

УДК 598.1:577

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В СОВРЕМЕННОЙ ГЕРПЕТОЛОГИИ

**Н.М. Айвазян**

*Ереванский государственный университет  
Армения, 375025, Ереван, А. Манукяна, 1  
E-mail: vipradde@yahoo.com*

Поступила в редакцию 18.11.2007 г.

Исследована спонтанная и фотоиндуцированная хемилюминесценция (ХЛ) гомогенатов и общей фракции липидов нервной, сердечной, печеночной и мышечной тканей представителей амфибий и рептилий, а также перекисное окисление липидов, активность фермента супероксиддисмутазы (СОД) и электрические параметры искусственных липидных мембран (БЛМ) из липидов указанных тканей позвоночных. Показано, что уровни свечения гомогенатов и липидов выше в мозге земноводных по сравнению с рептилиями. Это подтверждается также уменьшением активности СОД, сопровождающим подобное изменение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ходе филогенеза. Полученные данные свидетельствуют о наименьшей степени электрической проводимости БЛМ из липидов мозга по сравнению с искусственными мембранами из липидов сердца, печени и мышц, что, очевидно, связано с высоким содержанием холестерина в нервной ткани. Показано, что проницаемость БЛМ из липидов мозга амфибий ниже, чем у пресмыкающихся.

**Ключевые слова:** хемилюминесценция, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутазы, бислоиные липидные мембраны.

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие современной биологии давно уже переросло рамки отдельных дисциплин и все чаще предъявляет требования к интеграции существующих возможностей и методов. Применительно к герпетологии биофизические методы до сих пор практически не использовались, но наши исследования в данной области в последние несколько лет позволяют утверждать о важности их применения для более глубокого понимания филогении и стратегии биохимической адаптации наземных пойкилотермных позвоночных (Айвазян и др., 2002; Закарян и др., 2003; Zakharian et al., 2003).

Обширный массив данных по биохимическому составу тканей позвоночных позволяет с определенностью заключить, что несмотря на большую разницу в физиологии между представителями различных классов позвоночных, липидная ткань, являясь наиболее консервативным структурным компонентом живых организмов, претерпела ничтожно малые изменения за сотни миллионов лет эволюции от рыб до млекопитающих (Забелинский и др., 1989, 1998; Шульдин, 1983).

Земноводные занимают особое место среди других животных, так как являются первыми наземными позвоночными. Изменения на уровне биохимии липидов у этих животных представляются крайне незначительными (Крепс, 1981). Возникает вопрос: как один универсальный набор липидов оказывается в состоянии обеспечить функционирование органов животных, настолько различающихся друг от друга по процессам жизнедеятельности? Ответ на этот вопрос может дать изуче-

ние процессов, влияющих на состояние липидных мембран, изменение их пластических свойств. Наиболее важную роль в процессах жизнедеятельности играют реакции свободнорадикального окисления (СРО) липидов, уровень которых обуславливает явление хемилюминесценции (ХЛ) в тканях. В качестве адекватной модели липидных мембран, удобной для изучения их пластических свойств, выступают искусственные бислойные липидные мембраны (БЛМ), сформированные из природных липидов исследуемых тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были исследованы земноводные двух видов: озерная лягушка – *Rana ridibunda* (15 экз.) и зеленая жаба – *Bufo viridis* (12), а также пресмыкающиеся четырех видов: желтопузик – *Pseudopus apodus* (5), кавказская агама – *Laudakia caucasia* (9), средняя ящерица – *Lacerta trilineata* (8) и водяной уж – *Natrix tessellate* (7). Декапитацию и отделение мозга, сердца, печени и поперечно-полосатых мышц производили на холоде. Выбор тканей продиктован их происхождением из различных зародышевых листков: ткани головного мозга развиваются из эктодермы, печеночная ткань – из энтодермы, мезодерма служит основой для развития всех видов механической ткани. Ткани промывали струёй дистиллированной холодной воды и гомогенизировали в аппарате Поттера-Эльвехейма в буферном растворе (0.175 М КСl, 0.025 М Трис-НСl, рН = 7.4) с конечной концентрацией 20 мг сырого веса ткани на 1 мл буфера. Измерение интенсивности ХЛ проводили с помощью квантометрической установки, работающей на основе фотоэлектронного умножителя ФЭУ-139 с диапазоном спектральной чувствительности 300 – 800 нм (Закарян и др., 1990). Измерение фотоиндуцированной ХЛ проб производили после облучения УФ-лампой MEDICOR, Q-439, BUDAPEST (экспозиция – 2.5 мин, расстояние до кюветы – 5 см).

О накоплении продуктов СРО липидов (МДА) судили по тесту с 2-тиобарбитуровой кислотой, проводимому на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 532 нм (Стальная, Гаришвили, 1985). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу (Макаревич, Голиков, 1983), основанному на способности фермента тормозить реакцию аутоокисления адреналина при рН = 10.2 (длина волны – 480 нм).

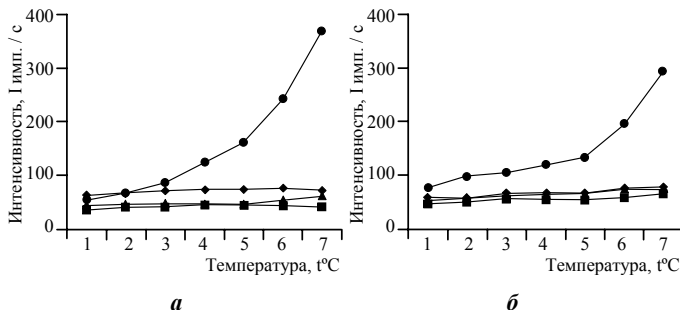
Фракцию общих липидов из тканей выделяли по методике Кейтса (1975). Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали на тефлоновой апертуре по методу Рудина (Mueller, Rudin, 1968). Электрические параметры БЛМ измеряли при помощи электрометрической установки на базе дифференциального усилителя с обратной связью «Keithley-301». В качестве среды использовали раствор 0.1М КСl.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с применением критерия Стьюдента – Фишера. Результаты представлены в виде  $M \pm S.E.M.$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе экспериментов исследовалась температурная зависимость спонтанной ХЛ (СХЛ) тканевых образцов различных классов позвоночных в диапазоне от 25 до 60°C (рис. 1). Как видно из приведенных данных, наибольшее све-

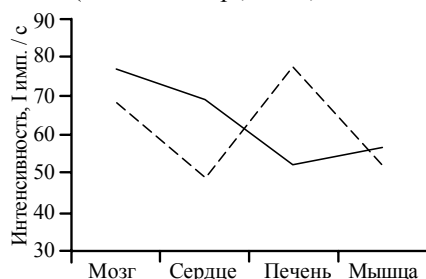
чение в обоих случаях наблюдается в гомогенатах мозга. Вид кривой роста свечения при повышении температуры характерен для каждого класса позвоночных и может дать информацию о течении процессов СРО в исследуемом организме. В первую очередь налицо весьма низкий уровень процессов перекисного окисления липидов у рассмотренных классов позвоночных, особенно в мозге рептилий (в сравнении с др. классами (Айвазян и др., 2002)). Увеличение свечения по мере повышения температуры является критерием изменения микровязкости липидов в составе мембран в режиме реального времени.



**Рис. 1.** Зависимость спонтанной ХЛ гомогенатов тканей амфибий (а) и рептилий (б) от температуры: ● – мозг; ▲ – сердце; ■ – печень; ◆ – мышца

При этом в обоих случаях заметен перелом кривой при определенной температуре: в случае амфибий – это двойной перелом (при 35 и 50°C), в случае же рептилий – резкий перелом только в области 50°C. Очевидно, эти точки демонстрируют так называемый фазовый переход липидсодержащих структур мозга и расчет коэффициентов для данных процессов позволяет утверждать с большой долей вероятности о наличии здесь физического процесса без какого-либо участия ферментативных компонентов. Интенсивность процессов СРО значительно ниже в мозге рептилий, чем у земноводных, причем это различие сохраняется и для очищенных липидных фракций (рис. 2). Пресмыкающиеся выделяются в ряду позвоночных очень высоким содержанием холестерина в тканях (Лизенко и др., 1981; Медведева, 1986).

С результатами по изучению СХЛ исследуемых образцов хорошо коррелируют экспериментальные данные по прямому определению накопления малонового диальдегида (МДА) в процессе СРО липидов, что, по существу, отражает те же процессы, что и СХЛ (табл. 1). Более того, в данном случае тенденция к понижению уровня ПОЛ при переходе к полностью наземному образу жизни заметна для всех исследуемых органов позвоночных. С процессами ПОЛ напрямую связана также активность ферментов системы защиты организма от так называемой окислительной деструкции (пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза). Малейшее нарушение уровня интенсивности СРО-процессов приводит



**Рис. 2.** Интенсивность СХЛ липидов тканей амфибий (---) и рептилий (—)

к развитию патологий (Владимиров, Арчаков, 1972; Закарян и др., 1997; Арутюнян и др., 1999) и, следовательно, активность указанной системы для каждого организма находится в состоянии некоего динамического равновесия, оценка которого также необходима при анализе процессов СРО (табл. 2). Приведенные в табл. 2 данные по определению активности СОД – еще одно подтверждение теории угасания процессов ПОЛ у представителей класса рептилий, причем относительно отдельных тканей имеет место отношение  $СОД \leftrightarrow ПОЛ$ .

**Таблица 1**

Концентрация МДА в тканях амфибий и рептилий, нмоль / пробу

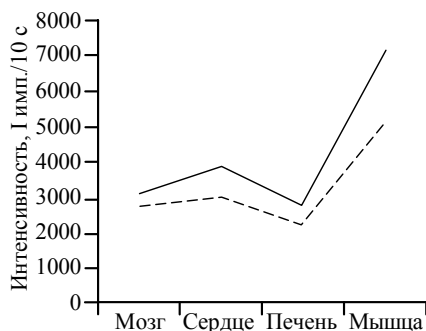
Позвоночные	Мозг	Сердце	Печень	Мышца
Амфибии	1.3±0.3	2.6±0.1	2.4±0.08	0.99±0.08
Рептилии	0.68±0.2	2.7±0.09	2.6±0.01	0.74±0.01

**Таблица 2**

Активность СОД в удельных единицах в гомогенатах тканей амфибий и рептилий

Позвоночные	Мозг	Сердце	Печень	Мышца
Амфибии	4±0.5	0.04±0.01	0.067±0.03	2.56±0.01
Рептилии	2.13±0.3	0.09±0.01	0.047±0.01	0.67±0.02

Иначе выглядит картина ФХЛ гомогенатов, облученных УФ-светом. При этом уровень интенсивности свечения исследуемых образцов у рептилий оказывается выше, чем у земноводных (рис. 3). Подобный реверс результатов ФХЛ, предположительно, обусловлен белковыми компонентами мембран, выступающими при УФ-облучении в роли основных участников процесса, приводящего к генерации квантов, и главными факторами, обуславливающими уровень ФХЛ в исследуемой биологической системе. Основанием к подобным суждениям могут являться также известные указания об увеличении содержания интегральных белков в тканях в зависимости от степени дифференциации организма позвоночных (Медведева, 1986).

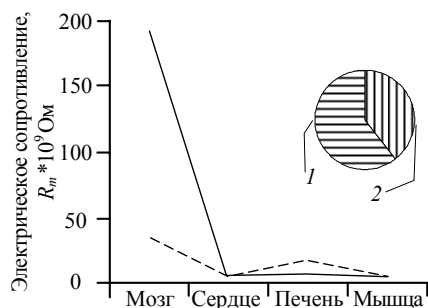


**Рис. 3.** Интенсивность ФХЛ гомогенатов тканей амфибий (---) и рептилий (—)

Изучение электрических свойств БЛМ – максимально приближенный вариант исследования пластических свойств природных мембран во всем многообразии их гетерогенного липидного состава (Антонов, 1982). Пленки, сформированные из выделенных липидных фракций тканей исследуемых позвоночных, наделены электрическим сопротивлением порядка  $10^9$  Ом, кроме БЛМ из липидов мозга, сопротивление которых намного выше – около  $10^{10-11}$  Ом (рис. 4).

Холестерин, который является известным стабилизатором искусственных мембран, и в этом случае существенно влияет на результаты экспериментов (на

БЛМ). Липиды мозга рептилий, у которых содержание холестерина в мозге почти в 10 раз выше, чем в мозге амфибий, наделены электрической проводимостью на порядок выше, чем в случае последних. Налицо, как видим, прямая зависимость между содержанием холестерина и сопротивлением искусственных мембран из липидов мозга указанных классов позвоночных. Однако, как в случае описанных выше экспериментов по исследованию интенсивности процессов СРО, так и при анализе данных о физико-химических свойствах БЛМ необходимо отметить, что наряду с содержанием холестерина указанные процессы, несомненно, связаны с так называемым индексом ненасыщенности липидов тканевых мембран амфибий и рептилий. Данные научной литературы свидетельствуют о наличии в составе липидов рептилий более насыщенных жирнокислотных остатков по сравнению с тканями земноводных (Крепс, 1981; Аврова, 1999).



**Рис. 4.** Электрическое сопротивление БЛМ из липидов тканей амфибий (---) и рептилий (—). Для сравнения в правом верхнем углу – процентное содержание холестерина в мозге амфибий (1) и рептилий (2) по данным Т.Н. Медведевой (1986)

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований добавляют новые данные в картину изменений состояния липидной компоненты тканей амфибий и рептилий и позволяют интерпретировать их в эволюционном аспекте. Переход к полностью наземному образу жизни сопровождался резким повышением уровня холестерина в тканях с одновременным понижением индекса ненасыщенности липидов (особенно в мозге) (Аврова, 1986), результатом чего явилось понижение уровня процессов СРО и уменьшение электрической проводимости мембран соответствующих тканей рептилий. Вследствие угасания процессов ПОЛ понизилась также активность фермента СОД – одного из ключевых антиоксидантных регуляторов указанных реакций.

При низком уровне окислительных процессов, непостоянной температуре тела и незначительной подвижности животного потребность в пище у земноводных относительно невелика. Кожа земноводных, функционирующая как дополнительный орган дыхания, лишена защитных образований, способных удерживать тепло, а постоянное испарение влаги через кожу в связи с ее дыхательной функцией значительно снижает температуру тела. Ороговение кожи и потеря кожей дыхательной функции сделали пресмыкающихся независимыми и от влажности окружающей среды, позволив им заселить области с низкой влажностью. Однако сохранившаяся от предков зависимость температуры тела от температуры окружающей среды, т.е. пойкилотермия, связанная с низким уровнем обмена веществ, определяет как специфику распространения, так и многие биологические черты пресмыкающихся. Вероятно, накопление холестерина, так называемого «структурного ан-

тиоксиданта», в процессе эволюции было оправдано в качестве защитного механизма против перегрева. Однако, вероятно, именно следствием этого может быть явление замедленного обмена веществ, так как на сегодня доказано, что липиды являются вторичными мессенджерами во многих физиологических процессах, и реакции, изменяющие пластические свойства липидов в составе мембран, имеют ключевое значение в регуляции данных процессов.

Таким образом, из вышеизложенных данных следует, что одним из наиболее очевидных изменений в организме рептилий в связи с переходом к полностью наземному образу жизни явилось ужесточение барьерной функции биологических мембран в клетках различных тканей, что, в свою очередь, сделало их более резистентными к влиянию таких факторов внешней среды, как влажность, температура и радиация. В связи с этим исследование процессов свободнорадикального окисления в организме земноводных и пресмыкающихся приобретает крайне важное значение для понимания механизмов долговременной биохимической адаптации животных к меняющимся условиям окружающей среды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аврова Н.Ф.* 1986. Сравнительное исследование липидов нервной ткани в трудах академика Е.М. Крепса // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 22, № 4. С. 333 – 342.
- Аврова Н.Ф.* 1999. Биохимические механизмы адаптации к изменениям условий среды у позвоночных: роль липидов // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 35, № 3. С. 170 – 180.
- Айвазян Н.М., Закарян А.Е., Закарян Н.А.* 2002. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов у некоторых высших позвоночных // Учен. записки Ереван. гос. ун-та. № 2. С. 92 – 98.
- Айвазян Н.М., Закарян А.Е., Карагезян К.Г.* 2002. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления и активность супероксиддисмутазы в нервной ткани позвоночных // Нейрохимия. Т. 19, № 4. С. 284 – 287.
- Антонов В.Ф.* 1982. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука. 150 с.
- Арутюнян В.М., Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Акопян Г.С., Григорян К.А.* 1999. Исследование свободнорадикальных процессов в плазме крови больных хронической почечной недостаточностью // Вестник Междунар. академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вып. 7 (19). С. 104 – 108.
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* 1972. ПОЛ в биомембранах. М.: Наука. 252 с.
- Забелинский С.А., Чеботарева М.А., Кривченко А.И.* 1998. Сравнительное исследование ФЛ митохондрий позвоночных, живущих в различных условиях обеспеченности кислородом. Новый взгляд на роль ЖК // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 34, № 2. С. 163 – 172.
- Забелинский С.А., Шуколюкова Е.П.* 1989. Сравнительное исследование ФЛ состава мозга позвоночных с разной нормальной температурой тела // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 25, № 1. С. 144.
- Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г.* 2003. Физико-химические свойства искусственных бислойных мембран из липидов тканей позвоночных // Докл. РАН. Т. 388, № 1. С. 1 – 3.
- Закарян А.Е., Геворкян А.А., Акопян Г.С., Айвазян Н.М., Петросян В.Ф., Мирзоян Т.Г.* 1997. ХЛ плазмы крови при периодической болезни в модельных системах // Сб. науч. трудов Ереван. гос. мед. ун-та. Т. 2. С. 49 – 51.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

- Закарян А.Е., Погосян Г.А., Цагикян А.Р.* 1990. Установка для регистрации ХЛ биологических объектов // Биологический журнал Армении. № 1. С. 51 – 54.
- Кейтс М.* 1975. Техника липидологии. М.: Мир. 322 с.
- Кренс Е.М.* 1981. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние. 339 с.
- Лизенко Е.И., Сидоров В.С., Белгова О.М.* 1981. Сравнительное изучение липидного состава лизосомальной фракции печени позвоночных // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 18, № 3. С. 254 – 258.
- Макаревич О.П., Голиков П.П.* 1983. Активность СОД крови в острый период различных заболеваний // Лабораторное дело. № 6. С. 24 – 27.
- Медведева Т.Н.* 1986. Сравнительная биохимия обмена веществ у животных. Куйбышев: Изд-во Куйбыш. гос. ун-та. С. 10 – 23.
- Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г.* 1985. Биохимические методы исследования. М.: Медицина. С. 66 – 68.
- Шульдин А.Н.* 1983. Эволюционное разнообразие ФЛ структур // Успехи совр. биол. Т. 95, вып. 1. С. 16 – 31.
- Mueller P., Rudin D.* 1968. Action potentials induced in bimolecular lipid membranes // Nature. Vol. 217. P. 713 – 719.
- Zakharian A.E., Ayvazian N.M., Zakharian N.A.* 2003. Comparative analysis of properties of artificial bilayer membranes from brain lipids of amphibians and reptiles // 12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica / Zoological Institute, Russian Academy of Sciences. St. Petersburg. P. 173 – 174.

### APPLICATION OF BIOPHYSICAL METHODS IN MODERN HERPETOLOGY

**N.M. Ayvazyan**

*Yerevan State University  
1 A. Manukian Str., Yerevan 375025, Armenia  
E-mail: vipradde@yahoo.com*

Spontaneous and photoinduced chemiluminescence (ChL) of homogenates and lipid fractions from the nervous, heart, liver, and muscular tissues of some representatives of amphibians and reptiles, lipid peroxidation, and superoxide-dismutase (SOD) activity were studied. The electrical properties of artificial lipid membranes (ALM) formed of the lipids of the said tissues of vertebrates were examined. The levels of homogenate and lipid luminescence were shown to be higher in the amphibian brain in comparison with reptiles. This fact is also confirmed by a decrease in the SOD activity accompanying phylogenetic changes in lipid peroxidation processes. The data obtained speak for the lowest degree of electrical conductivity of ALM made from the brain lipids as compared to the lipids of the heart, liver, and muscular tissues, which is likely due to the high cholesterol content in the nervous tissue. Penetration of ALM made of amphibian brain lipids is shown to be lower than for reptiles.

**Key words:** chemiluminescence, lipid peroxidation, superoxide-dismutase, artificial bilayers