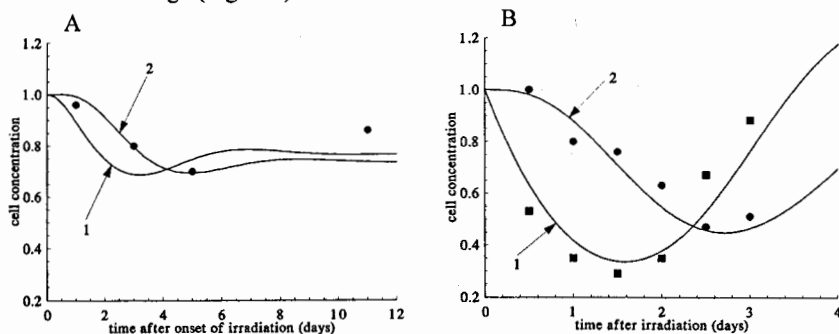


Figure 1. Dynamics of the SIES in rats under chronic irradiation at the dose rate of 0.84 Gy/day (A) and in mice after acute exposure to the dose of 7 Gy (B). Modeling results are the dimensionless total concentration of crypt cells  $X_{ud}$ ,  $X_d$ , and  $Y$  (curve 1), and the dimensionless concentration of villous cells  $Z$  (curve 2). The relevant experimental data for crypt cells [2] and villous cells [3, 4] are shown by boxes and circles, respectively.

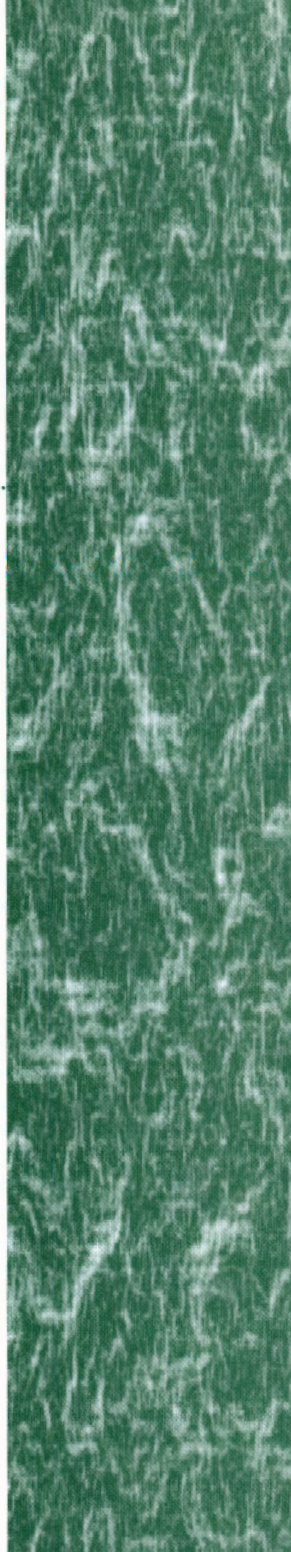
## Summary

The models developed reproduce a broad range of experimental data characterizing the dynamics of small intestine epithelium in acutely/chronically irradiated mammals. This demonstrates that the models do account for the principal cause-effect relationships governing the function of the small intestine epithelium system under irradiation. We found the values of constant coefficients and compared quantitatively the modeling results with experimental data. The agreement obtained suggests that the models can be used to simulate and predict the dynamics of the intestinal epithelium in mammals exposed to acute/chronic irradiation at broad ranges of doses and dose rates.

## REFERENCES

1. Bond V.P., Fliendner T.M., and Archambeau J.O. Mammalian radiation lethality: A disturbance in cellular kinetics. New York: Academic Press, 1965.
2. Kononenko A.M. Citologiya., 10, p. 1425, 1968 (In Russian).
3. Kononenko A.M., Pharaohonov G.V. Radiobiologiya, 9, p. 209, 1969 (In Russian).
4. Quastder H., Bensted J.P.M., Chir B. The British Journal of Radiology, 32, p. 501, 1959.

**Секция  
«ОБЩАЯ  
И КОСМИЧЕСКАЯ  
РАДИОБИОЛОГИЯ»**





## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ РАДИОБИОЛОГИИ (СИНХРОТРОННАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ)

Авакян Ц.М., Минасян М.А.

*Ереванский физический институт им. А.И.Алиханяна, г. Ереван, Армения,  
tsovak@mail.yerphi.am*

В последнее время в литературе появляется много работ, связанных с применением синхротронного излучения (СИ) в биологии и в медицине [14]. Одной из задач биологии является изучение механизмов функционирования биосистем, динамических и кинетических аспектов биологических явлений. С этой точки зрения СИ является уникальным прибором. Однако все эти исследования сопровождаются сильным повреждающим действием СИ. В работе [12] на ускорителе СПИАР было установлено, что при рентгенструктурном анализе стабильности белковых кристаллов к повреждающему действию СИ зависит от времени съемки. В исследованиях Вазиной [2] было показано повреждающее действие монохроматического СИ на мышечных волокнах, где образец при рентгенструктурном анализе денатурировался под лучом. Эти данные и появление нового источника радиации обязывают радиобиологов всесторонне заниматься изучением характера СИ.

Линейард [11] показал, что электрон, движущийся по окружности, в магнитном поле вследствие большого ускорения должен стать источником электромагнитного излучения. Шотт [13], исследуя движение электронов по окружности, пытался объяснить природу, волн, охватывающих диапазон от инфракрасного до рентгеновской области. В 1947 г. на синхротроне "Дженерал электрик" с энергией 70 МэВ были проведены экспериментальные исследования по спектральному распределению излучения в области видимого спектра. Для изучения микромира физиками в дальнейшем были построены ускорители и накопители электронов. Современные гигантские электронные кольцевые ускорители с предельной энергией 6-12 ГэВ являются источниками интенсивных СИ. [15,16]. Широкий диапазон длин волн 0,1-1000 А°, излучаемых электронами в течение циклов работы ускорителя, высокая степень поляризации, большие мгновенные интенсивности потока фотонов в узком энергетическом интервале  $\Delta E/E \sim 10^{-4}$  и незначительная расходимость пучка  $\sim 10^{-4}$  радиан, делают синхротронные пучки уникальным инструментом для исследований в области физики, биологии, медицины, и т.д. Среди многих уникальных характеристик СИ определенное место занимает непрерывность энергетического спектра и очень высокая интенсивность белого (немонохроматизированного) спектра. В накопительном кольце на круговой орбите электрон излучает широкий и мощный спектр, например, когда пучок 2,5 ГэВ электронов с током 1 А вращается в магнитном поле 10 кГс, то излучается более 400 кВт мощности фотонного излучения в площади поперечного сечения в несколько квадратных миллиметров. Используя накопительное кольцо в 3 ГэВ, СИ приблизительно в 1000 раз ярче в области 1,54 А°, чем рентгеновская трубка с вращающимся анодом. Причем, белый спектр превосходит трубку в  $10^5$ - $10^6$  раз. Спектр СИ сплошной, без характеристических пиков, и простирается непрерывно от инфракрасных до области рентгеновских лучей, включая такие длины волн, которых не имеют другие наземные источники. Из такого мощного источника

посредством монохроматора можно выделять номинальные длины волн, имеющие требуемую ширину полосы. Кроме того, белый спектр СИ строго параллелен (от  $< 1$  мрад до нескольких мрад). Это означает, что всю электромагнитную энергию можно собрать в оптическом компоненте монохроматора. Для экспериментов по радиационным воздействиям желательно иметь поперечное сечение луча не менее  $1 \text{ см}^2$  и энергетическое разрешение не более нескольких эВ. Другая характерная особенность СИ – высокая степень поляризации (100 %) в орбите ускорителя. Эта уникальность представляет для определенных экспериментов большой интерес. Например, индуцированные радиацией эффекты в ДНК могут быть исследованы в условиях конформационных изменений, что обнаруживается вращающим дихроизмом [5]. Полезные данные по зависимости углового распределения СИ, его яркости и интенсивности в широком окне от длины волны фотона (энергии) могут быть найдены в обзоре Кунца [3]. Таким образом, в вакуумном ультрафиолете (ВУФ) и в областях рентгеновских лучей СИ превосходит любой альтернативный источник, а также в вопросах настройки, яркости, интенсивности луча и поляризации света. Как таковой, он необыкновенно хорошо удовлетворяет потребностям сложных радиационных, химических, биологических экспериментов.

Что может предлагать радиобиологу синхротронная радиация как инструмент для изучения радиационных эффектов в биомолекулах и клетках?

В обычном применении излучения молекулы облучаются без разбора из-за случайного смещения энергии в атомах. Следовательно, зависимость возбуждения и повреждения биомолекул и последовательные изменения в их функционировании в биологической системе *a priori* не могут рассматриваться с ссылкой на местоположение первичных повреждений. Для такого подхода необходим свободный выбор длины волны падающих фотонов. В то же время интенсивность луча, связанная с каждой длиной волны, должна быть достаточно высокой. СИ приемлемо удовлетворяет обоим этим требованиям. В работе [18], где обсуждается теория попадания и ее следствие в приложении к проблеме мутагенеза, автором показано, что изменение величины половинной дозы ( $D_{1/2}$ ) с длиной волны  $\lambda$  используемых излучений, связаны формулой  $D_{1/2} = 1/\lambda \times a/(a+R)$ , где R – истинный пробег вторичных электронов в ткани, а – средний пробег вторичных электронов в области попадания.

В последние годы было признано, что фотоны, имеющие энергию в несколько кэВ или около того, значительно эффективнее, чем  $\gamma$ -лучи, особенно тот критический интервал, который находится вокруг поглотительных уровней. Некоторые исследования, проведенные монохроматическими X-лучами показали, что эффективность облучения часто зависит от энергии падающего фотона. Максимальный эффект обнаруживался при энергии чуть превосходящей энергию связывания электрона во внутренней оболочке самого сильного связанного с ядром атома. Зная K-край поглощения элемента, можно определить сорт атома поглотителя [1]. Галперн и Мютце (1978) обнаружили, что облучение микроорганизмов *Micrococcus denitrificans*, имеющих частично бромированные ДНК, рентгеновскими лучами с энергией 14,4 кэВ, то есть немного выше K-края (уровня) для Вг, производит большее количество гибели на единицу поглощенной дозы, чем облучение рентгеновскими лучами с энергией 12,1 кэВ, т.е. ниже этого уровня.

Кажется очевидным, что эффект облучения зависит от локализации первичных поглощенных событий в молекулярной системе. Дальнейшие исследования повреждения (облучение), произведенного мягкими X-лучами будут важными в установлении быстрых пространственных последствий смещения энергии в биомолекулах и в исследованиях биологически чувствительных участков (сайтов) в пределах клетки. Как уже известно, для этого нужен переменный источник фотонов мягких рентгеновских лучей, т.е. СИ.

Исследования Вирт А. и Юнг Г. (17), касающиеся ВУФ области, выполненные с помощью разрядных ламп разреженных газов, показали, что разрывы в ДНК фагов увеличиваются на 5 порядков, если облучать их лучами с энергией 5 эВ и 11,2 эВ. Эта энергетическая область совпадает с той, в которой в дополнение к электронному возбуждению начинает играть роль процесс ионизации. Ясно, что здесь также необходимо применять СИ, которое является удобным источником для ВУФ.

При использовании низкоэнергетических рентгеновских лучей для облучения органических веществ нужно знать, что дискретное поглощение фотонов в отдельных атомах молекулярной системы зависит в большей степени от энергии фотона. В этом отличие от жестких фотонов (например  $\gamma$ -источника  $\text{Co}^{60}$ ), для которых сечение поглощения незначительно зависит от порядкового номера атома.

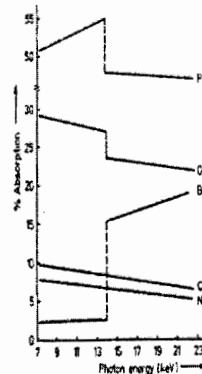


Рис. 1 Процентная адсорбция X-лучей в атомах ДНК *M. denitrificans* в которых 8% тимина было замещено бромурацилом, как функция энергии фотона. (Halpern and Mutze, 1978).

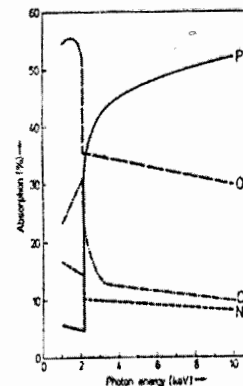


Рис. 2 Процентная адсорбция X-лучей в атоме натуральной ДНК *M. denitrificans* как функция энергии фотона.

Обратимся к двум биологическим примерам. На рис. 1 дан процент фотоадсорбции в различных определенных атомах ДНК *Micrococcus denitrificans*, в которой 8 % тимина были замещены бромурацилом для согласования с K-краем этого вещества. Поскольку энергия фотона возрастает от значения K-уровня для Вг к значениям выше этого уровня (13,48 кэВ), относительное поглощение в атомах Вг увеличивается от 2,4 % до 15,3 % за счет поглощения в атомах О и Р (содержание брома в ДНК всего 0,33 % по массе).

Подобные графики для природного ДНК показаны на рис. 2. Резкое увеличение процента поглощения фосфором происходит при энергиях фотона немного выше K-края Р. (2,14 кэВ). Поражающее следствие поглощения образцом таково,

что при правильном выборе энергии случайных фотонов можно предопределить в значительной мере расположение поглощенных событий в ДНК. Следовательно, последующие вторичные эффекты в высокой степени поврежденной материи, будут существовать не в случайных, а в определенных местах данной молекулярной системы.

Обоснованием для использования СИ могут служить следующие соображения:

А) Поглощение рентгеновских лучей в биоматериалах ведет к вкладу энергии по электронным трекам (блямбам), которые могут быть короче по сравнению с размерами клетки или под клеточными органеллами. Поэтому, мягкие рентгеновские лучи могут использоваться в качестве тонкого зонда для исследования размера событий биологической структуры, вовлеченной в радиобиологические процессы. Этот подход может быть квалифицирован как "молекулярное выборочное исследование" [10].

Б) Каждое поглощение фотона низкоэнергетических X-лучей приводит к удалению электрона из внутренней оболочки, сопровождаемое лавиной Оже электронов. Это, в свою очередь, может инициировать локализованные высокодеструктивные события, способные усилить конечноточечные эффекты. Этот подход может быть квалифицирован как "усиление Оже эффекта".

В) Дальнейшее развитие экспериментов привело к прикладным программам по применению СИ в медицине (коронорография) [16].

Радиобиологические работы по низкоэнергетическим X-лучами были всегда затруднительными, хотя в Харуэлском центре (1970) Ниери с сотрудниками были проведены обширные эксперименты, где источником ультрамягкого рентгена до 1,5 кэВ служили K-края алюминия или 0,28 кэВ от углерода. Они сравнивали с  $\gamma$ -квантами  $Co^{60}$  и наблюдали инактивацию или мутацию в двух типах культивированных клеток молочной железы V79, облученных 1,5 кэВ X-лучами и ионами гелия 20 кэВ/мм или 50 кэВ/мм. Было показано, что 1,5 кэВ X-лучи гораздо эффективнее, чем  $\gamma$ -кванты. Принимая во внимание, что 1,5 кэВ X-лучи продуцируют только очень короткие треки электронов ( $< 0.07$  нм), авторы заключили, что размеры подклеточных уникальных структур, включая инактивацию и мутацию, не могут быть больших размеров, чем чувствительные сайты в клетке, в пределах которых происходит около 14 ионизаций. Это представляет большой интерес для радиобиологов при проверке теоретических моделей. Таким образом, в эксперименте можно предопределять объем в пределах биологической структуры, поглощающей энергию вторичных электронов и контролировать это посредством постепенного изменения в энергии X-лучей. Усовершенствование этой методики ( $a^*$ ) может быть достигнуто только с использованием источников СИ, где можно получить любые энергии в области мягкого рентгена.

Применяемые традиционные источники ионизирующей радиации не позволяют так изменять энергию возбуждения, чтобы образовались первичные радикалы (ПР) заданного типа. Это становится возможным лишь с применением СИ и будет представлять особый интерес для интерпретации прямых эффектов на ДНК и механизма действия ПР. Тот факт, что начальное накопление энергии в облученных биосистемах неомогенно, усложняет кинетический анализ, особенно, если излучение с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ). Изменения в ЛПЭ

могут возникать от изменения длины волны в рентгеновской области. И здесь СИ также позволяет исследовать детали механизма, недоступные при использовании других источников излучения (6).

При проведении работ по синхротронной радиобиологии (на канале СИ ЕрФИ) возникает необходимость точного измерения числа поглощенных фотонов  $N^*$  заданной длины волны  $\lambda$  на единицу события [8]. На рис. 3 представлены результаты измерения линейных коэффициентов поглощения  $\mu(\lambda)$  для семян *Pisum sativum L*, *Triticum sativum L*, *Nicotiana tabacum L*, также дистиллированной воды. Установка для проведения измерения и облучения собрана на базе гониометра ГУР-5 с использованием идеального кристалла Si(iii). Измерение числа отраженных от кристалла фотонов осуществлялось с помощью ионизационной камеры. В дальнейшем были проведены эксперименты по действию сплошного и монохроматизированного (0,3-4,0 А°) СИ.

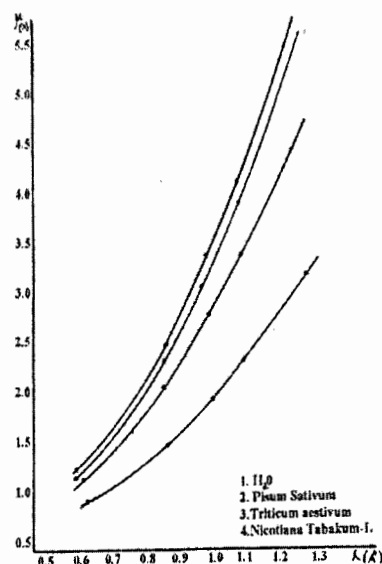


Рис. 3  
Изменение линейных коэффициентов поглощения  $\mu(\lambda)$  от длин волн СИ для биологических объектов.

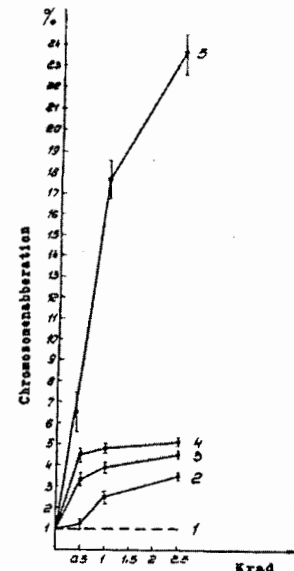


Рис. 4  
Действие X-лучей (2) и немонахроматического СИ (4) в гелийной (3) и кислородной (5) атмосфере (1). Абсцисса - доза радиации; Крад. Ордината - число aberrantных клеток, %.

Обнаружен кислородный эффект (рис. 4) и заметная задержка митозов в корешках растений (рис. 5, 6).

ЭПР сигналы оказались больше, чем при контроле, а митотическая активность оказалась намного ниже, чем при действии X-лучей с энергией 240 кэВ (рис. 7) [4, 7, 9]. Эти эксперименты показали, что биологическое действие СИ по своему характеру резко отличается от действий других источников.

Подобные данные были получены на накопителе ВЭПП-3 в Новосибирске (Осипова Л.П., 2001 г.). Недавно М. Крумеры, Г. Ульм и Е. Шмид [19], исследуя

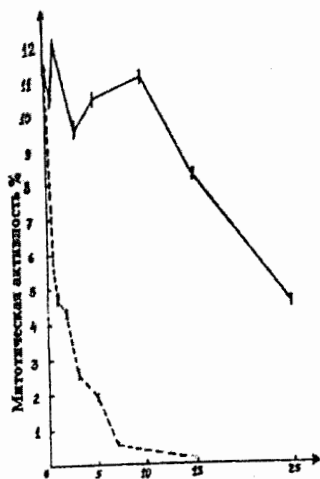


Рис. 5 Доза, Крад

Зависимость митотической активности клеток пшеницы от вида облучения и дозы.  
X лучи, 248 КВ ; ----- СИ

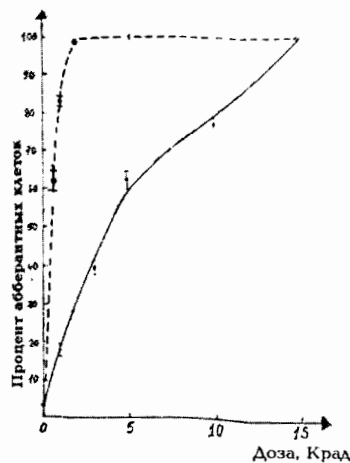


Рис. 6

Действие X лучей и СИ на хромосомный апл. клеток пшеницы.  
X лучи ; ----- СИ

дицентрические хромосомы в монослоях лимфоцитов человека при облучения СИ с энергией 1,83-17,4 кэВ, получили избирательное поглощение СИ в диапазоне 10 кэВ. Эти эксперименты также показывают уникальность СИ при радиобиологических экспериментах.

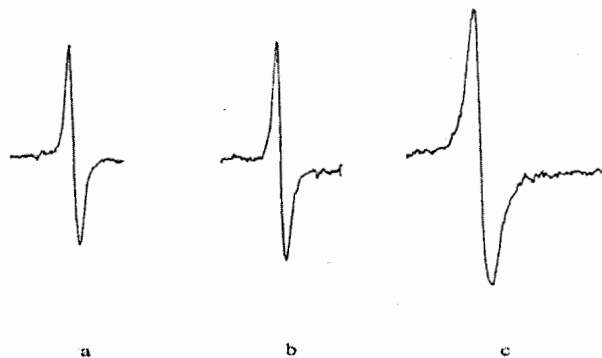


Рис.7

Спектры ЭПР :

а) сухих семян табака, б) последствие X-лучей; в) последствие СИ.

## Заключение

Этот небольшой обзор предназначен для прояснения некоторых основных тем, но не является попыткой обзора литературы. К сожалению, мы не нашли в литературе обзорных статей по молекулярной радиобиологии СИ. Однако, это не значит, что на каналах синхротронных пучков накопителей и ускорителей электронов не должны планироваться широкомасштабные эксперименты по выявлению уникальных возможностей для радиобиологии, как например, удачно поставленные эксперименты по изучению структуры живой материи.

## Литература

1. Sturman H.B. Uses of SR in Biology, Academic Press, London, 1988
2. Phillips J.C. at all, Proc. Nat. Acad. Ssi, 73, 128-132, USA, 1976
3. Вазина А.А. Молекулярная биология, 8, 2, М.:1976
4. Lineard A.L. Eclair. elektr., 16, 5, 1898
5. Shott G.A. Ann. Phys., 24, 625, 1907
6. Winnick H. Synchrotron Radiation Research, N.Y, London, 1980
7. Winnick H. Scientific American, Vol. 255, 11, 1987
8. Полетаев А.И. Мол.биология, 8, 2, М.:1976
9. Кунц К. СИ, свойства и применения, М.:Мир, 1981
10. Zimmer K.G. Strahlentherapie, Bd. 54-s, 265-276, 1935
11. Бокий Г.Б. Практический курс рентгенструктурного анализа. М.:1951
12. Wirth A. Jung H. Photochem. Photobio. 15, 325-330, 1972
13. Halpern A., Mutze B. I., J. Rad. Biol. 34, 1978
14. Adams Dj. CERN, 77-09, Geneva, 1977
15. Avakian Ts.M., Karabekov I.P., Martirosian M.A. Preprint EPI-256 (49)-77.
16. Avakian Ts.M., Karagouzyan A.S. Radiobiologia 17, 1977
17. Минасян М.А., Авакян Ц.М., Семерджян С.П. Радиобиология, 18, 5, 1978
18. Avakian Ts.M., Gevorkyan S.G., Simonyan A.L., Arakelyan V.B., Karagouzyan A.S., Simonyan N.V. Modern problem of radiobiologi..., dedicated to centenary of N.W. Timofeeff-Ressovsky, 96-99, 2000
19. Krumrey M., Ulm G., Schmid E., Radiar Environ Biophys. (2004), 43:1-6

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ДРОЖЖАМ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

<sup>1</sup> Андриевская Д.В., <sup>2</sup> Кошечева К.Е., <sup>2</sup> Фенин А.А.

<sup>1</sup>ГУ ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН, г. Москва, Россия, labcognac@mail.ru  
<sup>2</sup>РХТУ им. Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия

Известно, что фенольные вещества являются мощными антиоксидантами. В последнее время проявляется большой интерес к исследованию антиоксидантных свойств природных фенольных соединений в различных модельных системах. Имеются работы по изучению микробных ауторегуляторов в защите дрожжевых клеток от окислительного стресса. Представляло интерес исследовать защитные свойства индивидуальных фенольных веществ растений в отношении дрожжей и возможность использования данной модели в качестве тест-системы.

В работе применяли спиртовые растворы кверцетина, галловой кислоты, кумарина и 4-гидроксикумарина. Концентрация веществ в конечном объеме составляла 0,003; 0,015; 0,03; 0,05 и 0,07 мг/см<sup>3</sup>. Выбранные концентрации фенольных веществ наиболее часто присутствуют в винах.

В качестве тест-объекта использовали винные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (раса Феодосия 7). Дрожжи выращивали в жидкой питательной среде (сусле 3,5 балл) в колбах объемом 250 см<sup>3</sup> (50 см<sup>3</sup> среды), с периодическим перемешиванием, при 28 °С. Инокулятом служила культура в логарифмической фазе роста (12 ч.). Жизнеспособность дрожжей определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) при высеве соответствующих разведений клеточных суспензий на суловой агар.

Реакцию радиационного окисления проводили в условиях стационарного облучения  $\gamma$ -лучами <sup>60</sup>Со на установке РХМ- $\gamma$ -20 (РХТУ им. Д.И. Менделеева). Для исследований была выбрана доза ионизирующего облучения 50 крад.

Предварительно определяли влияние различных концентраций кверцетина, галловой кислоты, кумарина и 4-гидроксикумарина на жизнеспособность клеток дрожжей. Эксперименты проводили с пробами, отобранными из культуры в количестве 3 см<sup>3</sup>. В опытные варианты вносили 0,1 см<sup>3</sup> фенольных веществ в исследуемых концентрациях и инкубировали при 28 °С в течение 30 мин и 2 ч. Численность КОЕ в пробах без внесения данных веществ была принята за 100 %.

Показан ингибирующий эффект фенольных веществ в исследуемых концентрациях, как через 30 мин., так и через 2 ч. прединкубации. Число жизнеспособных клеток снижается на 40 % в опытах с кверцетином (0,015 – 0,07 мг/см<sup>3</sup>), на 25 % – с галловой кислотой (0,03 – 0,07 мг/см<sup>3</sup>), на 60 % – с кумарином (0,003 – 0,07 мг/см<sup>3</sup>) и на 70 % – с 4-гидроксикумарином (0,003 – 0,015 мг/см<sup>3</sup>).

В опытах по изучению протекторных функций фенольных веществ, пробы прединкубировали в течение 30 мин, подвергали  $\gamma$ -облучению до дозы 50 крад и определяли численность жизнеспособных клеток через 30 мин и 2 ч после действия радиации. Непосредственный протекторный эффект определяли через 30 мин после облучения, а способность клеток размножаться – через 2 ч. При этом рассчитывали: долю (%) выживших клеток после облучения по сравнению с необлученными клетками (принятыми за 100 %) для каждой концентрации вносимых

веществ; и долю (относительный %) выживших облученных клеток, прединкубированных с исследуемыми веществами, по сравнению с незащищенными клетками (принятыми за 100 %). Для установления реактивирующего действия исследуемые вещества вносили сразу после облучения дрожжей и через 2 ч инкубации проводили определение численности жизнеспособных клеток (диаграммы 1–4).

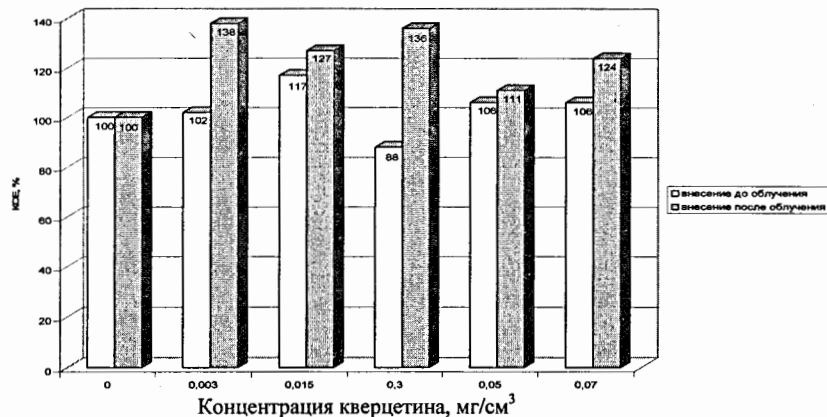


Диаграмма 1. Число жизнеспособных клеток дрожжей через 2 ч после облучения

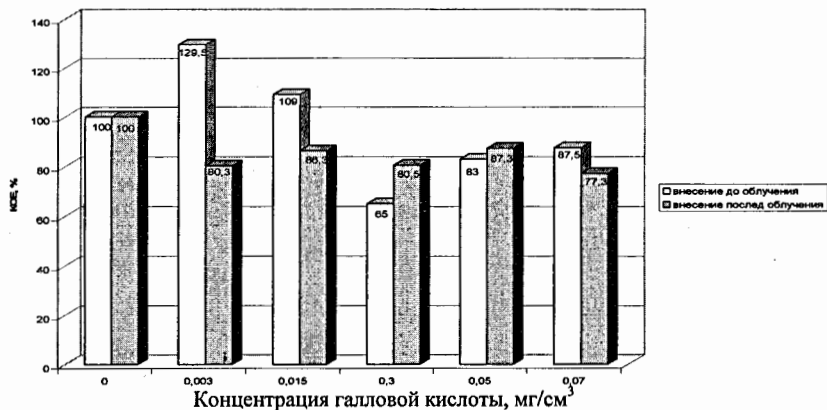


Диаграмма 2. Число жизнеспособных клеток дрожжей через 2 ч после облучения

Показано, что кверцетин обладает протекторным действием в концентрациях 0,0015–0,03 мг/см<sup>3</sup> и сохраняет способность клеток к размножению после облучения. Он также обладает выраженным реактивирующим действием: число жизнеспособных клеток на 30 % больше, чем в опытах в превентивном внесении.

Галловая кислота обладает протекторным действием в концентрациях 0,03 – 0,07 мг/см<sup>3</sup>, при этом отмечено снижение способности клеток к размножению. Реактивирующего действия на дрожжи не выявлено.

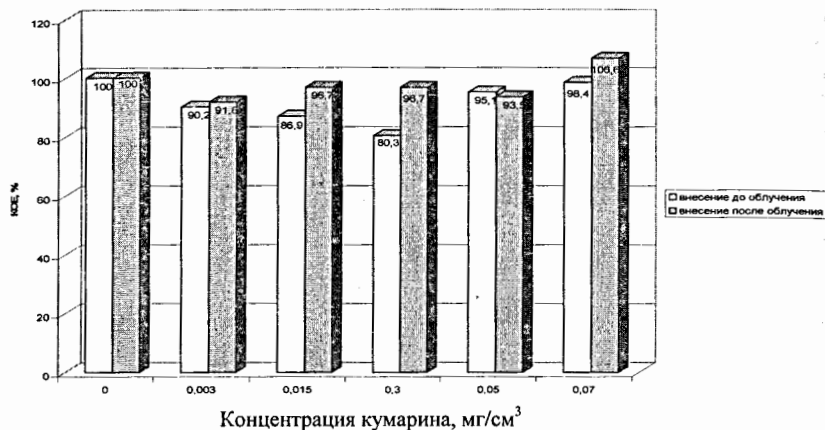


Диаграмма 3. Число жизнеспособных клеток дрожжей через 2 ч после облучения

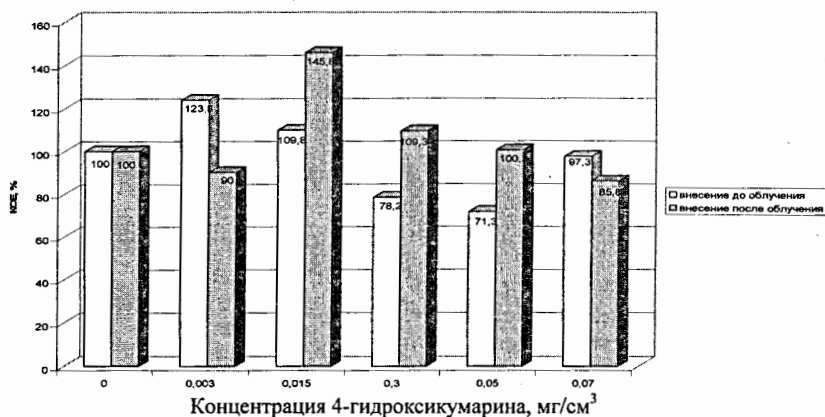


Диаграмма 4. Число жизнеспособных клеток дрожжей через 2 ч после облучения

Кумарин обладает протекторным действием в концентрациях 0,003 и 0,03 мг/см<sup>3</sup> и сохраняет способность клеток к размножению. В тоже время реактивирующее действие кумарина выражено слабо: отмечено незначительное увеличение числа жизнеспособных клеток дрожжей.

Для 4-гидроксикумарина протекторных свойств не выявлено, в исследованных концентрациях он стимулировал гибель клеток. Одновременно с этим 4-гидроксикумарин способствовал сохранению способности клеток к делению. Данное вещество обладает ярко выраженным реактивирующим действием: число жизнеспособных клеток существенно возрастает при его внесении после облучения.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено влияние фенольных соединений на жизнеспособность клеток и их радиопротекторные свойства по отношению к дрожжам *Sacch. cerevisiae*.

Протекторными свойствами обладают кверцетин, галловая кислота, кумарин; ярко выраженными реактивирующими свойствами обладают кверцетин и 4-гидроксикумарин. Реактивирующие свойства кверцетина и 4-гидроксикумарина можно объяснить с возможной остановкой клеточного деления, вызванного облучением, на стадии, в которой наиболее активно проявляются внутриклеточные репарационные процессы.

Исследованная нами модель может служить тест-системой для оценки следующих защитных свойств фенольных веществ различного происхождения: непосредственной протекторной активности веществ (внесение до облучения) по отношению к облучаемой клетке; протекторной активности веществ по отношению к репродуктивной функции клетки; реактивирующей способности по отношению к облученной клетке (внесение после облучения).

#### Литература

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты// Вестник РАМН. – 1998, № 7. – с. 43-51.
2. Кудряшов Ю.Б. «Радиационная биофизика (ионизирующие излучения)/ учеб. для вузов», М.: «ФИЗМАТЛИТ», 2004. – 448 с.
3. Степаненко И.Ю., Страховская М.Г., Беленикина Н.С., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Ревина А.А., Эль-Регистан Г.И. Защита *Saccharomyces cerevisiae* алкилоксибензолами от окислительного и радиационного поражения. Микробиология, 2002. - с. 204-207.
4. Heinonen I.M., Lehtonen P.J., Hopia A.I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. J. Agr. Food Chem., 1998, v. 46, № 1, p. 25-31

## АСИММЕТРИЧНОЕ МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ У ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ РНК ВИРУСОВ

Барковский Е.В., Хрусталёв В.В.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь,  
barkovsky@hotmail.ru

У одноцепочечных РНК вирусов все гены закодированы только на одной цепочке РНК, которая называется «РНК+» цепью. Комплементарная ей цепочка носит название «РНК-» цепи. Отличительной особенностью мутационных процессов в геномах одноцепочечных РНК вирусов является их асимметричность. Например, если нуклеотидная замена А на Г происходит в геноме одноцепочечного РНК вируса на РНК+ цепи, то она повышает общее содержание Г в геноме независимо от содержания С. Если же замена А на Г происходит на РНК- цепи, то она повышает общее содержание С в геноме независимо от содержания Г.

Если в вирионе геном представлен РНК+ цепью, сам вирус называют *одноцепочечным РНК+ вирусом*. Такой вирус, попадая в клетку, может незамедлительно начинать процесс синтеза белков. В начале репликации на РНК+ цепи синтезируется комплементарная РНК-цепь, которая затем используется в качестве матрицы для синтеза новых вирусных геномов [3]. Можно сказать, что геном РНК+ вируса в клетке существует в виде РНК+ цепи дольше, чем в виде РНК- цепи.

Если в вирионе находится РНК- цепь, вирус называют *одноцепочечным РНК- вирусом*. Прежде чем такой вирус начнет синтезировать собственные белки в клетке, должна произойти репликация его генома с образованием РНК+ цепей (мРНК). В процессе образования дочерних вирусных геномов РНК+ цепь служит матрицей, на которой образуются РНК- цепи [3]. Жизненный цикл одноцепочечных РНК- вирусов предполагает несколько более продолжительное существование их геномов в фазе РНК- цепи, нежели чем в фазе РНК+ цепи.

Нарушение правила «С=G и А=U», выполняющегося в ДНК как С=G и А=T, должно значительно усугубляться из-за воздействия мутационных процессов преимущественно на РНК+ цепь (у *РНК+ вирусов*) или на РНК- цепь (у *РНК- вирусов*).

Асимметричность мутационного давления в геномах одноцепочечных РНК вирусов позволяет определить, какие из гипотетических мутационных процессов являются активными, то есть, не являются отражением замен на комплементарной цепи. Интерес представляет и то, что в геномах этих вирусов отсутствует система репарации [3].

### Материалы и методы

Для исследования особенностей процессов мутационного давления в геномах одноцепочечных вирусов мы выбрали 1) 84 совокупности кодирующих участков (СКУ) геномов *одноцепочечных РНК- вирусов* и 2) 82 СКУ геномов *одноцепочечных РНК+ вирусов* из электронной базы данных Codon Usage Database [5]. Все расчёты производились при помощи оригинальной программы VVK 3.2. [1].

### Результаты и обсуждение

На сегодняшний день известно, что основной вклад в АТ-давление вносит процесс дезаминирования цитозина [6]. При этом на месте цитозина в ДНК (или РНК) появляется урацил. В РНК замены С на U осуществляются ферментами из

семейства АРОВЕС [2]. Весьма вероятно, что в цепочках вирусных РНК происходит не только ферментативный (за счёт работы ферментов клеток-хозяев), но и спонтанный процесс дезаминирования цитозина, весьма характерный для ДНК [6].

Судя по результатам наших исследований, в геномах одноцепочечных РНК+ и РНК- вирусов дезаминирование цитозина происходит. Доказательством этому служит то, что коэффициент корреляции между U и C в группе СКУ *одноцепочечных РНК+ вирусов со значением  $3C < 0,3$*  составляет -0,69 ( $3C$  – содержание цитозина в третьих положениях кодонов). Частоты использования А и G в нашей выборке СКУ РНК+ вирусов вообще не коррелируют между собой ( $R=0,12$ ). Это может быть связано не только с тем, что чаще дезаминированию подвергается дольше существующая РНК+ цепь, но и с наличием других мутационных процессов, изменяющих частоту использования G на РНК+ цепи.

Ни в одной СКУ геномов *одноцепочечных РНК- вирусов* показатель  $3C$  не превышает 0,3. Для всех СКУ этих вирусов коэффициент корреляции между U и C составляет -0,57. В то же время, коэффициент корреляции между А и G у одноцепочечных РНК- вирусов составляет -0,73. Этот факт заставляет нас предположить, что более часто цитозин подвергается дезаминированию на дольше существующей РНК- цепи этих вирусов, результатом чего и является сильная обратная связь между А и G.

В своих работах Суеoka Н. придает основное значение в создании GC-давления процессу замен А на С с вовлечением как минимум трех ферментов из системы репарации [6]. Эти ферменты вырезают аденин из пары с окисленным гуанином (8-оксо-гуанином) и восстанавливают 8-оксо-гуанин. В результате, на месте А появляется С. В геномах одноцепочечных РНК вирусов такой процесс невозможен из-за отсутствия системы репарации. С другой стороны, по той же причине в геномах одноцепочечных РНК вирусов должны часто происходить замены G на U и C на A. Такие замены возникают из-за окисления гуанина непосредственно в РНК: во время репликации напротив 8-оксо-гуанина в цепь РНК включается аденин, а не цитозин. Последующая репликация приводит к появлению урацила на месте окисленного гуанина [4].

В геномах *одноцепочечных РНК+ вирусов* процесс окисления гуанина действительно приводит к заменам G на U. Среди СКУ, показатель  $3C$  которых не превышает 0,3, коэффициент корреляции между G и U равен -0,68. Коэффициент корреляции между А и С равен -0,65 для всех СКУ РНК+ вирусов, однако отдельно в группах СКУ с  $3C > 0,3$  и  $3C < 0,3$  корреляционной связи между А и С нет. Получается, что в группе СКУ *РНК+ вирусов с  $3C > 0,3$*  определяется низкое содержание А. Это явление не может быть связано с частыми заменами от А к С. Для объяснения этой ситуации и самого факта наличия группы РНК+ вирусов с очень высоким содержанием  $3C$  требуется внесение в нашу систему процесса, повышающего содержание цитозина в РНК.

Известно, что ферментативный процесс дезаминирования аденина существует в мРНК [2]. Изучены несколько представителей ферментов семейства аденин-дезаминаз. В результате дезаминирования аденина образуется инозин, который является аналогом гуанина. Известно, что в ДНК происходит спонтанное дезаминирование аденина, являющееся молекулярным механизмом транзаций А на G и U на C (на комплементарной цепи) [3]. Если считать, что дезаминирование

аденина (как спонтанное, так и за счет клеточных ферментов) происходит в РНК вирусах, то высокое содержание С в SKU некоторых РНК+ вирусов следует объяснять повышенной активностью этого процесса в их геномах (на РНК-цепи). В группе РНК+ вирусов с показателем  $3C > 0,3$  отсутствует корреляция между С и U ( $R = 0,07$ ). С ростом частоты использования С частота использования U не изменяется, что, скорее всего, связано с тем, что процесс замен G на U поддерживает частоту использования U на стабильном уровне.

Деаминация аденина должна происходить и на РНК+ цепи, вызывая замены А на G. На самом же деле, в группе SKU РНК+ вирусов с  $3C > 0,3$  отмечается сильнейшая отрицательная связь между частотами С и G ( $R = -0,93$ ). С ростом частоты использования С частота использования G не растёт (как происходит в двухцепочечной ДНК), а падает. Судя по всему, причина этому – окисление гуанина в РНК, приводящее к заменам G на U. То есть, рост частоты использования гуанина нивелируется его окислением.

О том, что деаминация аденина в группе РНК+ вирусов с  $3C > 0,3$  происходит и на РНК+ цепях, свидетельствует отрицательная связь средней силы между частотами А и U ( $R = -0,62$ ). Эту связь можно объяснить тем, что частота использования А падает за счёт деаминации, а образующийся при этом G окисляется и замещается на U.

#### Выводы

В группе одноцепочечных РНК-вирусов нами найдены отрицательные связи между частотами использования G и U, С и А, С и U, G и А; корреляция между А и G и между С и U отсутствует. Это свидетельство того, что деаминация цитозина и окисление гуанина происходит на обеих цепях РНК-вирусов, но чаще (см. выше) – на РНК-цепи.

У одноцепочечных РНК+ вирусов с  $3C < 0,3$  обнаружены отрицательные корреляционные связи только между С и U и между G и U. Эти данные свидетельствуют о том, что процессы деаминации цитозина и окисления гуанина у этих вирусов происходят преимущественно на РНК+ цепях.

У одноцепочечных РНК+ вирусов с  $3C > 0,3$  отрицательные корреляционные связи есть только между С и G (сильная) и между А и U (средней силы). Повышение уровня С в геномах этих вирусов объясняется интенсивным деаминарованием аденина на РНК+ и на РНК-цепях. Низкое содержание G в геномах данных вирусов можно объяснить процессом окисления гуанина, преимущественно происходящим на РНК+ цепях.

У одноцепочечных РНК-вирусов и у РНК+ вирусов с уровнем  $3C < 0,3$  процесс деаминации цитозина явно преобладает над процессом деаминации аденина. У одноцепочечных РНК+ вирусов с уровнем  $3C > 0,3$  процесс деаминации аденина более интенсивен, чем процесс деаминации цитозина. У всех одноцепочечных РНК-вирусов выражен процесс окисления гуанина непосредственно в РНК.

#### Литература

1. Хрусталёв В.В., Барковский Е.В. // Медицинский журнал. – 2006. – №1. – стр.118-120.
2. Deichman A.M., Choi W.C., Baryshnikov A.Yu. RNA-editing. Hypothetical Mechanisms / М.: Practical medicine, 2005. – 266 p.

3. Singer M., Berg P. Genes and Genomes / University Science Books, 1991. – Vol.1. – 373 p.
4. Kino K., Sugiyama H. // Chemical Biology. – 2001. – Vol.8. – P.369-378.
5. Nakamura, Y., Gojobori, T. and Ikemura, T. // Nucl. Acids Res.– 2000. – 28, 292.
6. Sueoka N. // Gene. – 2002. – Vol.300. – P.141-154.



**ПОДХОДЫ К МАТЕМАТИЧЕСКОМУ МОДЕЛИРОВАНИЮ  
ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА У БАКТЕРИЙ  
*ESCHERICHIA COLI***

Белов О.В.

Лаборатория радиационной биологии, ОИЯИ, dem@jinr.ru

Рассматриваются современные представления об организации системы SOS-репарации у бактерий *Escherichia coli*. Целью данного исследования явилась разработка подходов к математическому моделированию индуцированного мутационного процесса у бактерий *Escherichia coli*.

Ранее указывалось, что индуцированный мутационный процесс у *E. coli* определяется комплексом генных продуктов, синтезируемых в ходе SOS ответа. Как показали исследования последних лет, важнейшими из них являются белки, осуществляющие *umuDC*-зависимый синтез ДНК по матрице, содержащей повреждения (translesion synthesis – TLS). В ходе этого процесса закрепляется большинство мутаций при действии излучений и ДНК-тропных химических агентов. В рамках данного исследования подробно проанализирован механизм функционирования SOS-системы клеток бактерий *E. coli*. Рассмотрен процесс образования трёх основных комплексов SOS-системы:  $UmuD_2C$ ,  $UmuDD'C$  и  $UmuD'_2C$  и показана их роль в реализации TLS.

Моделирование механизмов различных этапов репарационного процесса предпринималось в ряде работ. Одна из моделей, описывающая магистральные пути функционирования SOS-системы разработана в 1999 году в ОИЯИ [1]. В предлагаемой математической модели SOS-системы учены лишь процессы взаимодействия продуктов генов *lexA* и *recA* во время начального периода работы SOS-системы. В последнее время получены новые экспериментальные данные, касающиеся активности основных генов SOS-системы клеток *E. coli*, свидетельствующие о необычном колебательном отклике SOS-системы при УФ облучении. В связи с этим пересмотрен ряд модельных представлений и вопрос о концентрации в клетке одонитевой ДНК, которая является индуцирующим SOS-сигналом. В настоящей работе сохранен функциональный вид уравнений, однако параметры модели изменены и согласованы с новыми экспериментальными данными:

$$\frac{d[LexA]}{dt} = \tau_l \frac{b_l + 1}{b_l + [LexA]^2} - \tau_l [LexA] - k_l [LexA] \cdot [RecA^*],$$

Начальные условия:

$$[LexA] = 1,$$

$$\frac{d[RecA]}{dt} = \tau_r \frac{b_r + 1}{b_r + [LexA]^2} - \tau_r [RecA] - k_r [RecA] \cdot [ssDNA] + \theta [RecA^*],$$

$$[RecA] = 1$$

$$[RecA^*] = 0.$$

$$\frac{d[RecA^*]}{dt} = k_r [RecA] \cdot [ssDNA] - \theta [RecA^*].$$

$\frac{1}{\tau_l}$  и  $\frac{1}{\tau_r}$  – времена жизни белков LexA и RecA, соответственно.  $\theta$  – аналог обратного времени жизни белка RecA\*,  $k_l$ ,  $k_r$  – параметры модели. В рамках настоящего исследования найдены экспериментальные данные для нормированной концентрации белка [LexA] в клетках дикого типа *E. coli*, облученных УФ дозой в 5 Дж/м<sup>2</sup> [2], найдена временная зависимость [RecA\*](t) для различных численных значений параметра  $\tau_l$  (рис.1). Проведены расчеты концентрации одно-

нитевой ДНК при различных численных значениях параметров математической модели (рис. 2). Приведены решения предлагаемой математической модели (рис. 3).

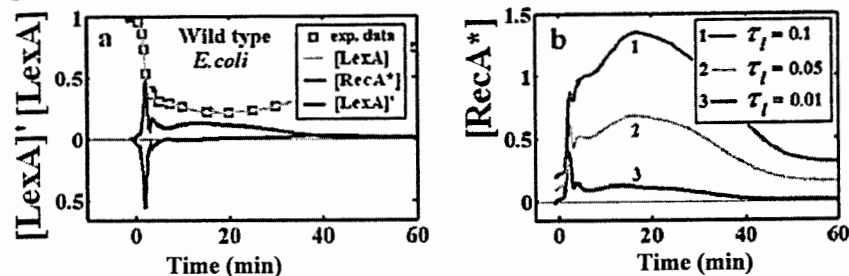


Рис.1. а) Временная зависимость нормированной концентрации белка [LexA](t), при облучении УФ дозой 5 Дж/м<sup>2</sup> клетки дикого типа *E. coli*. б) Рассчитанные временные зависимости нормированной концентрации активированного белка [RecA\*](t), в относительных единицах, при различных значениях параметра  $\tau_l$

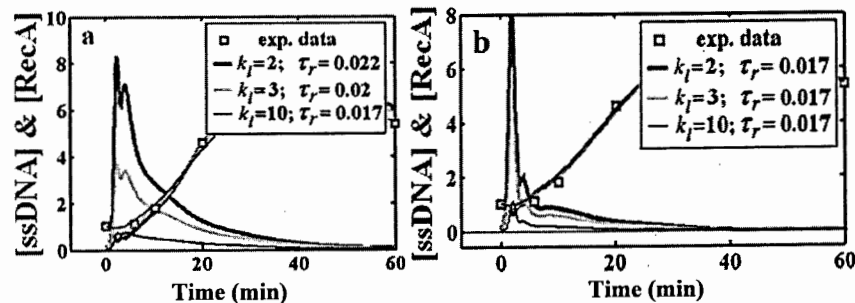


Рис. 2. Временные зависимости концентрации одонитевой ДНК [ssDNA](t). Расчеты проведены: а) с использованием кривой 1; б) с использованием кривой 3, при различных численных значениях параметров математической модели

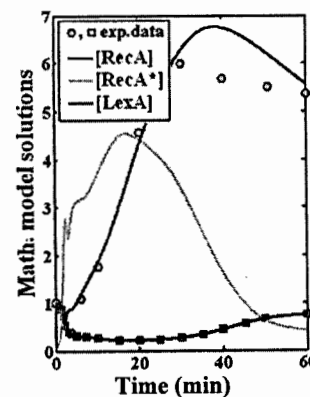


Рис. 3. Решения математической модели. Экспериментальные данные для [LexA] взяты из работы [2], для [RecA] – из работы [3]

В работе представлены экспериментальные данные, касающиеся синтеза белков UmuD, UmuD' и активности гена *umuC* в ходе ответа на повреждение ДНК (рис. 4).

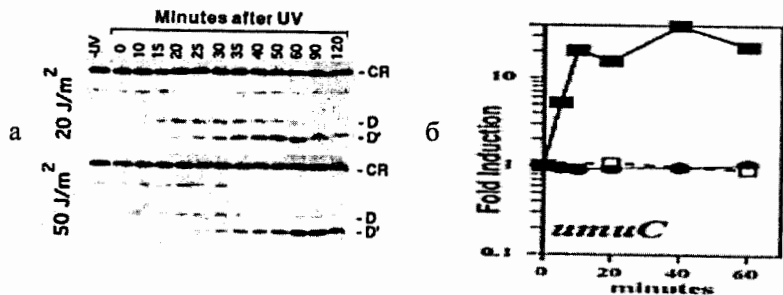


Рис. 4. а) Динамика синтеза белков UmuD и UmuD' при повреждении ДНК. D – позиция UmuD; D' – позиция UmuD'; CR – контроль реакции [4]. б) Индукция гена *umuC* после ультрафиолетового облучения в относительных единицах. ■ – облученный *wild type*; □ – необлученный *wild type*; ● – облученный *lexA1*-мутант; ○ – необлученный *lexA1*-мутант

Картина распределения фракций белков UmuD и UmuD', интерпретирована в виде кривых (рис. 5).

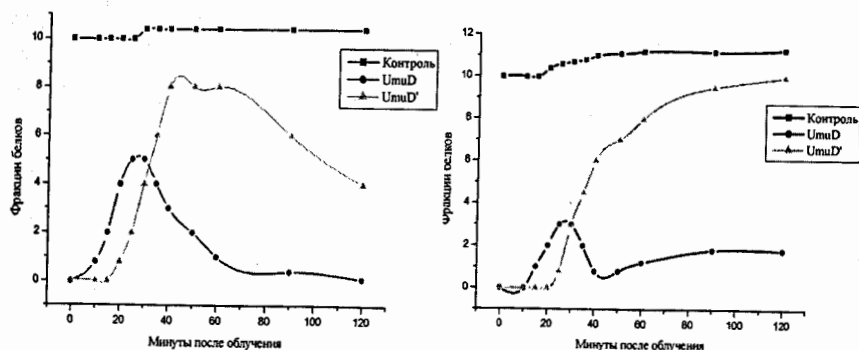


Рис. 5. Динамика синтеза белков UmuD и UmuD' при УФ облучении: а) для дозы 20 Дж/м², б) для дозы 50 Дж/м². Фракции белков представлены в относительных единицах

При сопоставлении полученных данных и модельных подходов сделано следующее предположение, касающееся математического моделирования работы той части SOS-системы, где происходит образование важнейших белковых комплексов: UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C, UmuD<sub>2</sub>C. Используя экспериментальные данные по синтезу белков UmuD, UmuD' и динамику формирования RecA\* [5], возможно получить производные по времени:

$$\frac{d[UmuD_2]}{dt}, \frac{d[UmuD'_2]}{dt}, \frac{d[UmuDD']}{dt}$$

Следовательно, можно составить систему из трёх дифференциальных уравнений, в которую войдут концентрации остальных белковых комплексов SOS-системы и параметры математической модели. Исходя из этого, можно приблизительно определить вид системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[UmuD_2]}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & \text{начальные условия:} \\ \frac{d[UmuD'_2]}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & [UmuD_2](0) = 1, \\ \frac{d[UmuDD']}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & [UmuD'_2](0) = 0, \\ & & [UmuDD'](0) = 0. \end{aligned}$$

Подобную систему дифференциальных уравнений возможно создать и для концентраций трёх основных белковых комплексов:

$$\begin{aligned} \frac{d[UmuD_2C]}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & \text{начальные условия:} \\ \frac{d[UmuD'_2C]}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & [UmuD_2C](0) = 0, \\ \frac{d[UmuDD'C]}{dt} &= \dots \text{параметры и концентрация белковых комплексов} \dots; & [UmuD'_2C](0) = 0, \\ & & [UmuDD'C](0) = 0. \end{aligned}$$

Таким образом, в настоящей работе проведен анализ современных экспериментальных данных, касающихся исследования кинетики *recA*, *lexA*, *umuD*, *umuC* генов. На основе ранее разработанной и усовершенствованной модели предложен подход к математическому моделированию кинетики экспрессии основных генов SOS-системы. Реализация данного подхода возможна путём усовершенствования предложенной системы дифференциальных уравнений. Основными задачами предстоящих исследований являются усовершенствование систем дифференциальных уравнений; поиск параметров систем; поиск более точных экспериментальных данных и их формализация.

### Литература

1. Аксенов С.В. Математическое моделирование генетической регуляторной системы SOS-ответа у бактерий *Escherichia coli*. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физ.-мат. наук. Дубна. 1999. Aksenov S.V. Dynamics of the inducing signal for the SOS regulatory system in *Escherichia coli* after ultraviolet irradiation // Math. Biosci. 1999. V. 157. № 15.
2. Sassanfar M., Roberts J. Constitutive and UV-Mediated Activation of RecA Protein: Combined Effects of *recA441* and *recF143* Mutations and of Addition of Nucleosides and Adenine // Journ. Bact. 1991. V. 173.
3. Weisemann J.M., Funk C., Weinstock G.M. Measurement of In Vivo Expression of the *recA* Gene of *Escherichia coli* by Using *lacZ* Gene Fusions // Journ. Bacteriol. 1984. V. 160. P. 112-121.
4. Timothy Opperman, Sumati Murli, Bradley T. Smith, Graham C. Walker. A model for a *umuDC*-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. // Genetics. 1999. V. 96 P. 9218-9223.
5. Белов О.В. Временная зависимость индуцирующего сигнала SOS-системы *E. coli*. Анализ экспериментальных данных для концентрации белка LexA (в печати).

# ВОЗДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ (ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ) НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Близнюк У.А., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Черныш А.М., Козлов А.П., Ермаков А.Н.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, fomina2001@rambler.ru

Исследование процессов, происходящих в биологических мембранах при воздействии различных физико-химических факторов является современной проблемой биофизики [1]. Целью данной работы является диагностика скрытых повреждений, возникающих в биологических мембранах при воздействии пучка ускоренных электронов, воздействия  $\gamma$ -излучения в широком диапазоне доз, а также действия лекарственных препаратов, как отдельно, так и в сочетании с действием ионизирующего излучения с помощью метода электропорации калиброванными импульсным электрическим полем. В качестве материала для исследования была использована суспензия эритроцитов, предварительно выделенных из крови человека, а затем помещенных в 0,9 % раствор NaCl. Источником импульсного электрического поля служил клинический дефибриллятор, обеспечивающий калиброванный импульс длительностью 6 мс, который создавал в растворе поле с напряженностью  $E = 1100$  В/см.

Облучение суспензии эритроцитов пучком ускоренных электронов проводилось на Разрезном Микротроне НИИЯФ МГУ. Целью данного эксперимента являлось исследование распределения биологического эффекта по мере прохождения пучка ускоренных электронов в суспензии эритроцитов. Суспензия облучалась в специально изготовленных полипропиленовых цилиндрических пробирках длиной 3 см и диаметром 1,6 см. Пробирки полностью заполнялись суспензией эритроцитов по 5 мл каждая, торцы пробирок герметично закрывались тонкой полипропиленовой пленкой. Далее пробирки укладывали друг за другом вплотную торцами в специальный желоб, который обеспечивал неподвижную фиксацию пробирок при проведении облучения. Количество пробирок в желобе определялось расстоянием, необходимым для полного поглощения пучка электронов в суспензии. Энергия пучка электронов составляла 20-40 МэВ. Для проведения облучения в желоб было помещено 11 пробирок. Время облучения составляло 15 минут. Далее суспензии из каждой пробирки подвергались электропорации импульсным электрическим полем. Детектирующим фактором был индуцируемый указанными физическими воздействиями гемолиз эритроцитов. Далее следили за изменением оптической плотности суспензий во времени, подвергавшихся только облучению, а также подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения и импульсного электрического поля. Подробно методика опытов приведена ранее в работе [2]. С помощью математической обработки полученных кинетических кривых уменьшения численности эритроцитов в суспензиях анализировали средние константы скорости уменьшения числа эритроцитов при комбинированном воздействии  $\beta_{\text{э+изп}}$  в каждой пробирке отдельно, при электропорации контрольной (необлученной) суспензии  $\beta_{\text{изп}}$ . Биологический эффект при прохождении пучка ускоренных электронов в каждой  $i$ -пробирке оценивали по

относительной константе скорости уменьшения числа эритроцитов  $\tilde{\beta}_i = \frac{\beta_{\text{э+изп}i}}{\beta_{\text{изп}k}}$ .

Необходимо отметить, что оптическая плотность облученных суспензий во всех пробирках в течение первых суток не изменялась, т.е. имело место наличие скрытых повреждений в мембранах эритроцитов. Однако, эти повреждения стали явными при последующем воздействии импульсным электрическим полем, так как  $\beta_{\text{э+изп}i} \geq \beta_{\text{изп}k}$  во всех 11 пробирках. На рис. 1 представлена зависимость относительной константы скорости уменьшения численности эритроцитов  $\tilde{\beta}$  от расстояния, пройденного пучком электронов в суспензии.

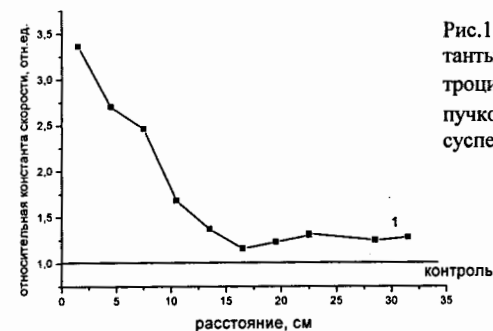


Рис.1. Зависимость относительной константы скорости уменьшения числа эритроцитов  $\tilde{\beta}$  от расстояния, пройденного пучком электронов с энергией 40 МэВ в суспензии (кривая 1)

Рис. 1 отражает пространственное распределение биологического эффекта по мере прохождения пучка ускоренных электронов с энергией 40 МэВ в суспензии. Как видно из рисунка, при прохождении пучка электронов первых 15 см в суспензии относительная константа скорости уменьшалась, что соответствует уменьшению биологического эффекта в соответствии с уменьшением значения поглощенной дозы в зависимости от расстояния. Однако при дальнейшем движении электронов в суспензии наблюдалось увеличение относительной константы скорости (примерно на 20 %) при дальнейшем уменьшении поглощенной дозы до 0.

Следующая часть работы посвящена экспериментальному исследованию воздействия пучка ускоренных электронов (энергия электронов 20 МэВ, время облучения 10 мин) на суспензию в различных концентрациях от 0,3 % до 100 % эритроцитов в 1 мл суспензии (до концентрации крови). При последующем разбавлении до 0,3 % в результате электропорации облученных и контрольных (без облучения) суспензий наблюдалось уменьшение константы скорости гемолиза эритроцитов при увеличении их концентраций в суспензиях. У облученных суспензий константы скоростей гемолиза эритроцитов были больше, чем у контрольных для каждой концентрации соответственно. При этом, чем больше концентрация эритроцитов в суспензии, тем меньше разность констант скоростей гемолиза эритроцитов у облученной и контрольной суспензий.

Лекарственные препараты могут оказывать нарушающее или укрепляющее действие на структуру мембраны эритроцитов. Влияние одного и того же препарата может существенно различаться при добавлении разных его концентраций

в суспензию эритроцитов. В работе исследовали комбинированное воздействие ионизирующего излучения и перфторуглеродного кровезаменителя перфторана, а также ионизирующего излучения и анестетика эсмерона на мембрану эритроцитов. Для выявления возможных скрытых повреждений сразу после воздействия лекарств суспензию подвергали воздействию калиброванного импульсного электрического поля. При облучении суспензии эритроцитов с добавлением эсмерона наблюдалась неаддитивность скоростей гемолиза эритроцитов. Сумма констант скорости уменьшения числа эритроцитов облученной суспензии  $\beta_e$  и суспензии с эсмероном  $\beta_э$  не равнялась константе скорости уменьшения числа эритроцитов в облученной суспензии с добавлением эсмерона  $\beta_{e+э}$ :  $\beta_{e+э} > \beta_e + \beta_э$ . При облучении суспензии эритроцитов с добавлением перфторана в большой концентрации препарат «предохранял» мембрану эритроцитов от воздействия ионизирующего излучения (пучок ускоренных электронов: энергия 40 МэВ, время облучения 10 мин) (см. рис. 2). Сумма констант скорости уменьшения числа эритроцитов облученной суспензии  $\beta_e$  и суспензии с перфтораном  $\beta_n$  не равнялась константе скорости уменьшения числа эритроцитов облученной суспензии с перфтораном  $\beta_{e+n}$ :  $\beta_{e+n} < \beta_e + \beta_n$ . Константы скорости уменьшения числа эритроцитов суспензии с перфтораном  $\beta_n$  и облученной суспензии с перфтораном  $\beta_{e+n}$  равны между собой и больше константы скорости уменьшения числа эритроцитов облученной суспензии  $\beta_e$  в 2 раза.

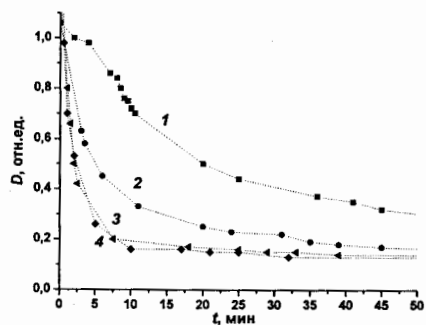


Рис. 2. Кинетические кривые уменьшения численности эритроцитов: 1 – контрольная суспензия (без облучения и препарата), 2 – облученная суспензия, 3 – суспензия + перфторан (100 мкл на 1 мл суспензии), 4 – облученная суспензия + перфторан (100 мкл на 1 мл суспензии)

Проведено исследование повреждения мембран эритроцитов человека при воздействии на суспензию крови  $\gamma$ -излучения в широком диапазоне доз (2-1000 Гр, мощность облучения 2,75 Гр/мин). Показано, что облучение в диапазоне поглощенных доз от 600 Гр и выше ведет к гемолизу эритроцитов сразу (или через несколько часов) после облучения, и значение константы скорости гемолиза растет с увеличением поглощенной дозы. Для диапазона поглощенных доз от 2 Гр до ~ 350 Гр не наблюдалось явного увеличения скорости гемолиза эритроцитов после воздействия на суспензию импульсным электрическим полем по сравнению с необлученной суспензией. Это свидетельствует о том, что в этом диапазоне доз степень повреждения мембран является малой и практически не зависит от величины поглощенной дозы. Для доз от 400 Гр до ~ 550 Гр наблюдалось явное увеличение скорости гемолиза после воздействия импульсного элект-

рического поля, растущее с увеличением поглощенной дозы. В этом диапазоне доз возникают скрытые повреждения мембран.

#### Литература

1. *Benderitter M., Vincent-Genod L., Pouget J. et al. // Radiation Research. 2003. 159. № 4. P. 471 - 478.*
2. *Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Алексеева П.Ю. Исследование воздействия гамма-излучения на эритроциты с помощью электропорации // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. 2005. № 3. С. 19 – 22.*

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЛУЧЕВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

<sup>1,2</sup>Ватлизов Д.В., <sup>1</sup>Клепко А.В., <sup>1</sup>Андрейченко К.С., <sup>3</sup>Нурищенко Н.Е.,  
<sup>1</sup>Андрейченко С.В.

<sup>1</sup>Научный центр радиационной медицины АМН Украины, г. Киев, Украина

<sup>2</sup>Национальная медицинская академия последипломного образования  
им. П. Л. Шупик, г. Киев, Украина

<sup>3</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, г. Киев, Украина  
scotch2006@mail.ru

Быстрое развитие атомной энергетики, безусловно, таит в себе опасность непредвиденного облучения персонала атомных объектов и населения прилегающих территорий ионизирующей радиацией, чему ярким свидетельством является авария на ЧАЭС (1986 г). При радиационном воздействии на живой организм репродуктивная система становится наиболее уязвимой. В этой связи особый интерес представляет изучение различных этапов развития радиационного синдрома в сперматозоидах, которым предопределена роль клеток-хранителей и переносчиков генетической информации при воспроизведении потомства [4, 5]. Показано, что ионизирующая радиация вызывает повреждение тканей и, в то же время, способствуют индукции запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, который, согласно современным представлениям, является основным механизмом, регулирующим естественное отмирание клеток в тканях живого организма. Поэтому любая стимуляция апоптоза обязательно сопряжена с существенным уменьшением первоначального пула нормально функционирующих клеток в общей популяции [1-3].

Основной задачей проведенных исследований было изучение общих тенденций иммобилизации и мортализации сперматозоидов под действием разных доз ионизирующей радиации, а также изучение количественных аспектов пострадиационного перехода сперматозоидов на разные стадии запрограммированной клеточной гибели.

### Материалы и методы

Исследования проводились на белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 250 - 300 г разведения местного вивария. После декапитации животных извлекали семенные придатки (эпидидимисы) и помещали в изотонический раствор натрия хлорида. Эпидидимисы облучали  $\gamma$ -лучами <sup>60</sup>Со на установке «Исследователь» с мощностью дозы 1,9 сГр/с в диапазоне доз 1-100 Гр. Сперматозоиды отделяли с помощью нейлонового фильтра с диаметром пор в 100 мкм.

С целью тестирования подвижности сперматозоидов каплю приготовленной суспензии переносили на предметное стекло термостатируемого столика с температурой 37 °С и просматривали под микроскопом МБИ-15 на увеличении  $\times 600$ .

Количественное изучение разных стадий клеточной гибели в популяции сперматозоидов проводили на лазерном проточном цитометре PAS фирмы Partec (Германия) при входящем напряжении лазера 200 мВ и длине волны 488 нм. Для работы на проточном цитометре использовали набор «AnnexineV apoptosis detection kit 1» фирмы BD Bioscience (США). Детектирование меченых аннексином V-ФИТЦ (флуоросцеин изотиоционат) и пропидия йодидом (ПЙ) сперматозоидов производилась с помощью зеленого и красного светодетектора соответственно

[6-7]. Обработку данных проводили программой FlowMax (Partec, Германия).

Нормально функционирующие клетки определяли как аннексин V-ФИТЦ(-) /ПЙ(-). Клетки, находящиеся на ранней стадии апоптоза, определяли как аннексин V-ФИТЦ(+)/ПЙ(-), а клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза или погибшие в результате апоптоза, определяли как аннексин V-ФИТЦ(+)/ПЙ(+). Аннексин V-ФИТЦ(-) /ПЙ(+) определяли как мертвые клетки, погибшие в результате некроза.

Количество сперматозоидов, погибших в результате апоптоза, определяли путем вычисления разницы между общим числом неподвижных сперматозоидов и погибших в результате некроза. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятой методике [8].

### Результаты и обсуждение

При исследовании иммобилизации сперматозоидов было установлено, что в диапазоне доз гамма-облучения 1-100 Гр подвижность гамет менялась волнообразно, образуя явный минимум при 8 Гр и очевидные максимумы при 32 и 100 Гр (рис. 1 А).

Значительная потеря подвижности при дозе в 8 Гр сочеталась с появлением мертвых сперматозоидов, погибших в результате развития в них как апоптоза, так и некроза, хотя вклад апоптоза в гибель сперматозоидов был почти в 2 раза больший, чем некроза (рис. 1 Б).

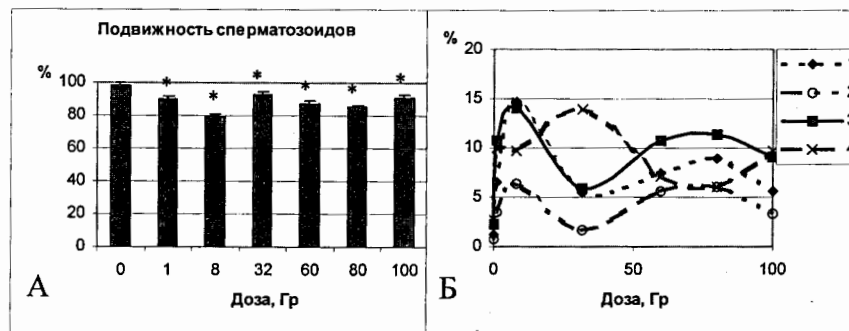


Рис. 1. Количественная характеристика пострадиационного состояния сперматозоидов в зависимости от дозы гамма-облучения: А: подвижность сперматозоидов Б: 1 – Апоптотическая мортализация, 2 – Некротическая мортализация, 3 – поздняя стадия апоптоза, 4 – ранняя стадия апоптоза. (\* - достоверные изменения относительно контроля при  $p \leq 0,05$ )

С ростом дозы облучения, наблюдалось постепенное выравнивание указанной диспропорции, причем при дозе в 80 Гр вклад обоих компонентов в реализацию указанного феномена становится почти одинаковым. Однако, уже при дозе в 100 Гр снова выявлено восстановление диспропорции. Однако необходимо указать, что в изученном диапазоне доз мертвых сперматозоидов было обнаружено не более 22 % от всей популяции клеток. Кроме мертвых сперматозоидов были также выявлены клетки на поздней и ранней стадии апоптоза. Как оказалось, наибольшее количество сперматозоидов на поздней стадии апоптоза было

обнаружено при дозе в 8 Гр. В то же время, резкое возрастание сперматозоидов на ранней стадии апоптоза имело место лишь при дозе в 32 Гр – 13 %. По сравнению с контролем это число возросло почти в 6,5 раз (см. рис. 1 Б).

Нашими исследованиями удалось также показать, что после облучения эпидидимисов ионизирующей радиацией в диапазоне доз 1 – 100 Гр обязательно остается не менее 60 % клеток, которые полностью сохраняют свою подвижность и присущие им жизненные функции (рис. 2).



Рис. 2. Гистограмма количественных изменений субпопуляции нормально функционирующих сперматозоидов в общей популяции мужских гамет в зависимости от дозы гамма-радиации (\* - достоверные изменения относительно контроля при  $p \leq 0,05$ )

Полученные данные способствуют получению объективной информации о дозовых закономерностях развития апоптоза и некроза в мужских гаметах под действием гамма-радиации путем моделирования процессов радиационного поражения на сперматозоидах лабораторных животных.

#### Литература

1. Ricci G., Peticarari S., Fragonas E. et. al Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes // Human Reproduction. 2002. 17. P.2665-2672.
2. Barroso G., Taylor S., Morshedi M. et. al Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptic markers: a comparison of two different sperm subpopulations // Fertility and Sterility. – 2006. – 85, No.1. – P. 149-154.
3. Martin G., Sabido O., Durand Ph., Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction // Human Reproduction. – 2005. – 20, No 12. – P.3459-3468.
4. Pandey K. K., Patchell M. R. Genetic transformation in chicken by the use of irradiated male gametes // Mol. Gen. Genet. - 1982. - 186, No 3.-P. 295-300
5. Braham C. F. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research // Biol. ReV. - 1974. – 49, No 4. - P. 399-422
6. Annexin V-FITC apoptosis detection kit I // echnical data sheet. BD Bioscience. 2002.
7. Apoptosis: Applied Reagents and Technologies // Instruction Manual. – BD Bioscience. – 1998. - 2<sup>nd</sup> ed. – 99 p.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск: Вища школа. 1973. 320 с.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ HPRT-МУТАНТНЫХ СУБКЛОНОВ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

Гапиев О.Ю., Говорун Р.Д., Кошлань Н.А., Кошлань И.В., Юрков А.М.  
Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия, pertsevaolya@mail.ru

Выявляемая геномная и хромосомная нестабильность у отдаленных потомков облученных клеток привлекают внимание исследователей в связи со все более очевидной ролью хромосомных аномалий в патогенезе ряда опухолевых заболеваний человека, затрагивающих отдельные гены. Стабильность генома, фундаментального свойства всего живого, обеспечивается репарацией ДНК. Результатом сбоев этого механизма являются мутации, которые зачастую, быстро элиминируются в следующих поколениях, но и могут сохраниться, реализуя другую, не менее значимую функцию генома, его изменчивость. Механизмы индукции и поддержания генетической нестабильности до сих пор не выяснены до конца и требуют дальнейшего изучения.

Цитогенетическим анализом была обнаружена воспроизводимая нестабильность хромосом у отдаленных потомков клеток китайского хомячка, мутантных по локусу HPRT, которая наблюдалась как у радиационно-индуцированных мутантных субклонов, так и при спонтанном мутагенезе [1, 2]. В целях продолжения изучения природы геномной нестабильности предполагается провести исследование HPRT-мутантных субклонов, индуцированных излучениями разного качества методами молекулярной генетики. Локус гипоксантин-гуанин фосфорибозил-трансфераза (HPRT), расположенный на X-хромосоме, удобен для индукции, изучения и классификации мутантных клеток млекопитающих и уже долгое время широко используется как селективный генетический маркер [3]. Для клеток китайского хомячка его размер и последовательность определены и доступны [4].

Ионизирующее излучение вызывает разнообразные повреждения ДНК: одно- и двухнитевые разрывы, модификацию оснований, формирование ДНК-белковых сшивков, транслокации участков ДНК, образование мостов (соединение двух фрагментов, относящихся к разным хромосомам). Нестабильные aberrации, приводящие к гибели облученной клетки или ее потомков из-за невозможности равномерного распределения генетического материала между дочерними клетками, уверенно регистрируются метафазным методом [1,2]. Для стабильных перестроек, которые сопровождаются перемещением участков поврежденных хромосом и могут передаваться в ряду клеточных поколений, требуются подходы, отличные от метафазного анализа, например FISH или ПЦР-анализ. Для продолжения исследования природы геномной нестабильности, нами предполагается использовать методику на основе ПЦР-анализа.

Как один из важных этапов будущего исследования, в нашу задачу входит оптимизация процедур выделения и анализа ДНК, содержащей HPRT-ген. Поскольку действие радиации на ДНК вызывает различные повреждения ее структуры (в том числе и HPRT локуса), важно подобрать процедуры ее экстракции, учитывающие их характер и тяжесть.

Среди наиболее распространенных на сегодняшний день методов, наиболее

давно используемым является фенольно-хлороформная экстракция [5], большинство модификаций которой по-прежнему достаточно громоздки. В 1981 году была разработана процедура для изоляции ДНК из клеток млекопитающих с использованием поликарбонатных фильтров [6]. Этот метод дает хороший выход ДНК большого молекулярного веса. Несмотря на все его преимущества, значительную конкуренцию составил недорогой, безопасный и достаточно быстрый метод солевой экстракции ДНК, разработанный в 1988 году и уже довольно широко применяющийся для выделения ДНК и последующей амплификации в ПЦР [7]. Он не требует ни обширного диализа [8], ни использования фильтров [6]. Сравнение трех, наиболее используемых методов изоляции ДНК приведено в таблице 1. Видно, что степень чистоты извлекаемой ДНК практически одинакова во всех трёх случаях. Исходя из соображений доступности, простоты проведения и учитывая тот факт, что для ПЦР-анализа достаточно небольшого количества ДНК, представляется целесообразным для ее выделения из клеток китайского хомячка использовать именно метод солевой экстракции.

Таблица 1. Сопоставление эффективности методов экстракции ДНК

Метод экстракции ДНК	Выделенная ДНК, %	Степень очистки ДНК	
		A260 нм/A280 нм	A260 нм/A230 нм
с поликарбонатными фильтрами	85-90	1,8	2,35
фенольно-хлороформная	50-60	1,85	2,35
солевая экстракция	50-60	1,8	—

Для клеток китайского хомячка была разработана и опробована методика мультиплексной ПЦР с одновременной амплификацией всех девяти экзонов HPRT-гена [9]. Мы планируем использовать последовательный и избирательный подход к анализу повреждений различной индукции и масштаба. Так, крупные делеции могут быть обнаружены последовательным сравнением амплифицированных фрагментов гена. Для исследования аббераций среднего размера нами предлагается использовать методику рестрикционного анализа с различными эндонуклеазами, например *HaeIII*, *AluI*, *HinfI*, *HindIII*, *PstI* [10]. Данный подход широко используется в молекулярной биологии, в частности для картирования генов благодаря скорости и неплохой разрешающей способности, 20-50 п.н. для одной эндонуклеазы. В случае же перекрытия сайтов рестрикции становится возможным не только регистрировать повреждения размером в несколько пар оснований, но, при необходимости, и точно фиксировать их положение.

Кроме того, перспективным для оценки неспецифических изменений гена является метод ПЦР реакции с неспецифическими олигонуклеотидными праймерами (MSP-PCR, AFLP, фингерпринтинг). Наличие повторяющихся последовательностей, например, -GTG-, позволяет получать фрагменты произвольного размера, в зависимости от выбранного праймера. Правильный выбор праймера и достаточно большое количество фрагментов позволяют вести количественный анализ собственной (внутривидовой) генетической вариабельности в последовательном ряду поколений [11]. Подобный подход, несомненно, может быть успешно применен для определения степени собственной вариабельности HPRT-гена и получения характеристики геномной нестабильности в зависимости от дозы радиационного воздействия. При необходимости, важные повреждения могут быть, в последствии, картированы.

Сопоставление данных, полученных на основе непосредственного анализа генетического материала (HPRT гена) посредством полимеразной цепной реакции и цитогенетического анализа, позволит получить более полное представление о природе геномной нестабильности мутантов. Детальное изучение молекулярных событий, инициирующих геномную нестабильность в последующих генерациях мутантных клеток, послужит этапом для установления природы геномной нестабильности клеток и ее механизмов.

#### Литература

1. Кошлань И.В. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки млекопитающих и хромосомная нестабильность HPRT-мутантных субклонов. //Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Объединенный Институт Ядерных Исследований. Дубна. 2002. 92. С.
2. Красавин Е. А., Говорун Р. Д., Шмакова Н. Л., Кошлань И.В., Насонова Е.А., Репин М.В. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки человека и млекопитающих. //ЭЧАЯ. 2004. Т. 35. вып. 6. с. 1483-1511 .
3. Xu Z., Yu Y., Gibbs R.A., Caskey C.T. and Hsie A. W. Multiplex DNA amplification analysis at the hpvt locus in Chinese hamster cells. // Mut. Res.1993. V. 288. p. 237-248.
4. Konecki D.S., Brennan J, Fuscoe J.C., Caskey C.T. and Chinault A.C. Hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase genes of mouse and Chinese Hamster: Construction and sequence analysis of DNA recombinants. //Nucleic Acids Research. 1982. V. 10. p. 6763-6775.
5. Kirby K.S. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids; evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. //Biochem J. 1957. Jul. V. 66. N. 3. p. 495-504.
6. Steven A. Leadon and Peter A. Cerutti. A rapid and mild procedure for the isolation of DNA from mammalian cells. //Analytical Biochemistry. 1982.V.120. p. 282-288.
7. Miller S.A., Dykes D.D. and Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. // Nucleic Acids Research. 1988. V. 16. N. 3. p. 1225.
8. Longmire J, Albright K, Lewis A, Meincke L. and Hildebrand C. A rapid and simple method for the isolation of high molecular weight cellular and chromosome-specific DNA in solution without the use of organic solvents. // Nucleic Acids Res.1987. V. 15. p. 859.
9. Xu Z., Yu Y., Hsie A.W., Caskey C.T., Rossiter B., and Gibbs R.A. Deletion Screening at the Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Locus in Chinese Hamster Cells Using the Polymerase Chain Reaction. //Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 1989. V. 9. p. 177-187.
10. Rossiter B. J. F., Fuscoe J. C., Muzny D. M., Fox M., Caskey C. T. The Chinese Hamster HPRT Gene: Restriction Map, Sequence Analysis, and Multiplex PCR Deletion Screen.//Genomics. 1991. V. 9. p. 247-256.
11. Юрков А.М., Чернов И.Ю. Географические расы некоторых видов аскомицетовых дрожжей в Московской и Новосибирской областях. //Микробиология. 2005. т.74. № 4. с. 687-692.

# РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ И РЕАКЦИЯ ГРЫЗУНОВ НА ХРОНИЧЕСКОЕ РАДИАЦИОННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В МАЛЫХ ДОЗАХ (ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКИЙ РАДИОАКТИВНЫЙ СЛЕД)

Григоркина Е.Б., Пашнина И.А.

Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия  
grigorkina@ipae.uran.ru

Наличие обширных территорий, загрязненных радионуклидами после Кыштымской (1957 г.) и Чернобыльской (1986 г.) аварий, оставляет проблему радиоадаптации мелких млекопитающих одной из актуальных и дискуссионных в радиоэкологии. В настоящем сообщении мы приводим результаты комплексного изучения радиорезистентности, а также ряда физиологических и цитогенетических показателей у грызунов, обитающих в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа) и фоновых территориях Урала.

Объекты исследования – грызуны, различающиеся эколого-физиологическими особенностями (малые лесные мыши – *Apodemus (S) uralensis*, полевые мыши – *Apodemus agrarius*, красные полевки – *Clethrionomys rutilus*, обыкновенные полевки – *Microtus arvalis*, полевки-экономки *Microtus oeconomus* и обыкновенные слепушонки – *Ellobius talpinus*), отловленные на участках, сходных по геоботаническому описанию и фаунистическому составу, но разных по плотности радиоактивного загрязнения. Импактные участки отлова зверьков находится в эпицентре ВУРСа: слепушонок в 6 км, мышей и полевок – в 13 км от места взрыва емкости с радиоактивными отходами и различаются плотностью радиоактивного загрязнения (табл. 1); контрольные участки находятся за пределами ВУРСа и уровень загрязнения соответствует фоновым значениям для Уральского региона. Радиорезистентность изучали традиционно в радиобиологическом эксперименте после острого тотального облучения животных, отловленных на чистых территориях, рассчитывали ЛД<sub>50/30</sub> (табл. 2). С целью исключения влияния физиологического статуса на радиационную устойчивость, в экспериментах использовали зверьков (мыши и полевки) только второго типа онтогенеза (схема) [1]. Это сеголетки, отловленные осенью, не участвующие в год своего рождения в процессах популяционной репродукции, характеризуются минимальным уровнем обмена веществ, функция – сохранить популяцию зимой, а весной начать новый цикл ее обновления.

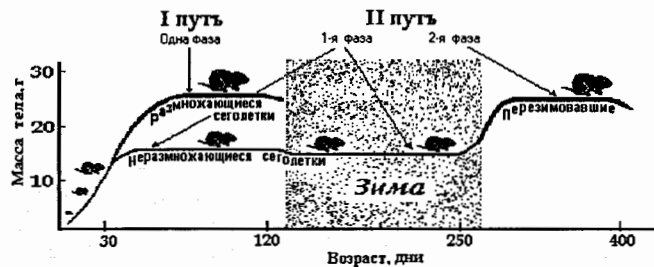


Рис. 1. Схема двух альтернативных путей онтогенетического развития у мышевидных грызунов [1]

Кроме того, зверьки этой группировки являются наиболее радиорезистентными по ЛД<sub>50/30</sub>, летальности, реакции системы гемопоэза, средней продолжительности и другим характеристикам [2].

Таблица 1. Радиоэкологическая характеристика участков отлова, важные биологические параметры и поглощенные дозы у грызунов на ВУРСе

Вид	Плотность загрязнения участка обитания на ВУРСе <sup>90</sup> Sr	Продолжительность жизни грызунов	Поглощенная за жизнь доза на ВУРСе, Бэр	Репродуктивный возраст	Доза у животных репродуктив. возраста, Бэр
<i>A. (S) uralensis</i> <i>A. agrarius</i> <i>Cl. rutilus</i> <i>M. arvalis</i> <i>M. oeconomus</i>	400-540 Ки/км <sup>2</sup> (15-20 МБк/м <sup>2</sup> )	1,5 года	0,07-1,5	1,5 мес.	0,36
<i>E. talpinus</i> (черная морфа)	950-1050 Ки/км <sup>2</sup> (35-39 МБк/м <sup>2</sup> )	6 лет	0,33 – 29,63	2 года	11,40

Установлено, обыкновенные слепушонки являются самым радиочувствительным видом из большой серии изученных нами видов грызунов (табл. 2) [3], что связано с их образом жизни и эколого-физиологическими особенностями. Это полиморфные по окраске меха животные (бурая и черная морфы), имеют большую, чем мыши и полевки, массу тела, характеризуются низкой миграцией, ведут подземный норный образ жизни.

Таблица 2. Радиорезистентность грызунов разной экологической специализации, отловленных на фоновых территориях Урала [3]

Вид	ЛД <sub>50/30</sub> , Гр М±m	Место отлова
<i>Ellobius talpinus</i> * (черная морфа)	26 5,0±0.7	Кунашакский р-н (Челябинская обл.)
<i>Ellobius talpinus</i> * (бурая морфа)	17 5,1±0.6	Лебяжье-Вский р-н (Курганская обл.)
<i>Apodemus (S) uralensis</i>	36 7,0±0.4	Ильменский заповедник (Челябинская обл.)
<i>Microtus arvalis</i> *	27 9,4±0.4	Нижне-Сергинский р-н (Свердловская обл.)
<i>Microtus oeconomus</i>	30 9,6±0.4	Каслинский р-н (Челябинская обл.)
<i>Apodemus agrarius</i>	57 10,0±0.2	Полевской р-н (Свердловская обл.)
<i>Clethrionomys rutilus</i>	56 12,8±0.4	Иремель (Челябинская обл.)

Примечание: звездочкой обозначены виды, для которых ЛД<sub>50/30</sub> определена впервые

Ранее нами [3] показано, что масса тела, тип питания и биотопические предпочтения животных являются основными характеристиками, которые обуславливают радиорезистентность мелких млекопитающих. Возможно, обитание в норах (стабильность микроклиматических условий) при отсутствии естественной инсоляции, препятствует развитию у слепушонок преадаптации к острому облучению.

Исследование гематологических, иммунологических [4] и цитогенетических [5] характеристик у животных из зоны ВУРСа, выявило большую устойчивость



обыкновенных слепушенок к хроническому облучению (длительное, в течение 50 лет, обитание в радиационном биоценозе) т. к. ни в одной из анализируемых систем не было обнаружено значимых с контролем различий (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение цитогенетических, гематологических и иммунологических характеристик у грызунов (ВУРС – контроль)

Вид	Цитогенетические показатели	Гематологические показатели	Иммунологические показатели
Мыши и полевки	+*	+*	+*
Слепушонки	-	-	-

Примечание: \* обозначено наличие достоверных различий по комплексу показателей у грызунов из импактных и контрольных выборок

При этом поглощенные дозы [6] у слепушенок репродуктивного возраста в 30 раз выше, чем таковые у мышей и полевок (табл. 1), у которых установлены многочисленные достоверные (по сравнению с одноименным контролем) сдвиги в системе гемопоза и иммунитета, а также увеличенная частота микроядер в клетках костного мозга.

Полученные результаты допускают генетическую интерпретацию, т. е. расценены как популяционно-генетическая радиоадаптация у *E. talpinus* в загрязненной радионуклидами среде при изоляции поселения (низкая миграция) в северной части ареала. Мыши и полевки в силу своей высокой миграционной способности, за короткое время могут преодолевать пространства, сопоставимые с поперечными размерами зоны загрязнения, что приводит к формированию «проточного» населения, т. е. населения с меняющимся составом [7]. При этом устанавливается равновесие между вселенцами с чистых территорий и выселенцами из зоны загрязнения. Таким образом, грызуны подвижных видов ускользают от длительного воздействия повреждающего фактора, что препятствует развитию у них радиоадаптации. Для верификации наших рассуждений представляется важным оценить наличие радиационно-индуцированного адаптивного ответа у изучаемых видов грызунов разной экологической специализации. Можно предположить, что в качестве адаптирующих доз облучения в данном случае выступает хроническое облучение в малых дозах, которое воздействует на организм животных постоянно обитающих в зоне загрязнения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 07-04-96091 р\_урал\_a).

#### Литература

1. Оленев Г.В. // Экология. 2002. № 5. С. 341 – 350.
2. Оленев Г.В., Григоркина Е.Б. // Экология. 1998. № 6. С. 447-451.
3. Григоркина Е.Б. // Рад. биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 3. С. 245-250.
4. Пашнина И.А. Анализ иммунологических и гематологических особенностей грызунов, обитающих в радиоактивной среде: Автореф. дис. канд. биол. наук. Екатеринбург. 2003.
5. Гилева Э.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 6. С. 670-673.
6. Пашнина И.А., Любашевский Н.М., Стариченко В.И. // Молодеж. междунар. конф. «Экология-2003». Архангельск: УрО РАН, 2003. С. 196-197.
7. Григоркина Е. Б., Оленев Г. В. // Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека: Материалы II Междунар. конф. Томск. 2004. С. 160-162.

#### БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Давтян М.А., Навасардян Л.А., Барсегян Э.Х., Арцруни Н.А., Марутян С.В., Григорян Р.

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, marsed@ysu.am

Живые организмы обладают большими приспособительными возможностями, позволяющими им выживать в экстремальных условиях. Очевидно, при этом организмы вырабатывают определенные защитные механизмы, изучение которых является основой для разработки способов защиты организмов от экстремальных воздействий.

Многими исследованиями показано, что ионизирующее излучение вызывает множественные односайтовые (однонитевые разрывы, модификации оснований) и мультисайтовые кластерные (локальные множественные двунитевые разрывы, межмолекулярные сшивки типа ДНК-белок и ДНК-ДНК) повреждения ДНК [Pfeiffer P., et.al., 1996]. Известно более 100 продуктов радиолитического нарушения ДНК облученных клеток [Téoule R., 1987; Von Sonntag C., 1987; Fielden E., et.al., 1991].

Недостаточно изучены вопросы изменений фракций белков при экстремальных воздействиях различных факторов на организмы. Имеются сведения, что при голодании на фоне общего катаболизма белков происходит и биосинтез определенных белков и, в том числе, индукция некоторых ферментов. В этом направлении представляет большой интерес индукция стрессовых белков, называемых белками теплошока (БТШ) [Bensaude O., et.al., 1983; Barnett Th., et.al., 1980; Ellis R.J., 1987; Hartl F.U., 1999], которые синтезируются не только при тепловом воздействии, но и под влиянием других стрессовых факторов (этанол [Watson K., et.al., 1983; Zeuthen M., et.al., 1988]; гипоксия [Sachs M., et.al., 1980]; перекись водорода [Keyse S., et.al., 1987] и др.). Хотя имеется определенный прогресс в области изучения этих белков (выявлен ген БТШ, изучены особенности экспрессии последнего, установлена консервативность БТШ в эволюции [Lindquist, 1986]), но ряд принципиальных вопросов защитного механизма БТШ остается открытым. В этом направлении представляют определенный интерес некоторые предварительные данные о предохранении БТШ хроматина от повреждений [Levinger L., et.al., 1981] и даже их участие в процессах репликации [Munro, et.al., 1986] и репарации ДНК [Lai B.-T., et.al., 1984].

Исследования показали (рис.1), что у дрожжей *S.guilliermondii* ВКМ У-42 после последовательного голодания на 2 %-ой глюкозе (48 ч) и воде (24 ч) резко увеличивается щелочерастворимая фракция белков и уменьшается водорастворимая.

Выявлены некоторые различия в количественном соотношении аминокислот водорастворимой фракции белка до и после голодания (табл. 1)

Так, после голодания заметно повышается содержание лизина, гистидина и аспарагиновой кислоты и, наоборот, понижается содержание фенилаланина и валина водорастворимой фракции белка. Процентное содержание аминокислот щелочерастворимой фракции при голодании подвергается небольшим изменениям, заметно понижается содержание лишь фенилаланина.

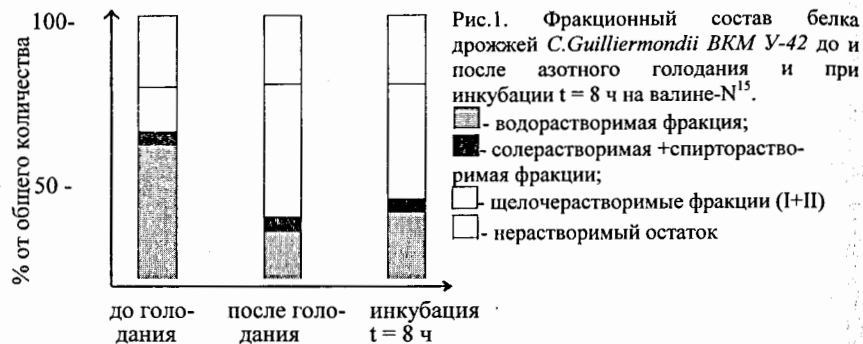


Рис.1. Фракционный состав белка дрожжей *C. guilliermondii* BKM Y-42 до и после азотного голодания и при инкубации  $t = 8$  ч на валине- $N^{15}$ .  
 ■ - водорастворимая фракция;  
 ■ - солерастворимая + спирторастворимая фракции;  
 □ - щелочерастворимые фракции (I+II)  
 □ - нерастворимый остаток

Можно заключить, что изучаемые фракции белков, являясь гетерогенными, наблюдаемые изменения в процентном содержании аминокислот являются следствием изменения количественного соотношения подфракций белков.

Таблица 1. Аминокислотный состав водорастворимой и щелочерастворимой фракций белка дрожжей *C. guilliermondii* BKM Y-42 (в молях)

Аминокислоты	Водорастворимая фракция		Щелочерастворимая фракция	
	Исходная культура	Голодающая культура	Исходная культура	Голодающая культура
Цистеин	8,4±0,06	9,3±0,2	-	-
Лизин+гистидин	10,9±0,1	15,2±0,3	20,6±0,4	21±0,5
Аргинин	5,8±0,07	4,7±0,06	6±0,04	5,7±0,05
Аспарагиновая кислота+серин	15,7±0,2	21±0,3	5,4±0,03	4,8±0,04
Глицин	8±0,1	8,1±0,2	6,3±0,5	8,4±0,06
Глутаминовая кислота+треонин	18,8±0,3	19±0,3	24±0,4	24,5±0,45
Аланин	10,8±0,2	10,2±0,2	11,4±0,3	12±0,2
Тирозин	4,2±0,05	3±0,05	2,7±0,05	3,3±0,06
Валин	4,3±0,06	1,32±0,03	6±0,04	6,3±0,03
Фенилаланин	3,2±0,05	1±0,03	4,3±0,04	2±0,01
Лейцин	9,4±0,1	7,5±0,09	14±0,2	12±0,1

В последующих экспериментах изучались изменения в белковых фракциях при восстановлении питания голодавших культур с целью внесения ясности в сущность вышеприведенных изменений при голодании. В этой серии опытов предварительно голодавшие дрожжи переносились в полноценную питательную среду, содержащую в качестве источника азота валин- $N^{15}$ . Процентное содержание  $N^{15}$  в препарате составляло 17,3. Инкубация проводилась в течение 8 ч. Результаты показали, что при этом содержание биомассы не претерпевает существенных изменений. Так, количество биомассы увеличивается на 1±2 %, тогда как количество белка и общего азота на 11±1 % и 45,5±1,5 % соответственно.

В последующем изучалась динамика включения  $N^{15}$  во фракцию водорастворимых азотсодержащих небелковых соединений (аминокислоты,

$NH_4^+$  и др.). С этой целью пробы брались через 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч и 8 ч инкубации. Как видно из приведенной на рис. 2 кривой динамики обогащения небелковых азотсодержащих соединений  $N^{15}$ , до первого часа инкубации процентное содержание  $N^{15}$  постепенно увеличивается, доходя до 8,5, а после первого часа инкубации в течение 1 часа постепенно понижается. Можно предположить, что понижение процентного содержания  $N^{15}$  в этих условиях происходит только вследствие разбавления его аминокислотами, образующимися за счет катаболизма белков клетки.

После второго часа инкубации, как показывает график, процентное содержание метки в небелковой азотсодержащей фракции вновь постепенно увеличивается и к концу восьмого часа достигает 12,6. По-видимому, после второго часа указанная возможность разбавления метки (вероятнее всего катаболизмом некоторых белковых фракций) постепенно ослабевает. Так или иначе, наблюдаемая динамика включения валина- $N^{15}$  во фракции небелковых азотсодержащих соединений свидетельствует о том, что в период восстановления питания голодавших по азоту дрожжей происходят глубокие сдвиги не только анаболического порядка.

Далее нами исследовалось процентное содержание  $N^{15}$  в отдельных аминокислотах гидролизата суммарного белка. Соответствующие данные приведены на рис. 2. Как и следовало ожидать, через 30 мин инкубации наибольший процент  $N^{15}$  обнаруживается в валине, несколько меньший – в фенилаланине и значительно меньший – в других аминокислотах. Через 480 мин инкубации содержание  $N^{15}$  в валине остается наибольшим, но заметно возрастает в ряде других аминокислот, особенно в лизине, фенилаланине и глутаминовой кислоте.

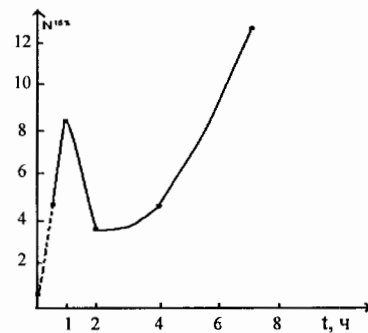


Рис.2. Динамика накопления  $N^{15}$  в свободном аминокислотном пуле дрожжей *C. guilliermondii* BKM Y-42 после восьмичасовой инкубации в присутствии валина- $N^{15}$

Таким образом, в разные периоды инкубации интенсивность включения отдельных аминокислот в биосинтез белков неодинакова. Это можно объяснить, вероятно, неравномерным анаболизмом различных белковых фракций в период восстановления азотного питания голодавших дрожжей. Данные табл. 2 и рис.1 показывают, что при восстановлении питания голодавших культур происходят глубокие сдвиги во фракционном составе белков, а именно наблюдается значительное увеличение количества водорастворимых белков и уменьшение щелочерастворимых. Таким образом, при восстановлении питания голодавших культур постепенно нормализуется процентное соотношение белковых фракций дрожжей, приближаясь к таковому для неголодавших культур.

Совокупность приведенных данных позволяет заключить, что при восстановлении азотного питания голодавших дрожжей в белковом обмене

Таблица 2. Фракционный состав белка голодавших по азоту дрожжей *C. Guilliermondii* ВКМ У-42 после восьмичасовой инкубации в присутствии валина- $N^{15}$

Фракции	От биомассы дрожжей, %	От общего количества белка, %
Водорастворимая	7,3±0,2	36,5±1,1
Солерастворимая	0,3±0,05	1,5±0,25
Спирторастворимая	0,05±0,01	0,25±0,05
Щелочерастворимая I		
Щелочерастворимая II	8,6±0,3	43±1,5
Нерастворимый остаток	3,4±0,2	17±1
Сумма	19,65±0,76	98,35±0,9

происходят процессы, обратные по характеру, наблюдаемым при голодании. Изменения при голодании в общих чертах выражаются в усилении катаболизма водорастворимых белков и анаболизма щелочерастворимых белков, а при восстановлении азотного питания, наоборот, в усилении катаболизма щелочерастворимых белков и анаболизма водорастворимых белков. Мы можем полагать, что указанные изменения относятся не ко всем белкам указанных фракций, а, скорее всего, к определенным индивидуальным белкам (подфракциям) этих фракций.

Придавая важное значение роли индуцируемых БТШ в формировании термоустойчивости, мы провели исследование синтеза БТШ у штамма термотолерантного мутанта *Candida rugosa* ВСБ-925.

Дрожжевые клетки *Candida rugosa* ВСБ-925 были инкубированы при 40°C. В течение интенсивной фазы роста (17-й час инкубации) дрожжи были выделены из культуральной среды и помещены в среду, содержащую валин- $N^{15}$  в качестве единственного источника азота. Инкубацию проводили в течение 3-х часов при относительно высокой температуре – 44 °С. Затем из культуральной среды были выделены клетки. Полученную дрожжевую биомассу замораживали (-15 °С) и пропускали через Френч-пресс, после чего выделяли водосолерастворимые белки и проводили фракционное разделение методом гель-фильтрации. Количество синтезированного белка определяли методом Лоури [Lowry О.Н., et al, 1951].

Данные таблицы 3 показывают, что с учетом степени включения тяжелого изотопа азота  $N^{15}$  в белковые фракции в условиях термошока количество синтезированных низкомолекулярных ( $M \leq 78$  кД) белков примерно в 2 раза больше высокомолекулярных. Степень включения  $N^{15}$  в белковые фракции показала также, что процентное содержание низкомолекулярных белков, синтезированных в дрожжах *Candida rugosa* ВСБ-925 при термошоке, примерно в 3 раза больше высокомолекулярных.

Табл. 3. Содержание  $N^{15}$  в различных препаратах дрожжей и культуральной среде

Препараты	Содержание $N^{15}$ , %
Целостные клетки	1,7±0,05
Высокомолекулярные белки	1,5±0,08
Низкомолекулярные белки	2,75±0,06
Среда до инкубации	17,0±0,01
Среда после инкубации	15,0±0,15

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях термошока в дрожжевых клетках, возможно, происходят глубокие биохимические сдвиги, которые выражаются в усилении биосинтеза определенных белков, так и в усилении катаболизма других, о чем свидетельствует процентное содержание  $N^{15}$  в белковых фракциях, а также в культуральной среде до и после инкубации. Наблюдаемое понижение процента метки в среде инкубации может произойти за счет разбавления метки за счет катаболизма определенных белковых и других высокомолекулярных азотсодержащих соединений.

При сравнительном исследовании мезофильного штамма дрожжей *C. maltosa* и его термотолерантного мутанта *C. rugosa*, выращенных в течение 48ч при 32°Cи 40°C соответственно, на электрофореграммах белков дрожжей *C. maltosa* и мутанта дрожжей меченных 35S-метионином, оказалось, что при теплошоке в течение 20 мин (рис. 3 и 4) индуцируются 2 подфракции, имеющие молекулярные массы 74 и 79 кД соответственно.

Вероятно, непосредственную защитную функцию выполняют только 2 группы БТШ, которые проявляются у термотолерантного мутанта при температуре 40°C и усиливается их синтез при температуре 44 °С, то есть при термошоке. Известно, что несмотря на то что у мутанта не выражены эти 6 групп БТШ характерных для дикого предшественника, он проявляет резистентность даже при температуре 40 °С.

Не исключена возможность, что специфические отличия, обнаруженные при сравнительном исследовании изучаемых дрожжевых штаммов в условиях повышенных температур, объясняются тем, что у термофильного вида мы имеем дело не только с индукцией синтеза полипептидов *de novo*, как у дикого предшественника, а с сохранением и усилением синтеза конститутивных белков с массой 74 и 79 кД, образующихся в норме при оптимальной температуре.

Наши исследования показали, что и при этаноловом стрессе (этанол 6 %) в течение 5 мин повышенной резистентностью характеризуется термотолерантный мутант, по сравнению с мезофильным штаммом. При этом у термотолерантного мутанта меченый метионин интенсивно включается в белки с молекулярными весами 74 и 79 кД.

Можно сделать вывод, что идентифицированные белки с молекулярными массами 74 и 79 кД выполняют не только функцию, связанную с обеспечением клетки термоустойчивостью, но и играют центральную роль в формировании клеточной резистентности вообще в отношении различных стрессорных факторов.

В наших предыдущих исследованиях показано, что при интенсивном облучении рентгеновскими лучами дрожжей повреждается ДНК и в репарационном периоде повреждение продолжается. При исследовании нами электрофоретических фракций белков дрожжей оказалось, что белковые фракции до и в течение облучения не претерпевают изменения, но при пострадиационном (репарационном) периоде усиливается биосинтез некоторых фракций и даже появляется ряд новых фракций, среди которых очевидно индуцируются белки фракций с молекулярным весом 70-72 кД. Очевидно, они являются белками теплового шока, вероятнее всего – hsp70. В настоящее время нами проводятся эксперименты по идентификации указанных белковых фракций и выяснения их соответствия известным шаперонам.

Известно, что многие белки, в том числе – аргиназа, в кислой среде (рН3 и ниже) распадается на субъединицы и при этом фермент инактивируется. То же самое происходит при связывания EDTA природного активатора аргиназы –  $Mn^{++}$ . Фермент можно реактивировать инкубированием при рН9,5 в присутствии  $Mn^{++}$  соответственно. В наших экспериментах указанными способами была инактивирована и реактивирована аргиназа печени лягушки *Rana ridibunda*. Молекуляр-

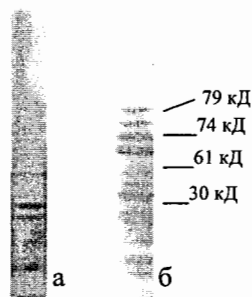


Рис. 3. а – Электрофореграмма белков дрожжей *S. maltosa* меченных  $^{35}S$ -метионином, при теплошоке в течение 20 мин; б – радиоавтография этой же электрофореграммы

Рис. 4. а – Электрофореграмма белков термотолерантного мутанта дрожжей, меченных  $^{35}S$ -метионином, при термошоке в течение 20 мин; б – радиоавтография этой же электрофореграммы

ная масса нативного фермента составляет 125000-130000 Д. Оказалось, что при кислотной инактивации аргиназы фермент распадается на четыре субъединицы с молекулярной массой 32 кД, а после реактивирования молекулярный вес фермента составляет 31 кД, т.е. является октамером, а нативный фермент – тетрамером. Соответственно, значение  $K_m$  для тетрамерной и октамерной аргиназ различны. Таким образом, при реактивации предварительно инактивированной аргиназы происходит образование нового олигомера. Было сделано предположение, что возможно неправильное сворачивание или сборка субъединиц в олигомерную структуру связано с недостаточным количеством шаперонов, главным образом, вследствие разбавления среды реактивирования.

При инактивировании фермента EDTA тетрамер распадается на димеры и мономеры с молекулярным весом 63 и 32 кД соответственно. При реактивации в условиях инкубации при рН 9,5 и в присутствии  $Mn^{++}$  восстанавливается тетрамерная структура за счет уменьшения количества мономеров и димеров. Однако реактивированный тетрамер не чувствителен к тиоловым ядрам. Таким образом, и при данной форме инактивации и реактивации происходит образование олигомерной структуры не идентичной нативному ферменту. Возможно, причиной этого явления является неправильный фолдинг белка из-за недостатка шаперонов.

Авторами показано, что додекамерная глутаминсинтетаза распадается на неактивные субъединицы под влиянием 6М гуанидингидрохлорида или 7М мочевины. Удаление денатурирующих факторов совершенно недостаточно для

реактивирования фермента, т.к. фолдинг и сборка протекают неправильно. При участии шаперонов (hsp-70, GroEL) и шаперонинов (hsp-60, hsp-10, GroES и др.) ренатурация (реактивация), т.е. фолдинг и сборка происходит очень продуктивно и быстро [Hartl F.U., 1999; Mosimoto et al, 1994; Фишер М.Т. 1998]. Свойствами шаперонов обладают и некоторые ферменты. К последним относятся две различные фольдазы (протеиндисульфидизомераза и пептидилпролилцистранизомераза) [Чу-чен, 1998].

Результаты наших предварительных экспериментов показывают, что добавка к среде ренатурации предварительно инактивированной двумя способами аргиназы, определенные белковые фракции экстракта печени лягушки, не обладающих аргиназной активностью, значительно повышает эффективность реактивирования с высоким выходом нативного тетрамера. Очевидно, в указанных фракциях содержатся белки термошока (шапероны, шаперонины и др.) направляющие процесс фолдинга по правильному направлению. В настоящее время ведутся исследования по идентификации этих белков.

### Литература

1. Bensaude O., Morange M. Spontaneous High Expression of Heat-shock Proteins in Mouse Embryonal Carcinoma Cells and Ectoderm from 8 Mouse Embryo.//EMBO J., 1983, v.2, p.173-177.
2. Barnett Th., Altschuler M., McDaniel C.N., Mascarenhas J.P. Heat Shock Induced Proteins in Plant Cells.//Dev.Genet., N.Y., 1980, v.1, p.331-340.
3. Ellis R.J., Nature, 1987, v. 328, p. 378-379.
4. Hartl F.U., Nature, 1999, v. 381, p. 571-580.
5. Pfeiffer P., Pfeiffer P., Gottlich N., Reichenberger S., et.al. // Mutat. Res., 1996, v.366, p.69-86.
6. Tёoule R. Tёoule R.// Int. J. Radiat. Biol., 1987, v.51, p.573-589.
7. von Sonntag C. von Sonntag C. The Chemical Basis of Radiation Biology. L.: Horwood, 1987, 378p.;
8. Fielden E., Fielden E.M., O'Neill P. // The Early Effects of Radiation on DNA. B.:Springer, 1991, 230p.
9. Watson K. Watson K., Cavicchioli R. Acquisition of Ethanol Tolerance in Yeast Cells by Heat Shock. // Biotechn.Letters, 1983, v.5, p.583-688.
10. Zeuthen M., Zeuthen M.L., Dabcowa N., Ahiebo C.M., Howard P.H. Resistance to Ethanol and Induction Heat Shock Proteins by Ethanol in *Candida albicans*. // J. Gen. Microbiol., 1988, v.135, N5, p.1375-1384.
11. Sachs M. Sachs M.M., Freelin M., Okimoto R. The Anaerobic Priteins of Maize. // Cell, 1980, v.20, N3, p.761-767.
12. Keyse S., Tyrell R.M. Both Near UV Radiation and Oxidizing Agent Hydrogen Peroxide Induce a 32kD HSP in Normal Human Skin Fibroblasts. // J. Biol. Chem., 1987, v.262, N30, p.14821-14825.
13. Lindquist S. The Heat Shock response. // Ann. Rev Biochem., 1986, v.55, p.1151-1191.
14. Levinger L., Varshavsky A., Heat Shock Proteins of *Drosophila* are Associated with Nuclease-resistant, High-salt-resistant Nuclear Structures. //J. Cell Biol., 1981, v.90, N3, p.793-796.

15. Munro, Pelham H. An HSP 70-like Protein in the ER: Identity with the 78kD Glukose-Regulated Protein and Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein. // Cell, 1986, v.46, p.291-300.Lai B.-T.,et.al.,1984
16. Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. // J. Biol. Chem, 1951, v.193, p. 265-278.
17. Mosimoto R.I., Tissieres A., Goorgopulos C. Progress and respectivities on the biology of heat shock proteins and molecular chaperons. // The biology of heat shock proteins and molecular chaperons, NY, Colg Spring Harbor, 1994, p. 408.
18. Чу-чен Уонг Биохимия, т.63, вып.4, стр.483-490,1998
19. Фишер М.Т. Биохимия, т.63, вып.4, стр.453-470, 1998

## БИОХИМИКО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КРОВИ У ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ В МАЛЫХ ДОЗАХ

Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б.

*Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, г. Москва, Россия,  
galiv03@rambler.ru*

Было изучено влияние слабых радиационных воздействий на состояние биохимико-цитогенетических показателей в периферической крови у популяции людей в отдаленные сроки после Чернобыльской катастрофы. Обнаружено, что в диапазоне низких дозовых нагрузок (от 0,1 до 20 сЗв) повышена выраженность генетических повреждений в лимфоцитах крови. В этом же интервале доз наблюдается увеличение как водорастворимых, так и липидзависимых антиоксидантов (АО) в плазме крови. С ростом индивидуальных поглощенных доз (от 20 сЗв до 150 сЗв) исследуемые системы отвечают по разному: уровень АО снижается, а частота aberrаций хроматидного типа в лимфоцитах периферической крови увеличивается, но не столь значительно по сравнению с действием низких доз.

Присутствие радиационной активности в среде обитания человека вызывает особую озабоченность, так как отмечают усиление мутационных процессов в различных клетках и тканях и стимуляцию канцерогенеза в ответ на действие низких доз радиации. Мутагенез сопровождается нестабильностью хромосомного аппарата клеток различных тканей и дестабилизацией генома. Причем эффекты низкоинтенсивного облучения в области малых доз могут быть выше, чем эффекты больших доз радиации [Crompton, 1998; Cuttler, Pollycove, 2003; Hooker, 2004].

Для оценки действия облучения в малых дозах пытаются разработать различные биохимические и биофизические критерии, в частности, большое внимание уделяется изучению антиоксидантного статуса организма. Уровень антиокислительной активности (АОА) клеток критических органов имеет большое значение в исходе лучевого поражения. Наиболее устойчивое состояние метаболизма к действию ионизирующей радиации в среднетельных дозах облучения характеризуется как высокой величиной АОА липидов, так и высоким уровнем сульфгидрильных групп [Бурлакова и др., 1983].

Среди водорастворимых антиоксидантов глутатион(GSH) занимает особое место. Наряду с витаминами С, А и Е глутатион подавляет окислительные процессы в клетке и препятствует перекисному окислению липидов. Относительно большой вклад глутатиона связывают с функцией регенерации, по крайней мере, двух витаминов:  $\alpha$ -ТФ и аскорбиновой кислоты. Кроме того, он усиливает их действие [Winkler *et al.*, 1994].

Целью нашей работы было оценить эффект дозовых нагрузок и определить возможные связи между биохимико-цитогенетическими показателями у популяции людей, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному облучению после Чернобыльской катастрофы.

### Материалы и методы

В обследованную группу входили участники ликвидации аварии, работавшие в первые дни после аварии (Л1) и в последующие годы (Л2), получившие

суммарные дозовые нагрузки в диапазоне от 0,1 сЗв до 150 сЗв, и дети, проживающие на загрязненных радионуклидами территориях (гг. Мценск, Болхов и Чечерск). Суммарные дозовые нагрузки у детей на порядок ниже (0,01-7 сЗв), чем у взрослых лиц, поэтому исследуемые параметры коррелировали с дозовыми нагрузками, полученными для их матерей, дозовые нагрузки для которых составляли от 0,1 до 70 сЗв. Показано, что в системе мать – плод концентрация радиоцезия в плаценте и в плоде соответствует его концентрации в материнском организме. Кроме того основной путь поступления  $^{137}\text{Cs}$  к грудному ребенку лежит через молоко матери [Бандажевский, 2001]. Группой сравнения были жители “чистых” районов.

Анализировали плазму капиллярной крови (взятую натошак) или пуповинную кровь новорожденных. В 100 мкл плазмы спектрофлуориметрически определяли содержание глутатиона при 350/420 нм методом McNeill. *et al.*, 1968 в нашей модификации. Токоферол и ретинол определяли при 295/325 нм и 339/470 нм соответственно [Storer, 1974]. Все результаты выражали в мкМ.

### Результаты и обсуждение

Полученные нами экспериментальные результаты показали, что содержание глутатиона не зависит от возраста и не закреплено как генетический признак [Иваненко, Буракова, 2004]. Наше заключение согласуется с литературными данными [Pastore A *et al.*, 1998]. В тоже время мы обратили внимание на увеличение вариабельности исследуемых параметров у индивидов. Изменчивость признака может говорить как об индивидуальной радиочувствительности людей, так и о радиобиологических особенностях низкоинтенсивного излучения, которому подверглись жители загрязненных радионуклидами районов.

Анализ окислительно-восстановительной системы глутатиона (рис.1а, б), витамина Е (рис. 1в) в плазме у детей (индивидуальные данные), проживающих на разных по загрязненности радионуклидами территориях, ликвидаторов (Л1, Л2) аварии на ЧАЭС через 4-5-6-7 лет после катастрофы выявил сложный характер зависимости исследуемых параметров от дозы радиации. На рис.1 представлены зависимости доза-эффект для исследуемых параметров. Из рисунка видно, что в диапазоне низких дозовых нагрузок (0,1 сЗв - 25 сЗв) наблюдается увеличение содержания не только восстановленного глутатиона, но и жирорастворимых АО (данные приведены только для витамина Е) в плазме у детей, проживающих на разных по загрязненности радионуклидами территориях, и ликвидаторов (Л1, Л2). Повышение окислительно-восстановительного потенциала обусловлено, в основном, увеличением восстановленных форм глутатиона [Иваненко, Буракова, 2005]. С ростом суммарных дозовых нагрузок (30-150 сЗв) содержание GSH снижается до критических значений, а уровень GSSG в плазме повышается. Таким образом, система АО в плазме у популяции людей по-разному отвечает на воздействие хронического низкодозового ионизирующего излучения в низких и больших дозах.

В качестве показателя скорости мутагенеза в соматических клетках у детей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, мы использовали частоту индекса разрывов хроматид (ИРХ) [Иваненко и др., 2004]. Для ликвидаторов-2 (данные цитогенетического анализа предоставлены Г.П. Снигиревой) также был рассчитан этот показатель (ИРХ). Мы обнаружили (рис.1г), что

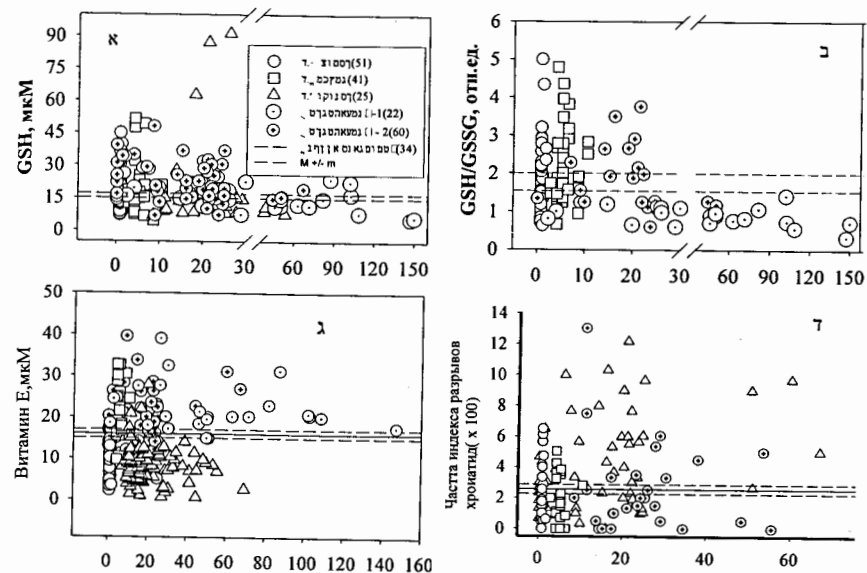


Рис.1. Ответ системы глутатиона (а, б), витамина Е (в) в плазме и частоты индекса разрывов хроматид в лимфоцитах (г) у детей и ликвидаторов (Л1, Л2), подвергшихся воздействию радиации низкой интенсивности. По оси абсцисс: Доза, сЗв

не только у детей, но и у Л2 частот индекса разрывов хроматид в диапазоне низких доз значительно превышает (более чем в 2 раза) частоту хроматидных aberrаций у людей, получивших высокие дозы.

Таким образом, при низкоинтенсивном облучении популяции людей, наблюдаемые цито-биохимические изменения при воздействии низких доз (0,1 сЗв - 30 сЗв) существенно отличаются от нарушений, вызванных высокими дозами (30-70 сЗв): эффект низких доз у некоторых индивидов превышает эффект высоких.

Повышение уровня хроматидных нарушений у ликвидаторов 2, как полагают авторы [Шевченко, Снигирева, 2006] может быть обусловлено химическим загрязнением окружающей среды. Нельзя исключить также и влияния на генетический аппарат клеток постоянного, в течение длительного времени воздействия излучения низкой интенсивности за счет радионуклидов, поступающих в организм человека из окружающей среды с продуктами питания.

При сопоставлении биохимических и цитогенетических показателей между собой, мы обнаружили, что при низких дозах (до 20 сЗв) между уровнем GSH (рис. 2б) или содержанием, например, витамина А (рис. 2а) в плазме и частотой ИРХ в лимфоцитах периферической крови наблюдается положительная корреляционная зависимость. С увеличением дозы (20 сЗв - 70 сЗв) характер зависимости меняется: увеличивается частота хроматидных aberrаций в лимфоцитах и снижается содержание жир- и водорастворимых АО в плазме у популяции людей. На рис. 2 стрелками показано направление этих зависимостей.

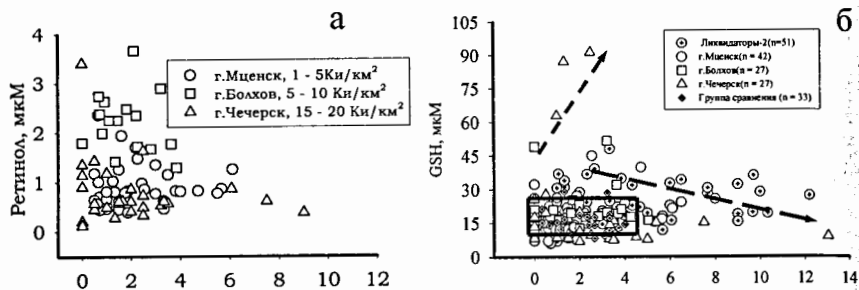


Рис. 2. Зависимость между частотой хроматидных нарушений в лимфоцитах (а, б) и содержанием ретинола (а) или GSH(б) в плазме у детей и ЛЭ. По оси абсцисс: Частота индекса разрывов хроматид (x 100)

Индивиды, входящие в эти две группы, возможно, составляют группу риска. Лица, у которых исследуемые параметры находятся в пределах: для ретинола до 1,5 мкМ, GSH до 15 мкМ, а для частоты ИРХ до 3,5 единиц (область обозначена прямоугольником), по-видимому, будут составлять группу "контроля." Качественно разный ответ исследуемых систем на действие низких и высоких доз ионизирующей радиации может быть объективным показателем радиационно-индуцированных нарушений и может служить основой для формирования отдаленных патологических состояний у популяции людей.

#### Литература

1. Crompton Nigel .E.A. // Acta Oncolog. 1998. V. 37. N. 2. P.129-142.
2. Cuttler J.M., Pollycove M. // J. of Amer. Physicians and Surgeons 2003. V. 8. N. 4. P. 108-111.
3. Hooker A.M., Bhat M., Day T.K. et al. // Radiat. Res. 2004. V. 162. P. 447-452.
4. Бурлакова Е.Б., Иваненко Г.Ф., Шишкина Л.Н. // Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. М.: Наука. 1983. С. 21-29
5. Winkler B.S., Orselli S.M., Rex N.S // Free Rad . Biol. Med.1994. V. 17. P. 333-349.
6. Бандажеский Ю.И. Радиоцезий и внутриутробное развитие зародыша Минск «Белград» 2001. 54 с.
7. Ellman G.L, Lysko H. // J. Lab. Clin. Med. 1967. V. 70. P. 518-527.
8. Mc Nell T.L. and Beck L.Y. // Anal. Biochem. 1968. V. 22. P. 431-441.
9. Storer G.B. // Biochem. Med.1974. Т. II. P. 71-80.
10. Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б // Известия РАН. Сер.Биол. 2004. № 6. С. 682-688.
11. Pastore A., Massoud R., Motti C. et al. // Clin. Chem. 1998. V. 44. P. 825-832.
12. Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б // Известия РАН. Сер. Биол. 2005. № 1 С. 9-17.
13. Иваненко Г.Ф., Сусков И.И., Бурлакова Е.Б // Известия РАН. Сер. Биол. 2004. № 4. С. 410-415.
14. Шевченко В.А., Снигирева Г.П. // Радиационная биология. Радиозэкология 2006. Т. 46. №2 С.133-139.

## ИЗУЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С ВЫСОКОЙ ЛПЭ

Зайцева Е.М.<sup>1</sup>, Деперас – Каминьска М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>2</sup>Святокишинская академия, Кельце, Польша

Известно, что междонорные отличия могут быть причиной ошибки в биодозиметрии при определении полученной дозы, а также то, что при проведении космических полетов или лучевой терапии возрастает вероятность облучения человека именно излучениями с высокими ЛПЭ. Это подтверждает актуальность исследований индивидуальной радиочувствительности человека, в которых лимфоциты периферической крови человека *in vitro* подвергаются облучению пучками тяжелых ионов.

В коллаборации с польскими исследователями была проведена серия экспериментов по изучению индивидуальных отклонений распределения повреждений ДНК в хромосомах, результаты которых показали, что ошибка может быть минимизирована, если оценивать повреждения в хромосоме 2, так как отклонения показателей повреждений между донорами (9 доноров) хромосомы-2 наименее вариабельны. Кроме того, выявлено, что отношение между центрическими кольцами и дицентриками в хромосоме-2 может являться реперной точкой для оценки дозы облучения при облучении высокими ЛПЭ.

Настоящий эксперимент был проведен в продолжение данного направления исследований, цели эксперимента:

1. Изучение индивидуальной радиочувствительности человека на модели лимфоцитов периферической крови человека при воздействии тяжелых ионов.

2. Исследование применимости РСС - анализа для определения поглощенной дозы при облучении тяжелыми ионами.

3. Оценка количества aberrаций в лимфоцитах крови человека при фиксации в разные сроки, будет ли оно возрастать при увеличении времени культивирования в связи с задержкой прохождения клеточного цикла при облучении ионами <sup>20</sup>Ne.

#### Материалы и методы

Лимфоциты периферической крови трех доноров облучены на циклотроне U400М Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований ионами <sup>20</sup>Ne с энергией 52 МэВ/нуклон и ЛПЭ 170 кэВ/мкм, с дозой 1 Гр.

Клетки фиксировали через 50, 60, и 70 час. культивирования (International Atomic Energy Agency, IAEA, 2001), препараты окрашивались согласно стандартной FPG методике (Perry & Wolff 1974), для определения частоты дицентриков и колец центрических анализировались только первые послелучевые метафазы.

Частоту РСС-фрагментов определяли в клетках, находящихся в G<sub>2</sub> фазе митоза, используя метод преждевременной конденсации хромосом (Durante et al 1998).

## Результаты и обсуждение

На Рис.1а можно видеть, что суммарное количество дицентриков и центрических колец у трех доноров различается. У доноров 1 и 2 при фиксации через 50 и 60 часов уровень aberrаций не отличается, а после 70 часов снижается. Донор 3 оказался наиболее радиочувствительным, наибольшее количество aberrаций наблюдается при фиксации через 50 часов, а затем, с увеличением времени культивирования оно падает.

Причем по количеству дицентриков и центрических колец наиболее радиочувствительным оказался донор 3, тогда как по уровню PCC фрагментов наиболее чувствительным является донор 1.

Анализ количества PCC фрагментов у трех доноров показал, что их уровень у доноров 2 и 3 практически не различается, у донора 1 он выше (рис. 1б).

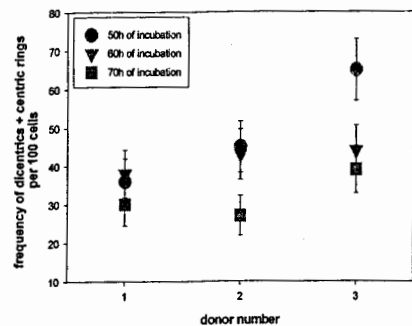


Рис.1 А) Уровень дицентриков и колец центрических в хромосомах лимфоцитов трех доноров

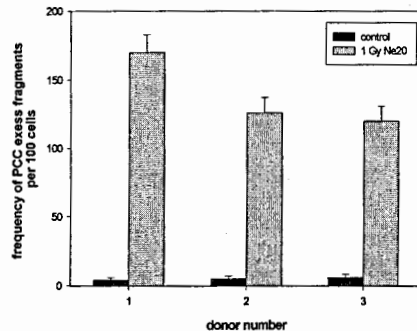


Рис.1 Б) Уровень PCC фрагментов в клетках трех доноров

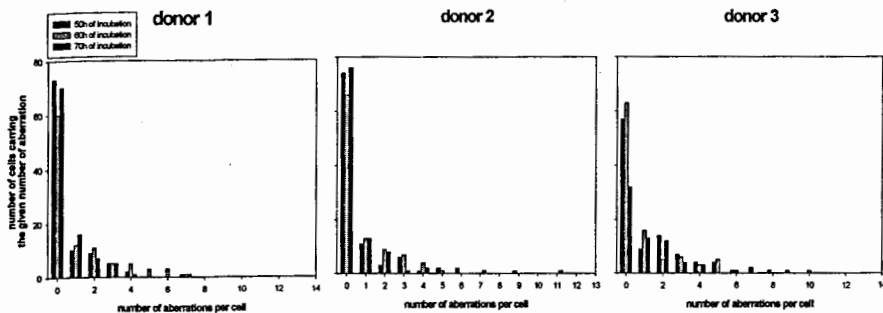


Рис.2 Распределение суммарного количества дицентриков и колец центрических в лимфоцитах трех доноров после облучения ионами  $^{20}\text{Ne}$  с дозой 1Гр и ЛПЭ 170 кэВ/мкм

При этом у доноров 1 и 2 количество клеток с более чем одной aberrацией выше при фиксации в более поздние сроки, у донора 3 этого эффекта не наблюдается (рис. 2).

## Заключение

Полученные нами результаты говорят о том, что:

1. Метод преждевременной конденсации хромосом может быть использован при определении поглощенной дозы после воздействия ионизирующего излучения с высокой линейной передачей энергии.

2. Радиочувствительность лимфоцитов периферической крови человека при воздействии излучения с высокой ЛПЭ индивидуально варьируема.

3. При облучении ионами  $^{20}\text{Ne}$  в клетках фиксированных в более поздние сроки увеличения количества aberrаций мы не наблюдали, но исследования будут продолжены.

В дальнейшем предполагается проведение анализ aberrаций хромосом и их радиочувствительности после облучения ионами  $^{20}\text{Ne}$  (с дозой 1 Гр, ЛПЭ 170 КэВ/мкм) с использованием FISH-метода.

Также планируется проведение экспериментов по облучению лимфоцитов крови человека различными видами тяжелых ионов.

## Литература

1. IAEA. 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Tech Rept. 405. Vienna: International Atomic Energy Agency.
2. Perry P, Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature (London) 258:121 – 125.
3. Durante M, Furusawa Y, Gotoh E: A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. Int J Radiat Biol 74: 325-331 (1998)



## ВЛИЯНИЕ ЭМИ КВЧ НА РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПРОЦЕСС И ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМСТВА МЫШЕЙ ЛИНИЙ C57/B16 И Balb

Исаева Н.Р., Куротченко Л.В., Терешкина О.В., Субботина Т.И., Яшин А.А.  
Тульский государственный университет, mbd2@rambler.ru

Исследовалось влияние фактора воздействия ЭМИ КВЧ на репродуктивную функцию мышей. Для оценки плодовитости самцов и самок использовали параметры отражающие данный процесс: скрещиваемость, численность потомства, изменение эстрального цикла. Изменение эстрального цикла учитывали по срокам наступления беременности и срокам получения потомства. Для выявления особенностей постэмбрионального развития потомства использовали такие критерии, как: вес новорожденных мышат, сроки покрытия шерстью, показатель летальности, на основе увеличения случаев мертворождения в помете и увеличения гибели новорожденных «в гнезде» (до трехнедельного возраста), то есть окончания периода вскармливания.

Воздействию ЭМИ КВЧ в течение одного месяца подвергалось только родительское (Р) поколение мышей. Родительское поколение было представлено двумя парными семьями, которые включали одного самца и одну самку, для каждой линии. Использовались черные мыши линии C57/B16 и белые мыши линии Balb. Во всех сформированных семьях родительского поколения было получено по четыре помета. Анализ данных по общему количеству потомства, полученного в четырех пометах, для каждого из десяти поколений позволил выявить ряд особенностей, отражающих влияние воздействия ЭМИ КВЧ как на родительское, так и на последующие поколения.

На втором этапе эксперимента из мышат первых пометов экспериментальной и контрольной групп были сформированы по две семьи первого (F1) поколения, от каждого из которых было получено по четыре помета. Семья четвертого поколения (F4) дала только два помета по 1 детенышу в каждом. Так как обе особи пятого поколения оказались самцами, формирование семьи пятого (F5) поколения оказалось невозможным.

В повторном этапе эксперимента, несмотря на снижение числа самих пометов, уменьшение количества особей в пометах начиная с третьего (F3) поколения в семьях мышей линии C57/B16 полученное соотношение полов оказалось достаточным для формирования новых семей. По истечении 18 месяцев от начала эксперимента, начиная с седьмого поколения (F7) в семьях линии C57/B16 наблюдалось увеличение количества особей в пометах. Экспериментальные мыши линии C57/B16 с шестого (F6) по десятое (F10) поколение включительно на протяжении 15 месяцев приносили количество детенышей соответствующее норме для данной линии, подтвержденной результатами в контрольных группах, что свидетельствует о восстановлении репродуктивной функции мышей, задействованной в повторной серии эксперимента.

Исследование динамики изменения количества особей в пометах экспериментальной и контрольной групп мышей линии Balb позволило установить, что в экспериментальной группе наблюдалось уменьшение количества детенышей с первого по пятое поколение. Наиболее низкие показатели численности потомства зафиксированы в первом, третьем и пятом поколениях. Среднее

количество в помете для поколения F1 составило 5 для поколения F3 5 и для поколения F5 4 особи. Начиная с поколения F7, среднее количество особей возрастает с 7 до 8 в поколении F10. При этом, начиная с поколения F6, динамика изменения среднего количества особей фактически совпадает с таковой в контрольной группе, что свидетельствует о восстановлении репродуктивной функции.

График динамики изменения количества особей в экспериментальной и контрольной группах линии C57/B16 представлен на рисунке 1.



Рис. 1. Динамика численности новорожденных экспериментальной и контрольной групп мышей линии C57/B16 в ряду поколений

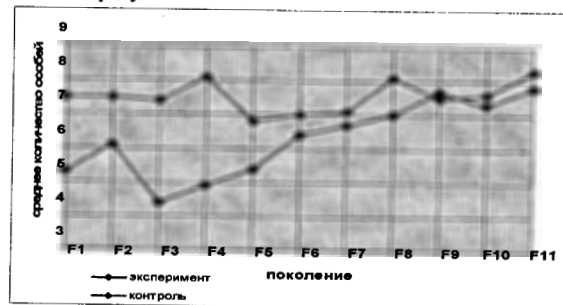


Рис. 2. Динамика численности новорожденных экспериментальной и контрольной групп мышей линии Balb в ряду поколений

График динамики изменения количества особей в экспериментальной и контрольной группах линии Balb представлен на рисунке 2.

В ходе анализа динамики изменения количества особей, очевидно, что мыши линии C57/B16 в экспериментальных группах приносили меньшее количество детенышей в пометах с первого по пятое поколение в сравнении с контрольной группой. Изучение веса новорожденных мышат послужило критерием для оценки внутриутробного развития эмбрионов в экспериментальных и контрольных группах. Взвешивание новорожденных мышат осуществлялось параллельно с подсчетом особей в пометах. Учитывался тот факт, что вес новорожденного мышонка зависит и от количества особей в помете. Динамика изменения средних показателей веса мышат линии C57/B16 в экспериментальной и контрольной группах показана на рисунке 3.

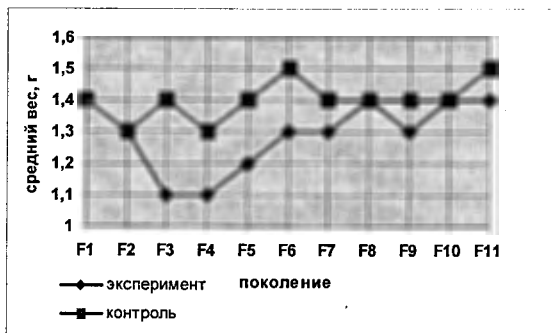


Рис. 3. Динамика веса новорожденных мышат линии C57/Bl6 в экспериментальной и контрольной группах

Анализ динамики изменения средних показателей веса мышат в экспериментальной и контрольной группах линии Balb подтверждает снижение веса в поколениях F4, F5 и F6 экспериментальной группы. Начиная с поколения F6, показатели веса в экспериментальной группе приближаются к показателям контрольной группы и, с поколения F7, стабилизируются на уровне нормальных физиологических значений для линии Balb. В контрольной группе животных линии Balb во всех поколениях, показатели веса оставались стабильными и не выходили за параметры нормы.

Динамика изменения веса мышей линии Balb в экспериментальной и контрольной группах показана на рисунке 4.

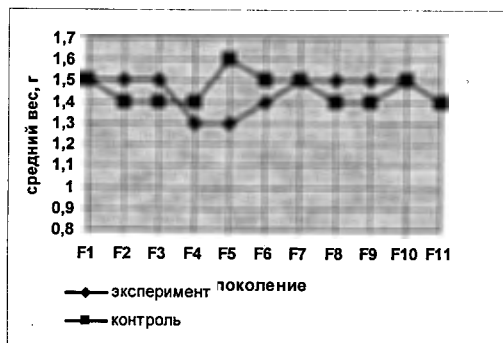


Рис. 4. Динамика веса новорожденных мышат линии Balb в экспериментальной и контрольной группах

Дальнейшее изучение влияния ЭМИ КВЧ на постэмбриональное развитие потомства основывалось на этапе эксперимента, в течение которого регистрировались сроки покрытия мышат шерстью. Для выявления изменений в данном критерии была задействована линия мышей C57/Bl6. Особенностью проведенного эксперимента является то, что семьи мышей до воздействия ЭМИ КВЧ в пометах приносили нормально опушенных особей, то есть начинающих покрываться

шерстью с 4 – 6 дня жизни и полностью опушенных к 2 – 3 месяцам жизни. Сроки полного покрытия шерстью в экспериментальной группе значительно превышали таковые в контрольной группе и составили от 3 до 5 месяцев. С поколения F7 по F11 количество неопушенных мышат снизилось до 35 % - 26 %, что совпадало с показателями исходного фона и данными, полученными в контрольной группе. Одновременно с нарушением сроков покрытия шерстью среди потомства экспериментальной группы зарегистрировано уменьшение количества особей в пометах до 15 – 16, что так же свидетельствует о наиболее негативном воздействии ЭМИ КВЧ на F3 – F5 поколения. В поколениях F7 – F11 сроки формирования шерстного покрова соответствовали показателям нормы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что вследствие воздействия ЭМИ КВЧ формируются патологические отклонения в постэмбриональном развитии потомства, которые в частности проявляются в изменении сроков формирования шерстного покрова и наиболее выражены со второго (F2) по пятое (F5) – шестое (F6) поколения.

Показатель летальности в экспериментальной группе животных является одним из наиболее важных для оценки жизнеспособности особей в поколениях, полученных от родителей, подвергшихся воздействию ЭМИ КВЧ. В каждой группе летальность определялась путем подсчета умерших мышат в возрасте от рождения до трехнедельного возраста, то есть до окончания периода вскармливания. В ходе исследования было установлено, что в экспериментальной группе гибель новорожденных мышат наблюдалась с первого (F1) поколения по F11. Соотношение летальности в экспериментальной и контрольной группах приведены на рисунке 5.

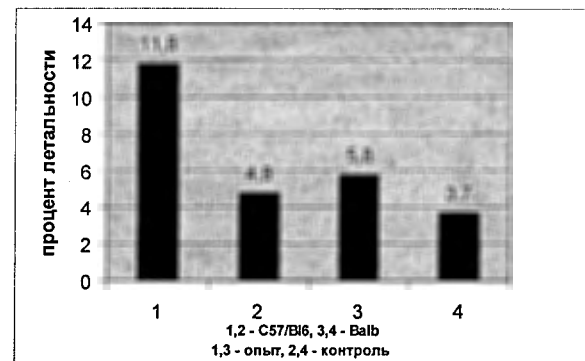


Рис. 5. Общий показатель летальности у мышей линий C57/Bl6, Balb

Изучение частоты гибели мышат в зависимости от поколений показало, что в экспериментальной группе пик летальности приходится на поколения F3, F4 и F5. Результаты, полученные в экспериментальной группе мышей линии Balb, согласуются с аналогичными показателями в группе мышей линии C57/Bl6, в которой наибольшее количество погибших мышат до 3х недельного возраста пришлось на поколения F3 – F5 и составило 17 из 46, то есть 37 % от особей рожденных в этих поколениях.

Анализ результатов летальности в экспериментальной группе мышей линии Balb по соотношению погибших особей во всех поколениях подтверждает, что пик гибели приходится на поколения F3 – F5. Из 64 погибших в поколениях F1 – F11, 35 особей приходится на поколения F3 – F5 и составляет 55 % от общего количества погибших во всех поколениях. В контрольной группе мышей линии Balb так же была зарегистрирована летальность на протяжении всех 11 полученных поколений, из 663 рожденных детенышей погибло 24, что составило 3,7 % от общего числа новорожденных.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что патологические эффекты вследствие воздействия ЭМИ КВЧ начинают формироваться с поколения F1 и бывают наиболее выражены с третьего (F3) по пятое (F5) поколения. Таким образом, результаты анализа в экспериментальной группе мышей свидетельствуют о более высокой летальности по сравнению с контрольной группой. Особое внимание заслуживает тот факт, что максимум летальных исходов пришлось на поколения F3, F4 и F5, для которых одновременно характерны такие отклонения, как достоверное снижение рождаемости, веса новорожденных мышат и отставание в постэмбриональном периоде развития. Отсутствие аналогичных изменений в контрольной группе подтверждает, что воздействие ЭМИ КВЧ на родительское поколение является фактором, оказывающим негативное воздействие на репродуктивную функцию не только в родительском поколении, но и в последующих, не имевших контакта с данным физическим фактором. При этом наиболее уязвимыми являются третье, четвертое и пятое поколения животных, появившихся в сроки от 9 до 15 месяцев после воздействия ЭМИ КВЧ на родительское поколение (Р).

#### Литература

1. Биофизика полей и излучений и биоинформатика. Ч. 1. Физико-биологические основы информационных процессов в живом веществе. / Нефедов Е.И., Протопопов А.А., Хадарцев А.А., Яшин А.А.; под. ред. А.А. Яшина. – Тула: изд-во Тул. гос. ун-та, 1998, С. 124. – 333 с.
2. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А.. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте. – Гос.мед.изд. УССР, Киев. – 1962, 347 с.
3. Родштат И.В. Биоритмологические аспекты КВЧ-воздействия низкой интенсивности // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2002. - № 2(26). – С. 52-56.
4. Терешкина О.В. Влияние ЭМИ КВЧ на репродуктивную функцию у млекопитающих. Роль социальных медико-биологических и гигиенических факторов в формировании здоровья населения. Сб. ст. Пенза, сентябрь 2005. Изд. Приволжский Дом знаний., с. 108-111.

## УЧАСТИЕ КОМПЛЕКСОВ CDC28, SAGA И RENT В РЕГУЛЯЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Колтова Н.А.

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия

Радиорезистентность организмов определяется генетическим статусом клеток. Многолетние исследования позволили выделить большое количество генов, продукты которых осуществляют репарацию различных повреждений ДНК (Game, 2000). До настоящего времени выделяют все новые и новые гены радиочувствительности, играющие роль в различных аспектах репарации (Bennett et al., 2001; Birrell et al., 2001). Долгие годы оставалась загадкой проблема репарации ДНК, компактизованной в клетке в нуклео-протеиновые комплексы. Для эффективного прохождения репарационных процессов структура хроматина должна изменяться. В последние годы начали появляться данные, указывающие на важность процессов модификации гистоновых белков, в результате чего ДНК становится доступной для репарации (Meuer, 2001).

Совместно с ИМГ РАН нами были получены у дрожжей новые ядерные мутации радиочувствительности *srn* (Koltovaya et al., 1998; 2003). Три из них удалось локализовать (Devin et al., 1990; Koltovaya et al., 2003), а именно в генах, кодирующих протеинкиназу CDC28, субъединицу Ada1 транскрипционного фактора SAGA, обладающего гистон-ацетилтрансферазной (HAT-*histone acetyltransferase*) активностью, и компонент Net1 комплекса RENT, регулирующего локализацию фосфатазы Cdc14 и гистон-деацетилтрансферазы (HDAC-*histone deacetyltransferase*) Sir2 (Devin et al., 1990; Koltovaya et al., 2003). Нарушение Ada1 приводит к снижению локусного мутагенеза на порядок, а мутация *cdc28-srn* к увеличению уровня спонтанной и снижению индуцированной геной конверсии. Показано участие генов в G0/G1- (*CDC28*, *NET1*), G1/S- (*NET1*, *ADA1*), S- (*NET1*, *ADA1*), G2- (*CDC28*) checkpoint-контроле. Представляется вероятным, что эти гены играют роль в репарации различных повреждений ДНК и их действие опосредуется частично через модификацию белков репарации и нуклеосомной структуры хромосом, играющей важную роль в ответе клетки на повреждения ДНК, включая доставку checkpoint- и репарационных факторов к месту повреждения ДНК и их активацию.

**Регуляция выбора пути репарации.** Механизм репарации двуниевых разрывов (ДНР) ДНК посвящены многочисленные обзоры (Глазер, Глазунов, 1999; Королев, 2007). С концами ДНР связываются белковые комплексы Ku и MRX (*MRE11/RAD50/XRS2*), удерживающие и процессирующие концы ДНР. Комплекс белков Ku обеспечивает инициацию незаконной рекомбинации (NHEJ), комплекс MRX принимает участие в инициации обеих ветвей рекомбинационной репарации (HR и NHEJ).

Репарация ДНР по механизму гомологичной рекомбинации (HR) может происходить при наличии в клетке двух и более гомологичных хромосом или хроматид. Этот процесс идет в поздней S и в G2 фазах гаплоидных клеток и в диплоидных клетках. В поздней S-фазе и в фазе G2 гаплоидной клетки HR между сестринскими хроматидами является преимущественной (Gonzalez-Barrera et al.,

2003). Способность к репарации путем HR определяется не только наличием гомолога, но активностью циклин-зависимой фосфокиназы CDC28 (Ira et al., 2004; Aylon, Kupiec, 2005). Киназа CDC28 обеспечивает выбор пути репарации (HR или NHEJ) в фазах G1 и G2. Киназная активность CDC28 необходима для протяженной деградации концов ДНР комплексом MRX (Ira et al., 2004). В фазе G1 отсутствует гомологичная матрица и на фоне низкой активности протеинкиназы CDC28 комплекс MRX связывается с ДНР ДНК, но высокая стабильность концов ДНР ДНК стимулирует NHEJ. В фазе G2 на фоне высокой активности киназы CDC28 и эффективной деградации концов ДНР ДНК могут репарироваться HR-путем. 5'-3'-деградация почти полностью зависит от комплекса MRX в фазе G2 и лишь частично в фазе G1 (Deide, Gottschling, 2001). В процессе NHEJ деградация ДНР ДНК осуществляется нуклеазами Mre11 и Exo1. Киназная активность CDC28 необходима и для активации checkpoint ДНР ДНК (Ira et al., 2004). Ингибирование киназной активности CDC28 не влияет на активацию checkpoint-контроля в фазе S при обработке HU, в результате которой возникают участки одонитевой ДНК (онДНК) в застрявших репликативных вилках. Эти данные согласуются с нашими данными о влиянии мутации *cdc28-srm* на радиочувствительность, гомологичную рекомбинацию, G1-, G2 -checkpoint и об отсутствии влияния на HU-чувствительность (Колтовая, Кадышевская, 1997; Koltovaya et al., 1998).

Предполагается, что киназа CDC28 в фазе G2 регулирует статус фосфорилирования комплекса MRX и других факторов, участвующих в процессировании ДНР ДНК. Действительно, некоторые белки, участвующие в рекомбинации ДНК, являются субстратами CDK, включая Xrs2p и Srs2p (Ubersax et al., 2003; Liberi et al., 2000). Показано функциональное взаимодействие между киназой CDC28/CLB2 и комплексом MRX в процессе митотического цикла, рекомбинации и репарации (Grandin, Charbonneau, 2003; Aylon, Kupiec, 2005). В необлученных клетках белок Mre11 вместе с геликазами Srs2 и Sgs1 входит в состав большого комплекса, при облучении происходит индуцибельное CDC28-зависимое фосфорилирование Srs2p и Mec1p-зависимое образование отдельных комплексов Sgs1p-Mre11p и Srs2p-Mre11p (Chiolo et al., 2005). Фосфорилирование Srs2p необходимо для checkpoint, у мутанта *srs2* не происходит активации киназы Rad53 и замедления репликации в ответ на intra S-повреждения ДНК (Liberi et al., 2000).

Как показал анализ рекомбинационного восстановления клеток с нарушенной теломеразой киназа CDC28/CLB2 контролирует два пути гомологичной рекомбинации Rad50p/Rad59p (Rad52p, Rad50p, Mre11p, Xrs2p, Rad59p, Sgs1p) и Rad52p-зависимый Rad50p-, Rad51p-независимый (Grandin, Charbonneau, 2003). В различных системах показано участие циклинов в отклике на повреждения ДНК. Так, потеря S-циклинов Clb5 и Clb6 вызывает повышение чувствительности клеток к действию ММС, УФ-света и ионизирующей радиации (Meun, Holloway, 2000). Для дрожжей *S. pombe* показано участие киназы Cdc2/циклин В в регуляции рекомбинационной репарации индуцированной радиацией ДНР ДНК в фазе G2 (Caspari et al., 2002). При этом дефект киназной активности CDK1 влияет на образование центров Rhp51p (ортолог Rad51p) в ответ на действие ионизирующей радиации, кроме того активность циклин-зависимой киназы CDK1-циклин В совместно с checkpoint-белком Crb2 необходимы для поддержания функциональной активности топоизомеразы III.

Мы анализировали радиочувствительность диплоидных клеток в стадио-

нарной фазе роста (Koltovaya et al., 1998). Мутация *cdc28-srm* увеличивает радиочувствительность мутанта *rad52* с заблокированной HR, по-видимому, это связано с нарушением минорного пути репарации NHEJ или checkpoint. Введение дополнительной checkpoint-мутации *rad53* в генотип двойного мутанта *cdc28-srm rad52* не приводит к дополнительному увеличению  $\gamma$ -чувствительности. Мутация *rad53* снижает эффективность HR (Glaser et al., 1990) и NHEJ (de la Torre, Lowndes, 2000), но не известно за счет остановки клеточного цикла или индукции репарационных генов. Двойной мутант *cdc28-srm rad53* более чувствителен, чем одиночный мутант *rad53*, по-видимому, за счет дополнительной репарационной функции CDC28 (Колтовая, Девин, 2002).

В случай диплоидной клетки в любой стадии цикла существует второй комплект хромосом и клетка может использовать HR для репарации ДНР. В связи с этим у дрожжей существует специализированная система регуляции, направляющая ДНР на путь предпочтительного использования HR и подавления NHEJ в G1-фазе клеточного цикла. Гетерозиготность по локусу типа спаривания *MAT* влияет на выбор между альтернативными путями репарации, отдавая предпочтение HR (Heude, Fabre, 1993; Yan et al., 1995). Локус типа спаривания является регулятором транскрипции, в частности, у гетерозигот по типу спаривания репрессирован ген *NEJ1*, участвующий в NHEJ, что направляет репарацию по пути HR, а не NHEJ (Frank-Vaillant, Marcand, 2001; Valencia et al., 2001). Нарушение регуляции сайленсинга копий локуса *MAT* может привести к дерепрессии гена *NEJ1*. RENT-комплекс участвует в регуляции локализации белка сайленсинга Sir2 (Cuperus et al., 2000), обладающего HDAC-активностью (Ghidelli et al., 2001). Нарушение белка Net1, удерживающего белок Sir2 в ядрышке, может влиять на радиочувствительность непрямым образом через сайленсинг локуса типа спаривания. Действительно, нами показано, что мутация *net-srm* влияет на радиочувствительность дрожжевых клеток (Koltovaya et al., 2003).

**Химические модификации гистонов.** У всех эукариот лизины в позициях 5, 8, 12 и 16 на N-конце гистона H4 и в позициях 9, 14, 18, 23 и 27 на N-конце гистона H3 обратимо ацетируются *in vivo*. Молекулярно-генетический анализ показал, что в дрожжевых клетках за глобальное ацетилирование гистона H4 ответственна субъединица Esa1 комплекса NuA4. Для глобального ацетилирования H3 необходима ацетилтрансфераза Gcn5, входящая в комплекс SAGA (Kuo et al., 2000; Vogelauer et al., 2000).

В непосредственной близости от сайта ДНР происходит дополнительное ацетилирование гистонов. В процессе HR к ДНР привлекаются ацетилазы Gcn5 и Esa1 (Tamburini, Tyler, 2005). Уровень ацетилирования лизинов гистонов H3 и H4 увеличивается в областях, фланкирующих разрыв, а затем снижается в процессе HR. В процессе HR на участке более 0.6 тпн и менее 2 тпн от разрыв наблюдается увеличение ацетилирования девяти остатков лизина в N-концах гистонов H3 и особенно в гистоне H4. Замены ацетилируемых лизинов в хвостовой части гистона H4, делеции хвостовых участков гистонов H3 и H4, разрушение генов *GCN5* и *ES1* блокируют HR-репарацию. Наблюдаемое ацетилирование гистонов, фланкирующих HO-разрыв ДНК, является, по-видимому, следствием репарации ДНК, а не наличия самого ДНР, так как оно существенно снижено в случае разрушения гомологичной донорной последовательности или белка Rad52, необходимого для прохождения HR.

К ДНР ДНК рекрутируются также деацетилазы Rpd3, Sir2, Hst1 (Tamburini, Tyler, 2005). Деацетилирование глобальное и локальное лизина 16 гистона H4, контролируемое генами *SIN3* или *RPD3*, приводит к нарушению репарации ДНР (Jazaayeri et al., 2004). При этом, в отличие от глобального деацетилирования гистонов, характерного для белкового комплекса Sin3/Rpd3, в сайте ДНР эти белки деацетилируют только лизин 16 гистона H4. Возможно, дефект репарации у мутантов по генам *SIN3* и *RPD3* связан с уменьшением эффективности связывания репарационных белков с концами ДНР, занятых комплексом NuA4.

Группой японских ученых было показано участие белков сайленсинга в репарации ДНР ДНК путем NHEJ (Tsukamoto et al., 1997). Используя дигибридную систему, Tsukamoto с соавторами обнаружили взаимодействие белков Ku70 и Sir4. По-видимому, с концами ДНР ДНК связывается белок Ku70, рекрутирующий белок Sir4 к ДНР, а белок Sir4 в свою очередь взаимодействует с белками Sir2 и Sir3. Sir-белки модифицируют структуру хроматина, взаимодействуя с аминоконцами гистонов H3 и H4, принимают участие в создании неактивной хроматиновой структуры, предотвращая деградацию концов онДНК. Анализ эффективности NHEJ показал участие генов *SIR2*, *SIR3* и *SIR4* в воссоединении концов (Tsukamoto et al., 1997; Boulton, Jackson, 1998). Причем белки Ku70, Ku80 и гены *SIR2*, *SIR3*, *SIR4* и *SRS2*, необходимы для эффективного и безошибочного соединения липких концов (Hegde, Klein, 2000). Для репарации тупых концов необходимы гены *RAD50*, *RAD52*, *SRS2* и соединение концов сопровождается делециями. В клетках млекопитающих p53-зависимый регуляторный путь также опосредуется Sir2 $\alpha$ -зависимым деацетилированием гистонов (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Экспрессия каталитически неактивного белка hSIR2 активирует p53-зависимый апоптоз и влияет на радиочувствительность. Комплекс RENT участвует в регуляции локализации белка сайленсинга Sir2 (Cuperus et al., 2000), обладающего HDAC-активностью (Ghidelli et al., 2001). Мутация *net1-srm* влияет на радиочувствительность (Koltovaya et al., 2003). Это влияние может быть обусловлено влиянием на сайленсинг или эффективность NHEJ.

**Ремодулирование структуры хроматина.** В динамических изменениях структуры хроматина принимают участие ремодулирующие комплексы INO80, SWI/SNF, RSC, SWR1. Связывание INO80 с хроматином облегчает процессинг онДНК, образующейся в ходе деградации концов ДНР ДНК, и не влияет на checkpoint (Van Attikum et al., 2004). Комплекс SWI/SNF разрушает нуклеосомный кор АТФ-зависимым способом и может удалять гистоны с ДНК (Kingston, Narlikar, 1999). Для рекрутирования ремодулирующих хроматин комплексов в ответ на индуцированный HO-эндонуклеазой ДНР важно ацетилирование гистонов, например, рекрутирование Rvb1-содержащих комплексов SWR1 и INO80 к HO-разрыву снижено в клетках, мутантных по HDAC-Esa1-NuA4 (Downs et al., 2004). SAGA-комплекс, помимо модифицирования хроматина, также необходим для сборки ремодулирующих комплексов. НАТ-независимая функция SAGA-комплекса заключается в повышении эффективности доставки ремодулирующего комплекса SWI/SNF к промоторам (Yoon et al., 2003). Ada1p и Ada5p вместе с Spt7p необходимы для целостности SAGA-комплекса. Мутации в этих субъединицах разрушают комплекс и имеют более выраженный эффект, чем в несуществен-

ных субъединицах, включая НАТ-Gcn5 (Sterner et al., 1999). Мутации *gcn5 $\Delta$*  и *ada2 $\Delta$*  не влияют на УФ-чувствительность, но влияют на эффективность NER (Ferreiro et al., 2006). Нами показано влияние *hfl1-srm* ( $\equiv$  *ada1 $\Delta$* ) на чувствительность к ионизирующей радиации, локусный мутагенез и checkpoint-контроль (Koltovaya et al., 2003).

Киназа CDC28, по-видимому, принимает участие в регуляции модифицирующих и ремодулирующих комплексов. Субъединица ремодулирующего комплекса SWI/SNF киназа Snf1 фосфорилирует гистон H3 по серину-10, что облегчает дальнейшее ацетилирование лизина-14 НАТ-Gcn5 (Lo et al., 2001). Негативный регулятор Sip2 киназы Snf1 является субстратом киназы CDC28 (Ubersax et al., 2003). Субстратами киназы CDC28 являются также и компоненты модифицирующих HDAC- Hos2p и Hos3p и ремодулирующих хромосомы комплексов CAF1 (Rif2), FACT (Spt16), SWI/SNF (Sip2 - Snf1), SAGA (Ngg1/Ada3), SLIK (Ngg1/Ada3), а также белки, участвующие в сайленсинге (Net1, Sir4, ORC) (Ubersax et al., 2003). Таким образом, комплексы CDC28, SAGA и RENT, обладающие фосфорилирующей, НАТ- и HDAC- активностями, играют важную роль в химической модификации репарационных белков и нуклеосом и ремодулировании хроматина, определяющих эффективность репарации и checkpoint-контроля.

#### Литература

1. Глазер В.М., Глазунов А.В. 1999. Генетика 35:1449-1469.
2. Колтовая Н.А., Кадышевская Е.Ю. 1997. Докл. РАН 357:710-712.
3. Колтовая Н.А., Девин А.Б. 2002. Докл. РАН 387:1-4.
4. Королев В.Г. 2007. Радиобиология. В печати.
5. Aylon Y., Kupiec M. 2005. Cell Cycle 4:e61-e63.
6. Bennett C.B., Lewis L.K., et al. 2001. Nature Genet. 29:426-434.
7. Birrell GW, Giaever G, Chu AM, et al., 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:12608-12613.
8. Boulton S.J., Jackson S.P. 1998. EMBO J. 17:1819-1828.
9. Caspari T, Murray J.M., Carr A.M. 2002. Genes Dev 16:1195-1208.
10. Chiolo I., Carotenuto W., Maffioletti G., et al. 2005. Mol. Cell. Biol. 25:5738-5751.
11. Cuperus G., Shafaatian R., Shore D. 2000. EMBO J 19:2641-2651.
12. De la Torre-Ruiz M-A., Lowndes N.F. 2000. FEBS Let. 467:311-315.
13. Deide S.J., Gottschling D.E. 2001. Curr. Biol. 11:1336-1340.
14. Devin A.B., Prosvirova T.Yu., Peshekhonov V.T., et al. 1990. Yeast 6:231-243.
15. Downs J.A., Allard S., Jobin-Robitaille O., et al. 2004. Mol. Cell 16:979-990.
16. Ferreiro J.A., Powell N.G., Karabetsou N., Mellor J., Waters R. 2006. Nuc. Acids Res. 34:976-984.
17. Frank-Vaillant M., Marcand S. 2001. Genes Deversion 15:3005-3012.
18. Game J.C. 2000. Mutation Res. 451:277-293.
19. Ghidelli S., Donze D., Dhillon N., Kamakaka R.T. 2001. EMBO J 20:4522-4535.
20. Glaser VM, Glasunov AV, Tevzadze GG et al. 1990. Curr. Genet. 18:1-5.
21. Gonzalez-Barrera S, Cortes-Ledesma F, et al. 2003. Mol. Cell. 11:1661-1671.
22. Grandin N., Charbonneau M. 2003. Mol. Cell. Biol. 23:9162-9177.
23. Hegde V., Klein H. 2000. Nucleic Acids Res. 28:2779-2783.
24. Heude M., Fabre F. 1993. Genetics 133:489-498.

25. Ira G., Pelliccioli A., Balijja A., et al. 2004. Nature 431:1011-1017.
26. Jazayeri A., McAinsh A.D., Jackson S.P. 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:1644-1649.
27. Kingston R.E., Narlikar G.J. 1999. Genes Dev. 13:2339-2352
28. Koltovaya N.A., Arman I.P., Devin A.B. 1998. Yeast 14:133-146.
29. Koltovaya N.A., Guerasimova A.S., Tchekhouta I.A., Devin A.B. 2003. Yeast 20:955-971.
30. Kuo M.H., vom Baur E., Struhl K., Allis C.D. 2000. Mol. Cell. 6:1309-1320.
31. Liberi G., Chiolo I., Pelliccioli A., et al. 2000. EMBO J. 19:5027-5038.
32. Lo W.S., Duggan L., Emre N.C., et al. 2001. Science 293:1142-1146.
33. Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W. 2001. Cell 107:137-148.
34. Meyer P. 2001. Curr. Opin. Plant Biol. 4:457-462.
35. Meyn M.A., Holloway S.L. 2000. Curr Biol 10:1599-1602.
36. Sterner D.E., Grant P.A., Roberts S.M., et al. 1999. Mol Cell Biol 19:86-98.
37. Tamburini B.A., Tyler J.K. 2005. Mol. Cell. Biol. 25:4903-4913.
38. Tsukamoto Y., Kato J., Ikeda H. 1997. Nature 388:900-903.
39. Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quang P.N., et al. 2003. Nature 425:859-864.
40. Valencia M., Bentele M., Vaze M.B., et al. 2001. Nature 414:666-669.
41. Van Attikum H., Fritsch O., Hohn B., Gasser S.M. 2004. Cell 119:777-788.
42. Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., et al. 2001. Cell 107:149-159.
43. Vogelauer M., Wu J., Suka Nio, Grunstein M. 2000. Nature 408:495-498.
44. Yan Y.X., Schiestl R.H., Prakash L. 1995. Curr Genet 28:12-18.
45. Yoon S., Hongfang Q., Swanson M.J., Hinnebusch A.G. 2003. Mol. Cell. Biol. 23:8829-8845.

## ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ HPRT-МУТАНТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИОНАМИ АЗОТА ( $^{14}\text{N}$ ) И ЛИТИЯ ( $^7\text{Li}$ ).

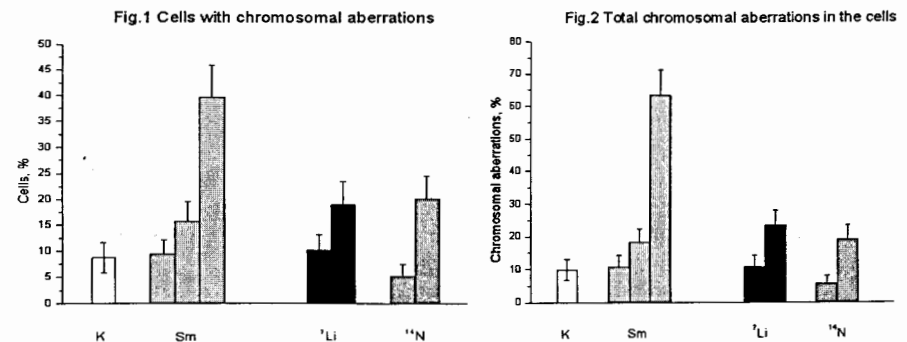
Кошлань Н.А., Говорун Р.Д., Кошлань И.В.

*Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия.*

Проблема геномной нестабильности остается актуальной и привлекает внимание исследователей. Повышение уровня мутаций и хромосомных aberrаций наблюдается не только в первых, но и в последующих поколениях облученных клеток [1,2]. Повышенный уровень хромосомных aberrаций у потомков облученной клетки указывает на существование фактора, поддерживающего нестабильность в последующих поколениях клеток. Особенно обостряется эта проблема в ситуациях, когда людям по тем или иным причинам постоянно приходится сталкиваться с воздействием радиации. Однако природа радиационно-индуцированной нестабильности до сих пор остается невыясненной.

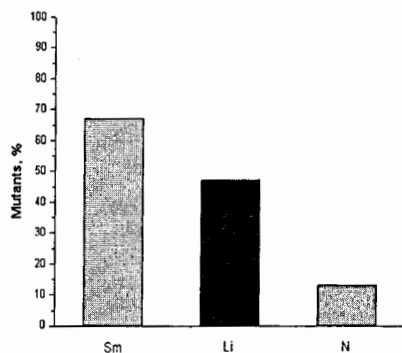
В лаборатории радиационной биологии ОИЯИ проведена серия экспериментов по облучению клеток млекопитающих излучениями с разными ЛПЭ для оценки влияния качества излучения на проявление хромосомной нестабильности у потомков мутантных клеток [3,4]. Были выделены спонтанные и радиационно-индуцированные HPRT-мутантные субклоны клеток китайского хомячка линии V-79 и проведен их цитогенетический анализ. Клетки облучали ускоренными ионами азота  $^{14}\text{N}$  с ЛПЭ 77 кэВ/мкм и лития  $^7\text{Li}$  с ЛПЭ 20 кэВ/мкм в дозах 1, 2 и 3 Гр. Для выявления и селекции спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантов использовали тест-систему, основанную на резистентности клеток с мутацией в локусе HPRT к токсичному для нормальных клеток пуриновому аналогу 6-тиогуанину (6-TG)[5].

При цитогенетическом анализе наблюдали гетерогенность спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов по исследованным цитогенетическим показателям (митотической активности, анеуплоидии, уровням хромосомных aberrаций). Среди мутантных субклонов выявлены образцы с повышенным в 1,5-3 раза уровнем хромосомных aberrаций по сравнению с необлученным контролем (без 6-TG). При спонтанном мутагенезе обнаружены также группа мутантов с экстремально высоким содержанием хромосомных нарушений с числом aberrантных клеток до 40% и общим числом хромосомных нарушений до 60% и выше. При облучении клеток ионами  $^7\text{Li}$  был встречен единичный образец с экстремально высоким уровнем хромосомных aberrаций.



Кроме того, при облучении клеток ионами  $^{14}\text{N}$  встречены мутанты со сниженным по сравнению с интактным контролем в 2-4 раза уровнем хромосомных aberrаций.

Fig.3 Fraction of mutants with higher level of chromosomal aberrations



Анализируя полученные данные, мы не отметили зависимости от дозы облучения выхода мутантов как не отличающихся от контроля, так и с повышенным уровнем хромосомных aberrаций (рис. 1,2). На рисунке 3 видно, что выход мутантов с повышенным уровнем хромосомных aberrаций снижается с увеличением ЛПЭ ионов. При спонтанном мутагенезе группа таких составила 67%. При радиационно-индуцированном мутагенезе доля клеток с

повышенным по сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций снижается до 50% при индукции ионами  $^7\text{Li}$  и до 13% – ионами  $^{14}\text{N}$ .

Наши исследования показали, что последствия мутационных событий проявляются в возникновении хромосомной нестабильности в популяциях мутантных клеток. Их потомки оказались гетерогенными по исследованным цитогенетическим показателям, что было характерно как при спонтанном, так и при радиационно-индуцированном мутагенезе. У многих из мутантных субклонов отмечено повышение частоты хромосомных aberrаций, уровень которой варьировал в широких пределах.

Кроме того, среди радиационно-индуцированных мутантов, облученных ионами азота, наблюдались варианты со сниженным по сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций. Отсутствие среди радиационных мутантов образцов с повышенным уровнем хромосомных aberrаций находит свое объяснение. Можно полагать, что при облучении тяжелыми ионами погибают все клетки с какими-либо дефектами, но жизнеспособные в нормальных физиологических условиях, а возникающие из наиболее полноценных выживших клеток мутанты (например, с эффективно работающей системой репарации повреждений) не отличаются от контроля или даже имеют сниженный уровень хромосомных aberrаций в клетках.

Наблюдаемая вариабельность цитогенетических показателей, по-видимому, определяется типом возникших мутаций. Их последствия могут проявляться в ряду клеточных поколений как через изменение и нарушение активности гена, так и через нарушение активности соответствующего фермента. Это может быть связано не только с точковыми мутациями, но и со структурными изменениями гена: микроделециями, инверсиями, вставками, а также частичной или полной потерей гена в случае структурной делеции X-хромосомы, в которой он находится [6].

В последнем случае, образование пуриновых нуклеотидов должно идти по пути *de novo*. А в случае синтеза фермента со сниженной активностью или при синтезе недостаточного количества нативного фермента возникает ситуация, приводящая к нарушению равновесия в метаболизме клетки. Такое неустойчивое состояние может сопровождаться хромосомной нестабильностью как этапом в поиске равновесия и адаптации к изменившимся условиям существования. В итоге будут формироваться мутантные субклоны с повышенным по сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций [7].

Становится также понятным механизм нестабильности хромосом у потомков мутантных клеток. Мутации передаются из поколения в поколение и, тем самым, снимается вопрос о консервации инициирующего события в ряду поколений. Появление повышенного количества хромосомных aberrаций в клетках многих спонтанных и радиационно-индуцированных мутантов может свидетельствовать о том, что при мутагенезе в клетках млекопитающих с неизбежностью повышается вероятность нарушения целостности хромосом, что можно рассматривать как этап соответствующей перестройки генома, адекватной изменившимся условиям существования.

#### Литература

1. Little J.B. Radiation-induced genomic instability. // Int. j. Radiat. Biol. 1998. Vol. 74. № 6. P. 663-671.
2. Sabatier L., Lebeau J., Pommier J.P., Dutrillaux B. Chromosome instability and telomeric alteration detected in irradiated human fibroblasts. // Proceedings of the Tenth Internal Congress "Radiation Research 1895-1995", edited by Hagen U., Harder D., Jung H., Streffer C. Wurzburg. Germany. 1995. V. 2. P. 509-512.
3. Кошлань И.В., Говорун Р.Д., Кошлань Н.А. Индукция HPRT-мутантов клеток млекопитающих излучениями с разной ЛПЭ. // Пятая научная конференция молодых ученых и специалистов ОИЯИ. Дубна 2001г. Тезисы докладов. 5-10 февраля 2001г. Стр 120-122.
4. Govorun R.D., Koshlan I.V., Koshlan N.A., Krasavin E.A., Shmakova N.L. Chromosome instability of HPRT-mutant subclones induced by ionizing radiation of various LET. // Adv.Space.Res. 2002, Vol.30, №4, P. 885-890.
5. Thacker J., Stretch M., Stephens M. The induction of thioguanine-resistant mutants of Chinese hamster cells by  $\gamma$ -rays. // Mutation Research. 1977. V. 42. P. 316-326.
6. Цитогенетические нарушения и мутагенез в клетках млекопитающих и человека, индуцированные ионизирующими излучениями с различной ЛПЭ. // Радиационная биология. Радиозология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 539-548.
7. Говорун Р.Д., Кошлань И.В., Насонова Е.А., Ретин М.В., Шмакова Н.Л., Красавин Е.А. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки млекопитающих // ЭЧАЯ (Физика элементарных частиц и атомного ядра). Т. 35. Вып. 6. 2004.

## МЕХАНИЗМЫ НЕЙПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ДВУХАТОМНЫХ ФЕНОЛОВ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ АСТРОЦИТОВ *IN VITRO*

Мезен Н.И., Федулов А.С., Квачева З.Б., Шадыро О.И.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь

Гипоксия – ведущее звено механизмов повреждений нервной ткани, возникающих при многих патологиях нервной системы [5]. Важную роль в адаптационных реакциях, развивающихся в нервной ткани в ответ на гипоксическое воздействие, играют астроциты. Однако механизм их гипоксического повреждения до конца не ясен. Одним из существенных факторов сложной цепи метаболических нарушений, развивающихся в клетках нервной ткани при гипоксии, является активация свободнорадикального окисления липидов [4]. В этой связи актуальными являются исследования, направленные на создание эффективных ингибиторов свободнорадикального окисления — антиоксидантов. Среди последних по своей антиокислительной активности выделяются многоатомные фенолы. Целью данного исследования явилось изучение возможных механизмов протекторного действия производных двухатомных фенолов на астроциты, культивируемые в условиях гипоксии.

### Материал и методы исследования

Антиоксидантную активность соединений изучали по их влиянию *in vitro* на кинетику накопления малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах головного мозга лабораторных крыс по методике [1]. Первичную культуру астроцитов получали по методу [7] в модификации [3]. Для этого использовали головной мозг новорожденных крысят 1-2-недельного возраста. В эксперимент брали культуру 1-2 пассажного уровня на 4-5 сутки роста *in vitro*. Содержание астроцитов в культуре и их функциональную активность контролировали с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител с использованием поликлональных антител к глиально фибриллярному кислом белку (ГФКБ) (Sigma, США). Для морфологического изучения культуры клетки фиксировали раствором Дюбоск-Бразиль-Буэна, окрашивали гематоксилином Бемера и 0,5 % водным раствором эозина. Препараты анализировали в световом микроскопе "Biostar" (ФРГ) с увеличением 100-400. Для определения митотической активности подсчитывали в поле зрения микроскопа 3000-5000 клеток, выделяя среди них клетки в стадии деления и выражали в промиллях (%). Ультраструктуру астроцитов изучали по общепринятой методике на клетках, фиксированных 2,5 % глутаральдегидом и 1 % OsO<sub>4</sub> в 0,1 К какодилатном буфере (pH 7,3), обезвоженных и спиртах возрастающей концентрации и заключенных в аралдит. Ультратонкие срезы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100-CX (Япония). Гипоксическое воздействие на культуры осуществляли в герметичной камере с газовой смесью 95 % азота и 5 % углекислого газа при 37 °С. Морфометрический анализ проводился с использованием компьютерной системы анализа изображения "Bioscan-NT" по программе, разработанной в лаборатории компьютерных технологий МГМУ. Активность СОД определяли методом [6].

### Результаты и обсуждение.

На кафедре радиационной химии и химической технологии БГУ были синтезированы производные пирокатехина и гидрохинона, условно названные Т-2, Т-3, К-1, Т-37.

В качестве препарата сравнения использовали близкий по структуре исследуемым соединениям широко известный антиоксидант ионол

Наибольшей антиоксидантной активностью из изучаемых соединений обладает 3,5-дитрет-бутилпирокатехин (соединение Т-3), которое ингибирует образование МДА в интервале концентраций 10<sup>-8</sup>-10<sup>-3</sup> М. Уровень МДА при концентрациях соединения 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> М не превышает 9,4-3,1 % от контроля («норма»). В концентрации 10<sup>-8</sup> М соединение Т-3 ингибирует образование МДА на 61,5 %. Соединение Т-37 (алкилированный о-аминофенол) в концентрациях 10<sup>-6</sup>-10<sup>-3</sup> М снижает образование МДА на 80,6-98,7 %. В концентрациях 10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup> М – на 1,7-8,3 %. По эффективности данное соединение превосходит ионол, особенно в диапазоне низких концентраций, где последний не влияет на содержание МДА.

Дальнейшая оценка биологической активности отобранных соединений проводилась в первичной культуре астроцитов мозга новорожденных крыс, находящейся в условиях гипоксии. Полученные нами культуры мозга новорожденных крыс состояли на 95 % из ГФКБ – положительных клеток. Культуры представлены протоплазматическими и фибриллярными астроцитами. Протоплазматические астроциты среди астроглиальных клеток преобладали. Характерной особенностью их при обработке антисывороткой к ГФКБ является наличие равномерного специфического свечения тел и отростков. При ультраструктурном изучении контрольной культуры астроцитов их цитоплазма и ядра имели низкую электронную плотность. В цитоплазме содержалось небольшое количество глиофибрилл и рибосом. Эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи представлены короткими цистернами. Количество митохондрий, их размеры и форма варьировали в широких пределах. Ядра протоплазматических астроцитов имели округлую или овальную форму, содержали равномерно диспергированный хроматин, в большинстве случаев 2-3 нуклеолонемных ядрышка. Митотическая активность интактных культур составляла 15,6 %. Размеры клеток в первичных астроцитарных культурах варьируют от 150 мкм<sup>2</sup> до 1700 мкм<sup>2</sup>. Наибольшее количество клеток имеет площадь от 700 мкм<sup>2</sup> до 1000 мкм<sup>2</sup>.

Первые морфологические изменения в астроцитах наблюдались через 18 часов от начала гипоксического воздействия. Они характеризовались появлением отечных клеток с вакуолизацией их цитоплазмы, появлением многоядерных клеток. При этом снижался уровень митотической активности астроцитов. Степень выраженности этих изменений усиливалась после 20-часовой гипоксии, вовлекая в поражение ядра. Поражение клеток имело очаговый характер. Целостность монослоя в эти сроки еще сохранялась. Поэтому этот временной интервал был выбран нами для оценки антигипоксических свойств исследуемых соединений. Дальнейшая инкубация культур в гипоксической камере в течение 24 часов и более приводила к нарушению целостности монослоя с отторжением части клеток от поверхности флакона.

Электронно-микроскопический анализ астроцитов, подвергнутых 20-часовому воздействию гипоксии, выявил выраженные ультраструктурные изменения в



ядре и цитоплазме. Так, большая часть ядерного хроматина была диспергирована, у внутреннего листка нуклеолемы наблюдалась лишь его узкая конденсированная полоска. Наблюдались митохондрии с деструкцией крист и разреженным матриксом, число которых в некоторых клетках достигало 20-30 % от общего количества. Цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулаума были несколько расширены. Так же нами было отмечено снижение уровня СОД в гомогенате культуры клеток астроцитов в 1,9 раза. При гипоксии появились клетки с площадью цитоплазмы от 1700 мкм<sup>2</sup> до 4000 мкм<sup>2</sup>.

Одним из подходов, позволяющим тестировать состояние мембранных липидов, находящихся как в бислое, так и приобелковых (анулярных) липидов является определение степени эксимеризации мембраносвязанного флуоресцентного зонда пирена [2]. При гипоксии происходит увеличение отношения интенсивности эксимерной к мономерной флуоресценции красителя при возбуждении 335 нм более чем в 2 раза, что свидетельствует о снижении вязкости липидного бислоя мембран астроцитов.

Внесение в культуральную среду перед помещением астроцитов в гипоксическую камеру исследуемых соединений в дозе 0,05 мкг/мл приводило к существенному снижению выраженности нейродеструктивных процессов.

#### Выводы

1. Производные двухатомных фенолов Т-2, Т-3, Т-37, К-1 обладают антиоксидантной активностью.
2. Антиоксидантная активность у данных соединений зависит от строения их исходных соединений, среди которых дифенол Т-3 и аминофенол Т-37 превосходят по активности ионол.
3. Разработана модель гипоксического повреждения астроцитов в первичной культуре мозга новорожденной крысы. Характерными признаками поражения клеток является нарушение функционального состояния их мембран, отек клеток, формирование многоядерных клеток, снижение митотической активности, снижение уровня СОД. В более длительные сроки (24-48 часов) – деструкция клеточного монослоя.
4. Установлен выраженный протективный эффект исследуемых препаратов Т-3, Т-37 в условиях гипоксического воздействия на астроциты *in vitro*, который проявляется нормализацией метаболизма и функциональной активности клеток.

#### Литература

1. Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, -1972, 252с.
2. Т.Г. Е. Добрецов. Флуоресцентные методы в исследовании клеток. – М.: Наука, 1989, 26 с.
3. З.Б. Квачева, М.К. Недзьведь, П.Г. Рытик и др. – Материалы I Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре ткани».- Пущино, 1984, с.108-111.
4. Н.И. Мезен., З.Б. Квачева, А.С. Федулов, Ф.В. Олешкевич, О.И. Шадыро, В.А. Тимошук.. – Бюл. Экспер. Биологии и медицины 1996, №11, т.122, с.581-584.
5. Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические аспекты. Под редакцией Л.Д. Лукьяновой, И.Б. Ушакова. М., 2004, с.112-138
6. Б. П. Шаронов, Л.Д. Кондратьев. Биохимия, 1991, №4, с.621-627.
7. J. Boocher, M. Sensenbrenner. Neurobiol., 1972, v.2, p.97-105.

## МУЛЬТИАБЕРРАНТНЫЕ КЛЕТКИ И ХРОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗОМ

Рябченко Н.И., Насонова В.А., Фесенко Э.В., Кондрашова Т.В., Антощина М.М., Павлов В.В., Рябикина Н.В.

Медицинский радиологический научный центр РАМН, Россия, г. Обнинск, nryabchenko@rnbler.ru

При цитогенетическом анализе лимфоцитов периферической крови в ряде случаев обнаруживаются метафазы, содержащие большое число структурных хромосомных повреждений. Такие поврежденные метафазы называют сложными клетками, мультиаберрантными клетками (МА-клетки), а также “ogue-cells” [1, 2, 3]. МА-клетки наблюдаются как при обследовании лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующих излучений [4, 5, 6, 7], так и лиц, не подвергавшихся воздействию кластогенных факторов [2, 8]. Нестабильность МА-клеток и непредсказуемость их появления в различных группах пациентов и здоровых индивидуумов существенно затрудняет исследование феномена мультиаберрантности в качестве показателя хромосомной нестабильности и возможного участия этих клеток в проявлении отдаленных последствий действия кластогенных факторов на организм.

Нами было показано [9], что более 80 % больных лимфогранулематозом (ЛГМ) после проведения химиотерапевтического лечения содержат МА-клетки. Высокая частота встречаемости МА-клеток позволило провести цитогенетический анализ мультиаберрантных клеток и изучить закономерности их появления.

Исследуемая группа состояла из 43 больных лимфогранулематозом, получавших в клинике МРНЦ РАМН только одну химиотерапию (18 больных) и получавших после химиотерапии курса лучевой терапии с различными суммарными очаговыми дозами (25 больных). Группы сравнения были представлены 30 первичными больными ЛГМ и 76 здоровыми донорами.

Образцы крови получали от здоровых доноров, больных ЛГМ до и в течение первых двух суток после проведения курса химиотерапии и последующей лучевой терапии. Лимфоциты культивировали при 37°C в среде RPMI-1640 с 20 % эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА). Для определения числа пройденных клетками циклов репликации ДНК (митозов) использовали метод дифференциальной окраски хроматид с помощью 5-бромдезоксинуридина, который добавляли вместе с ФГА в культуру лимфоцитов. Лимфоциты фиксировали через 48-96 часов после культивирования в присутствии ФГА и 5-бромдезоксинуридина. Для накопления метафаз за 2 часа до фиксации в каждую культуру добавляется демекольцин в конечной концентрации 0,6 мкг/мл.

Учитывая вариации данных различных авторов о числе aberrаций хромосом в МА-клетках, мы относили к мультиаберрантным клеткам метафазы, которые содержат не менее четырех обменных aberrаций хромосомного типа. Для изучения механизмов формирования МА-клеток была исследована зависимость их появления от типов воздействующих на организм факторов, а именно химиотерапевтических (комплекс препаратов, применяемых при лечении больных ЛГМ), которые индуцируют aberrации хроматидного типа, и радиационных, которые при воздействии на покоящиеся лимфоциты периферической

индуцируют в основном аберрации хромосомного типа (гамма-лучевая терапия).

Была оценена частота появления структурных aberrаций хромосом в мультиаберрантных метафазах первого митоза лимфоцитов здоровых доноров, первичных больных ЛГМ (группы сравнения), а также больных после проведения химиотерапии и последующей лучевой терапии. Общая частота aberrаций хромосом на 100 метафаз у первичных (не получавших лечения) больных ЛГМ оказалась значительно выше, чем у здоровых лиц ( $4,80 \pm 0,54$  и  $2,12 \pm 0,13$ , соответственно;  $p < 0,01$ ), а у больных после проведения химиотерапии - выше, чем у первичных больных ( $7,20 \pm 0,58$ ;  $p < 0,01$ ). Разница в частоте aberrаций между первичными больными и здоровыми донорами объяснялась, главным образом, повышенной частотой хроматидных aberrаций ( $4,34 \pm 0,51$  у больных и  $1,87 \pm 0,12$  в контроле;  $p < 0,01$ ). После проведения химиотерапии у лимфоцитов больных наблюдался не только повышенный уровень aberrаций хроматидного типа ( $5,20 \pm 0,50$ ), но и aberrаций хромосомного типа:  $1,99 \pm 0,36$  против  $0,47 \pm 0,19$  у первичных больных ( $p < 0,01$ ) и  $0,25 \pm 0,04$  у здоровых лиц ( $p < 0,01$ ). Преобладающий вклад в общую частоту aberrаций в каждой из обследованных групп вносили aberrации хроматидного типа, а доля aberrаций хромосомного типа у больных после химиотерапии составляла 28 %.

У 15 больных ЛГМ после химиотерапии и незавершенного курса гамма-лучевой терапии по многопольному варианту (суммарная очаговая доза (СОД) менее 12 Гр) были взяты для анализа образцы крови. Показано, что дополнительное облучение увеличивает общее число aberrаций хромосом на 100 метафаз до  $18,3 \pm 5,2$ , при этом число aberrаций хроматидного типа увеличивается до  $11,0 \pm 4,9$ , а уровень aberrаций хромосомного типа увеличивается до  $7,3 \pm 1,7$  и составляет 39,9 % от всех индуцированных aberrаций. Завершение после химиотерапии (10 больных) полного курса лучевой терапии по многопольному варианту с СОД 19-23 Гр на шейно-подключичную область, средостение, селезенку, легкие и другие области приводит к дальнейшему повышению уровня aberrаций хромосом на 100 метафаз до  $43,3 \pm 2,5$ , из которых 91,4 % составляют aberrации хромосомного типа ( $39,6 \pm 2,6$ ). Следует отметить, что у больных ЛГМ после завершения курса химио- и лучевой терапии наблюдается как снижение числа лимфоцитов в периферической крови, так и снижение способности ФГА стимулировать митотическую активности культивируемых лимфоцитов, что существенно затрудняет анализ МА-клеток у этой группы больных.

Кроме обычных aberrантных клеток, лимфоциты 15 из 18 больных ЛГМ, обследованных после проведения химиотерапии, содержали МА-клетки, несущие четыре и более обменных aberrаций хромосомного типа. Всего у этих больных после проведения курса химиотерапии было найдено 60 МА-клеток, или 1,1 % от общего числа метафаз (5568), проанализированных для этих 18 человек. Следует подчеркнуть, что среди 4988 метафаз, проанализированных у 30 первичных больных, ЛГМ оказалась только одна мультиаберрантная, а у 76 здоровых доноров (свыше 12000 проанализированных метафаз) не было найдено ни одной МА-клетки. в отличие от обычных aberrантных клеток.

В периферической крови 33 больных после завершения курса химиотерапии и неполного курса лучевой терапии было найдено 109 МА-клеток, из которых более половины (а именно, 67) были найдены среди диплоидных метафаз первого *in vitro* деления, в то время как остальные 42 МА-клетки были найдены в

полиплоидных метафазах. При этом среди диплоидных метафаз второго и третьего *in vitro* митозов МА-клеток обнаружено не было. В спектре aberrаций больных после химиотерапии и незавершенной лучевой терапии преобладали aberrации хроматидного типа, в то время как в спектре aberrаций МА-клеток преобладали aberrации хромосомного типа (97,5 %).

Полиплоидные МА-клетки встречались относительно часто в любом из трех последовательных циклов *in vitro* репликации. Сопоставление и анализ типов, характеристик и структурных особенностей aberrаций, наблюдаемых в мультиаберрантных полиплоидах различных циклов деления, показало, что МА-клетки могут формироваться как *in vivo*, так и *in vitro* в отсутствие непосредственных кластогенных стимулов, причем при условии блокированной сегрегации хромосом МА-клетки не подвергаются элиминации в ходе митоза и способны сохраняться в течение, по крайней мере, двух циклов деления. Полученные результаты указывают, что формирование мультиаберрантных клеток подчиняется иным закономерностям, чем формирование обычных aberrантных клеток. Наши данные позволяют высказать предположение об участии в формировании МА-клеток незавершенного апоптоза, при котором цепь ответных на апоптотический сигнал событий преждевременно обрывается и клетка восстанавливает целостность своего хромосомного аппарата, несмотря на наличие множественных двунитевых разрывов ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 06-04-48300).

#### Литература

1. Bloom, A.D., J.V. Neel, T. Tsuchimoto and K. Meilinger. // Cytogenet. Cell Genet. 1973. V. 12. P. 175-186.
2. Tawn E.J., C.L. Cartmel and E.M.T. Pyta (1985). // Mutation Res. 1985. V. 144. P. 247-250.
3. Awa A.A., Neel, J.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1021-1025.
4. Домрачева Е.В., Кунцов С.А., Шкловский-Корди Н.Е., Воробьев А.И. (). Гематология и трансфузиология. 1991. № 11. С. 56-57.
5. Sevan'kaev, A.V., Thyb A.F., Lloyd D.C. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 1993. V.64. P. 361-367.
6. Lazutka J.R. Mutation Res. 1996. V. 350. P. 315-329.
7. Ривкинд Н.Б., Старицина Л.П., Скворцова Г.В. // Терапевтический архив. 1996. № 7. С. 77-79.
8. Mustonen C., Lindholm E.J., Tawn L. et al // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74. P. 781-785.
9. Ryabchenko N.I., Nasonova V.A., Fesenko E.V. et al. // Mutation Research. 2006. V. 601. P. 61-70.

## МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНА CHALLENGE-МУТАГЕН В ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ КОРРЕКЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК (MMR): СВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ ВИДАМИ РАКА

Тронов В.А., Крамаренко И.И., Козлова А.Д., Красавин Е.А.  
ИХФ РАН, г. Москва, Россия, [tronov@center.chph.ras.ru](mailto:tronov@center.chph.ras.ru)

Пять механизмов репарации обеспечивают целостность и интактность генома в клетке: прямое восстановление повреждений; репарация двуниевых разрывов (включает механизм гомологичной рекомбинации и механизм сшивания негомологичных концов; эксцизионная репарация нуклеотидов; эксцизионная репарация оснований; репарация некорректных пар (mismatch repair, MMR, коррекционная репарация). Некорректные пары образуются в результате ошибок ДНК-полимеразы с довольно высокой частотой (1 пара на 10000 нуклеотидов). Сегодня однозначно доказана связь мутации генов этого механизма с наследственной предрасположенностью к наследственному неполипозному колоректальному раку (НРТК), называемому синдромом Линча 1.

Таблица 1

Дефект MMR	MMR-статус	Заболевание/синдром <sup>1)</sup>
Герм.-мутации гена <i>MLH1</i>	Низкий уровень	НРТК/синдром Линча 1, НРТК-спектр/синдром Линча2
Герм.-мутации гена <i>MSH2</i>	Низкий уровень	НРТК, синдром Мюир-Торр
Гиперметилирование <i>MLH1</i> промотера	Низкий уровень	Спорадический РТК, рак эндометрия, рак яичников и др.
Мутации гена <i>mgmt</i> <sup>2)</sup>	Высокий уровень	Спорадический РТК, цирроз печени, гепатоклеточный рак

Примечания. НРТК – наследственный неполипозный рак толстой кишки; РТК – рак толстой кишки. <sup>1)</sup>Синдром Линча 1 включает в себя только наследственные колоректальные опухоли. Синдром Линча 2 охватывает наследственные опухоли близлежащих органов – эндометрий, яичники, тонкий кишечник, желудок, мочеточник, почечные лоханки. Синдром Мюир-Торр – наследственная неоплазия сальных желез, фенотипический вариант НРТК. <sup>2)</sup>Ген *mgmt* кодирует фермент прямого деметилирования гуанина, метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу. Недостаточность по этому ферменту приводит к перегрузке системы MMR и мутаторному фенотипу.

В таблице 1 перечислены генетические дефекты в системе коррекционной репарации и связанные с ними опухолевые заболевания человека. Существенно, что во многих патологиях, представленных в таблице, изменения в генах, как считают, понижают уровень активности механизма MMR. Понижение активности MMR ассоциировано как с наследственными, так и со спорадическими заболеваниями. Эта ассоциация является важнейшей причиной интереса к механизму коррекционной репарации. Вторая причина заключается в том, что на сегодня нет убедительной процедуры оценки функциональной активности MMR. Суждения о статусе MMR, представленные в таблице, сделаны на основании косвенных данных – нестабильность микросателлитов и уровень экспрессии белков системы MMR. Оба показателя не являются в строгом смысле количественными. Поэтому целью нашей работы была разработка метода количественной оценки функциональной активности MMR и исследование с его помощью репарации в лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных.

MMR является единственным пострепликативным репаративным меха-

низмом. Он в полной мере функционирует только в делящихся клетках и характеризуется двумя особенностями: (1) MMR протекает только на вновь синтезированной цепи ДНК, оставляя нетронутой матричную нить; (2) механизм характеризуется самой обширной эксцизией, оставляющей однонитевые бреши до 2000 нуклеотидов. Коль скоро процесс затрагивает только дочернюю цепь ДНК, то возникает вопрос, что будет, если повреждение находится в матрице и не препятствует репликации. Таким повреждением является модифицированный по 6 кислороду гуанин – ОбмеГ. Структурно он сильно напоминает аденин. Поэтому в парах с цитозином и аденином он не сильно деформирует регулярную структуру дуплекса, и потому его не узнает механизм дорепликативной репарации нуклеотидов. Клетка, содержащая эту модификацию, входит в цикл, и после его завершения начинает раунд коррекционной репарации. Он заканчивается формированием некорректной пары, поскольку основания, комплементарного ОбмеГ в клетке нет. Эта пара активирует новый раунд репарации, который также не завершается удалением дефекта. Такая репарация называется абортивной (незавершенной). В результате наблюдается череда эксцизии и ресинтеза с образованием временной однонитевой бреши, которая со временем переходит во вторичный двуниевый разрыв под действием эндонуклеаз. Этот разрыв сигнализирует о дезинтеграции генома и процесс завершается апоптозом. Эти события разворачиваются в клетках с активной системой коррекционной репарации. Если же механизм коррекции нарушен, то нет разрывов, нет апоптоза, но через 2 цикла репликации происходит трансверсия G:C → A:T. Таким образом, вторичный разрыв ДНК есть результат функционирования эксцизионной репарации и может репрезентировать ее активность.

Взяв за основу эту схему, мы попытались на ее основе разработать способ оценки вторичных двуниевых разрывов, возникающих в клетке в ответ на действие метилирующего агента – метилнитрозомочевина (МНМ). Поскольку коррекция протекает только в делящихся клетках, разрабатываемый тест должен различать делящиеся и неделящиеся клетки. Это требование привело нас к выбору метода комет в сочетании с маркером клеточного деления BrUdr. Таким образом, схема эксперимента по оценке эффективности коррекционной репарации в делящихся клетках включает в себя следующие элементы (Таблица 2): использование МНМ в качестве challenge-мутагена, индуцирующего ОбмеГ; использование ингибитора трансферазы ObbzG для подавления прямого восстановления метилированного гуанина метилтрансферазой; использование нейтрального варианта метода комет для детекции двуниевых разрывов через 24 ч после воздействия мутагена; контроль апоптотической гибели: мы для этого использовали ранний показатель инверсии мембранного фосфатидиласерина и поздний показатель – изменение морфологии ядра клетки.

Таблица 2. Операции в опыте по оценке активности MMR

Время, ч	Действия
0	Культивирование 24-48 ч +ObbzG, +МНМ, +BrUdr
24	Вторичные разрывы ДНК (Comet assay); аннексин-позитивные клетки
48	Терминальная фаза апоптоза (морфология, гиподиплоидия)

Эта схема была реализована в опытах на лимфоцитах здоровых периферической крови здоровых доноров. Исследовали покоящиеся и ФГА-стимулированные клетки. Показано, что через 24 ч после внесения мутагена наблюдается формирование двунитевых разрывов в стимулированных лимфоцитах; в это же время наблюдается возрастание частоты аннексин-позитивных клеток; морфологические изменения наблюдаются только в поздний период, через 48 ч; покоящиеся лимфоциты устойчивы к действию метилнитрозомочевины по всем использованным показателям. Эти результаты говорят о том, что (i) вторичные разрывы проявляются спустя 1 цикл репликации (через 24 ч) в результате процессинга безразрывного дефекта ОбмеG, индуцированного метилнитрозомочевинной; (ii) эти разрывы являются сигналом для последующего апоптоза, ранние признаки которого проявляются вскоре после появления разрывов; (iii) морфологические изменения наблюдаются на 24 ч позднее, что характерно для лимфоцитов; (iv) МММ может выполнять роль зонда при оценке активности коррекционной репарации.

Эту методику мы применили к опухолевым клеткам, полноценным и дефектным по коррекционной репарации и обнаружили, как показано на рисунке, убедительную корреляцию выхода вторичных разрывов с наличием в клетках мутаций в системе ММР, т.е. с ожидаемой в них активностью коррекционной репарации (серые столбики на гистограмме).

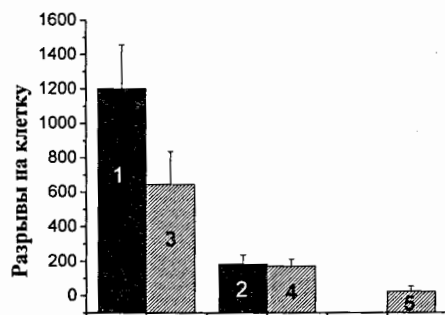


Рис. 1. 1 – Лимфоциты здоровых доноров (n = 10); 2 – лимфоциты больных раком яичников (n = 8); 3 – клетки HeLa, ММР-профитные (n = 6); 4 – клетки COLO320HSR (n = 5); 5 – клетки НСТ116, ММР-дефицитные (n = 8)

Большой интерес представляют результаты, полученные на лимфоцитах крови здоровых доноров и больных спорадическим раком яичников. Эта патология относится к спектру рака толстого кишечника, т.е. характеризуется пониженной

активностью коррекционной репарации. Здесь этот факт представлен со всей очевидностью и убедительностью (черные столбики гистограммы). Таким образом, подход, базирующийся, на использовании МММ как challenge мутагена, позволяет количественно оценивать эффективность коррекционной репарации в клетках. Процедура адаптирована для исследования лимфоцитов крови и показала свою информативность на патологии с ожидаемой недостаточностью механизма коррекционной репарации (спорадический рак яичников).

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ПЕРФУЗИРОВАННОГО СЕРДЦА ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ

Хачатрян Г.И., Гаспарян А.Г., Айрапетян Р.Л., Аракелян Л.Н., Геворкян Г.А.  
Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА, г. Ереван, Армения, kevorg@ipia.sci.am

Креатинфосфокиназный путь трансформации энергии является одним из чувствительных реакций, реагирующий на различные патологии организма. Это было показано на большом клиническом материале исследований больных с инфарктом миокарда, ишемической болезнью сердца, а также при экспериментальном краш синдроме и многих других патологиях [1].

В настоящей работе мы использовали модель изолированного перфузированного сердца (по Лангендорфу) для выявления тонких нарушений, возникающих после тотального гамма облучения организма. В схему эксперимента включали 25-минутную тотальную ишемическую нагрузку. При такой нагрузке не происходит развитие необратимых процессов поврежденного миокарда и после реперфузии сердце легко восстанавливает свою деятельность, тем самым представляется возможность выявления достоверных различий между нормой и облучением.

Эксперименты проводились на беспородных белых крысах-самцах линии Вистар весом 200-250 г. Животных облучали тотально, однократно, в равномерном поле гамма излучения  $^{60}\text{Co}$  на установке "ГУБЭ" в дозе 6,2 Гр при мощности дозы 0,9 Гр/мин. Все эксперименты проводились на второй день после облучения. Тотальную ишемию вызывали путем полного выключения протока перфузируемой жидкости в течение 25 минут. Экстракция, разделение и количественный анализ фосфолипидов из грубой фракции плазматических мембран проводили по методу [2, 3]. Скинирование биопсийного материала 5-7 мг проводили по методу [4].

В работе были исследованы следующие наиболее чувствительные к радиационной патологии параметры дыхания: соотношение скорости АДФ стимулированного дыхания к скорости базального дыхания ( $V_{\text{макс}}/V_{\text{баз}}$ ), процент ингибирования карбоксиатрактилазида % кат =  $100(1 - V_{\text{кат}}/V_{\text{баз}})$ , индекс креатин-стимулированного дыхания  $\text{IKp} = (V_{\text{КР}} - V_{\text{АДФ}}) / V_{\text{АДФ}}$ .  $\text{P}^{31}$ -ЯМР-спектроскопию комбинировано с перфузией изолированного сердца проводили по методу описанному в работе [5]. Проводимые исследования выявили слабое звено креатинфосфокиназного (КФК) пути транспорта энергии. Это митохондриальный пул образования фосфокреатина. Миофибрилярный пул КФК реакции после облучения практически не меняется [6].

Было показано, что после тотального облучения в миокарде фосфокреатин уменьшается на 25 %, константа скорости КФК реакции уменьшается на 18 %, а перенос фосфора от АТФ и фосфокреатина – на 40 % (таблица 1).

Таблица 1. Креатинфосфокиназа-зависимый поток фосфора из креатинфосфата и АТФ при облучении дозой 6,2 Гр

Серии экспериментов	Содержания креатинфосфата (мкмоль·г сух. вес <sup>-1</sup> )	Константа скорости (сек <sup>-1</sup> )	Поток фосфора (F) Креатинфосфат→АТФ (мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·г сух. вес <sup>-1</sup> )	ΔF (мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·г сух. вес <sup>-1</sup> )
Контрольные	26,8±0,8 (6)	0,85±0,04	1375±100(4)	551
Облученные	19,8±0,6 (6)	0,69±0,03	824±56(6)	

Следует отметить также, что после реперфузии у облученных животных вероятность восстановления работы сердца несколько уменьшается. Наблюдается изменение времени наступления постишемической контрактуры.

В этих опытах наблюдается также увеличение концентрации лизофосфолипидов в грубых фракциях плазматических мембран кардиомиоцитов (рис. 1).

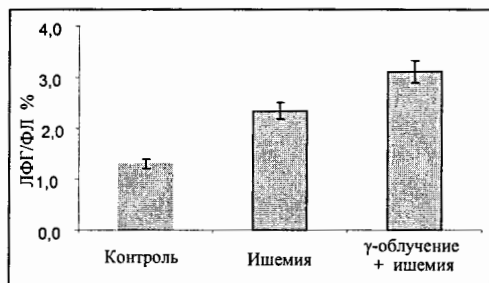


Рис. 1. Изменение лизофосфолипидов в условиях гамма облучения и тотальной ишемии миокарда крысы. ФЛ фосфолипиды, ЛФГ лизофосфолипиды – лизофосфатидилхолин+лизофосфатидилэтанолламин  $P < 0,05$

Однако насколько это влияет на интактность клетки, необходимо оценить методом электронной микроскопии. Состояние митохондрий мы оценили на биопсийном материале методом скинирования сапонином. Скорость базального дыхания на второй день после облучения практически не отличается от скорости контрольного. Однако утверждать на основании этого, что окислительно-восстановительная цепь митохондрий не подавляется ионизирующим излучением, было бы ошибочным, поскольку одновременно незначительное увеличение протонной утечки внутренней мембраны митохондрий мог бы компенсировать базальное дыхание. Это подтверждает и повышенный фон лизофосфолипидов после облучения (рис. 1). Косвенно об этом свидетельствует и тот факт, что после облучения наблюдается небольшое (но достоверное) снижение процентного ингибирования карбоксиатрактилазидом. Наблюдается также уменьшение дыхательного контроля скинированных волокон после облучения.

Как показали эксперименты, самым чувствительным к облучению параметром дыхания является креатиновый индекс. Этот параметр, характеризующий контроль митохондриального дыхания КФК реакции, на второй день после облучения уменьшается более чем в два раза.

Таким образом можно сказать, что если изменения работы митохондриальной КФК обнаруживается уже на второй день после облучения, то миофибриллярная креатинфосфокиназа в этот же период продолжает нормально функционировать. Это и приводит к уменьшению переноса фосфора от АТФ к фосфокреатину в ЯМР исследованиях.

Авторский коллектив выражает глубокую благодарность Рууге Е.К., Штейнштейнеру А.Я. и Лакомкину В.Л. за предоставленную возможность и оказанную квалифицированную помощь при осуществлении ЯМР исследований.

## Литература

1. Kevorkian G.A., Kanayan A.S., Hayrapetyan H.L., Guevorkian A.G., Marukhyan G.L., Avanesyan S.A., Manukyan L.A., Voskanian L.H., Galoyan A.A. In "Biochemical and Molecular-Biological Aspects of the Brain Immune System". Encyclopedia Armenica Publishing House, Yerevan, 2001, 86-94.
2. Folch J. et al. J. Biol. Chem, 1957, v226, p. 497.
3. Vaskovsky et al, J. Chromatogr., 1975, v114, p. 129.
4. Veksler V.J. et al, BBA, 1987, v897, p. 191.
5. Kupriyanov V.V. et al, Symp. On Myocardial Metabolism, 1984, p.297- 324.
6. Хачатрян Г.И. Современные аспекты радиационной медицины, 1992, стр. 5-7.

## ПИГМЕНТИРОВАННЫЕ ДИМОРФНЫЕ БАЗИДИОМИЦЕТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Юрков А.М.

Лаборатория радиационной биологии ОИЯИ, г. Дубна, Россия, yurkov@jinr.ru

Пигменты каротиноидной природы широко распространены у различных организмов: растений, животных и микроорганизмов. Они выполняют функцию «гашения» свободных радикалов, являясь сильными антиоксидантами, а у некоторых прокариотических организмов каротиноиды участвуют в фотосинтезе. Среди представителей царства грибов, видовое разнообразие которых оценивается около 1,5 млн. видов (Hawksworth, 1991; 2001), известны и открываются продуценты новых каротиноидных соединений, к примеру в группе диморфных базидиомицетов (Sampaio, 2004; Madhour, 2005; Юрков и др., 2007).

Пигменты, синтезируемые в норме диморфными базидиомицетами используются в настоящее время в различных областях: сельское хозяйство (аквакультура, окраска желтков яиц), медицина (лечение рака, атеросклероза, последствий облучения). Установлено, что препарат пигмента *астаксантина* значительно ускоряет скорость репараций в эукариотических клетках. Млекопитающие не способны к синтезу каротиноидных пигментов, однако их клетки могут захватывать (например в форме эфиров) и использовать эти соединения. Исследование свойств пигментов, поиск и даже создание новых соединений позволяющих стимулировать репарационные процессы после облучения и выполнять протекторные функции на разнообразные внешние агенты несомненно является важной задачей медицинской и космической радиобиологии.

Диморфные базидиомицеты регулярно выделяются из разнообразных природных местообитаний, в том числе и с неблагоприятными условиями среды. Часто указывалось, что пигментированные микроорганизмы доминируют в местах с повышенной экспозицией к солнечной радиации, таких как филопланна (Fonseca, Inacio, 2006), а также на участках с пониженным содержанием озона (высокогорные регионы). Кроме того, в последнее время новые виды диморфных базидиомицетов неоднократно обнаруживали в местах, многие из которых рассматриваются как экстремальные для микроорганизмов (глубоководные местообитания, автоморфные водоемы) и для живых существ в целом (кислые источники, кольдеры, «черные курильщики») (Sampaio, 2004; Fell et al., 2004).

В то же время механизм устойчивости к разнообразным факторам среды и его связь со способностью к образованию пигментов изучены слабо. Что делает одни и те же широко распространенные виды способными обитать в столь разных природных условиях? Существует ли строгая положительная корреляция между наличием (или количеством) пигментов, каротиноидных или меланоидных, и способностью организма занимать не благоприятные ниши, например с повышенной экспозицией? Каковы пределы устойчивости различных доминирующих видов диморфных базидиомицетов к неблагоприятным факторам внешней среды? Вот только некоторые примеры фундаментальных вопросов современной микробной экологии, которые могут успешно изучаться в радиационной биологии. Диморфные базидиомицеты являются не только отличным объектом фотобиологии, как продуценты каротиноидных фотопротекторов. Они так же

синтезируют вещества микоспорины, которые начали изучать совсем недавно (Libkind, van Broock, 2006). Свойства, роль и возможность практического применения микоспоринов в настоящее время мало изучены. Исследование двух типов соединений протекторов на одном объекте позволит расширить представление о пределах и механизмах толерантности живых существ. Изучение пределов экологической лабильности этой группы живых существ делает ее потенциально идеальным объектом для проведения мониторинговых радиоэкологических исследований на разнообразное антропогенное воздействие.

Успехи последнего времени в области систематики и изучения биоразнообразия грибов указывают на дальнейший рост числа сообщений об обнаружении новых видов диморфных базидиомицетов, среди которых находят потенциальных продуцентов промышленно значимых пигментов. Недавно была успешно проведено скрининговое исследование большого числа штаммов диморфных базидиомицетов, многие из которых не изучались ранее на предмет состава каротиноидов (Юрков и др., 2007). К настоящему времени описано сравнительно много пигментированных видов, однако чаще всего Интересы исследователей концентрируются на пигментах: бета-каротин, торулин, торуло-родин, астаксантин, ликопин. Недавно у представителей диморфного таксона *Dioszegia* был обнаружена способность синтезировать редкий каротиноидный пигмент плектаниак-сантин (Bae et al., 1971; Libkind, van Broock, 2006). Открытие новых соединений у мало изученных таксонов и, следовательно, ранее неизвестных биохимических путей расширяет наше представление о возможностях и пределах существования живых существ. Безусловно, требуется более широкое исследование организмов, ранее попадавших в поле зрения лишь узких специалистов с целью изучения состава и свойств продуцируемых ими каротиноидных пигментов, в том числе с позиции радиобиологических исследований. Протекторные и репаративные функции изопреноидных соединений, в том числе и бесцветных (например, фитоин), особенно интересны в сравнении с уже используемыми астаксантином, бета-каротином.

К настоящему времени известна способность к оптической изомеризации некоторых пигментов каротиноидной природы, которые обнаружены у диморфных базидиомицетов. Обратимая и управляемая оптическая изомеризация привлекает интерес к этим соединениям, а также поиску и селекции потенциальных продуцентов, для использования в перспективных нанотехнологических разработках. Применение биологических молекул, способных к оптической изомеризации, для передачи сигнала в технологии т.н. «биологического компьютера» в перспективе позволит намного увеличить быстродействие вычислительных машин. Возможность применения органических молекул для передачи сигнала была показана на примере соединения родопсин. Однако использование этого вещества осложнено тем, что оно разрушается при повышенных температурах. Пигменты каротиноидной природы более стабильны и могут успешно использоваться в этой технологии.

Диморфные базидиомицеты представляют неоспоримое удобство для экспериментальной работы. Они обладают широким спектром утилизируемых субстратов, т.е. могут расти на разнообразных синтетических средах и даже продуктах пищевых производств. Температурный оптимум у этой группы также очень широкий.

Группа диморфных базидиомицетов является хорошим модельным эукариотическим объектом для последующей экстраполяции данных на клетки млекопитающих и человека. Основные физиологические процессы у них протекают как у высших организмов; культура может расти в одноклеточной форме; среди представителей различных таксонов есть организмы с различным набором хромосом; у ряда видов есть половой процесс. Подходы к генетическому анализу этих грибов достаточно хорошо отработаны и существенно не отличаются от используемых для исследования низших эукариот, к примеру, дрожжей. Некоторые ключевые виды диморфных базидиомицетов используются в международных программах по определению полных последовательностей их генома и созданию эволюционного древа Грибов (AFTOL). Наличие доступных последовательностей, помимо прочего, дает большое преимущество для выбора именно этих организмов в качестве объекта для генетических исследований, в том числе и радиобиологических.

Грибы из группы диморфных базидиомицетов являются перспективным объектом для разнообразных радиобиологических исследований будущего: фотобиологических, радиоэкологических, радиационно-генетических.

#### Литература

1. Bae M., Lee T.H., Yokoyama H., Boettger H.G., Chichester C.O. The occurrence of plectanixanthin in *Cryptococcus laurentii*. // *Phytochemistry*. 1971. V. 10. P. 625–629.
2. Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Sampaio J.P. Basidiomycetous yeasts. In "The Mycota VII part B, Systematic and Evolution" // Springer-Verlag. 2004. P. 3-35.
3. Fonseca A., Inacio J. Phylloplane yeasts. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Series: The Yeast Handbook (Eds. C.A.Rosa and G.Peter) // Springer-Verlag. 2006. P. 263-301.
4. Hawksworth D.L. The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, Significance and Conversation // *Mycological Research*. 1991. V. 95 (6). P. 641-655.
5. Hawksworth D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited // *Mycological Research*. 2001. V. 105 (12). P. 1422-1432.
6. Libkind D., van Broock M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts // *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2006 (in press).
7. Madhour A., Anke H., Mucci A., Davoli P., Weber R.W.S. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Hetero-basidiomycetes, Fungi). // *Phytochemistry*. 2005. V. 66. P. 2617–2626.
8. Sampaio J.P. Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts. In "Frontiers in Basidiomycete Mycology" (Eds. Agerer A., Blanz M. and Piepenbring M.) // IHW-Verlag. 2004. P. 49-80.
9. Юрков А.М., Вустин М.М., Тяглов Б.В., Максимова И.А., Синеокий С.П. Пигментированные базидиомицетовые дрожжи – перспективный источник каротиноидов и убихинона Q-10 // *Микробиология*. 2007 (в печати).

## THE *IN VITRO* MICRONUCLEI AND FISH TECHNIQUES APPLICATION ON HUMAN FIBROBLASTS AND PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AFTER X-RAYS IRRADIATION

Durgaryan A.A.

Yerevan State University, Yerevan, Armenia, a.dourgarian@mail.ru

### Introduction

Ionizing radiation causes very efficiently damage in the genetic material of living cells. The main target of ionizing radiation is DNA, where it induced different types of "lesions" (damages): single strand breaks, double strand breaks, base damages etc. All these alternations can lead to perturbation in the cell cycle, formation of micronuclei, point mutations, chromosome aberrations, cell differentiation or even cell death in the way of necrosis or apoptosis, despite of very efficient DNA-repair systems present in the cells. Repair of radiation damage needs time, so hit cells usually show cell cycle delay and most damaged cells can not enter mitosis. Point mutation and "transmissible" chromosome aberrations like translocation or inversions persist in the cell and could lead to carcinogenesis. Therefore it is important to examine how ionizing radiation influences cells. Several cytogenetics techniques can be used for investigation of the effects of ionizing radiation in the cell systems. The goals of recent study were to reveal and describe the effects of ionizing radiation in human fibroblasts and lymphocytes using basic cytogenetic techniques.

### Materials and Methods

The micronucleus assay is frequently used for purposes of biological dosimetry or as a test for genetic toxicology. Micronuclei (MN) are formed from chromosomal fragments or lagging chromosomes at an anaphase which are not included in the nuclei of daughter cells. Therefore they are visible as distinctly separated objects within the cytoplasm of the daughter cells [1]. We compared MN frequency between control and irradiated cells in human normal fibroblasts.

Almost confluent fibroblasts (AG1522D) were cultivated in minimum essential medium Eagles with Earles salts (EMEM) with a twofold concentration of essential and nonessential amino acids and vitamins. The medium was supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% antibiotics and 1% glutamine at 37 °C. Cells were irradiated with 0, 2 and 6 Gy of X-rays. After 2.5 h cells were trypsinised, counted using a cell counter (CASY company), and seeded into 3 cm Ø Petri dishes at a density of 15000 / 1 Petri dish. Immediately afterwards Cytocholasin B in the concentration of 1 µg/ml was added to block cytokinesis. After 48h and 72h of cultivation, the medium was removed and cells were treated 20 min with 2 ml of 4% paraformaldehyde. Then cells were washed three times with phosphates buffered saline (1xPBS) and treated 7 min with 2 ml of 0.5% Triton X-100. All samples were stained with DAPI 10 µl in 50 ml PBS (DAPI stock solution 1 µl/ml). Cells were scored with a fluorescent microscope. The percentages of binucleated cells were scored (per 1000 cells / slide). The criteria for selecting binucleated (BN) cells were used according to M. Fenech (2000) [2]. MN frequency was scored only in BN cells.

To visualise certain aberration-types like translocations or insertions, which are not visible in Giemsa-stained slides in the irradiated samples of human peripheral blood lymphocytes, fluorescence in situ hybridization (FISH) technique was applied. FISH-

technique is based on the hybridisation of labelled DNA probes to cytological targets such as metaphase chromosomes, interphase nuclei, extended chromatin fibres in a complementary way [3]. With a fluorescence microscope probe binding site on the chromosome can be visualized.

Chromosomes slides of human lymphocytes irradiated with 0 and 2 Gy of X-rays were painted with whole chromosome probe for chromosome 2. The probe was labelled with Fluoresceine (FITC, 2XCP probe, MetaSystems, Germany).

Slides were counterstained with commercially available DAPI + Antifade solution (MetaSystems, Germany). A hundred images (DAPI filter and FITC filter - green color) of metaphase spread both for control and irradiated samples, were captured using Olympus fluorescent microscope and ISIS software (MetaSystems, Germany). All chromosome aberrations involving the painted chromosome 2 were scored. The PAINT system was used to describe chromosome aberration.

## Results

Frequency of BN cells are presented in the Fig.1. The number of BN cells decrease slightly after 48h of cultivation, although at 72 h number of BN cells decrease essentially after irradiation.

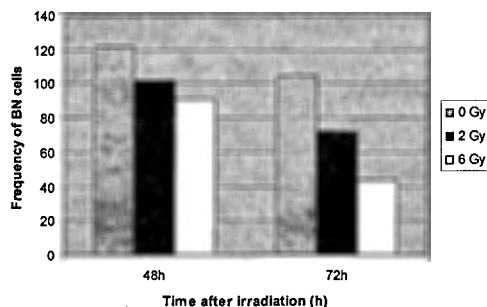


Fig. 1. Frequency of binucleated cells in the samples irradiated with 0, 2 and 6 Gy of X- rays after 48 and 72h of cultivation

MN frequency in the samples irradiated with 0, 2 and 6 Gy is shown in Fig. 2.

Average MN frequency increase of after irradiation at 48 h and 72 h. The greatest rise of MN frequency was in irradiated samples with 6 Gy after 72h of cultivation.

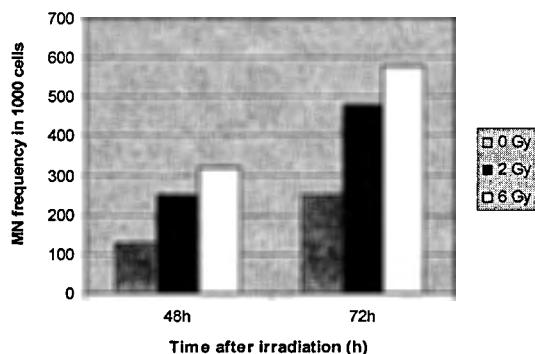


Fig. 2. MN frequency in the samples irradiated with 0, 2 and 6 Gy

In control sample only one translocation was found (total aberration frequency = 1.04/100 mitosis) (Fig3). In the irradiated sample we found 5 translocations, 7 dicent-

rics, 1 centric ring, 3 acentric fragments accompanied by truncated chromosomes and 1 complex aberration. The difference in chromosome aberrations between the control and irradiated samples is obvious, and the same time a Giemsa stain doesn't allow visualizing almost 30% of total aberration-types, like translocations.

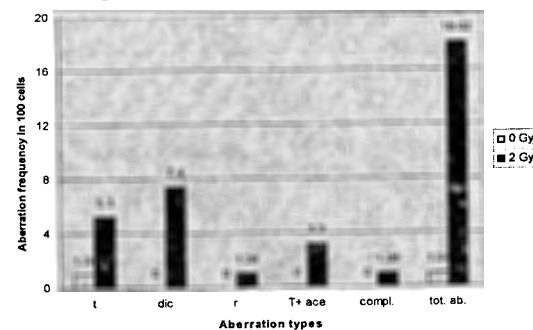


Fig. 3. Aberration frequency involving painted chromosome 2 in control and irradiated human lymphocytes. (t: translocation, dic: dicentric, r: centric ring, T+ ace: truncated chromosome accompanied with acentric fragment, compl.: complex type aberration, tot. ab.: total aberrations)

## Conclusions

In present work we could see the influence of ionizing radiation on the cells using different cytogenetic assays. The techniques used, micronucleus and one-color FISH-assays allow to reveal high level both micronuclei and symmetrical/asymmetrical chromosome aberrations in irradiated samples cells. The techniques used are highly sensitive and adequate to study effects of ionizing irradiation at cellular/chromosomal levels.

## References

1. Countryman P.I., H, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* 41 (1976) 321-331.
2. Fenech M., The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (2000) 81-95.
3. Speicher M.R., Carter N.P., The new cytogenetics blurring the boundaries with molecular biology, *Nature*, 6 (2005) 782-792.



# THE MICRODOSIMETRIC CONSIDERATION OF RBE OF LOW-ENERGY PROTONS ON V79 CELLS

<sup>1</sup>Khvostunov I.K., <sup>2</sup>Hooshang N., <sup>3</sup>Masaharu H. and <sup>4</sup>Shuzo U.

<sup>1</sup>Medical Radiological Research Centre, Obninsk, Russia, 726727@mrrc.obninsk.ru

<sup>2</sup>Center for Advanced Space Studies, NASA Johnson Space Center, Houston, USA

<sup>3</sup>Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

<sup>4</sup>School of Health Sciences, Kyushu University, Japan

The study of relative biological effectiveness (RBE) of low-energy protons and neutrons attracts considerable interest for many scientific fields. The reason of expected increasing the RBE of protons in the energy range of the Bragg peak is still the matter of scientific discussion. Our purpose was to present theoretical results on quantitative modeling of irradiation of V79 cells using track structure of slowing down protons and simulation of initial DNA breaks for investigation a variation of RBE values as a function of initial proton energy.

## Methods

The details of stochastic track structure simulation, estimation of microdosimetry spectra and DNA breaks induction have been published [1-3]. In brief, proton tracks below 1 MeV were simulated with LepHist code [1], and track segments higher 1 MeV with PITS code [2] in liquid water. The codes have been analyzed to provide the reliability on main physical quantities showing good agreement with experimental and theoretical data. The geometry of thin mono-layer have been considered, see fig.1. The shape of V79 cell nucleus was a rotation ellipsoid of 15  $\mu\text{m}$  width and 8  $\mu\text{m}$  high and the thickness between base and nucleus was 1  $\mu\text{m}$  [4]. It was used the description in terms of linear energy  $y = \epsilon / \langle l \rangle$ , where  $\epsilon$  – energy imparted in the target,  $\langle l \rangle$  – mean chord. This value has been recommended by ICRU as a tool, useful for estimation of RBE using dose averaged linear energy,  $y_D$ . Considering that linear energy is defined without reference to track structure it's applicable even if a range of ionizing particle is less than size of a target. We simulated a frequency distribution,  $f(y)$ , of linear energy and irradiation to proton beam at given dose  $D$  as following. The mean number  $\langle N \rangle$  of proton traversals per target area,  $S$ , was  $\langle N \rangle = 6.2 \cdot D \cdot S / \text{LET}$ , where  $D$  in Gy,  $S$  in  $\mu\text{m}^2$ , and LET in  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . The actual number of traversals was extracted from Poisson distribution with expected averaged value  $\langle N \rangle$ .

The microdosimetry spectra of linear energy were calculated using the whole cell nucleus and spherical volume with diameter 1  $\mu\text{m}$  (ICRU sphere) located along the short axis of cell nucleus. Then it was considered the yield of molecular damage which is the result of energy deposition and production of ionized and excited states in a DNA molecular. For this purpose it was used a section of linear DNA of 300 nucleotide pairs randomly orientated with proton beam. The canonical B-DNA was applied for twin

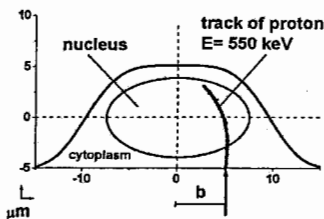


Fig.1. The schematic shape of cytoplasm and nucleus in a V79 cell used in the simulation of monolayer irradiation of cells to proton beam.  $b$  – impact parameter

helix. The volumetric DNA strand breakage model was used to estimate single and double strand breaks (SSB/DSB) [5].

## Results & Discussion

In the Fig. 2 the calculated  $y_F$  and  $y_D$  values using whole cell nucleus are shown as a function of initial energy of proton entering V79 cell. The low-energy protons with energy less 70 keV, are not able to deposition energy in a cell nucleus due to its short range. The calculated values show distinct maximum at 550 keV. The calculated linear energy distributions of 250 keV and 10 MeV protons in ICRU sphere located in a cell nucleus at the nearest point to beam entry are shown in the fig.3. Compared with the whole cell nucleus a linear energy in ICRU sphere is distributed rather broadly, up to 160  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . Such the largest linear energies are the result of  $\square 100$  keV energy deposition that is much less proton energy entering a cell. Besides, in the contrast with whole cell nucleus case, for ICRU sphere the  $y_F$  value is about twice less  $y_D$ .

It was pointed out that cellular effects of ionizing radiation should be determined by ionization clusters at the level of DNA molecule, rather than at the level of micrometers sensitive volumes [6]. Therefore the simulation of initial DNA breaks was carried out to test the hypothesis whether SSB/DSB do or do not correlate with observed biological effectiveness. It was calculated the yields of DNA breaks using geometry when protons expose segment of DNA straightforwardly.

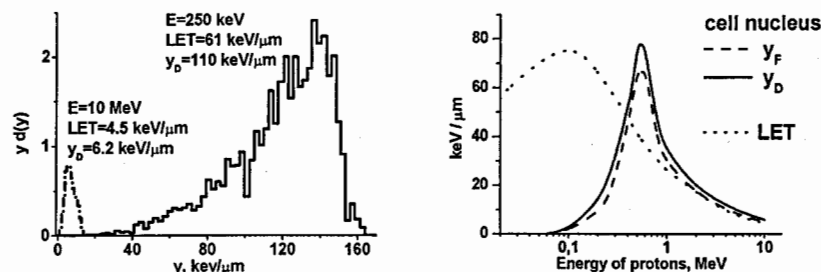


Fig. 2. Calculated frequency averaged,  $y_F$ , and dose averaged,  $y_D$ , values using a cell nucleus as a function of initial proton energy. The dot line represents LET of  $y_D(y)$ , so the area under the curves equals to dose averaged,  $y_D$ , value. The structures in the curves are of statistical nature

Fig. 3. Calculated linear energy distributions in a cell nucleus at the nearest point from proton beam entry. Shown is  $y_D(y)$ , so the area under the curves equals to dose averaged,  $y_D$ , value. The structures in the curves are of statistical nature

In the Fig. 4 the yields of DNA breaks per Gray per Dalton simulated in short DNA segment are shown as a function of initial energy of proton and classified on complexity [7]. Those results were calculated to show the shape of different DNA breaks as a function of proton energy.

Calculated spectra of linear energy and averaged values using cell nucleus, see Fig.2, obviously show the difference between LET and mean linear energies especially for very low-energy protons. The distribution of linear energy of 250 keV protons calculated using ICRU sphere, Fig.3, extends up to 160  $\text{keV}/\mu\text{m}$  showing the peak at 140  $\text{keV}/\mu\text{m}$ , that corresponds absorption of 93 keV. At that protons with energy 50 keV, which range is about 1  $\mu\text{m}$  give the linear energy just 75  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . So, the maximal linear

energies result from protons with initial energies in the order of Bragg peak crossing the sphere with maximal pathlength. In other words, the largest linear energies in the ICRU sphere are the result of so called "crossers" but not from the "stoppers" (particles full slowing down inside the target).

It can be clearly seen from fig.4 that sum of all single breaks (SSB) and simple single breaks (ssb) show monotone increasing curves in the range from 70 keV to 10 MeV whilst complex single breaks (ssb+ and 2ssb) show the curve with maximum. The sum of double breaks (DSB) and the complex breaks (dsb+, dsb++) also show the curves with maximum at about 0.2 MeV.

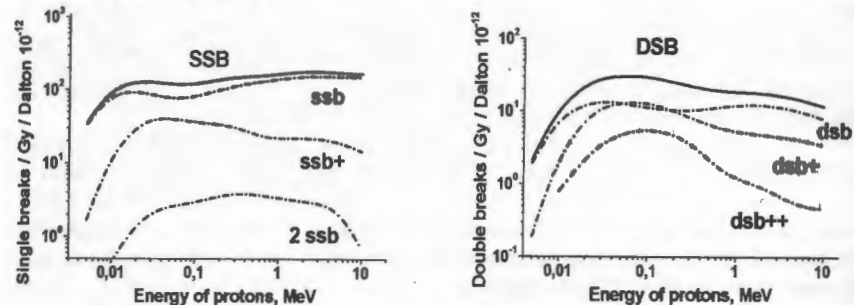


Fig. 4. Simulated yields of DNA breaks: SSB and DSB classified on complexity and shown as a function of energy of proton affected straightforwardly on a DNA segment

The results shown in fig.4 are the clear illustration of the following statements: (i) sensitive sites for cell lethality (transformation) are located in the cell nucleus and (ii) the complex DSB are the most relevant initial lesions leading to cell killing or transformation. The most efficient for delivering absorbed energy in whole V79 cell nucleus are the protons with incident energy of 550 keV. At that the protons with 200 keV were found to be the most efficient in order to induce a complex double strand breaks of DNA affecting DNA straightforwardly. Those calculated numbers are in the range of experimental  $RBE_{MAX}$  values (not shown).

#### References

1. Uehara S., Toburen L.H. and Nikjoo H. (2001) *Int. J. Radiat. Biol.* 77: 139-154.
2. Wilson W.E., Miller J.H. and Nikjoo H. (1993) – Plenum. Press. New York. 138-150, 1993.
3. Khvostunov I.K., Andreev S.G. and Eidelman Yu.A. (2002) *Radiat. Prot. Dos.* 99: 151-152.
4. Townsend K.M.S. and Marsden S.J. (1992) *Int. J. Radiat. Biol.* 61: 549-551.
5. Charlton D.E., Nikjoo H. and Humm J.L. (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* 56: 1-19.
6. Goodhead D.T. (1994) *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 7-17.
7. Nikjoo H., O'Neil P., Terrisol M. and Goodhead D.T. (1999) *Radiat. Environ. Bioph.* 38: 31-38.

### BACTERIAL EFFECTS OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC IRRADIATION WITH EXTREMELY HIGH FREQUENCY: PHENOMENON, EFFECTS OF ANTIBIOTICS AND MECHANISMS

Tadevosyan H., Trchounian A.

Department of Biophysics, Biological Faculty of the Yerevan State University, Yerevan, Armenia, Trchounian@ysu.am

The electromagnetic irradiation (EMI) of extremely high frequencies, or millimeter waves, with low-energetic intensity and with non-thermal action, is widely used in tele-communication technology and therapeutic practice (for reviews, see [1-2]) although low-orbital systems of cosmic communication and different elements of mobile one, and in addition, devices used in therapeutic practice radiate EMI of this frequency, small and very small doses of which (low flux capacity of  $0.005 \text{ mW/cm}^2$ ) affects living cells and organisms, including bacteria. This is of interest because bacteria and the other cells can interact with each other through EMI (for review, see [2]). In such respect, it has been shown, for instance, that bacteria possess the ultrasonic radiation [3] or reemission of secondary photons in sub-millimeter frequency range [4].

The coherent and "noise" (with broadband frequencies and accidentally changing phases) EMI of extremely high frequencies with low intensity have been shown to cause different, including bactericidal effects on *Escherichia coli* and the other bacteria [1-2, 5-9].

Here, the results on phenomenon and possible mechanisms of irradiation of *E. coli* K12 by coherent EMI with the frequency of 51.8 and 53 GHz are presented.

The methods of determination of bacterial growth specific rate under anaerobic conditions upon fermentation of glucose and of growth log-phase duration as well as of the changes in membrane properties by direct irradiation with coherent EMI of the frequency of 51.8 and 53 GHz with low intensity (flux capacity of  $0.06 \text{ mW/cm}^2$ ) (generator G4-141 assembled in the Institute of Radiophysics and Electronics of the NAS of Armenia, Ashtarak City) have been detailed elsewhere [7, 10-11].

The irradiation of bacteria by EMI at the frequency of 51.8 or 53.0 GHz led to a significant decrease in the specific rate of bacterial growth, the inhibitory effect was reinforced with time of the irradiation of 30 min to 1 h (Fig. 1). Such results comply with those that the frequency of 51.8 GHz is resonant for *E. coli* [12] and, on the other side, the exposition of 1 h is enough effective to inhibit bacterial growth [7-8]. The resonance, in which proteins and other macromolecules can be entered, might be a basis of membranous and the other mechanisms of the action of EMI of extremely high frequency on bacteria.

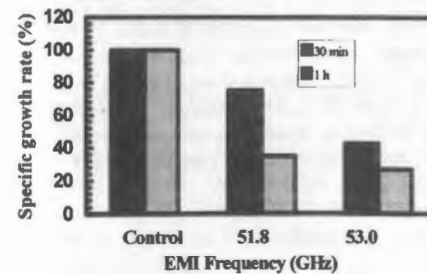


Fig. 1. The *E. coli* K12 growth rate changes after irradiation by EMI at the frequency of 51,8 and 53 GHz. Bacteria were grown in peptone medium with 0.2 % glucose at pH 7.5 under anaerobic conditions [10] after direct irradiation of 30 min or 1 h. Average data (in %) of 2-3 measurements are represented, standard errors are less than 3 %

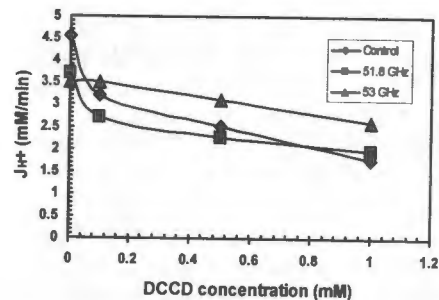


Fig. 2. The changes in inhibitory effect of DCCD on  $H^+$  fluxes from *E. coli* K12 after irradiation with EMI of the frequency of 51.8 and 53 GHz. The irradiation time was 1 h, for the others see the legends to Fig. 1

Importantly, sensitivity of bacterial cells to reagents like *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), inhibitor of the  $H^+$ -transporting  $F_0F_1$ -ATPase, was decreased. Indeed, inhibitory effect of DCCD (in concentrations of 0.1 to 1 mM) on  $H^+$  fluxes markedly decreased after irradiation of bacteria with EMI at the frequency of 51.8 or 53 GHz (Fig. 2) in spite of different values of  $H^+$  fluxes (not shown). A less sensitivity to DCCD could result from conformational changes in subunits of the  $F_0F_1$ -ATPase [13] having a key role in effects of EMI on bacteria.

Furthermore, a changed sensitivity to DCCD is of interest to detect changes in inhibitory effects of antibiotics on bacteria. Tetracycline and chloramphenicol were really effective to decrease the *E. coli* growth specific rate under fermentative conditions (Figs. 3 and 4): the effects of these antibiotics were obtained in a concentration-dependent manner (Fig. 3). But the irradiation of bacteria by EMI had changed the following growth in the presence of these antibiotics: the elevated decrease in the growth rate and the increased log-phase duration were determined (Fig. 4).

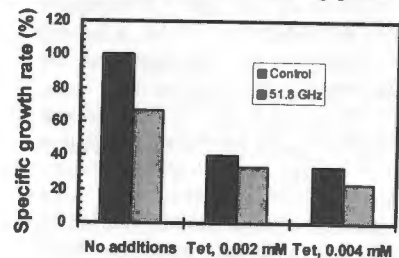


Fig. 3. Effects of tetracycline (Tet) and EMI irradiation with the frequency of 51.8 GHz on the *E. coli* K12 growth. The specific growth rate without addition and irradiation was 100%. In control, no irradiation; for the others see the legends to Fig. 2

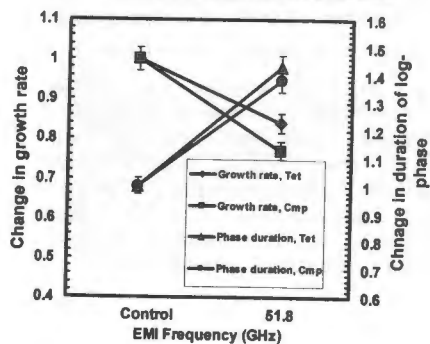


Fig. 4. Effects of EMI irradiation with the frequency of 51.8 GHz on the *E. coli* K12 growth rate and log-phase duration in the presence of antibiotics. 2  $\mu$ M tetracycline (Tet) or 2  $\mu$ M chloramphenicol (Cmp) were added into the growth medium. In control, no irradiation, standard errors are represented; for the others see the legends to Fig. 3

In addition to sensitivity to DCCD, these data indicate change in sensitivity of bacteria also to antibiotics detected. In the other words, irradiation of bacteria by EMI at the frequency of 51.8 GHz enforced the inhibitory effects of antibiotics. This seems to be in accordance with results that EMI of extremely high frequency with non-thermal intensity could change the *Staphylococcus* sensitivity to various antibiotics affecting membranous properties [6].

To confirm membranous effects of EMI of the extremely high frequency, this EMI upon irradiation duration of up to 1 h was shown to cause marked changes in  $H^+$  conductance of the membrane (decrease in  $\sim 1.7$ -fold), energy-dependent  $H^+$  and  $K^+$  transporting fluxes across the membrane (increase in  $\sim 1.4$ -fold), including via the  $H^+$ - $F_0F_1$ -ATPase, by *E. coli* whole cells. Membrane potential values ( $\sim -145$  mV) had no marked changes. The production of  $H_2$  by whole cells became less (blocking in  $\sim 8$ -fold). Moreover, the decrease in total and DCCD-inhibited ATPase activity of membrane vesicles after irradiation of bacteria was determined.

In concluding remarks, these results are mentioned to confirm input of membranous changes in bacterial action of low intensity EMI of extremely high frequency, when the  $F_0F_1$ -ATPase is playing probably a key role, although action of this EMI is offered also on structure and properties of water [1, 14-15] leading, for instance, to increase in chemical activity of water or hydration of proteins and other cellular structures. These could also relate to modifications of structure, properties and function of membrane proteins. So a target role of the  $F_0F_1$ -ATPase suggested might be following the changes in water properties.

It should be noted that, additionally, conformational changes in bacterial genome or DNA are also suggested [16]. Moreover, bactericidal effect might be determined by transition of bacterial pro-phages from lysogenic to lytic state [12].

The effects of such EMI can be a result of resonant interaction, when in case with *E. coli* it is shown that, regardless of intensities of EMI of extremely high frequency, resonance is at the frequencies of 41.5, 51.8 or 70.6 GHz [12, 16]; other resonant frequencies are not ruled out. However, the effects of EMI on *E. coli* and the other bacteria, especially primary cellular mechanisms of these effects, require a further study.

The effects of this EMI are also of significance to understand distinguishing role of bacteria in biosphere leading to changed metabolic pathways and, for instance, to antibiotics resistance. It is possible to use EMI for product protection from bacteria too.

The authors thank L. Arutyunyan and K. Akopyan for help in some experiments, and Dr. V. Kalantaryan for generator of EMI used and valuable advice. This study was done within the framework (Grant #0167) supported by Ministry of Education and Science of the Republic Armenia.

## References

1. Bechkii O.V., Devytakov N.D., Kislov V.V., *Crit Rev. Biomed. Eng.* 28 (2000) 247-268.
2. Trushin M.V., *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36 (2003) 153-160.
3. Matsushashi M., Pankrushina A.N., Takeuchi S., Ohshima H., Miyoi H., Endoh K., Murayama K., Watanabe H., Endo S., Tobi M., Mano Y., Hyodo M., Kobayashi H., Kaneko T., Otani S., Yoshimira S., Harata A., Sawada T., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44 (1998) 49-55.

4. Alipov E.D., Scheglov V.S., Sarimov R.M., Belyaev I.Ya., *Radiat. Biol. Radioecol.* 43 (2003) 167-171.
5. Gub N.M., Luneva I.O., Denisova S.N., Ostrovsky N.V., In *Millimeter waves in medicine and biology*. 10<sup>th</sup> Russian Symp. with intern. participation. Moscow, 1995. P. 96 (in Russian).
6. Bulgakova V.G., Grishina V.A., Orlova T.I., Petryakina Z.M., Polin A.N., Noks P.P., Kononenko A.A., Rubin A.B., *Biophysica*. 41 (1996) 1289-1293.
7. Trchounian A., Ogandzhanyan E., Sarkisyan E., Gonyan S., Oganesyanyan A., Oganesyanyan S., *Biophysica*. 46 (2001) 69-76.
8. Isakhanyan V., Trchounian A., *Biophysica*. 50 (2005) 604-606.
9. Novoselova E.G., Glushkova O.V., Sinotova O.A., Fesenko E.E., *Dokl. Russ. Acad. Sci.* 401 (2005) 117-119 (in Russian).
10. Trchounian A., Ohandjanyan E., Bagramyan K., Vardanyan V., Zakharyan E., Vassilian A., Davtian M., *Biosci. Rep.* 18 (1998) 143-154.
11. Akopyan K., Trchounian A., *Cell Biochem. Biophys.* 46 (2006) 201-208.
12. Belyaev I.Ya., Scheglov V.S., Alipov Y.D., Polunin V.A., *Bioelectromagnetics*. 17 (1996) 312-321.
13. Nakamoto R.K., Ketchum C.J., Kuo P.H., Al-Shawi M., *Biochim. Biophys. Acta*. 1458 (2000) 289-299.
14. Fesenko E.E., Geletyuk V.I., Kazachenko V.N., Chemeris N.K., *FEBS Lett.* 366 (1995) 49-52.
15. Tadevosyan H., Kalantaryan V., Trchounian A., In *Biological Effects of Electromagnetic Fields*. Proceedings of 4<sup>th</sup> Intern. Workshop, Crete (Greece). 2006. P. 1307-1314.
16. Belyaev I.Ya., Alipov Y.D., Scheglov V.S., Lystsov V.N., *Z. Naturforsch.* 47 (1992) 621-627.

## СОДЕРЖАНИЕ ВЫСТУПЛЕНИЯ

Григорьев А.И.	13
<span style="border: 1px solid black; padding: 1px;">Платэ Н.А.</span>	17
Газенко О.Г.	20
Ильин Е.А.	23
Галоян А.А.	28
Хомич В.Ю.	33
Смбатян А.Б.	34
Бадарч Дендев	35
Мазуренко С.Н.	37
Сисакян А.Н.	38
<b>ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ</b>	
Карапетян Н.В. Фотосинтез и фотозащита у цианобактерий	43
Кутлахмедов Ю.А., Корогодин В.И., Родина В.В. Проблемы и направления современной радиозоологии	46
Лебедев М.А. Вклад академика Н.М. Сисакяна в становление и развитие Пагуошского движения ученых	49
Попов В.О., Юрина Н.П. Академик Н.М. Сисакян и его вклад в развитие биохимии	53
Шафиркин А.В. Радиобиологические основы нормирования при длительных межпланетных космических полетах	58
Штемберг А.С. Проблемы оценки функциональных изменений в центральной нервной системе, вызванных ионизирующими излучениями в условиях космического полета	79
Galoyan A.A. The brain neuroendocrine immune system: biosynthesis of antibacterial peptides	88
<b>СЕКЦИЯ "БИОХИМИЯ"</b>	
Антропова И.Г., Фенин А.А., Ревина А.А., Хашба Е.В. Радиационно-химические превращения кумаринов в водно-органических системах	111
Бабаян Ю.С., Тадевосян А.А., Канарян Г.Л., Казарян Р.С., Маркарян А.Ш., Орбелян С.Д. Исследования связывания противоопухолевых соединений митоксантрона и аметантрона с ДНК, заранее облученной миллиметровыми электромагнитными волнами	115
Бабаян Ю.С., Тадевосян А.А., Канарян Г.Л., Калантарян В.П. Влияние когерентного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на плотность растворов ДНК	118
Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э., Линник Ю.И. Темпы эволюционных изменений и насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ класса 3 мыши и человека	121
Годовых Т.В., Годовых В.В. Особенности липидного и углеводного обмена у детей Чукотки	125
Голуб Н.В., Маркосян К.А., Шолух М.В., Касилович Н.В., Клейменов С.Ю., Левицкий Д.И., Курганов Б.И. Кинетика тепловой инактивации и денатурации митохондриальной аспаргатаминотрансферазы	128
Гумилевская Н.А., Азаркович М.И. Синтез белка в покоящихся рекальцитрантных семенах конского каштана	132
Ермохина О.В., Юрина Н.П. Определение устойчивости к окислительному стрессу дикого и мутантных штаммов зеленой водоросли <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	135

путем их биохимической характеристики		Strizh I.G. The network assembling of the redox signaling pathways: signal role of the oxygen photoreduction in chloroplast	219
Замятин А.А., Борчиков А.С. Являются ли фрагменты белков природными регуляторными олигопептидами?	139	<b>СЕКЦИЯ “КОСМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА”</b>	
Камнев А.А. Ядерная химия в энзимологии: новое применение эмиссионной спектроскопии ядерного гамма-резонанса для структурных исследований активных центров ферментов	143	Алчинова И.Б. Характер адаптивного ответа лимфоцитов, аномалий ядра буккальных эпителиоцитов и метаболических сдвигов у летчиков с различным стажем	227
Кириченко Е.Б., Орлова Ю.В., Курилов Д.В. Динамика накопления и состав эфирных масел морфотипов <i>Artemisia Lercheana</i> Web. Ex stechm. флоры Юго-Востока России	147	Африкян Э.К. Некоторые микробиологические аспекты биоповреждений полимерных материалов космической техники	231
Киселев М.А. Конформация молекул церамида 6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи млекопитающих – <i>stratum corneum</i>	153	Воейкова Т.А., Табаков В.Ю. Сравнительный анализ влияния факторов космического полета на жизнедеятельность микроорганизмов при краткосрочных полетах	238
Маргарян А.С., Овсепян Л.М., Бадалян Б.Р., Симонян А.А. Специфика изменения интенсивности течения процессов перекисного окисления липидов в различных биологических системах организма при экспериментальном циррозе печени	158	Заичкина С.И., Розанова О.М., Ахмадиева А.Х., Аптикаева Г.Ф., Смирнова Е.Н., Сорокина С.С., Романченко С.Н., Вахрушева О.А., Пелешко В.Н. Особенности действия малых доз излучений, моделирующих радиационное поле в условиях авиационных и космических полетов, на мышцах <i>in vivo</i>	242
Маркосян Л.С., Паронян А.Х., Оганесян Р.С., Мамян С.С. Экзоолисахариды фототрофных микроорганизмов	161	Карганов М.Ю., Панкова Н.Б., Ежова О.А., Комаров А.В. Полисистемная оценка функциональных характеристик здоровья летного состава ВВС	246
Маркосян К.А., Голуб Н.В., Ханова Е.А., Муранов К.О., Островский М.А., Асриянц Р.А., Муронец В.И., Касилович Н.В., Шолух М.В., Юдин Ю.К., Курганов Б.И. Механизм подавления агрегации белков $\alpha$ -кристаллином	165	Smirnova O.A. Radiation effects on small intestine epithelium system: mathematical modeling	250
Мкртычан М. ДНК-вакцина на основе нового СТ антигена BORIS защитит иммунизированных животных от РМЖ	169	<b>СЕКЦИЯ “ОБЩАЯ И КОСМИЧЕСКАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ”</b>	
Немых М.А., Добров Е.Н. Стабильность X-вируса картофеля и его белка оболочки: действие разупорядочивающих агентов	174	Авакян Ц.М., Минасян М.А. Использование синхротронного излучения в клеточной радиобиологии (синхротронная радиобиология)	257
Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Коростылева Т.В., Козловская Г.В., Пухальский В.А. Исследование дефензинов пшеницы <i>Triticum Kiharae dorof. et Migusch</i>	178	Андриевская Д.В., Кошечева К.Е., Фенин А.А. Определение радиопротекторных свойств фенольных веществ по отношению к дрожжам <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	264
Олескина Ю.П., Белкина Г.Г., Юрина Н.П. Идентификация белков нуклеоидов хлоропластов <i>Arabidopsis Thaliana</i> методом масс-спектрометрии	181	Барковский Е.В., Хрусталёв В.В. Асимметричное мутационное давление у одноцепочечных РНК вирусов	268
Осипенкова О.В., Юрина Н.П. Влияние ретроградных сигналов на экспрессию ядерных генов стрессового белка пластид <i>Elip</i> и генов белков фотосинтеза <i>Lhcb 1, RbcS</i>	184	Белов О.В. Подходы к математическому моделированию индуцированного мутационного процесса у бактерий <i>Escherichia Coli</i>	272
Останина Е.С., Варламов В.П., Яковлев Г.И. Ингибирование активности липолитических ферментов низкомолекулярным хитозаном	187	Близнюк У.А., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Черныш А.М., Козлов А.П., Ермаков А.Н. Воздействие различных физико-химических факторов (ионизирующее излучение, лекарственные препараты) на биологические мембраны	276
Панин Л.Е., Гимаутдинова О.И. Роль метаболитов стероидных гормонов в комплексах с аполипопротеином А-I в процессах регенерации	190	Ватлизов Д.В., Клепко А.В., Андрейченко К.С., Нуриченко Н.Е., Андрейченко С.В. Особенности развития клеточной гибели в сперматозоидах животных при лучевом воздействии	280
Паронян А.Х., Маркосян Л.С. Влияние аминокислот на биосинтез каротиноидов <i>Rhodospseudomonas Palustris</i> , шт. Д-6	194	Гапиенко О.Ю., Говорун Р.Д., Кошлянь Н.А., Кошлянь И.В., Юрков А.М. Молекулярно-генетический подход для исследования геномной нестабильности радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов клеток китайского хомячка	283
Проценко М.А., Буза Н.Л., Буланцева Е.А., Кораблева Н.П. Роль белкового ингибитора полигалактуроназы в растении	197	Григоркина Е.Б., Пашнина И.А. Радиорезистентность и реакция грызунов на хроническое радиационное воздействие в малых дозах (Восточно-Уральский радиоактивный след)	286
Скрипников А.Ю., Газарян И.Г. Прикладные и фундаментальные аспекты изучения пероксидазы в культивируемых клетках растений	200	Давтян М.А., Навасардян Л.А., Барсегян Э.Х., Арцруни Н.А., Марутян С.В., Григорян Р. Белковые фракции организмов при экстремальных состояниях	289
Срапионян Р.М., Паронян З.Х. Нейроспецифические кардиоактивные белок-гормональные комплексы, биорегуляции и перспективы их применения в медицине	204	Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б. Биохимико-цитогенетические изменения в крови у людей, подвергшихся радиационному воздействию в малых дозах	297
Юрина Н.П., Одинцова М.С. Передача сигналов от хлоропластов к ядру у высших растений и водорослей	207	Зайцева Е.М., Деперас-Каминьска М. Изучение индивидуальной радиочувствительности на лимфоцитах периферической крови человека при воздействии ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ	301
Ispirian K.A., Ispiryun R.K. Possible mechanism of yawning and its infectiveness	210		
Sargisova Y.G., Andreasyan N.A., Harutyunyan H.A., Hairapetyan H.L. The oxidative stress as a possible regulator of ADA2 activity	212		
Skripnikov A., Zryd Jean-Pierre. Moss protoplast is a biophysical model to study the mechanisms of orientation of plant cytokinetic apparatus	215		

Исаева Н.Р., Куротченко Л.В., Терешкина О.В., Субботина Т.И., Яшин А.А. Влияние ЭМИ КВЧ на репродуктивный процесс и постэмбриональное развитие потомства мышей линий C57/B16 и Balb	304
Колтова Н.А. Участие комплексов CDC28, SAGA и RENT в регуляции резистентности клеток к действию ионизирующей радиации	309
Кошлань Н.А., Говорун Р.Д., Кошлань И.В. Хромосомная нестабильность HPRT-мутантов, индуцированных ионами азота ( $^{14}\text{N}$ ) и лития ( $^7\text{Li}$ )	315
Мезен Н.И., Федулов А.С., Квачева З.Б., Шадыро О.И. Механизмы нейропротекторного действия производных двухатомных фенолов при гипоксическом повреждении астроцитов <i>in vitro</i>	318
Рябченко Н.И., Насонова В.А., Фесенко Э.В., Кондрашова Т.В., Антошина М.М., Павлов В.В., Рябкина Н.В. Мультиабберрантные клетки и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови больных лимфогранулематозом	321
Тронов В.А., Крамаренко И.И., Козлова А.Д., Красавин Е.А. Метилнитрозомочевина challenge-мутаген в оценке активности коррекционной репарации ДНК (MMR): связь с некоторыми видами рака	324
Хачатрян Г.И., Гаспарян А.Г., Айрапетян Р.Л., Аракелян Л.Н., Геворкян Г.А. Митохондриальные нарушения изолированного перфузированного сердца после гамма-облучения	327
Юрков А.М. Пигментированные диморфные базидиомицеты – перспективный объект для радиобиологических исследований	330
Durgaryan A.A. The <i>in vitro</i> micronuclei and fish techniques application on human fibroblasts and peripheral blood lymphocytes after X-rays irradiation	333
Khvostunov I.K., Hooshang N., Masaharu H., Shuzo U. The microdosimetric consideration of rbe of low-energy protons on V79 cells	336
Tadevosyan H., Trchounian A. Bacterial effects of low-intensity electromagnetic irradiation with extremely high frequency: phenomenon, effects of antibiotics and mechanisms	339

Научное издание

**ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ, РАДИАЦИОННОЙ  
И КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**  
Труды III Международного симпозиума

**PROBLEMS OF BIOCHEMISTRY,  
RADIATION AND SPACE BIOLOGY**  
Proceedings of the III International Symposium

Д19-2007-121

Ответственный за подготовку сборника к печати *И. В. Кошлань*.

Сборник отпечатан методом прямого репродуцирования с оригиналов, предоставленных оргкомитетом.

Подписано в печать 28.09.2007.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 21,25. Уч.-изд. л. 21,78. Тираж 300 экз. Заказ № 55900.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.  
E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)  
[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)