

84
17.1968
202.0110333
Г. 130

ВОПРОСЫ
БИОФИЗИКИ
И
ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ

130

ТРУДЫ ТБИЛИССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА, т. 130, 1968

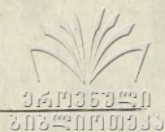
Контрольный экземпляр



ИЗДАТЕЛЬСТВО ТБИЛИССКОГО УНИВЕРСИТЕТА
TBILISI UNIVERSITY PRESS

TBILISI STATE UNIVERSITY

Proceedings, vol. 130, Biophysical Series, 1.



PROBLEMS OF BIOPHYSICS AND THEORETICAL BIOLOGY

TBILISI 1968

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
Бражневский Л. В.
Бродягинский М. М.
Зорин И. В.
Каннинг О. А.
Манжельдс В. П.
Натанс В. П.
Умришашвили Т. Д. (председатель)

ВОПРОСЫ БИОФИЗИКИ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

КОЛЛЕГИАЛЬНЫЙ ВОПРОС
Каннинг О. А.
Манжельдс В. П.
Натанс В. П.
Туманянц Г. Д. (Общая)
Умришашвили Т. Д.
Хачапуридзе В. П.
Цицидзе Т. П.
Хачапуридзе Г. В.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Бурджанадзе Т. В.
Заалишвили М. М.
Зарапов Г. В.
Канчели О. А.
Манджгаладзе В. П.
Натадзе Л. Л.
Туманишвили Г. Д. (председатель)

EDITORIAL BOARD

Burjanadze T. V.
Kancheli O. A.
Manjgaladze V. P.
Natadze L. L.
Tumanishvili G. D. (Chairman)
Zaalishvili M. M.
Zarapov G. V.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|-----|
| От редколлегии | 7 |
| Г. Д. Туманишвили—О кооперативном характере генов | 9 |
| К. А. Кафиани, Ю. А. Рачкус, М. Я. Тимофеева—Изучение популяций информационных РНК в начале онтогенеза вьюна | 15 |
| Н. В. Саламатина, Г. Д. Туманишвили—Действие клеточных ядер и цитоплазмы на синтез ДНК | 25 |
| Б. Н. Тарусов, Ю. П. Козлов, О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Г. Е. Федоров—Исследование процесса возбуждения методом радикальной сополимеризации | 33 |
| Н. В. Козлова—Флуоресценция тканей в видимой области спектра | 41 |
| Т. В. Бурджанадзе, Н. Г. Бакрадзе, Д. Р. Монаселидзе—О природе «внутримолекулярного плавления» коллагена | 49 |
| С. Н. Цагарели, Н. Ш. Гагошидзе—Количественная характеристика влияния коагуляции дорсального гиппокампа на процесс самообучения и сохранения ранее выработанных защитных навыков у белых крыс при различных внешних условиях | 57 |
| Т. Г. Чанишвили—Биологическая характеристика вирулентных, умеренных и умеренно-вирулентных бактериофагов | 67 |
| М. М. Заалишвили—О третьем компоненте механохимической системы гладкой мышцы | 77 |
| Указатель авторов | 115 |

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Editors note | 7 |
| G. D. Tumanishvili—On the cooperative character of gene action | 9 |
| C. A. Kafiani, J. A. Rachkus, M. J. Timofeeva—Study of messenger RNA populations at the beginning of the ontogenesis of loach (<i>Misgurnus fossilis</i>) | 15 |
| N. V. Salamatina, G. D. Tumanishvili—Action of cell nuclei and cytoplasm on DNA synthesis | 25 |
| B. N. Tarusov, U. P. Kozlov, O. R. Kols, I. M. Limarenko, G. E. Fedorov—Investigation of the excitation process by the method of radical copolymerization | 33 |
| N. V. Kozlova—Fluorescence of tissues in the visible region of spectrum | 41 |
| T. V. Burjanadze, N. G. Bakradze, D. R. Monaselidze—On the nature of "intramolecular melting" of collagen | 49 |
| S. N. Tsagareli, N. Sh. Gagoshidze—Qualitative characteristics of influence of dorsal hippocamp coagulation on the process of self-training and preservation of protective reflexes worked out by white rats under different external conditions | 57 |
| T. G. Chanishvili—Biological characteristic of virulent, temperate and temperate-virulent bacteriophages | 67 |
| M. M. Zaalishvili—On the third component of the smooth muscle mechanical-chemical system | 77 |
| Author Index | 116 |

ОТ РЕДКОЛЛЕГИИ

В сборник включены доклады и сообщения, до-
ложенные на семинаре по биофизике и теорети-
ческой биологии, организованном физическим фа-
культетом Тбилисского университета. С целью бо-
лее широкого и оживленного обсуждения насущных
вопросов современной биофизики и теоретической
биологии, редакционная коллегия решила привлечь
к сотрудничанию в сборнике ученых различных
городов Советского Союза.

Настоящий сборник является первым выпуском
серии биофизики Трудов Тбилисского университета.

Редакционная коллегия выражает надежду, что
издание сборника «Вопросы биофизики и теорети-
ческой биологии» будет способствовать развитию
теоретической биологии в нашей стране и укреп-
лению научных связей между советскими учеными.

Г. Д. ТУМАНИШВИЛИ

О КООПЕРАТИВНОМ ХАРАКТЕРЕ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ

Блестящие открытия последних лет в области генетики, цитогенетики и биохимии, приведшие к заманчивой и весьма перспективной схеме Жакоба и Моно, приостановились перед проблемой клеточной дифференцировки. В настоящее время принято думать, что понятие клеточной дифференцировки может быть отнесено лишь к многоклеточным организмам. По существу дифференцировка заключается в возникновении и размножении клеток определенного типа. Обычно молчаливо принимается, что, рассматривая вопрос дифференцировки, мы имеем дело с чем-то, присущим не одной отдельной клетке, а ансамблю клеток. В последнее время такое интуитивное представление полностью оправдалось.

Основное затруднение, на которое наталкивается генетика в отношении явления клеточной дифференцировки, заключается в том, что клетки, обладающие одним и тем же хромосомным набором, одинаковым геномом, проявляют резкие различия как по своим морфологическим, так и по функциональным особенностям. Даже установление факта различного распределения генной активности в геноме не дает ключа к разгадке тайны дифференцировки. Ясно, что различие типов клеток обусловлено тем, что не все гены активны. Для каждого типа клеток характерна активность лишь некоторого числа определенных генов, имеющих специфическую локализацию в геноме. Но что является причиной такого различия в распределении генной активности?

Для построения какой-либо гипотезы, объясняющей возникновение и сохранение определенного клеточного типа, оказываются недостаточными лишь внутриклеточные средства передачи информации. Приходится допустить, что часть сигналов притекает в клетку извне, определяя распределение активных генов в геноме [1, 2].

Источниками информации могут быть: 1) среда, окружающая клетки (неспецифические факторы); 2) клетки иного типа (гетеротипическая индукция по Гробстейну) и 3) клетки того же типа (гомотипическая индукция по Гробстейну).

Третий путь поступления информации в клетки существенным образом отличается от двух первых. В двух первых случаях клетки получают сигналы одного рода из среды (I_2) и сигналы другого рода (I_1) от клеток другого типа (рис. 1). Таким образом, все клетки получают одинаковые сигналы. Взаимодействие клеток одного типа в этом случае необязательно. Имеет место односторонний поток информации. Клетки ведут себя генетически одинаково, поскольку они подчиняются одной и той же команде.



0419353241

Совсем иные взаимоотношения между источником информации и клетками должны иметь место при третьем способе поступления сигналов в клетку. Каждая клетка получает сигналы от клеток-соседей. Вместе с тем, каждая клетка данного ансамбля, будучи подобной всем другим членам ансамбля, сама является источником информации для соседей. Каждый член данного ансамбля испытывает действие сложной совокупности сигналов. При этом, поток информации в этом случае направлен (для каждой клетки) не в одну сторону, а в две взаимно противоположные стороны (рис.2). Имеют место межклеточные взаимодействия, которые создают целую сеть связей, объединяющую клеточный ансамбль в единое целое. Если подобное взаимодействие, наряду с другими факторами, определяет суммарную активность генов каждой клетки, то следует признать, что в ансамбле клеток одного типа действие генов имеет кооперативный характер, и исключение некоторого критического числа взаимодействий должно привести

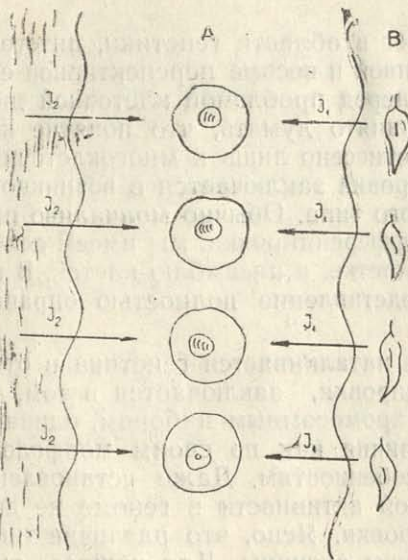


Рис. 1. Схематическое изображение поступления информации к клеткам определенного типа (А) от клеток другого типа (В) и из среды. В первом случае информация обозначена через I_1 , а во втором — через I_2 .

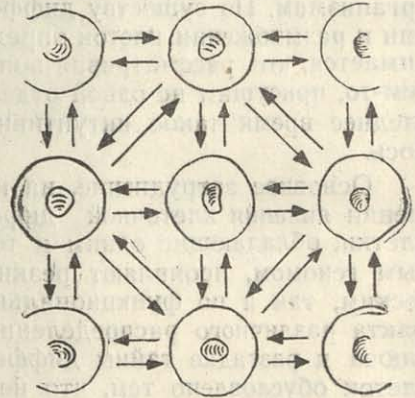


Рис. 2. Упрощенная схема межклеточных взаимоотношений. Стрелками обозначены потоки информации, которые создают сеть связей, охватывающую все члены данного клеточного ансамбля.

к изменению характера действия генов каждой клетки и, следовательно, к изменению клеточного типа, т. е. типа дифференцировки.

Чисто теоретически можно предположить, что кооперативное действие генов будет зависеть от числа сигналов, поступающих к каждому члену ансамбля, а также от интенсивности сигналов. Число взаимодействий в первую очередь зависит от числа клеток, входящих в данный ансамбль.

По-видимому, межклеточные взаимодействия могут осуществляться без непосредственного контакта клеток. Последний часто принимается за обязательный элемент так называемого контактного торможения, наблюдающегося в культуре клеток. Это понятие обычно относят к



подвижности клеток. Однако выяснилось, что контактное торможение распространяется на деление клеток [3, 4, 5, 6] и некоторые внутриклеточные синтезы, положительно влияя на дифференцировку. Глинос с сотрудниками [7, 8] показал, что торможение деления клеток и их усиленная дифференцировка происходят при повышении концентрации клеток во взвеси фибробластов сердца мышиноного зародыша.

Интенсивность сигналов несомненно зависит от расстояния между клетками. Наиболее вероятно, что сигналы от клетки к клетке передаются химическим путем. Тогда очевидно, при достаточно большом расстоянии между клетками информация будет рассеиваться благодаря разбавлению веществ-переносчиков окружающей клетки средой.

Изложенная точка зрения получила в последнее время серьезное обоснование. Мы могли бы привести множество работ, однако, вполне достаточно вспомнить работы Гробстейна [1] и Лопашова [2], где все сведения, касающиеся данного вопроса, систематизированы и изложены в виде более или менее стройной схемы. Из работ упомянутых авторов следует, что дифференцировка происходит лишь в клеточных агрегатах, но не в разрозненных клетках; что для наступления дифференцировки действительно необходимо участие определенного критического числа клеток. Вместе с тем тип дифференцировки зависит от взаиморасположения клеток в пространстве, что непосредственно влияет на число межклеточных взаимодействий.

Однако остается совершенно неясным, на что направлены «усилия» клеток? Что поддерживается или тормозится поступающими сигналами? Каков тот основной генетический параметр, который учитывает притекающую в клетку информацию и в конечном итоге определяет тип (дифференцировку) той или иной группы клеток?

А ригорі можно утверждать, что этот параметр должен удовлетворять двум требованиям: 1) он должен представлять собой характеристическую величину, т. е. величину, специфическую для данной популяции (ансамбля) клеток; 2) величина параметра должна быть постоянной для клеток одного типа (одной дифференцировки).

Ясно, что ни число хромосом, ни количество ДНК на ядро, ни ее концентрация в каждом из ядер клеток данного ансамбля не могут быть приняты за такой параметр. Постоянство числа хромосом, если бы даже оно действительно имело место, представляет собой скорее помеху (см. выше) для понимания сущности дифференцировки, поскольку число хромосом не является характеристическим. Кроме того, полиплоидные клетки обнаружены почти во всех тканях, но их число в каждой группе клеток также очень непостоянно.

Соответственно непостоянным оказывается среднее количество ДНК на ядро. Привлекает внимание тот несомненный факт, что ДНК распределена по ядрам неравномерно. Последнее обстоятельство уже в известной мере указывает на то, что следует искать величину, характеризующую не индивидуальные свойства клетки, а состояние клеточного ансамбля в целом.

В этом отношении весьма примечательно явление, неоднократно описанное для регенерирующей печени, но не получившее должного освещения в работах исследователей.

Все, кто изучал биохимические особенности регенерации печени после частичной гепатэктомии у крыс и мышей, неизменно отмечали постоянство содержания ДНК в ткани печени подопытных животных. В то же время, концентрация ядер в ткани печени подопытных



животных в течение двух суток сильно понижена. Нечто подобное мы наблюдали в поврежденной доле печени лягушки [9]. В этом случае концентрация ДНК в начале опыта падает, но довольно скоро восстанавливается. При введении же подопытным лягушкам экстракта печени курицы понижения концентрации ДНК не происходит. К 72-му же часу опыта, вследствие введения экстракта печени курицы, концентрация ядер в ткани печени повышается, но концентрация ДНК остается неизменной. Подобные явления имеют место в печени куриного зародыша при воздействии на него экстрактом печени курицы. В последнее время в нашей лаборатории (Джанелидзе — неопубл. данные) удалось наблюдать постоянство концентрации ДНК в почке крысы в случае односторонней нефректомии, в то время как концентрация ядер в ней понижена. Г. Квинихидзе любезно предоставила в наше распоряжение данные, из которых следует, что при повышении концентрации ядер в экваториальной части линзы куриного зародыша число полиплоидных клеток заметно уменьшается. Нетрудно видеть, что количество ДНК на ядро изменяется так, чтоб осталась постоянной концентрация в ткани.

Часть членов популяции (ансамбля) временно становится полиплоидной или, возможно, политенной. С другой стороны, ансамбль должен иметь некоторый резерв полиплоидных или политенных клеток.

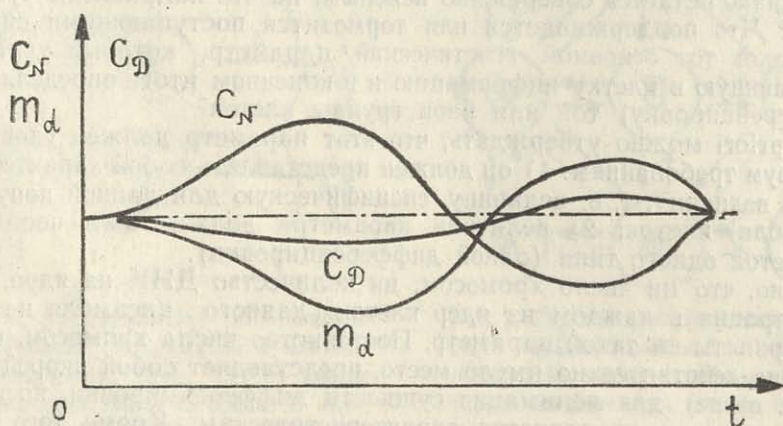


Рис. 3. Теоретические кривые, изображающие взаимоотношения концентрации ядер (C_N), концентрации ДНК (C_D) и среднего количества ДНК на ядро клетки (m_d) в ткани. Обозначения на кривых указывают изменение какой величины они изображают. t —время.

Количество ДНК на ядро находится в обратной зависимости от концентрации ядер. При этом, эта зависимость очень приближается к линейной. Взаимоотношения концентрации ядер в ткани, концентрации в ней ДНК и количества ДНК на ядро изображены в виде теоретических кривых на рис. 3. Ясно, что для осуществления таких взаимоотношений клетки должны проявлять, с одной стороны, способность к полиплоидизации (политенизации), а с другой стороны, в определенный момент должны делиться, минуя S фазу (соматический мейоз).



Вне всякого сомнения, концентрация ядер прежде всего выражает концентрацию клеток в ткани, т. е. по существу число взаимодействий между клетками. Однако наряду с этим концентрация ядер отражает некоторое общее ядерно-цитоплазматическое отношение, т. е. соотношение ядерных и цитоплазматических факторов в ткани. Как оказалось, такое соотношение действительно играет известную роль. Ядерные факторы тормозят синтез ДНК, а цитоплазматические — стимулируют его. При этом ядра вносят в эти взаимоотношения несколько больший вклад — при повышении концентрации ядер в ткани их тормозящая активность повышается [10, 11].

Концентрация ДНК в ткани выражает как бы концентрацию генетической информации в данном клеточном ансамбле. При этом, оба упомянутые выше требования, которые предъявляются к генетическому параметру, определяющему тип дифференцировки, оказываются удовлетворенными.

Вместе с тем, концентрация ДНК вполне соответствует кооперативному характеру процесса — ее постоянство несомненно результат взаимодействия клеток.

В настоящее время трудно утверждать, что концентрация ДНК — единственный фактор, определяющий клеточный тип. Мы не можем даже утверждать, что она действительно им является. Мы можем лишь настаивать на том, что концентрация ДНК в ткани действительно стремится к постоянству и может быть одним из основных факторов, определяющих направление дифференцировки той или иной группы клеток¹.

В заключение нам хочется сослаться еще на один факт, установленный на зародыше выюна. Оказалось, что для начала дифференцировки зародыша (гастрюляции), у зародыша должно быть определенное количество ДНК и, соответственно, информационный РНК [13]; а гаплоидные зародыши проходят до наступления гастрюляции одно дополнителное синхронное деление [14, 15].

Было бы весьма заманчиво представить процесс дифференцировки зародыша как возникновение мозаики концентраций ДНК. К сожалению, такое утверждение нуждается в более твердом фактическом обосновании, чем имеющееся в нашем распоряжении в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Grobstein, в сб. „Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis“. Изд. Locke, Academic Press, New York, I, 1963; AM, Zoologist, 6, 89, 1966.
2. Г. В. Лопашов, в сб. «Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы», Изд. «Наука», Москва, стр. 242 (1965).
3. M. A. Abercrombie, E. J. Ambrose, Cancer Res., 22, 525 (1962).
4. E. Bladè, L. Horel, N. Hanania, Exptl. Cell Res., 41, 473 (1966).
5. E. M. Levine, Y. Becker, Ch. W. Boone, H. Eagle, Proc., Nat. Acad. Sci., USA, 53, 350 (1965).
6. G. J. Todaro, H. Green, B. D. Coldberg, Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 66 (1964).
7. A. D. Glinos, R. J. Werlein, N. M. Papadopoulos, Science, 150, 350 (1965).

¹ В последнее время Буллоу [12] также выдвигает положение, согласно которому концентрация клеток влияет на активность генов.



8. A. D. Glinos, R. E. Maxwell, J. M. Vail, *Abstr. of Second Intern. Biophysics Congress, Vienna. № 643.*
9. Г. Д. Туманишвили, Б. П. Манджгаладзе и Х. Н. Джanelидзе, *Биохимия*, 28, 542 (1963); *Сообщ. АН ГССР*, 33, 549 (1964).
10. Н. В. Саламатина и Г. Д. Туманишвили, *Настоящий сборник*, стр. 25.
11. Г. Д. Туманишвили, *Некоторые вопросы регуляции роста живых тканей*, Изд. «Мециереба», Тбилиси (1965); в сб. «Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы», Изд. «Наука», Москва (1965), стр. 204.
12. W. S. Bullough, *Cancer Res.*, 25, 1 (1965).
13. М. Я. Тимофеева, К. А. Кафиани, А. А. Нейфах, в сб. «Структура и функции клеточного ядра», Изд. «Наука», Москва (1967), стр. 201.
14. C. F. Graham, *Exptl. Cell Res.*, 43, 13(1966).
15. Н. Н. Ротт и Г. А. Шевелева, *Цитология*, 9, 1266 (1967).

G. D. TUMANISHVILI

ON THE COOPERATIVE CHARACTER OF GENE ACTION

Summary

An assumption is made that the action of genes of each member of cell population is controlled by intercellular interactions. Thus the action of genes composing the cell ensemble has a cooperative character.

It has been established that the DNA concentration in the tissue is the quantity to a great extent constant. The constancy of DNA concentration in DNA in the tissue is maintained in most cases even at an essential change of nuclear concentration in the tissue. Here cytoplasm and nuclei of cells take part in the regulation of DNA synthesis—cytoplasm promotes DNA synthesis, nuclei inhibit it.

The author thinks it possible that DNA concentration is a genetic parameter directly controlled by intercellular interactions and determining in the end the type of the cells of a given ensemble.

К. А. КАФИАНИ, Ю. А. РАЧКУС,
М. Я. ТИМОФЕЕВА

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ИНФОРМАЦИОННЫХ РНК В НАЧАЛЕ ОНТОГЕНЕЗА ВЬЮНА

Раннее эмбриональное развитие широко изучается как модель дифференцировки, и одно из значительных направлений этих исследований касается процессов транскрипции генетической информации [1]. Проведенное нами ранее количественное изучение способности развивающейся икры вьюна к синтезу информационных РНК (мРНК) показало, что процесс транскрипции в ядрах в период синхронного дробления оплодотворенного яйца (первые 6 час. развития при 21°) заторможен, после чего он резко активизируется, и в дальнейшем происходит с большой интенсивностью [2, 3]. В этих работах впервые четко были показаны факт и момент стимуляции общей количественной активности генетического аппарата клеток в начале онтогенеза.

Для понимания молекулярных основ развития необходимы, однако, и качественные исследования синтеза мРНК, которые могли бы выявить дифференциальную регуляцию активности различных частей генома клеток в ходе их развития. Подобные исследования стали возможны благодаря развитию метода конкурентной гибридизации РНК с ДНК, основанного на комплементарности отдельных классов молекул мРНК к соответствующим участкам ДНК. Метод заключается в сравнении способности препаратов РНК конкурировать друг с другом за связывание на одних и тех же участках ДНК. Высокая степень конкуренции указывает на наличие одинаковых (гомологичных) полирибонуклеотидных последовательностей в сравниваемых популяциях молекул РНК, а отсутствие конкуренции свидетельствует о том, что популяции РНК содержат негомологичные РНК. Комбинируя меченые и немеченые РНК определенным образом, можно получать информацию о том, одинаковы или различны ДНК—последовательности (гены или цистроны), транскрибируемые, т. е. функционирующие в сравниваемых объектах. С помощью этого метода, на эмбрионах морского ежа [4, 5] и лягушки [6] были показаны гомологии и различия в наборах активных генов на разных стадиях развития, а также различия между частями зародыша лягушки, свидетельствующие о дифференциальной активации и подавлении функции отдельных частей генома [7].

Задачей данной работы было сравнение популяций мРНК на разных стадиях развития вьюна (*Misgurnus fossilis*) — от неоплодотворенного яйца до окончания гастрюляции, т. е. в период, включающий активацию генетической функции ядер и первые события морфологической дифференцировки.



Материал и методы. Синхронно развивающуюся икру вьюна получали путем искусственного оплодотворения яиц и инкубации их при 21° [8]. Немеченные препараты РНК выделяли из зрелых неоплодотворенных яиц и из развивающейся икры на стадиях: синхронного дробления—ранняя бластула, (5-й час развития), бластулы (6-й час.), средней—поздней бластулы (8-й час), поздней бластулы—начала гастрюляции (10-й час), средней гастрюлы (13-й час) и конца гастрюляции (20-й час).

Икру гомогенизировали в ледяном 0,01 М трис-НСI буфере (рН 6,5), содержащем 0,01 М $MgCl_2$, гомогенат обрабатывали додецилсульфатом натрия в конечной концентрации 1% в течение 30 сек. при 5-7° после чего трижды депротенизировали с помощью водонасыщенного фенола на холоду. РНК осаждали спиртом при добавлении ацетата калия до 0,05 М на холоду, и очищали двухкратным переосаждением 1,5 М $NaCl$ при — 20° и четырехкратным промыванием осадков РНК таким же солевым раствором. Полученные таким образом препараты «соленерастворимых РНК» (снРНК) икры свободны от примесей ДНК, транспортных РНК, гликогена и белков, и состоят, в основном, из РНК рибосом и информационных РНК [9, 10]. Последний термин (мРНК) используется в данной статье для обозначения РНК (в основном высокополимерных) не рибосомальной и не транспортной природы. В число этих РНК входят как истинные мРНК, обнаруживаемые в цитоплазме икры вьюна и выполняющие матричную функцию в белковом синтезе, так и другие нерибосомные РНК ядерной локализации, функция которых пока неизвестна [10].

Препараты немеченой снРНК выделяли также из пекарских дрожжей по методу Крестфильда и сотр. [11], и из печени взрослого вьюна. При получении снРНК из печени использовали описанную выше методику, которая дополнялась обработкой препаратов дезоксирибонуклеазой (5 мкг ДНКазы фирмы Вортингтон на 1 мл реакционной смеси: 0,01 М трис-НСI буфер, рН 7,8 с 0,01 М $MgCl_2$, 20 мин., 30°), с последующей трехкратной фенольной депротенизацией.

Радиоактивные препараты снРНК получали из икры после ее инкубации от 11-го до 13-го часа развития (ранняя—средняя гастрюла) с C^{14} —карбонатом натрия (конечная концентрация изотопа 70 мккюри на 1 мл смеси) в слабо кислой среде [12]. Удельная радиоактивность препарата снРНК составляла 136 000 имп/мин. на 1 мг РНК, причем вся метка была чувствительна к РНКазе. Поскольку на ранних стадиях развития вьюна, включая среднюю гастрюлу, синтез рибосомальных РНК не происходит, такие препараты снРНК содержат радиоактивность практически исключительно в молекулах новосинтезированных мРНК [9, 10].

ДНК в высокополимерной форме получали методом Мармура [13] из спермы вьюна. Следовательно, в опытах использовалась ДНК ядерной природы, благодаря чему получаемые при гибридизации результаты не осложнялись примесью рибонуклеиновых кислот неядерного происхождения, синтезируемых в икре вьюна на цитоплазматических матрицах ДНК [3]. Препарат ДНК содержал не более 0,5% белка, определяемого по Лоури [14]. ДНК денатурировали нагреванием, включали в агаровый гель («Ионагар» № 2, фирмы Оксид, Англия) и измельчали ДНК-агаровый гель для приготовления колонок, как описано Болтоном и Маккарти [15].

Гибридизацию РНК с ДНК проводили в растворе 0,3 М NaCl-0,03 М цитрат натрия при 60° [15] в течение 16 часов, в пробирках с притертыми пробками. Затем пробы переносили в колонки с водяной рубашкой и отмывали несвязавшуюся РНК той же солевой смесью при 60° [15]. Комплексы РНК-ДНК разрушали и элюировали связавшуюся РНК с помощью приема, предложенного Р. Н. Масловой (неопубликованные материалы): колонку охлаждали пропусканием через водяную рубашку холодной воды, добавляли 2 мл 0,1 н. КОН, и раствор освободившейся из комплексов РНК спускали в пробирку, стоящую на ледяной бане. Элюат немедленно нейтрализовали холодной 1,0 н. HCl (по фенолфталеину), после чего добавляли высокополимерную дрожжевую РНК в качестве носителя, и осаждали РНК на холоду добавлением трихлоруксусной кислоты до 5%. Осадки РНК собирали на мембранных фильтрах RUFFS (ЧССР) с диаметром пор 0,9—1,2 микрон, промывали фильтры холодной 5%-ной трихлоруксусной кислотой и спиртом и высушивали. Радиоактивность осадков измеряли с помощью неполярной жидкой сцинтилляционной смеси (0,4% 1,4-бис-2 (дифенилоксазол) бензола и 0,01% 2,5-дифенилоксазола в сцинтилляционно чистом толуоле) [16] на сцинтилляционном спектрометре фирмы ACES (Бельгия). Результаты выражали в единицах связавшейся с ДНК радиоактивности, причем выражение данных в виде процентов гибридизации (доля связанной C¹⁴-РНК от всей C¹⁴-РНК, внесенной в инкубационную смесь) не меняет характера кривых конкурентной гибридизации.

В отсутствие добавленной нерадиоактивной РНК связывание меченой РНК средней гастролы с ДНК вьюна при соотношении РНК:ДНК, равном 1:10, и при содержании ДНК не менее 500 мкг на 1 г геля, составляло 21%. При этом, 80% всей связанной метки были устойчивы к панкреатической РНКазе (5 мкг на 1 мл, 0,3 М NaCl-0,03 М Na-цитрат, 17°, 5 мин.), т. е., по-видимому, представляли собой истинные РНК-ДНК гибриды. Связывание C¹⁴-РНК с ДНК вьюна является видоспецифичным, т. к. гель, содержащий ДНК кишечной палочки вместо ДНК вьюна, связывает не более 1% добавленной к нему C¹⁴-сРНК гастролы. Столько же меченой РНК гастролы связывалось с гелем, не содержащим ДНК.

Необходимо отметить, что использованное в опытах соотношение C¹⁴-сРНК:ДНК, равное 1:5, соответствует условиям избытка ДНК, близким к условиям максимального связывания РНК. В опытах с конкуренцией немеченую РНК добавляли в возрастающих количествах, доходя до соотношения 10:1, т. е. до 50-кратного избытка по отношению к меченой РНК, вследствие чего немеченые молекулы РНК все в большей степени мешали связыванию гомологичных меченых молекул. Однако и это соотношение все еще далеко от насыщающего, когда занимают все участки ДНК, комплементарные данной популяции молекул РНК (по предварительным данным, для C¹⁴-РНК гастролы насыщение ДНК начинает проявляться при соотношении РНК:ДНК около 70:1). Поэтому при соотношении 10:1 конкуренция будет обнаруживаться в основном лишь между теми гомологичными молекулами РНК, которые находятся в препаратах в большом числе экземпляров, те же молекулы, которые относительно менее многочисленны, практически не будут конкурировать, несмотря на наличие гомологии. В силу сказанного, приводимые в данной работе результаты касаются в основном количественно преобладающих классов молекул РНК, другими словами, они дают возможность

судить о наличии или новообразовании РНК-продуктов только тех генов, которые наиболее активны в течение изучаемых отрезков развития. Данные же, касающиеся генов, продуцирующих небольшие количества молекул соответствующих мРНК, могут быть получены лишь при работе в зоне насыщения ДНК, и будут изложены в другом сообщении.

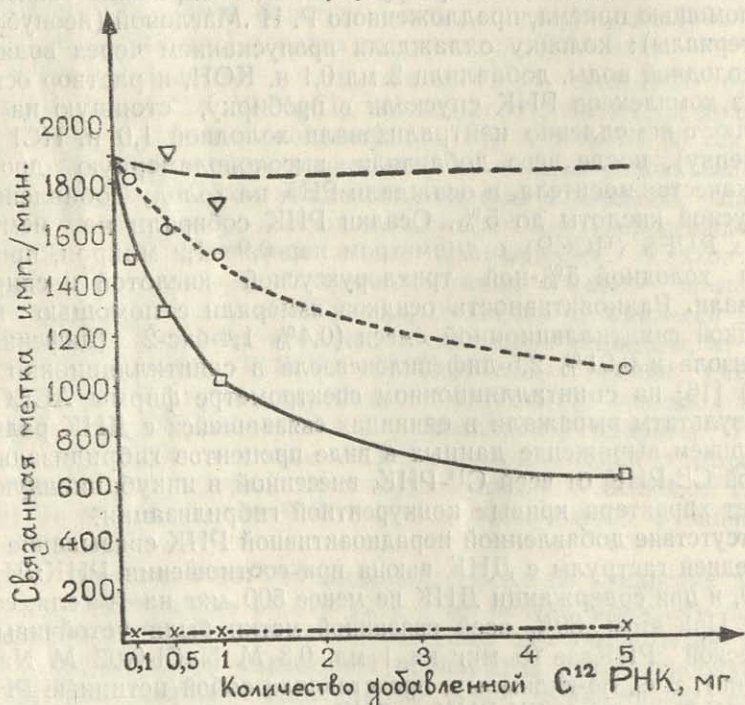


Рис. 1. Специфичность связывания C^{14} -РНК гастролы выюна с ДНК-агаровым гелем.

50 мкг C^{14} -снРНК, выделенной из икры выюна на 13-м часу развития после включения C^{14} -карбоната в течение двух часов (от 11-го до 13-го часа развития), инкубировали (16 час. при 60°) с 800 мг агарового геля, содержащего 50 мкг ДНК спермы выюна; немеченные препараты РНК (C^{12} -РНК) добавляли в пробы в количествах 0,1, 0,5, 1,0 и 5,0 мг; конечный объем проб был 0,9 мл. C^{12} -РНК;

Δ — Δ — связывание в присутствии РНК пекарских дрожжей;
 o—o — связывание в присутствии C^{12} -РНК печени выюна;
 п—п — связывание в присутствии C^{12} -РНК икры выюна из икры на стадии средней гастролы (13-й час развития);
 х—х — связывание в присутствии C^{12} -РНК гастролы выюна на геле, не содержащем ДНК.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены результаты опыта, в котором проверялась специфичность эффектов конкуренции в условиях, используемых в дальнейших опытах для характеристики популяций мРНК икры на разных стадиях развития. Из верхней кривой рис. 1 видно, что добавление возрастающих количеств немеченой снРНК дрожжей одновременно с 50 мкг C^{14} -снРНК гастролы выюна не вызывает

снижения связывания метки с ДНК спермы вьюна. Это свидетельствует об отсутствии неспецифического влияния избытков РНК на комплексообразование РНК зародышей вьюна с гомологичной ДНК; в то же время, добавление тех же количеств немеченой РНК гастролы угнетает связывание меченой РНК этой же стадии приблизительно на 60%. Инкубация таких же смесей меченых и немеченых РНК гастролы с агаровым гелем без ДНК не дает, как это показывает нижняя кривая рис. 1, увеличения сорбции меченой РНК, которая могла бы быть вызвана какими-либо примесями, например, белковыми. Препарат немеченой сРНК печени взрослого вьюна вызывает, как видно из рис. 1, существенное угнетение связывания C^{14} -РНК гастролы. Это показывает, что РНК дифференцированной ткани этого животного, в отличие от РНК генетически несвязанного вида (дрожжи), дает эффект конкуренции, сравнимый с тем, который обнаруживают РНК эмбриональных стадий.

Результаты, приведенные на рис. 1. наряду с упомянутым ранее отсутствием связывания C^{14} -РНК икры вьюна с гелем, содержащим ДНК кишечной палочки, и с 80%-ной устойчивостью комплексов РНК-ДНК вьюна к обработке РНКазой, позволяют заключить, что в описываемых в данной работе опытах наблюдалась специфическая гибридизация РНК зародышей вьюна с ДНК спермы этого животного, и что эффекты угнетения связывания меченой РНК зародышей являются следствием специфической конкуренции немеченых РНК зародышей вьюна за комплементарные последовательности на ДНК.

На рис. 2 приведены кривые, характеризующие относительную способность немеченых препаратов сРНК, полученных из зрелых неоплодотворенных яиц и на разных стадиях развития оплодотворенной икры, конкурировать с C^{14} -РНК, синтезированной в интервале 11—13 час. развития, за связывание с ДНК спермы вьюна. Рассмотрение этих кривых позволяет сделать следующие заключения.

Наибольшую и практически одинаковую степень конкуренции с меченой РНК ранней-средней гастролы обнаруживают немеченые РНК этой же стадии (13 час.), поздней бластулы — начала гастрюляции (10 час.) и конца гастрюляции (20 час.). Это свидетельствует о преобладании на этих стадиях эмбриогенеза популяций мРНК, которые гомологичны мРНК, синтезируемым на 11—13-м часах развития.

Несколько меньшую, но весьма значительную конкуренцию обнаруживают немеченые РНК, выделенные из неоплодотворенных и синхронно дробящихся яиц (5-й и 6-й часы развития). Способность этих препаратов к конкуренции с C^{14} -РНК гастролы можно, в пределах погрешности опыта, считать близкой друг другу. Этот результат означает, прежде всего, что неоплодотворенное яйцо содержит значительное число молекул мРНК, гомологичных новообразуемым мРНК гастролы. Количество таких молекул в яйце сравнимо с их количеством в гастролу, состоящей из большого числа клеток (порядка 10^4). Большая степень гомологии в популяциях неоплодотворенного яйца и гастролы свидетельствует о том, что при оогенезе и при гастрюляции транскрибируется большое число идентичных генов.

Способность немеченых РНК синхронно дробящегося яйца конкурировать с C^{14} -РНК гастролы в степени, близкой к конкурирующей способности РНК неоплодотворенного яйца, указывает на наличие в них сравнимых количеств гомологичных мРНК. Поскольку синтез мРНК в ядрах в первые 6 часов развития не обнаруживается [2, 3], этот резуль-



тат, по-видимому, может быть истолкован как свидетельство сохранения большей части мРНК, синтезированных в процессе оогенеза.

Значительно меньшую степень конкуренции обнаруживает немеченая РНК средней-поздней бластулы (8-й час развития). Кривая конку-

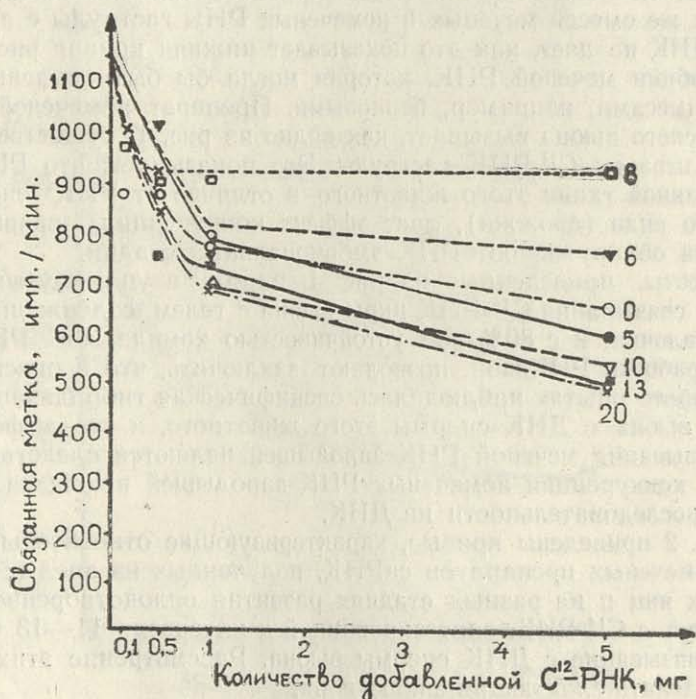


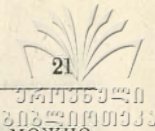
Рис. 2. Сравнение способности немеченых препаратов из икры вьюна на разных стадиях развития к конкуренции с C^{14} -РНК средней гастрюлы за связывание с ДНК спермы вьюна.

50 мкг C^{14} -снРНК, выделенной из икры вьюна на 13-м часу развития после включения C^{14} -карбоната от 11-го до 13-го часа, инкубировали (16 час. при 60°) с 930 мг агарового геля, содержащего 250 мкг ДНК спермы вьюна; немеченые препараты РНК добавляли в пробы в количествах 0,1, 0,5, 1,0 и 5,0 мг; конечный объем проб был 1,0 мл.

Цифры, которыми обозначены кривые, соответствуют часам развития, на которых выделялись препараты РНК:

- 0 — неоплодотворенная икра,
- 5 — синхронное дробление яйца, ранняя бластула,
- 6 — бластула,
- 8 — средняя-поздняя бластула,
- 10 — поздняя бластула — начало гастрюляции,
- 13 — средняя гастрюла,
- 20 — конец гастрюляции (замыкание желточной пробки).

ренции указывает на исчезновение из икры большей части (около 50%) популяции молекул мРНК, гомологичных мРНК, которые синтезируются на 11-13-м часах развития. Этот факт свидетельствует о распаде данно-



го класса молекул, запасенных в яйце при оогенезе. Отсюда можно приблизительно оценить полупериод жизни этих молекул с момента оплодотворения: он составляет около 8 часов, однако при этом распад этих молекул происходит во времени не равномерно, а значительно ускоряется между 5-м и 8-м часами развития.

Как видно из рис. 2, к 10-му часу развития способность немеченой РНК икры конкурировать с меченой РНК гастрюлы возвращается к максимальным значениям. Следовательно, в период между 8-м часом, когда конкуренция минимальна, и 10-м часом, т. е. в период поздней бластулы, имеет место обильный синтез тех классов мРНК, которые синтезируются и на стадии ранней-средней гастрюлы. Этот результат свидетельствует о том, что на начальных этапах гастрюляции не происходит обнаружимое при данной постановке опытов, т. е. множественное, образование таких классов мРНК, которые не синтезировались бы на стадии поздней бластулы. Этот вывод важен для понимания генетических механизмов, лежащих в основе одного из важнейших событий морфогенеза — перехода от стадии бластулы к гастрюле — однако необходимо подчеркнуть, что он касается лишь наиболее активно функционирующих генов, тогда как гены, на которых синтезируются небольшие количества молекул мРНК и которые могут иметь значение для гастрюляции, не учитываются.

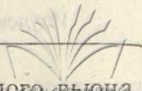
Рассматривая всю совокупность представленных данных, можно прийти к выводу, что в геноме вьюна имеется группа генов, активно транскрибируемых как при оогенезе, так и на стадиях поздней бластулы и гастрюлы. Часть этих генов, по-видимому, активна и в дифференцированных тканях взрослого организма, т. к. РНК печени содержит большое число молекул мРНК, гомологичных синтезируемым на стадии гастрюлы (рис. 1). Аналогичный вывод достигнут и при исследованиях популяций мРНК в неоплодотворенных яйцах, эмбрионах и дифференцированных тканях морского ежа [4, 5] и лягушки [6, 7]. Вместе с тем, очевидно, что в печени не обнаруживается большая часть популяции мРНК, которая имеется в яйце и в развивающихся зародышках вьюна. Это, по-видимому, является следствием ограничения активности определенных частей генома при дифференцировке тканей.

ВЫВОДЫ

1. Неоплодотворенное яйцо вьюна содержит популяцию молекул информационной кислоты (мРНК), гомологичную по крайней мере значительной части популяции молекул мРНК, синтезируемых в зародышках на стадии ранней-средней гастрюлы. Эта популяция мРНК в основном сохраняется в течение большей части периода синхронных дроблений, следующих за оплодотворением яйца, после чего около половины этой популяции распадается.

2. На стадии поздней бластулы имеет место обильный синтез популяции молекул мРНК, гомологичных синтезируемым на стадии ранней-средней гастрюлы. Этот класс молекул мРНК обнаруживается также на стадии конца гастрюляции. Популяция мРНК печени взрослого животного частично гомологична популяциям, обнаруживаемым на эмбриональных стадиях.

3. Делается вывод о существовании в геноме вьюна группы генов, активно транскрибируемых при оогенезе, позднем дроблении и гастрю-



ляии, а также в дифференцированной ткани (печени) взрослого лосося. Другая часть генома, активно транскрибируемая при оогенезе и на ранних стадиях эмбриогенеза, неактивна или мало активна в дифференцированной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. А. Кафиани и М. Я. Тимофеева, в сб.: «Успехи биологической химии», т. 8, стр. 138—167 (1967).
2. К. А. Кафиани и М. Я. Тимофеева, Доклады АН СССР, 154, 721 (1964).
3. М. Я. Тимофеева, А. А. Нейфах и К. А. Кафиани, в сб.: «Структура и функция клеточного ядра», Изд-во «Наука» (1967), (в печати).
4. A. H. Whiteley, B. J. McCarthy, H. R. Whiteley, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 55, 519 (1966).
5. V. R. Glisin, M. V. Glisin, P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 56, 285 (1966).
6. H. Denis, J. Mol. Biol., 22, 285 (1966).
7. R. A. Flickinger, R. Greene, D. M. Kohland, M. Miyagi Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 56, 1712 (1966).
8. А. А. Нейфах, Журнал общей биологии 20, 202 (1959).
9. М. Я. Тимофеева и К. А. Кафиани, Доклады АН СССР 169, 1183 (1965).
10. М. Я. Тимофеева и К. А. Кафиани, в сб.: «Нуклеиновые кислоты» (Труды 2-й конференции по нуклеиновым кислотам), Изд-во «Медицина», Москва (1966), стр. 106—111.
11. A. M. Crestfield, K. C. Smith, F. W. Allen, J. Biol. Chem., 216, 185 (1955).
12. S. Cohen, J. Biol. Chem., 211, 337 (1954).
13. J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 208 (1961).
14. O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
15. E. T. Bolton, B. J. McCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 48, 1390 (1962).

C. A. KAFIANI, J. A. RACHKUS,
M. J. TIMOFEEVA

STUDY OF MESSENGER RNA POPULATIONS AT THE BEGINNING OF THE ONTOGENESIS OF LOACH

(*Misgurnus fossilis*)

Summary

1. Populations of messenger RNA (mRNA) were studied in early stages of loach embryogenesis with the method of competition-hybridization of RNA's from different stages with loach sperm DNA.

2. Unfertilized egg of loach contains a population of mRNA which is homologous at least to the great part of mRNA molecules synthesized at the late blastula and early-mid gastrula stages. This mRNA population is on the whole conserved during the period of synchronous cleavage

following fertilization of the egg, then the large part of this population is decayed.

3. Abundant synthesis of a population of mRNA molecules, homologous to those synthesized at early-mid gastrula stage, occurs at the late blastula stage. Most part of this population is homologous to mRNA molecules which are present in unfertilized and synchronously cleaving eggs. These kinds of mRNA molecules are found also at the end of gastrulation.

4. It is concluded that there is a group of genes in loach genome which are actively transcribed during oogenesis, at gastrulation, and also in the differentiated tissue (liver). Another part of genome, also actively transcribed at embryonic stages, are inactive, or relatively inactive, in the differentiated tissue.

Н. В. САЛАМАТИНА, Г. Д. ТУМАНИШВИЛИ

ДЕЙСТВИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР И ЦИТОПЛАЗМЫ НА СИНТЕЗ ДНК

Недавно Г. Д. Туманишвили было выдвинуто предположение, что определенные ядерные факторы вызывают торможение синтеза ДНК, а цитоплазматические — стимулируют его. Согласно этой точке зрения соотношение между ядерными и цитоплазматическими факторами представляет собой основу одного из механизмов, обуславливающих постоянство концентрации ДНК в ткани [1]. Последнее действительно имеет место в ткани печени и, по всей вероятности, также и в других тканях [2]. Предполагается, таким образом, что ядра являются источником веществ, тормозящих синтез ДНК, в то время как цитоплазма содержит химические факторы, стимулирующие его.

С целью выяснения того, насколько правильно приведенное предположение, нами проведены опыты, изложение которых и составляет задачу настоящей работы. Мы провели более или менее подробное исследование в печени 11-дневных куриных зародышей изменений, вызванных введением в них ядерной и цитоплазматической фракции гомогената печени взрослой курицы. В дополнительной серии опытов мышам после частичного удаления печени вводили цитоплазматическую и ядерную фракции печени мыши. Мы имели основания предполагать, что введенные фракции будут избирательно локализоваться в гомологических тканях зародышей и подопытных животных, поскольку способностью к специфической локализации обладают как целые клетки, как и их компоненты [3—8].

Если фракции, выделенные из клеток, не сразу теряют свои свойства и некоторое время могут действовать подобно тому, как это происходит в целых клетках, введение ядерной фракции должно было создать в печени зародышей и подопытных животных преобладание ядерных факторов. Введение цитоплазматической фракции, напротив, должно было повести к преобладанию цитоплазматических факторов.

МЕТОДИКА

Опыты на куриных зародышах. С целью получения цитоплазматической и ядерной фракций печень взрослой курицы или, как это было



в некоторых опытах (см. ниже), печень куриных зародышей гомогенизировалась в 0,25 М растворе сахарозы при соотношении веса ткани к объему раствора 1:5 с добавлением 0,0018 М хлористого кальция. Гомогенизация проводилась в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Ядра осаждали центрифугированием при 600—700 g в течение 10 минут. Надосадочная жидкость, представляющая собой цитоплазматическую фракцию, сливалась. Ядра вновь ресуспензировались в половине первоначального объема раствора сахарозы и вновь центрифугировались. Эта процедура повторялась трижды.

В зародыши вводили по 0,04 мл цитоплазматической фракции или ядерной взвеси, что соответствовало 2 мг сухого вещества.

Для введения в зародыш какой либо из фракций в скорлупе и кожистой оболочке яйца прodelывалось отверстие и вещество вводилось через него при помощи микропипетки. Однако инъекции в воздушную камеру не производили.

Зародыши забивались на 3, 6, 12, 18, 24, 27, 36, 48 час после введения соответствующей фракции. В эти же сроки забивали контрольных зародышей. В каждой группе в каждый срок исследовано по 15 зародышей.

В печени зародышей определяли содержание ДНК. Определение производили спектрофотометрически по способу, предложенному Паневым и Марковым [9], дающему возможность исключить влияние примесей. Кроме того, в приготовленных микросрезях, окрашенных гематоксилин-эозином, подсчитывали число ядер на поле зрения с введением поправки на величину диаметра [10]. Полученное число являлось относительной величиной концентрации ядер в ткани. В таблице содержание ДНК выражалось в мг% фосфора ДНК, на рисунках же величины даны в процентах от соответствующих чисел, полученных при исследовании контрольных зародышей, не подвергавшихся никаким воздействиям.

Проведены также цитофотометрические исследования, для чего срезы толщиной в 5 μ окрашивались по Фельгену, снимались на пленку и фотометрировались обычным образом.

Опыты на мышах. Цитоплазматическую и ядерную фракции из печени мыши получали по методу Шово и сотр. [11], несколько видоизмененную нами: печень мышей гомогенизировалась в 0,25 М растворе сахарозы при соотношении веса ткани к объему раствора 1:5 в присутствии 0,0018 М хлористого кальция.

Гомогенат центрифугировали при 600—700 g в течение 10 минут. Надосадочная жидкость, представляющая цитоплазматическую фракцию, сливалась. Ядра ресуспензировались в 2,2М растворе сахарозы и центрифугировались при 18000 g в течение 25 минут. Процедуру повторяли дважды.

Животные были разделены на 3 группы: первой группе вводили цитоплазматическую фракцию, второй—ядерную, а третья группа либо

не подвергалась никаким воздействиям, кроме операции, либо была инъецирована раствором сахарозы. Мышам вводили по 0,1мл раствора на животное. Таким образом, при применении ядерной или цитоплазматической фракции каждое животное получало 20 мг сухого вещества при однократном введении.

Гепатектомию проводили по Йокояма [12]. Фракции мышам вводили внутривенно. В первой серии опытов введение производили однократно, сейчас же после операции. Во второй серии делалось еще одно введение на 24-й час после операции. Во всех случаях животных забивали через 30 часов после операции.

В опытах на мышах делались все те же определения, что и на зародышах. Цитофотометрические исследования проведены не были.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Опыты на зародышах. Результаты опытов этой серии даны в таблице и на рис. 1, 2, 3. Как видно из приведенных данных, действие цитоплазматической фракции печени взрослой курицы на синтез ДНК в печени 11-дневных куриных зародышей выражается в повышении концентрации ДНК в ткани, что происходит дважды — на 6 и 36 часы опыта. Соответственно повышается количество ДНК на ядро. В остальные сроки количество ДНК на ядро несколько ниже, чем в контроле, однако синтез ДНК в целом ускорен даже в эти периоды. Это подтверждается тем, что количество ДНК на всю печень в печени зародышей, подвергшихся воздействию цитоплазматической фракцией печени взрослой курицы, повышено почти в течение всего опыта.

Ядерная фракция куриной печени вызывает понижение концентрации ДНК в печени подопытных зародышей. В этом случае понижение концентрации ДНК в ткани наступает к 12-му часу и является более устойчивым, чем повышение концентрации ДНК под влиянием цитоплазматической фракции. Несмотря на то, что, учитывая точность применяемого нами метода, мы сознательно закругляли результаты (отбрасывая десятые), как показала обработка результатов по Стьюденту и Вилькоксоу (модификация Уайта) [13], различия оказались вполне существенными. Понижение концентрации ДНК в ткани сопровождается понижением её количества на ядро.

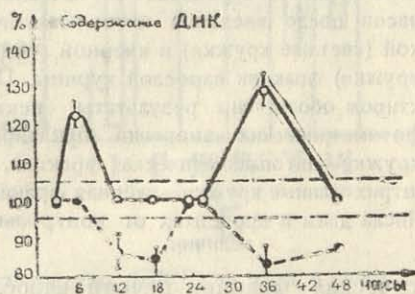
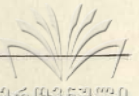


Рис. 1. Изменение содержания ДНК в печени 11-дневного куриного зародыша в течение 48 часов после введения в него цитоплазматической (светлые кружки) и ядерной (темные кружки) фракции гомогената печени взрослой курицы. Числа даны в процентах от соответствующих величин, полученных у контрольных зародышей.



Цитофотометрические исследования в основном подтвердили результаты биохимических опытов. Имеют место, однако, известные расхо-

ждения. Например, количество на ядро, измеренное цитофотометрическим способом, в случае введения в зародыши ядерной фракции, оказывается несколько ниже, чем эта же величина, полученная посредством соответствующего расчета.

В настоящее время мы не можем объяснить эти несовпадения, но не считаем их существенно меняющими суть полученных результатов.

Как удалось установить, тормозящая активность ядер может зависеть от ситуации, сложившейся в ткани в момент их выделения. Это, во всяком случае, показано в отношении митотической активности [14]. С целью выяснения того, зависит ли тормозящая синтез ДНК активность от взаимодействий клеток был поставлен следующий опыт. В 11-дневные куриные зародыши была введена цитоплазматическая фракция печени взрослой курицы. На 39-й час после введения

Рис. 2. Изменение среднего количества ДНК на ядро клеток печени 11-дневного куриного зародыша в течение 48 часов после введения цитоплазматической (светлые кружки) и ядерной (темные кружки) фракции взрослой курицы. Пунктиром обозначены результаты спектрофотометрических измерений (пунктирные кружки—цитоплазматическая фракция, заштрихованные кружки—ядерная фракция). Числа даны в процентах от контрольных величин.

концентрация ДНК в печени зародышей-реципиентов оказалась повышенной (рис. 4). Если на 36-й час опыта дополнительно ввести в зародыши ядерную фракцию печени зародыша, концентрация ДНК в печени подопытных зародышей остается повышенной. Нами был поставлен несколько иной вариант опыта. А именно, ядерная фракция была выделена из ткани печени зародышей, подвергшихся за 36 часов до выделения воздействию цитоплазматической фракцией печени взрослой курицы. Как известно, в таких условиях концентрация ядер в печени зародышей заметно повышена [14]. Введение ядерной фрак-

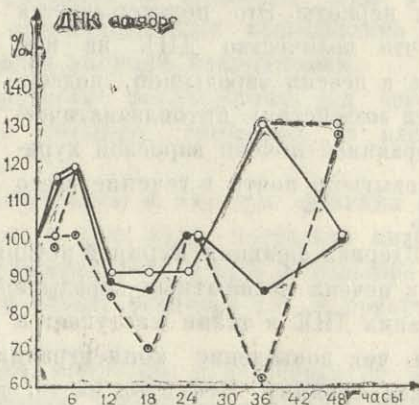


Рис. 3. Изменение среднего количества ДНК на ядро печени 11-дневного куриного зародыша без каких-либо воздействий (кривая 1), после введения цитоплазматической (кривая 2) и ядерной (кривая 3) фракций печени взрослой курицы. Числа выражены в мг $\times 10^4$.

ции печени зародышей, выделенной таким образом, резко снижает концентрацию ДНК в ткани печени зародышей-реципиентов (рис. 4).

Менее ясно обстоит дело с цитоплазматической фракцией печени зародышей. В обоих вариантах опыта её введение вызывало некоторое понижение концентрации ДНК в ткани печени подопытных зародышей.

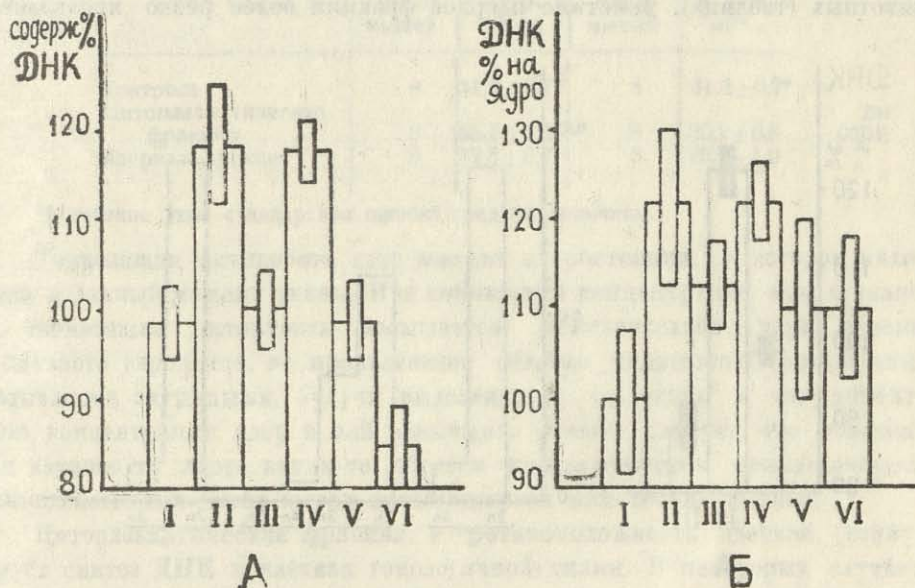


Рис. 4. Содержание ДНК (А) и среднее количество ДНК (Б) на ядро в печени 11-дневных куриных зародышей, инъецированных цитоплазматической фракцией печени взрослой курицы и подвергшихся на 36-й час опыта дополнительному введению цитоплазматической или ядерной фракции печени 11-дневного куриного зародыша. Определения производились на 39-й час опыта, через 3 часа после дополнительного введения. Результаты получены путем биохимических определений. Данные выражены в процентах от контроля.

I—контроль, II—цитоплазма (взр. курицы), III—цитоплазма (взр. курицы) + цитоплазма (зародыш), IV—цитоплазма (взр. кур.) + ядра (зар.), V—цитоплазма (взр. кур.) + цитоплазма (ПС), VI—цитоплазма (взр. кур.) + ядра (ПС). ПС—соответствующая фракция выделена из печени зародышей, инъецированных за 36 часов до выделения цитоплазматической фракцией печени взрослой курицы.

Однако в опытах, в которых мы проводили цитофотометрические определения, введение цитоплазматической фракции, выделенной из печени зародышей, инъецированных за 36 часов до выделения цитоплазматической фракцией печени взрослой курицы, совершенно очевидно повышало число полиплоидных клеток и, соответственно, количество ДНК на ядро (рис. 5.)

Опыты на мышах. Опыты с однократным и двукратным введением фракций дали несколько различные результаты. Средняя концентрация ДНК в ткани интактной печени оказалась равной $30,3 \pm 1,0$ мг%. (Опре-

деления проведены на мышах). В печени контрольных животных содержание ДНК, по нашим данным, равно $31,2 \pm 0,7$ мг%. Вследствие однократного введения цитоплазматической фракции гомогената печени мышам гепатектомированным мышам содержание ДНК в печени подопытных животных несколько повышается, однако, ядерная фракция не оказывает заметного влияния на содержание ДНК в печени гепатектомированных животных (таблица). Действие ядерной фракции более резко проявляется

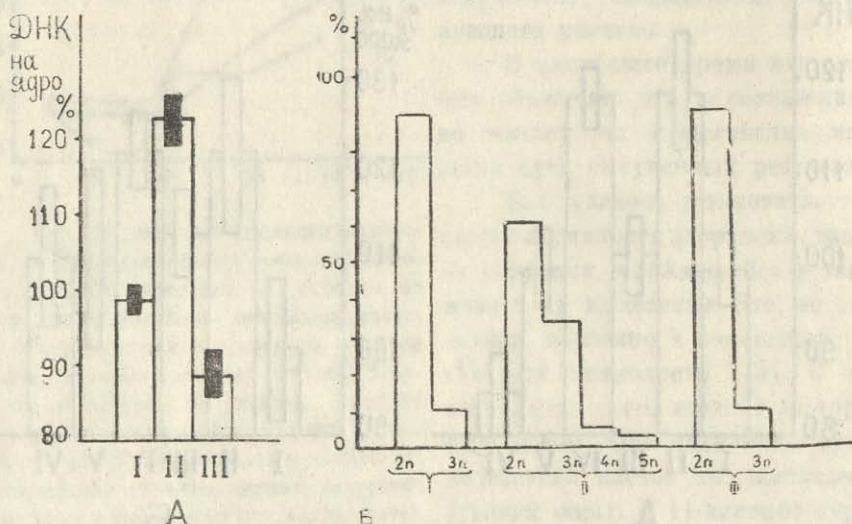


Рис. 5. Результаты цитофотометрических исследований среднего количества ДНК на ядро (А) и относительного числа полиплоидных клеток (Б) в вариантах опыта цитоплазма (взр. кур.) + цитоплазма (ПС) II и цитоплазма (взр. кур.) + ядра (ПС) III. I—контроль. Обозначения те же, что и на рис. 4.

при её двукратном введении. В этом случае содержание ДНК в печени мышей-рецидивентов оказалось заметно пониженным (таблица). В противоположность опыту с однократным введением цитоплазматическая фракция в случае её двукратного введения не действует на содержание ДНК в печени (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших опытов указывают на то, что ядра печени содержат фактор, тормозящий синтез ДНК в клетках печени того же типа. Торможение синтеза может быть настолько сильным, что падает не только общее содержание ДНК в ткани, но и её количество на ядро (опыты на зародышах). Торможение синтеза ДНК под воздействием ядерной фракции гомогената печени имеет место и в печени взрослых животных (мышей). В последнем случае падение концентрации ДНК в ткани не сопровождается понижением количества ДНК на ядро—торможение синтеза ДНК выражено не так резко, как у зародышей.



Содержание ДНК в ткани печени мышей после введения им цитоплазматической и ядерной фракции гомогената печени мыши

| III I Род опыта | Однократное введение | | Двукратное введение | |
|----------------------------|----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | число мышей | Р ДНК в мг % | число мышей | Р ДНК в мг % |
| Контроль | 8 | 31,2±0,7* | 8 | 31,2±0,7* |
| Цитоплазматическая фракция | 8 | 35,1±1,2 | 8 | 30,2±0,9 |
| Ядерная фракция | 8 | 32,5±0,7 | 8 | 25,5±1,0 |

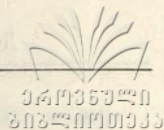
*В таблице дана стандартная ошибка средней величины.

Тормозящая активность ядер зависит от состояния, в котором находится в данный момент ткань. При повышении концентрации ядер в ткани их тормозящая активность повышается. Действительно, ядра печени 11-дневного зародыша, не проявляющие обычно тормозящей активности, оказываются активными, будучи выделенными из ткани в тот момент, когда концентрация ядер в ней повышена. Отсюда следует, что тормозящая активность ядер каким-то образом контролируется межклеточными взаимодействиями. Этот вывод представляется нам весьма важным.

Цитоплазматическая фракция, в противоположность ядерной, стимулирует синтез ДНК в клетках гомологичной ткани. В некоторых случаях при повышении концентрации ДНК в ткани под влиянием цитоплазматической фракции среднее количество ДНК на ядро понижается. Это, по-видимому, объясняется следующим. Цитоплазматическая фракция повышает митотическую активность (Саламатина и Туманишвили—1968). Понижение количества ДНК на ядро означает, что повышение митотической активности под влиянием цитоплазматической фракции происходит в большей мере, чем ускорение синтеза ДНК. Это заставляет предполагать, что для вступления клетки в митоз предшествующее ему удвоение количества ДНК в S фазе не является обязательным условием и в некоторых случаях клетки могут делиться, не проходя S фазу. Подобное предположение уже высказывалось [15, 16]. Однако расхождение между фазами митотического цикла в нашем случае может быть кажущимся, а наблюдаемые явления могут быть следствием удивления в какой-то момент G₂ фазы [см. 16 и 17]. Клетки как бы „застревают“ в ней. При определенных же обстоятельствах эти клетки вступают в митоз. Наступает кажущаяся деплоидизация.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Д. Туманишвили, Некоторые вопросы регуляции роста живых тканей, Изд. „Мецниереба“, Тбилиси (1965); сб. „Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы“, Изд. „Наука“, Москва, стр. 204 (1965).



2. Г. Д. Туманишвили, Настоящий сборник, стр. 9.
3. P. Weiss, G. Andres, J. Exptl. Zool., 121, 449 (1952).
4. G. Andres, J. Exptl. Zool., 122, 507 (1953).
5. J. D. Ebert, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 40, 337, 1954; В. сб. „The chemical basis of development“. Изд. D. McErloy and B. Glass, Maryland (1958), стр. 526.
6. J. D. Ebert, L. E. Delanney, Nat. Cancer Inst., Monograph, № 2, 73 (1960).
7. H. Walter, D. W. Allmann, H. R. Mahler, Science, 124, 1251 (1956).
8. T. A. Hudnik-Plevnik, V. R. Glinin, M. M. Simic, Nature, 184, 1818 (1959).
9. Р. Г. Цанев, Г. Г. Марков, Биохимия, 25, 151 (1960).
10. M. Abercrombie, Anat. Rec., 94, 239 (1946).
11. I. Chauveau, I. Moulé, C. Rouiller, Exptl. Cell Res., 11, 317 (1956).
12. Н. О. Йокояама, М. Е. Wilson, R. K. Tsubo, R. E. Stowell, Cancer Res., 13, 80 (1953).
13. Дж. У. Снедекор, Статистические методы в применении к исследованиям биологии (перевод с английского), Изд. «Сельскохозяй. лит. журналов и плакатов», Москва (1961).
14. Н. В. Саламатина, Г. Д. Туманишвили, Журн. общ. биол., 1968 (том XXIX, 2).
15. A. Linder, Cancer Res., 19, 189 (1959).
16. S. Gelfant, Exptl. Cell Res., 26, 395 (1962).
17. A. Macieira-Coelho, J. Panten, L. Philipson, Exptl. Cell Res., 43, 20 (1966).

N. V. SALAMATINA, G. D. TUMANISHVILI

ACTION OF CELL NUCLEI AND CYTOPLASM ON DNA SYNTHESIS

Summary

Cytoplasmic fraction of hen liver homogenate injection into 11-day-old chick embryos causes an increase of DNA concentration and of its amount per nucleus in the liver tissue of the embryorecipient. The nuclear fraction, on the contrary, decreases the DNA content and its amount per nucleus in embryonic chick liver. Suppression of DNA synthesis in the part of mouse liver after a partial hepatectomy is observed at intraperitoneal injection of nuclear fraction of the mouse liver and stimulation of DNA synthesis is observed at the use of cytoplasmic fraction of the mouse liver for the operated mice.

The extent of DNA synthesis suppression by nuclei depends on the state of the tissue during isolation of nuclei from it.

Experiments have shown that certain nuclear factors cause inhibition of DNA synthesis while cytoplasmic factors stimulate it.

Б. Н. ТАРУСОВ, Ю. П. КОЗЛОВ, О. Р. КОЛЬС,
И. М. ЛИМАРЕНКО, Г. Е. ФЕДОРОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВОЗБУЖДЕНИЯ МЕТОДОМ РАДИКАЛЬНОЙ СОПОЛИМЕРИЗАЦИИ

В настоящее время еще очень мало известно о химических и физико-химических процессах, сопровождающих возникновение и распространение возбуждения. Обширная литература, посвященная механизму возникновения биоэлектрических потенциалов, касается, главным образом, участия в этом процессе ионов — в первую очередь ионов калия, натрия и хлора, и сравнительно мало затрагивает вопрос о том, какие процессы обеспечивают возможность изменения ионных соотношений при возбуждении и восстановлении затем исходного состояния. В значительной мере это связано с тем, что физиология и биофизика располагают слишком малыми методическими возможностями для исследований в этой области. Новые перспективы для изучения химических и физико-химических процессов при возбуждении открылись после того, как Б. Н. Тарусовым и Ю. П. Козловым был разработан метод привитой радикальной сополимеризации. Этот метод позволяет прижизненно обнаруживать свободные радикалы в клетках животных и растений.

Метод радикальной полимеризации основан на принципе сополимеризации введенных в живые клетки виниловых мономеров с биополимерами протоплазмы. При этом количество полимеризованного мономера пропорционально количеству возникающих в тканях свободных радикалов. Обнаружить в тканях привитой полимер можно при помощи весового метода; или — с большей точностью — при помощи радиометрического метода и метода гистоавтордиографии, если использовать маномер, меченный радиоактивным изотопом [1—4].

Приступая к исследованию процесса возбуждения методом привитой сополимеризации, мы избрали объектами экспериментов клетки водоросли нителлы, нервы конечности травяного краба и седлищные нервы лягушки. В работе был использован мономер акриламида, меченый радиоактивным изотопом углерода C^{14} ($CH_2=C^*N-CONH_2$) [см. 5—8].

Прежде всего надо было установить, имеет ли место при возникновении и распространении возбуждения радикальный процесс. Мы рассуждали следующим образом: предположим, что при нанесении раздражения в возбудимом субстрате развивается реакция, в ходе которой появляются, возможно как промежуточный продукт, свободные радикалы. Эта реакция обеспечивает развитие и распространение возбуждения. Если же в клетку введен мономер, некоторая часть свободных радикалов будет инъецировать его полимеризацию. Тогда полимеризованный (или олигомеризованный) акриламид окажется связанным с возбуди-

мым субстратом. Если же возбуждение не осуществится и свободные радикалы не появятся, полимеризации акриламида не произойдет. В наших опытах для обнаружения в клетках меченого акриламида использовался метод гистоавторадиографии. Поэтому подопытные объекты — изолированные нервы и клетки водоросли — фиксировались при помощи спирта, формалина или кипятка, а затем подвергались соответствующей гистологической обработке, в частности проводке через ряд спиртов. Можно было ожидать, что при этом полимеризованный акриламид останется в клетке, а неполимеризованный уйдет в указанные растворы. В соответствии с этим на гистоавторадиограммах появится большее или меньшее количество треков от бета-частиц радиоактивного углерода.

Исходя из такой предпосылки, мы сопоставили препараты опытные, т. е. подвергнутые раздражению, и контрольные, которые были зафиксированы без раздражения.

Нервы краба и лягушки фиксировались 96° спиртом (с последующей фиксацией жидкостью Карнуа) после тетанизации, которая велась с частотой порядка 100 импульсов в секунду в течение 5—10 минут; клетки водоросли фиксировались кипятком после 10 одиночных раздражений. После проводки нервов через спирты объекты заключались в парафин. На микротоме изготовлялись срезы толщиной 10 микрон. Методом влажного прикрепления тканевых срезов были получены гистоавторадиограммы на фотопластинках типа МР. Препараты, окрашивались гематоксилином Караччи и заключались в канадский бальзам. Под микроскопом подсчитывалось число восстановленных зерен серебра на площади 0,004 мм². Из этого числа вычитался фон (число восстановленных зерен серебра вне препарата). Клетки водоросли фиксировались целиком и заливались эмульсией типа Р.

Во всех опытных препаратах было обнаружено большое количество треков от бета-частиц радиоактивного углерода. В контрольных препаратах треков было значительно меньше (рис. 1). Необходимо отметить, что получить контрольные препараты нервов, совершенно свободные от полимеризованного акриламида, практически не удавалось. Не говоря уже о том, что и в покоящихся клетках могут протекать некоторые химические процессы с образованием свободных радикалов, само воздействие фиксирующего раствора оказывает раздражающее действие. Вообще фиксировать нерв, совершенно не подвергая его раздражению, не удастся. Поэтому мы старались только сделать это раздражение возможно более слабым. Из большого количества испробованных фиксаторов мы остановились на 96° спирте и 4%-ном растворе формалина.

Гистоавторадиограммы получались от участков нерва, расположенных в 2—4 см от места раздражения. Поэтому можно считать, что с процессами радикального характера связано не только возникновение, но и распространение возбуждения.

Далее, вставал вопрос о том, есть ли корреляция между процессами, в ходе которых возникают свободные радикалы, и важнейшими физиологическими феноменами. Как известно, нерв может воспроизводить без трансформации ритмические раздражения только до тех пор, пока ритм стимуляции не превышает определенную, характерную для каждого вида нервов, частоту. Можно было предполагать, что если проведение возбуждения действительно непосредственно связано с радикалообразованием, а процесс сополимеризации полностью, или хотя бы час-

тично, необратим, количество полимеризованного акриламида будет нарастать по мере увеличения частоты раздражения — до тех пор, пока нерв будет воспроизводить заданный ритм.

Были поставлены опыты, в которых нервы конечности краба раздражались с частотами от 10 до 400 имп./сек., а седалищные нервы лягушки — от 10 до 1000 имп./сек. в течение 5 минут. Потенциалы действия записывались на шлейфном осциллографе МПО—2. Нерв краба может воспроизводить без заметной трансформации ритмы раздражения порядка 100—150 имп./сек. в течение 1—2 минут. После этого обычно часть волокон прекращает ответ на раздражение или отвечает на одно раздражение из двух, трех и т. д. При более высоких частотах трансформация наступает уже в первые секунды раздражения, а на раздражения с частотой 300—400 имп./сек. нерв краба, практически не отвечает.

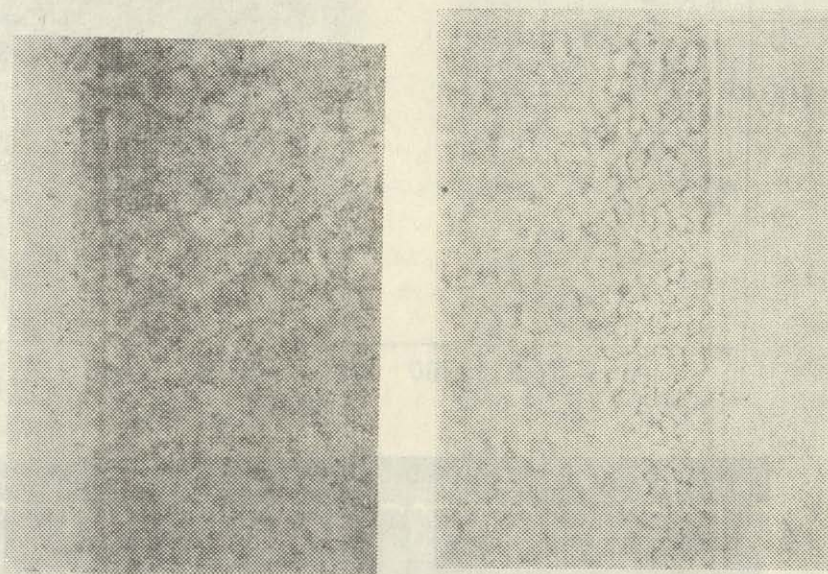


Рис. 1. Гистоавтордиограммы клеток водоросли нителлы.

А. Опыт (10 одиночных раздражений), Б. Контроль (без раздражения).
Увеличение 800 х.

На двигательном нерве лягушки снижение амплитуд потенциалов действия наступает при ритмах раздражения порядка 300—400 имп./сек. Приведенные здесь цифры надо считать приблизительными, т. к. частотный максимум зависит от ряда факторов, в частности от сезонных изменений.

Было установлено, что в нервах краба максимальное количество свободных радикалов образуется при частоте раздражения 120—160 имп./сек., а в нерве лягушки — при 250—300 имп./сек. (рис. 2, А и Б). На гистоавтордиограммах (рис. 3, А и Б) видно, что при малой частоте раздражения в обоих случаях восстановленных зерен серебра совсем мало, их количество резко увеличивается при максимальных частотах раздражения, воспроизводимых данными нервами, и снова падает, когда частота раздражения становится для этих нервов чрезмерной.

Таким образом, было установлено, что осуществление возбуждения непосредственно связано с образованием свободных радикалов. Можно

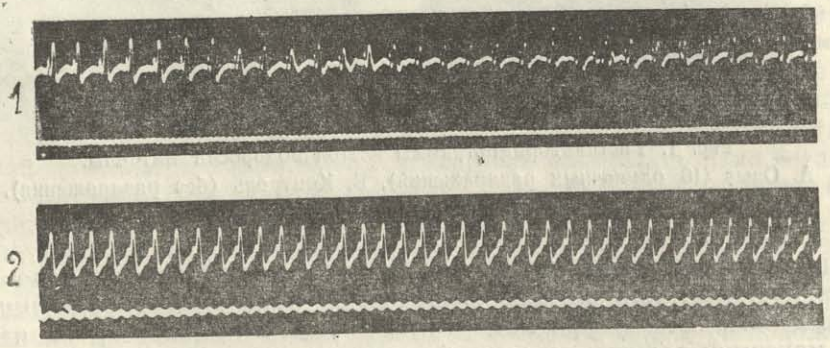
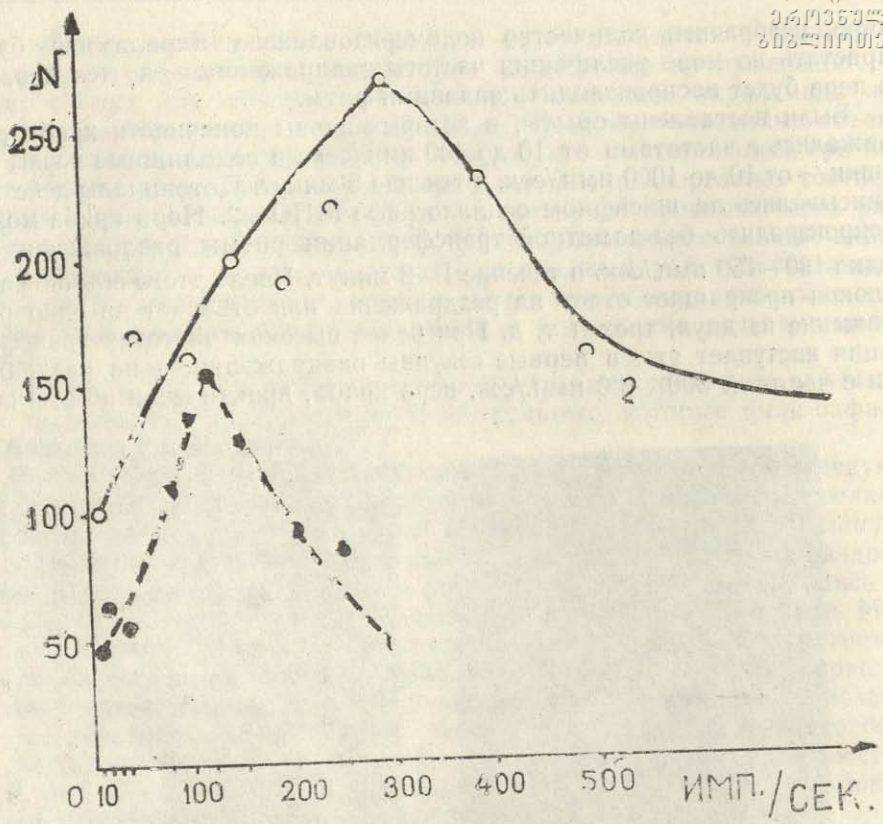


Рис. 2. А. Зависимость между частотой раздражения нерва краба и нерва лягушки и количеством образующихся в них свободных радикалов.

1) нерв краба, 2) нерв лягушки.

По оси абсцисс — частота раздражения (имп./сек.), по оси ординат — число зерен восстановленного серебра на единицу площади препарата (N).

Б. Потенциалы действия:

1) нерва краба (120 имп./сек.), 2) нерва лягушки (300 имп./сек.); отметчик времени в обоих случаях 500 гц.

было заключить также, что лабильность возбудимых образований зависит от скорости протекания в них радикальных реакций. Об этом говорят максимумы радикалообразования, приходящиеся на разные час-

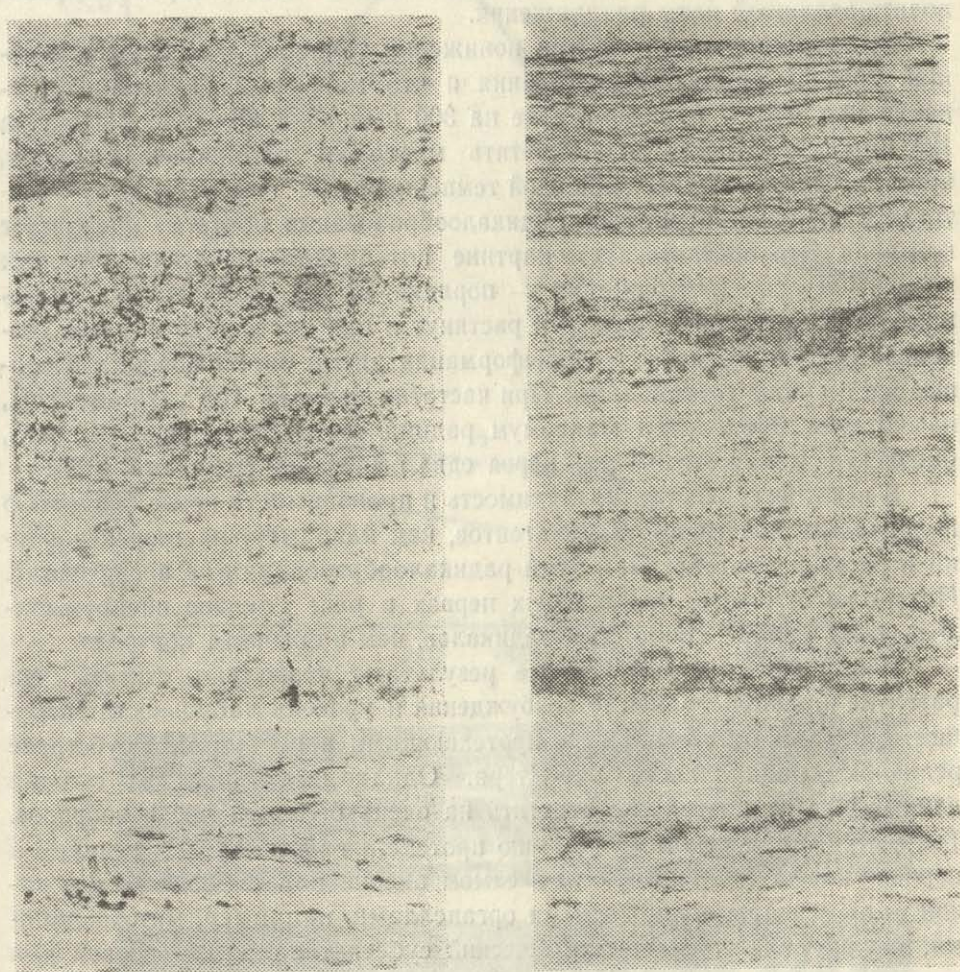


Рис. 3. Гистоавтордиограммы продольных срезов нервов, раздражаемых с разной частотой:

А. Краба. 1. — 60 имп./сек., 2. — 120 имп./сек., 3. — 200 имп./сек., 4. — контроль (без раздражения).

Б. Лягушки. 1. — 50 имп./сек., 2. — 300 имп./сек., 3. — 500 имп./сек., 4. — контроль (без раздражения).

Увеличение 600 х.

тоты раздражения у нервов лягушки и краба, обладающих заведомо различной лабильностью.

Для того, чтобы подтвердить предположение о связи лабильности со скоростью радикальных реакций надо было искусственно снизить в эксперименте лабильность нерва и проследить изменение радикалообра-

зования в этих условиях. С этой целью были проведены опыты, в которых нервы лягушки раздражались в условиях понижения температуры — при $+10^{\circ}$ и $+5^{\circ}\text{C}$. Как известно, при понижении температуры изменяется форма потенциалов действия и способность нерва воспроизводить заданный ритм раздражения.

Было обнаружено, что при понижении температуры снижается общий уровень радикалообразования и что максимум радикалообразования при $+10^{\circ}\text{C}$ приходится не на 300 имп./сек., как при $+20^{\circ}$, а на 125 имп./сек. При $+5^{\circ}\text{C}$ отметить максимум радикалообразования, практически, не удастся: при этой температуре на всех испытанных частотах раздражения уровень радикалообразования почти не превышает контроль. Это соответствует картине потенциала действия. Уже при низких частотах раздражения — порядка 10—25 имп./сек., пик потенциала действия нерва снижен и растянут и при частоте 25 имп./сек. довольно отчетливо заметна трансформация ритма, начинающаяся в первые же секунды тетанизации. При частотах порядка 100—125 имп./сек., на которые приходится максимум радикалообразования при $+10^{\circ}\text{C}$, биоэлектрическая активность нерва едва выражена (рис. 4 А и Б).

В некоторых опытах возбудимость и проводимость нерва полностью подавлялись действием таких агентов, как например, раствор новокаина и раствор уретана. При этом радикалообразования не происходило. Интересно отметить, что в таких нервах в ряде случаев обнаруживалось даже меньше свободных радикалов, чем в обычном контроле.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что развитие и распространение возбуждения и уровень лабильности возбудимых образований связаны с протекающими в возбудимом субстрате реакциями радикального характера. Однако имеющиеся на сегодня данные еще не позволяют ответить на очень большое число вопросов. Так мы не знаем еще локализацию протекания радикальных реакций в нервах — осуществляются они в самом аксоне или в оболочке и в какой мере связаны с клеточными органеллами, например, митохондриями. Трудно сказать, какой химический субстрат является основой для протекания этих реакций. Наконец, неизвестно, связано с радикальными реакциями непосредственно осуществление возбуждения или последующее восстановление исходного состояния возбудимого субстрата, или оба эти процесса. Пока имеются лишь некоторые указания на то, что восстановление после возбуждения имеет связь с радикальными реакциями. Была поставлена серия опытов, в которых нервы лягушки фиксировались через 5 минут после окончания тетанизации. В этом случае максимум радикалообразования приходился на частоты порядка 200—300 имп./сек., как и в обычном варианте опытов, однако, на каждой испытанной частоте количество свободных радикалов было большим.

Применение метода радикальной сополимеризации открывает широкие возможности для исследования процесса возбуждения и круг вопросов и объектов исследования должен быть значительно расширен.

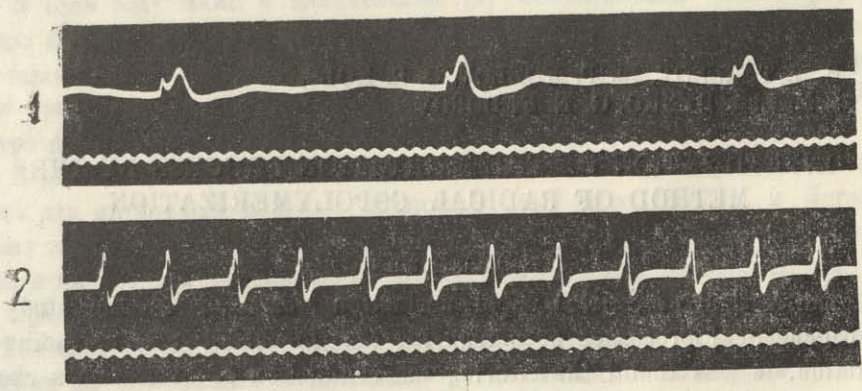
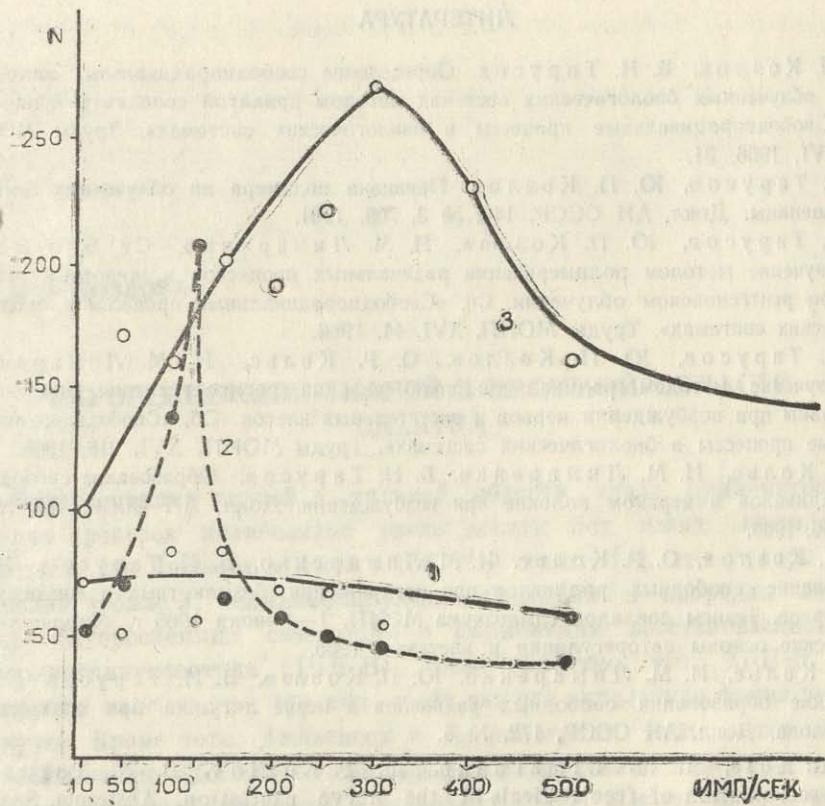


Рис. 4. А. Зависимость между частотой раздражения нерва лягушки и количеством обращающихся в нем свободных радикалов.

1. — при +5°C. 2. — при +10°C. 3. — при +20°C, по оси абсцисс — частота раздражения (имп./сек.), по оси ординат — число зерен восстановленного серебра на единицу площади препарата (N).

Б. Потенциалы действия нерва лягушки.

1. — при +5°C (25 имп./сек.). 2. — при +20°C (100 имп./сек.), отсчет времени в обоих случаях 500 мкс.

ЛИТЕРАТУРА

061035340
20321110333

1. Ю. П. Козлов, Б. Н. Тарусов. Определение свободнорадикальных состояний в облученных биологических системах методом привитой сополимеризации. Сб. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». Труды МОИП, XVI, 1966, 31.
2. Б. Н. Тарусов, Ю. П. Козлов. Прививка полимера на облученных семенах пшеницы. Докл. АН СССР, 140, № 3, 709, 1961.
3. Б. Н. Тарусов, Ю. П. Козлов, И. М. Лимаренко, Се Бао-шень. Изучение методом полимеризации радикальных процессов в животных тканях при рентгеновском облучении. Сб. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». Труды МОИП, XVI, 44, 1966.
4. Б. Н. Тарусов, Ю. П. Козлов, О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко. Изучение методом радикальной полимеризации распространения химической волны при возбуждении нервов и растительных клеток. Сб. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». Труды МОИП, XVI, 218, 1966.
5. О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Б. Н. Тарусов. Образование свободных радикалов в нервном волокне при возбуждении. Докл. АН СССР, 167, № 4, 956, 1966.
6. Ю. П. Козлов, О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Б. Н. Тарусов. Образование свободных радикалов при раздражении безмякотных и миелиновых нервов. Тезисы докладов симпозиума МОИП, 1—4 июня 1965 г. «Физико-химические основы авторегуляции в клетках», 1965.
7. О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Ю. П. Козлов, Б. Н. Тарусов. Изменение образования свободных радикалов в нерве лягушки при воздействии холода. Докл. АН СССР, 172, № 5.
8. O. R. Kols, I. M. Limarenko, Ju. P. Kozlov, B. N. Tarusov. Discrimination of free radicals at the nerve excitation. Abstracts. Second International biophysics congress. Vienna, September (1966).

B. N. TARUSOV, Ju. P. KOZLOV, O. R. KOLS,
I. M. LIMARENKO, G. E. FEDOROV

INVESTIGATION OF THE EXCITATION PROCESS BY THE METHOD OF RADICAL COPOLYMERIZATION

Summary

The method of radical copolymerization was used in the study of physico-chemical processes accompanying the initiation and spreading of excitation. It was found that during the conduction of excitation a chemical reaction develops, in the course of which free radicals are formed. The quantity of free radicals depends on the lability of the object and the frequency of the applied irritation. Thus, for instance, maximum radical formation is observed in the nerve of the crab at a frequency of 120—160 pulses per second, and in the sciatic muscle of the frog at 250—300 pulses per second. When the nerve lability is diminished (as by a drop of temperature) the level of radical formation is decreased. In experiments where excitability and conductivity of the nerve were depressed by the action of certain narcotics no free radicals were formed.

Н. В. КОЗЛОВА

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ТКАНЕЙ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ
СПЕКТРА

Флуоресценция тканей в видимой области стала применяться для изучения процесса метаболизма около десяти лет назад, по-видимому, после того, как Дюйзенс и Амец в 1957 году нашли [1], что спектры флуоресценции дрожжей, люминесцирующих бактерий и хлореллы подобны спектру флуоресценции связанного с ферментами восстановленного дифосфопиридиннуклеотида (ДПН-Н). Было известно, что ДПН-Н флуоресцирует с максимумом 460 мкм, тогда как его окисленная форма не флуоресцирует. Кроме того, Дюйзенсом и Кроненбергом было показано, что при связывании ДПН-Н с некоторыми ферментами максимум спектра его флуоресценции сдвигается в коротковолновую область до 440 мкм [2].

В 1858 году Чанс и Бальчевский [3] использовали спектрофлуориметрию для определения изменений пиридиннуклеотидов в митохондриях. Ими было показано, что максимум спектра флуоресценции митохондрий лежит при 443 мкм, что довольно хорошо согласуется с максимумом спектра флуоресценции связанного с ферментами ДПН-Н.

В дальнейшем флуориметрия в видимой области спектра была применена для интактных клеток и тканей. В 1959 году Чансом и Легалле [4] был построен дифференциальный микрофлуориметр для изучения изменений в процессе метаболизма в определённых частях живых клеток. На этом приборе измерялась интегральная интенсивность флуоресценции в видимой области спектра. Чанс и Торелл применили этот прибор для изучения флуоресценции цитоплазмы и скоплений митохондрий (Neben Kern) в сперматиде кузнечика. Они получили, что при переходе клеток от аэробного к анаэробному состоянию интенсивность флуоресценции митохондрий увеличивается, что свидетельствует о восстановлении пиридиннуклеотида в этих условиях. Флуоресценция же цитоплазмы не претерпевает подобных изменений (даже наоборот, немного уменьшается во времени), что, по мнению авторов, показывает, что оболочка митохондрий непроницаема для ДПН-Н. В дальнейшем интенсивность флуоресценции клеток и тканей в видимой области спектра стала использоваться в качестве показателя интенсивности дыхательных процессов в клетках [6] или



для определения реакции пиридиннуклеотида на введение различных таболитов [7, 8].

В настоящей работе изучены спектры флуоресценции ткани печени куриного зародыша и взрослой курицы в видимой области спектра, а также исследовано изменение интенсивности флуоресценции при переходе от аэробных к анаэробным условиям и при действии ингибитором дыхания KCN и обсуждён вопрос о связи исследованной нами флуоресценции с ДПН-Н.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ

Спектральные измерения в настоящей работе проводились на спектрофлуориметре, построенном на базе двойного монохроматора ДМР-4. Свет возбуждения от ртутной лампы СВД-500 проходил через светофильтр УФС-2, ограничивающий область возбуждения ртутными линиями с длиной волны менее 400 мк. Изучаемый объект помещался в кювету, температура которой поддерживалась постоянной (21°C). Регистрация флуоресценции производилась фотоумножителем ФЭУ-19 М (катод Sb—Cs). Сигнал с фотоумножителя подавался на самописец ЭПП-07 через катодный повторитель. В некоторых опытах измерялась интегральная интенсивность флуоресценции в области 430—550 мк на флуориметре, описанном в работе [9]. В этом флуориметре с помощью вращающегося полупрозрачного зеркальца на фотокатод фотоумножителя ФЭУ-18 подавались попеременно световые сигналы от объекта и источника возбуждения. Это позволяло путём дальнейшего деления в схеме измеряемого сигнала на опорный (от источника возбуждения) производить измерения, не зависящие от колебаний интенсивности возбуждающего света.

Объектами опытов служили печень куриных зародышей 9—19 дней инкубации и печень взрослой курицы (в возрасте 3—4 месяцев).

СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Как уже было сказано выше, рядом авторов было показано, что флуоресценция тканей или взвеси клеток в видимой области спектра обусловлена присутствием восстановленного пиридиннуклеотида (ДПН-Н), связанного с ферментами [1, 3, 5, 7, 8]. Однако мы получили, что максимум спектра флуоресценции печени куриного зародыша и взрослой курицы лежит при 470 мк, тогда как максимум спектра флуоресценции ДПН-Н в ткани лежит при 443 мк. На рис. 1 дан спектр флуоресценции печени куриного зародыша (с поправкой на спектральную чувствительность прибора). Спектр флуоресценции печени взрослой курицы подобен этому, но интенсивность флуоресценции меньше. Для проверки правильности калибровки прибора был снят спектр водного раствора хинина (см. рис. 1), который даёт интенсивную флуоресценцию с максимумом 450 мк [10].

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В КЛЕТКЕ

Для установления локализации флуоресценции с максимумом 470 мкм в клетке мы применили метод дифференциального центрифугирования тканевого гомогената. Гомогенат из ткани печени куриных зародышей разделялся на ядерную и цитоплазматическую фракции центрифугированием при 600 g в 0,25 M сахарозе. Тщательно очищенные от цитоплазматических частиц повторным центрифугированием в плотной сахарозе ядра не флуоресцировали. Цитоплазматическая фракция флуоресцировала с максимумом 470 мкм. Далее из цитоплазматической фракции центрифугированием при 10000 g были выделены митохондрии, которые в 0,25 M сахарозе давали

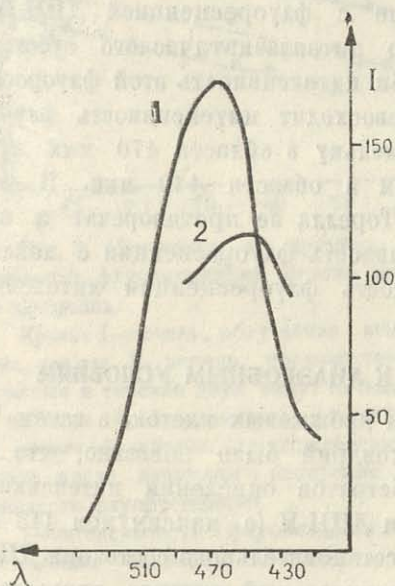


Рис. 1. Спектр флуоресценции ткани печени куриного зародыша (кривая 1) и спектр флуоресценции водного раствора хинина (кривая 2).

I—интенсивность флуоресценции в произвольных единицах, λ—длина волны в миллимикронах.

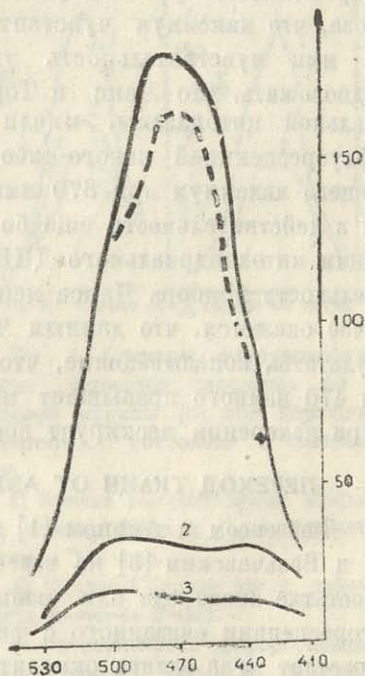
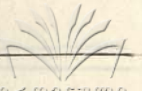


Рис. 2. Спектр флуоресценции цитоплазматической фракции гомогената из печени куриных зародышей (кривая 1) и митохондриальной фракции (кривая 2). Кривая 3—фон, даваемый свечением пустой кюветы.

I—интенсивность флуоресценции в произвольных единицах, λ—длина волны в миллимикронах.

флуоресценцию, столь незначительно превышающую фон, что невозможно было с достаточной точностью определить положение её максимума на спектре. Безмитохондриальная цитоплазма флуоресцировала с максимумом 470 мкм почти так же ярко, как и неразделённая цитоплазма. Результаты этих опытов показаны на рис. 2. Все спектры даны с соответствующими поправками на спектральную чувствительность прибора.

Здесь интересно отметить, что Чанс и Торелл [5], измеряя интег-



ральную интенсивность флуоресценции различных частей клеток сперматид кузнечика, получили, что в нормально дышащей клетке скопление митохондрий (Nebenkern) флуоресцирует гораздо менее ярко, чем безмитохондриальная цитоплазма. Объясняя флуоресценцию присутствием ДПН-Н, Чанс и Торелл высказали предположение, что либо ДПН-Н в безмитохондриальной цитоплазме существенно больше, чем в митохондриях, либо он находится вне митохондрий в каком-то особом состоянии, повышающем квантовый выход его флуоресценции по сравнению с митохондриальным ДПН-Н. Однако Чанс и Торелл измеряли интегральную интенсивность флуоресценции, причём характеристика чувствительности их прибора была такова, что максимум чувствительности был при 440 мк, а при 420 и 540 мк чувствительность уменьшалась вдвое. Учитывая это, можно предположить, что Чанс и Торелл, измеряя флуоресценцию безмитохондриальной цитоплазмы, имели дело не с флуоресценцией ДПН-Н, а с флуоресценцией какого-либо другого цитоплазматического субстрата, дающего максимум при 370 мк. Причём интенсивность этой флуоресценции в действительности ещё больше превосходит интенсивность флуоресценции митохондриального ДПН-Н, поскольку в области 470 мк чувствительность прибора Чанса меньше, чем в области 440 мк. В таком случае окажется, что данным Чанса и Торелла не противоречат и наши результаты, показывающие, что интенсивность флуоресценции с максимумом 470 нмного превышает интенсивность флуоресценции митохондрий и при измерении маскирует последнюю.

ПЕРЕХОД ТКАНИ ОТ АЭРОБНЫХ К АНАЭРОБНЫМ УСЛОВИЯМ

Дьюйзенсом и Амецом [1] на взвеси дрожжевых клеток, а затем Чансом и Бальчевским [3] на взвеси митохондрий было показано, что при недостатке кислорода или избытке субстратов окисления интенсивность флуоресценции связанного с ферментами ДПН-Н (с максимумом 443 мк) возрастает из-за сдвига окислительно-восстановительного состояния ДПН-Н в сторону восстановленного. Поэтому значительный интерес представляло проверить, как ведёт себя флуоресценция печени куриного зародыша и взрослой курицы при переходе ткани от аэробных к анаэробным условиям. Подобные опыты могли бы пролить свет на вопрос о связи флуоресценции печени куриного зародыша и взрослой курицы в видимой области спектра с ДПН-Н. Нами были проведены эти опыты и обнаружилось, что при выдерживании печени куриного зародыша или взрослой курицы длительное время в закрытой кювете без доступа кислорода интенсивность флуоресценции постепенно уменьшается. Чтобы проверить, не вызвано ли это уменьшение фотохимическими процессами под действием облучения ультрафиолетом, нами были проведены контрольные опыты на флуориметре, измеряющем интегральную интенсивность флуоресценции, но имеющем то преимущество, что измерения на нем не зависели от колебаний интенсивности возбуждения. Результаты этих опытов показаны на рис. 3. Изменение дозы ультрафиолетового облучения совершенно

не влияло на скорость уменьшения интенсивности флуоресценции во времени. Различия в начальной интенсивности флуоресценции связаны с различием между отдельными зародышами даже одного возраста.

При переходе ткани от аэробных к анаэробным условиям флуоресценция митохондриального ДПН-Н возрастает. Это было получено Чансом и Тореллом при измерении флуоресценции скоплений митохондрий (Nebenkerne) в сперматиде кузнечика [5]. Поэтому можно было ожидать, что при достаточно длительном выдерживании печени куриного зародыша

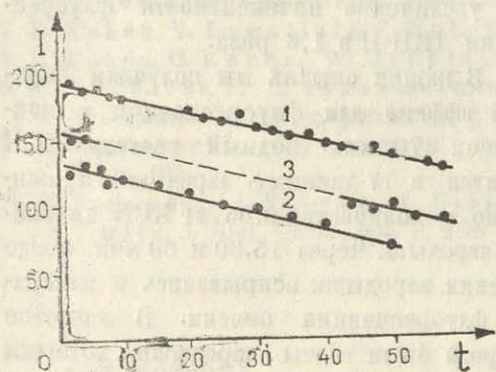


Рис. 3. Изменение во времени интенсивности флуоресценции печени куриного зародыша.

Кривая 1—печень, облучаемая непрерывно, кривая 2—печень, предварительно облучённая в течение двух минут интенсивным потоком возбуждающего ультрафиолета, кривая 3—печень, выдерживаемая в темноте после начального измерения интенсивности флуоресценции.

I—интенсивность флуоресценции в произвольных единицах, t—время в минутах

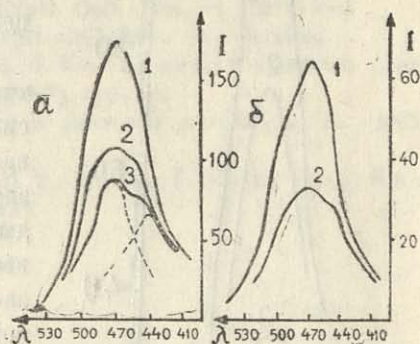


Рис. 4. Спектры флуоресценции печени куриного зародыша (а) и взрослой курицы (б) при переходе от аэробного состояния к анаэробному.

а) Кривая 1—сразу после вскрытия, кривая 2—через 1 час, кривая 3—через 1,5 часа.

б) Кривая 1—сразу после забоя, кривая 2—через 2 часа.

I—интенсивность флуоресценции в произвольных единицах, λ —длина волны в миллимикронах.

или взрослой курицы в закрытой кювете без доступа кислорода наряду с уменьшившейся флуоресценцией безмитохондриальной цитоплазмы (максимум при 470 мкм) проявится возросшая флуоресценция ДПН-Н (максимум при 443 мкм). Из рис. 4 видно, что это действительно так. Флуоресценция ДПН-Н проявляется, по-видимому, в виде горба на спектре при ~440 мкм. Этот горб в случае измерения флуоресценции печени куриного зародыша проявляется приблизительно через один час, в случае же измерения флуоресценции печени взрослой курицы для его проявления необходимо около двух часов выдерживать печень в закрытой кювете.

ДЕЙСТВИЕ ЦИАНИСТОГО КАЛИЯ

Хантером, Леви и др. [11] было показано, что при ингибировании дыхания цианистым калием (KCN) цепь окислительных реакций прерыв-

вается в последнем звене перед кислородом, что приводит к почти полному восстановлению всех компонентов дыхательной цепи, в том числе и ДПН. Поэтому естественно ожидать, что при введении KCN интенсивность флуоресценции ДПН-Н должна воз-

растать. Такой эффект и получали Шудель, Черноградская и др. [6], работая на клетках эсцитной карциномы Эрлиха. При ингибировании дыхания на 92% они получили увеличение интенсивности флуоресценции ДПН-Н в 1,6 раза.

В наших опытах мы получили обратный эффект для флуоресценции с максимумом 470 мкм. Водный раствор KCN вводился в 17-дневные зародыши приблизительно в количестве 0,65 мг KCN на каждый зародыш. Через 15, 30 и 60 мин. после введения зародыши вскрывались и измерялась флуоресценция печени. В качестве контроля были взяты зародыши, которым вводилось такое же количество раствора KCl. Результаты этих опытов видны на рис. 5. При введении KCN интенсивность флуоресценции с максимумом 470 мкм уменьшается. Ранее подобные опыты были проведены нами на флуориметре, описанном в работе [9], при измерении интегральной интенсивности флуоресценции печени куриного зародыша в области 430—550 мкм. Водный раствор KCN вводился в 12-дневные зародыши в таком же количестве. Контролем также служили зародыши, которым вводился раствор KCl. Введение KCN приводило через 1,5 часа к почти полному гашению флуоресценции.

Все описанные в настоящей работе характеристики и свойства флуоресценции ткани печени куриных зародышей и взрослой курицы в видимой области спектра заставляют предположить, что эта флуоресценция обусловлена присутствием в клетке не ДПН-Н, а какого-либо другого субстрата—флуорофора.

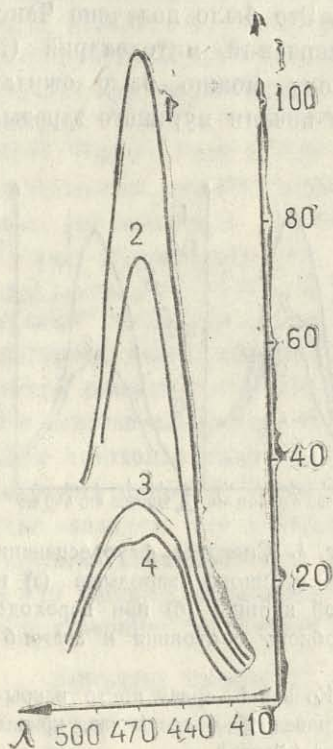


Рис. 5. Действие введения KCN на флуоресценцию печени 17-дневных куриных зародышей.

Кривая 1—спектр флуоресценции печени контрольных зародышей, кривая 2—спектр флуоресценции печени зародыша через 15 мин. после введения KCN, кривая 3—спектр флуоресценции печени куриного зародыша через 30 мин. после введения KCN, кривая 4—спектр флуоресценции печени куриного зародыша через 60 мин. после введения KCN, I—интенсивность флуоресценции в произвольных единицах, λ —длина волны в миллимикронах.

ЛИТЕРАТУРА

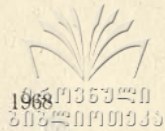
1. L. N. M. Duysens, J. Amesz, *Biochim. et Biophys. Acta*, 24, 19 (1957).
2. L. N. M. Duysens, G. H. M. Kronenberg, *Biochim. et Biophys. Acta*, 26, 437 (1957).
3. B. Chance, H. Baltscheffsky, *J. Biol. Chem.*, 233, (1958).
4. B. Chance, V. Legallais, *Rev. Sci. Instr.*, 30, 8, 732 (1959).
5. B. Chance, V. Thorell, *Nature*, 184, 4691, 931 (1959).
6. М. С. Шудель, Н. А. Черноградская, В. А. Брумберг, Ю. М. Розанов, Е. М. Брумберг. *ДАН СССР*, 1957, 2, 447 (1964).
7. E. Kohen, V. Legallais, C. Kohen, *Exptl. Cell Res.*, 41, 223 (1966).
8. E. Kohen, C. Kohen, W. Jenkins, *Exptl. Cell Res.*, 44, 175 (1966).
9. Н. В. Козлова, Г. Д. Туманишвили, И. Д. Колотова, в сборнике „Биоэнергетика и спектрофотометрия“, М. (1967), стр. 91.
10. С. Юденфренд, *Флуоресцентный анализ в биологии и медицине*, М. (1965), стр. 382.
11. F. E. Hunter, J. F. Levy, Y. Fink, B. Schutz, F. Guerra, A. Hurwitz, *J. Biol. Chem.*, 234, 8, 2176 (1959).

N. V. KOZLOVA

FLUORESCENCE OF TISSUES IN THE VISIBLE
REGION OF SPECTRUM

Summary

Spectra of fluorescence are given in this paper for the visible region of the chick embryonic liver tissue, as well as for that of the hen. It has been shown that spectra have maxima at 470 $m\mu$ and fluorescence is localized in cytoplasm without mitochondria. When the tissue is going from aerobic to anaerobic conditions the intensity of the fluorescence with the maximum 470 $m\mu$ is decreased and the maximum 440 begins to appear which is characteristic of DPN-H fluorescence. When KCN is added the fluorescence with the maximum 470 $m\mu$ disappears, while the fluorescence of DPN-H should increase. The data given allow to assume that in chick embryonic liver tissue as well as in that of a hen there is some other substrate-fluorophor, giving an intensive fluorescence with the maximum 470 $m\mu$.



Т. В. БУРДЖАНАДЗЕ, Н. Г. БАКРАДЗЕ,
Д. Р. МОНАСЕЛИДЗЕ

О ПРИРОДЕ „ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОГО ПЛАВЛЕНИЯ“ КОЛЛАГЕНА

Известно, что при нагревании трёхспиральная молекула коллагена в узком температурном интервале ($\Delta T = 2^\circ\text{C}$) полностью утрачивает спиральную конформацию и распадается на три разупорядоченных клубка [1]. Примечательной особенностью процесса денатурации коллагена, как отмечалось ранее [2], является тот факт, что средняя температура денатурации ТД, так же как и ширина интервала плавления ΔT по показаниям структурных характеристик (оптической активности или вязкости), является параметром, в заметной степени зависящим от скорости прогрева. В 1960 году Флори и Уйвером [3] был предложен механизм распада и респирализации денатурированного теплом коллагена. По мнению этих авторов, этот процесс должен включать в себя некоторую промежуточную стадию, которая, возможно, представляет собой нестабильную однопитевую спираль типа поли—L—пролин—II.

В настоящей работе нами показано, что процесс денатурации коллагена протекает в две стадии изменения его внутримолекулярных характеристик. Калориметрическое измерение энтальпии перехода спираль→клубок ΔH в условиях равномерного прогрева раствора $1^\circ/10$ мин. дало возможность установить, что отмеченные выше особенности денатурации коллагена обуславливаются тем, что стадии изменения конформации белка, обычно регистрируемой по изменению удельной оптической активности или вязкости, предшествует стадия значительного теплопоглощения, величина которого в пересчёте на аминокислотный остаток составляет 1370 кал. моль.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕХНИКА

В опытах использовали кислотнорастворимый коллаген (проколлаген) из кожи крыс. Белок экстрагировали по методу Ореховича [6] при $\text{pH} = 3,9$. Раствор белка двукратно переосаждали и фракционировали хлороформом. Окончательную очистку белка от крупных нерастворимых частиц и агрегатов проводили в препаративной ультрацентрифуге при



100 000g. Очищенный таким образом раствор в аналитической ультрацентрифуге („Спинко—Е“) давал один симметричный седиментационный пик.

Процесс теплопоглощения регистрировался с помощью вакуумного адиабатного микрокалориметра с автоматической записью поглощаемого тепла [7]. Чувствительность прибора составляла 10^{-7} ватт. Изменение удельной оптической активности в процессе денатурации регистрировали на спектрополяриметре с точностью $0,002^\circ$ при $\lambda=405\text{м}\mu$. Опыты ставились с растворами при $\text{pH}=3,9$ в $0,1\text{M}$ цитратном буфере с различными концентрациями белка от $0,02\%$ до $0,1\%$. Концентрацию белка определяли по сухому весу. Все процедуры, связанные с подготовкой растворов к эксперименту, проводились на холоде.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена запись теплопоглощения раствора коллагена полученная в условиях равномерного прогрева $1^\circ/10$ мин. Из рисунка видно, что теплопоглощение проходит в две стадии, соответствующие двум, разграниченным областям температур.

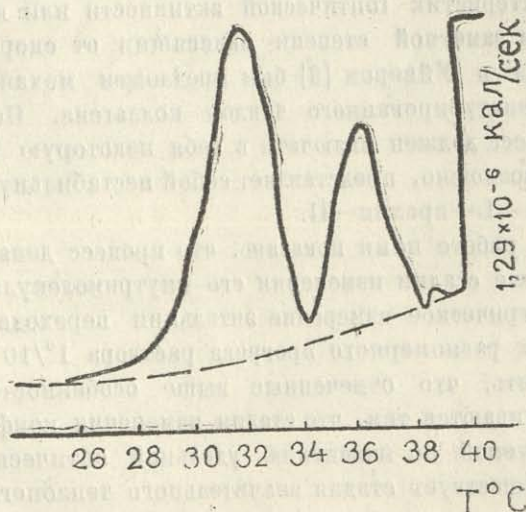


Рис. 1. Запись теплопоглощения при тепловой денатурации коллагена (в кал/сек.). Растворитель: $0,1\text{M}$ цитрат $\text{pH}=3,9$, скорость прогрева раствора $1^\circ/10$ мин. Концентрация белка $0,05\%$. Около 40°C дана калибровочная метка.

Первая из них охватывает $27^\circ\text{—}34,5^\circ\text{C}$, вторая же $34,5^\circ\text{—}40^\circ\text{C}$. Теплота плавления полного денатурационного процесса рассчитывалась по площади, ограниченной кривой плавления и базисной линией, обозначенной на рис. 1 пунктиром. На рис. 2а показана кривая теплопоглощения, полученная нами в результате усреднения данных десяти опытов при различных концентрациях белка ($0,02\%$ — $0,1\%$). Удельная теплота деа-

турации для полного процесса перехода спираль→клубок составляет $18 \pm 1,8$ кал/гр. Отсюда, вклад первой стадии оценивается $12,6 \pm 1,3$ кал/гр., второй же $-5,4 \pm 0,5$ кал/гр. В пересчёте на аминокислотный остаток эти величины оказываются равными: $\Delta H_1 + \Delta H_2 = 1960 \pm 200$ кал/моль для полного денатурационного процесса, $\Delta H_1 = 1370 \pm 140$ кал/моль для первой и $\Delta H_2 = 590 \pm 60$ кал/моль для второй стадии.

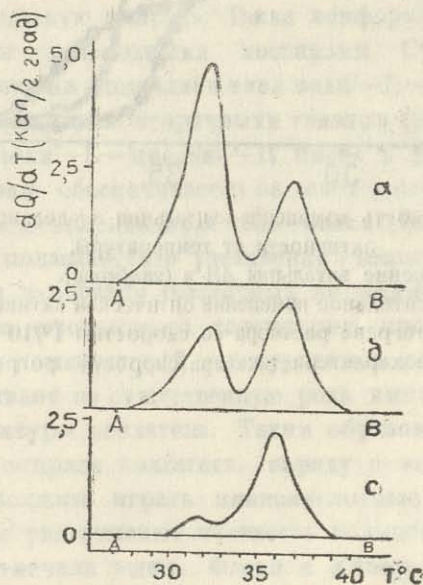


Рис. 2. Зависимость удельного теплопоглощения раствора коллагена от температуры.

а. Изменение энтальпии для нативного коллагена.

б и в. То же самое для предварительно прогретого до $33,5^\circ\text{C}$ и $54,5^\circ\text{C}$ и охлажденного до 25°C (в течение 8—10 часов).

Из рис. 2 б и в видно, что предварительный прогрев до $33,5^\circ\text{C}$ — $34,5^\circ\text{C}$ вызывает резкое уменьшение теплопоглощения на первой стадии. Поэтому малая величина 1 пика, наблюдавшаяся в работе [5], соавтором которой являлся один из нас, может быть объяснена частичной денатурацией препарата, вызванной недостаточно осторожным обращением с ним при подготовке к опыту, а также его длительным хранением на холоде (концентрированные растворы коллагена на холоде сохраняют свои нативные свойства не более одного месяца [3]).

Сопоставление данных увеличения энтальпии с результатами, полученными нами по изменению отрицательного удельного вращения

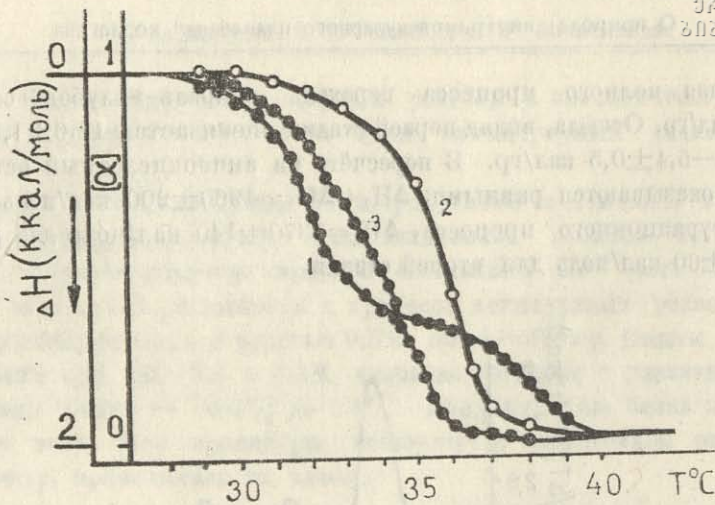


Рис. 3. Зависимость изменения энтальпии и удельной оптической активности от температуры.

Кривая 1—изменение энтальпии ΔH в (ккал/моль).

Кривая 2—относительное изменение оптической активности $[\alpha]_t^{40}/[\alpha]_{10}^{40}$ при прогреве раствора со скоростью $1^\circ/10$ мин.

Кривая 3—та же характеристика при скорости прогрева $1^\circ/100$ мин.

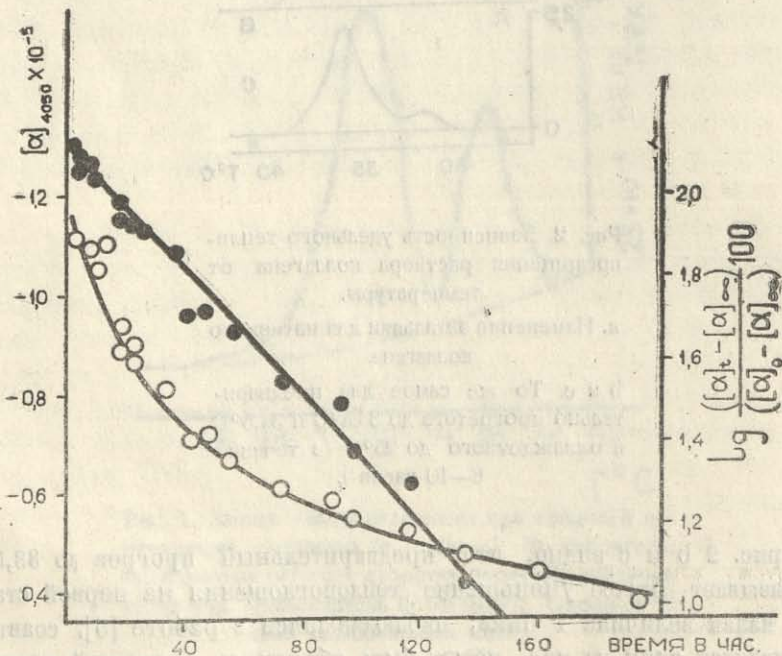


Рис. 4. Временная зависимость удельной оптической активности $[\alpha]_{4050}^{33^\circ}$ и $\lg \frac{[\alpha]_{\infty} - [\alpha]_t}{[\alpha]_{\infty} - [\alpha]_0}$ коллагена при $\lambda=405\text{m}\mu$ в условиях изотермической денатурации, при $t=33^\circ\text{C}$. Растворитель: 0,1М цитрат рН=3,9, концентрация белка 0,02%.

(рис. 3. и 4), позволяет высказать некоторые соображения относительно природы „внутримолекулярного плавления“ коллагена. В частности, представляет интерес обсудить вопрос, относятся ли два максимума теплопоглощения к одинаковым вторичным конформационным связям, или в двух стадиях изменения энтальпии участвуют вторичные связи различного характера.

Согласно представлениям, развитым в работах Рамачандрана [8], Рича и Крика [9], молекула коллагена состоит из трёх левозакрученных спиралей, свёрнутых вместе в правую спираль. Такая конформация стабилизирована внутримолекулярными водородными мостиками $\text{CO}\dots\text{HN}$, расположенными между односторонними спиральями типа поли—L—пролина—II. Не располагая внутримолекулярными вторичными связями (типа водородных в α -спиралях), спираль поли—L—пролина—II имеет в растворах стабильную конформацию, которая обеспечивается за счёт жёстких пирролидиновых колец, включённых в полипептидную цепь белка. Действительно, Жоззе и Харрингтон [10,15] показали, что увеличение температуры денатурации коллагена от образца к образцу (различных по иминокислотному составу) вызвано увеличением процентного содержания пролина и оксипролина. Прямая связь между температурой денатурации и содержанием пирролидиновых колец указывает на существенную роль иминокислотных остатков в стабилизации структуры коллагена. Таким образом, особую роль в стабилизации тройной спирали коллагена, наряду с межцепочечными водородными связями, должны играть иминокислотные остатки, которые в значительной степени увеличивают жёсткость полипептидной цепи [15].

Как мы уже отмечали выше, Флори и Уйвер [3], изучая кинетику респирализации денатурированного коллагена, указали на необходимость образования промежуточной нестабильной формы молекулы, которая может представлять собой одностороннюю спираль типа поли—L—пролина—II. Энгл [4] показал, что при ренатурации оптическая активность раствора восстанавливается в течение нескольких часов на 80%, в то время как вязкость монотонно увеличивается в течение нескольких суток. Учитывая то обстоятельство, что оптическая активность обусловлена вторичной структурой (спиралью типа поли—L—пролин—II), а вязкость жёсткостью и формой макромолекулы, Энгл пришёл к такому же выводу, к которому пришли ранее Флори и Уйвер. Таким образом, из упомянутых нами опытов по денатурации коллагена, а также из данных по влиянию иминокислотных остатков на температуру денатурации, можно сделать заключение о том, что в процессе денатурации возможно образование неустойчивой односторонней спирали типа поли—L—пролин—II.

На рис. 3 энтальпийные изменения денатурационного процесса совмещены с уменьшением отрицательного удельного вращения (для наглядности ось изменения энтальпии направлена вниз). Как видно из рисунка, при одинаковых скоростях прогрева раствора $1^\circ\text{C}/10\text{мин.}$ (кривые 1 и 2) вторая стадия увеличения энтальпии сопровождается основными измене-



ниями в оптической активности белка. Поскольку падение оптической активности связано с изменением во вторичной структуре коллагена [13], то можно предположить, что вся тепловая энергия второй стадии идет на разрушение вторичной структуры коллагена, т. е., спиралей типа поли—L—пролин—II. Более медленный прогрев раствора—1°C/100мин. (кривая 3) заметно изменил форму кривой плавления и привел к ее смещению. Поэтому можно считать вторую стадию теплопоглощения всецело неравновесной. Это подтверждается изогермической денатурацией коллагена при температуре 33°C (рис. 4). Действительно, при 33°C удельная оптическая активность молекулы падает до значения, присущего клубкообразной форме ($[\alpha]_{405} = -360^\circ$). Математическая обработка кривой показала, что процесс деспирализации протекает по экспоненциальному закону, что видно из линейной зависимости $\ln \frac{[\alpha]_t - [\alpha]_\infty}{[\alpha]_0 - [\alpha]_\infty}$ от времени. Из строгого экспоненциального характера поведения удельной оптической активности следует весьма важный вывод, что на первой стадии теплопоглощения изменения структуры имеют место не в отдельных участках макромолекулы, а охватывают всю молекулу в целом.

Величина энтальпии первой стадии денатурации $\Delta H = 1370$ кал/моль в пределах точности оценки соизмерима с энергией замещения водородной связи в белках [14]. Исходя из модели с одной водородной связью на один аминокислотный остаток [1], мы можем приписать эту энергию разрушению внутримолекулярного каркаса водородных связей. Однако, следует отметить, что для модели с двумя водородными связями на триаду аминокислотных остатков [8], энергия водородной связи в коллагене оказалась бы несколько большей, а именно 2000 кал/моль. Что касается величины энтальпии второй стадии теплопоглощения $\Delta H_2 = 590$ кал/моль, то она близка к энергии деспирализации линейных полимерных цепей (600—800 кал/моль) [12]. Равенство этих энергий может служить подтверждением того, что вторая стадия изменения энтальпии связана с разрушением вторичной структуры коллагена.

Таким образом, рассмотрев полученные нами результаты по калориметрическому изучению тепловой денатурации вместе с нашими данными по поведению оптической активности, приняв модель коллагена с одной водородной связью на остаток, мы приходим к следующему предположению. Две последовательные стадии изменения энтальпии связаны с изменением структуры в двух различных степенях организации молекулы. Первая стадия теплопоглощения $\Delta H_1 = 1370 \pm 140$ кал/моль вызвана нарушением третичной структуры белка, т. е. разрывом межцепочечных водородных связей, вторая же $\Delta H_2 = 590 \pm 60$ кал/моль с разрушением вторичной структуры—однотяжевых спиралей типа поли—L—пролин—II.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Doty, T. Nishichara, In: Recent advances in gelation and glue research. N. V., Pergamon Press (1958).
2. W. F. Harrington, P. von Hippel, Advances in protein chem., vol. 16, p. 1 (1961).
3. P. E. Flory, E. S. Weaver, J. Am. Chem. Soc., 82, 4518 (1960).
4. K. Engel, Arch. Biochem. and Biophys., 97, 105 (1962).
5. П. Л. Привалов, Д. Р. Монаселидзе, Г. М. Мревлишвили, Сб. „Молекулярная биофизика“, М. (1965).
6. В. Н. Орехович, Проколлагены, их химический состав и биологическая роль, М. (1952).
7. П. Л. Привалов, Д. Р. Монаселидзе, ПТЭ, 6, 174 (1965).
8. G. N. Ramachandran, G. Kartha, Nature, 176, 593 (1955).
9. A. Rich, F. H. C. Crick, Nature, 176, 915 (1955).
10. J. Josse, W. F. Harrington, J. Mol. Biol., 9, 269 (1964).
11. P. J. Flory, O. Spurr, J. Am. Chem. Soc., 83, 1308 (1961).
12. Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын, Конформации макромолекул, М. (1964).
13. E. R. Blout, J. P. Carver, J. Gross, J. Am. Chem. Soc., 85, 644 (1963).
14. J. Schellman, J. Phys. Chem., 62, 12 (1958).
15. W. F. Harrington, J. Mol. Biol., 9, 613 (1964).

T. V. BURJANADZE, N. G. BAKRADZE,
D. R. MONASELIDZE

ON THE NATURE OF „INTRAMOLECULAR MELTING“ OF COLLAGEN

Summary

It has been shown, using a sensitive microcalorimetric method, that heat absorption during the process of heat denaturation of three-chain helical structure of a collagen molecule has a two-step character with sharply pronounced maxima of heat absorption. At the first stage of heat denaturation, 27°—34.5°C, the value of enthalpy change is 1370 cal/mol. At the second stage, 34.5—40°C, when the change of optical activity takes place as well, it is 590 cal/mol.

On the basis of the data obtained an assumption is made that two-staged change of enthalpy is caused by two, different by their character, conformation forces. Commensurability of the enthalpy of the first stage of denaturation with the energy of hydrogen-bond breakup in the protein gives every reason to attribute the first stage of denaturation to destruction of intramolecular hydrogen frame in three-chain helical structure of collagen. The second stage of enthalpy change, due to its closeness to the energy of destruction of helicity in linear polymer systems, can be attributed to the destruction of one-chain helices of the type poly—L—proline—II.

С. Н. ЦАГАРЕЛИ, Н. Ш. ГАГОШИДЗЕ

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ КОАГУЛЯЦИИ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА НА ПРОЦЕСС САМООБУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАНЕЕ ВЫРАБОТАННЫХ ЗАЩИТНЫХ НАВЫКОВ У БЕЛЫХ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВНЕШНИХ УСЛОВИЯХ

Исследование закономерностей выработки поведенческих актов у животных и выявление роли различных структур головного мозга в этом процессе является одной из важнейших проблем нейрокибернетики и физиологии высшей нервной деятельности.

В настоящее время накоплено множество фактов, указывающих на определенную роль гиппокампа в выработке поведения животных [1—9]. Однако современная трактовка функции гиппокампа все ещё носит описательный характер, так как существующий экспериментальный материал не позволяет в полной мере оценить интегративную роль этой системы. Полученные разными авторами данные о влиянии разрушения гиппокампа на выработку условной защитной реакции весьма противоречивы. Так, например, Исаксон, Дуглас и Мур [10] показали, что животные с удаленным гиппокампом быстрее обучались избегать болевого электрического раздражения, чем интактные. В работе Ники [11], в отношении защитной реакции бегства не были отмечены какие-либо различия между животными с разрушенным гиппокампом и интактными. Каада [12] и Брейди [13] отметили нарушение реакции избегания после повреждения гиппокампа. Одной из причин расхождения во взглядах этих авторов является то, что в подобных работах не используются количественные методы сравнения результатов наблюдений, а качественные методы иногда приводят к необъективным выводам.

Данная работа ставит целью количественно описать процесс обучения животных, начиная с первоначального нулевого проявления до некоторой конечной величины условного рефлекса, и выяснить влияние коагуляции дорсального гиппокампа на этот процесс. Изучалось также влияние коагуляции гиппокампа на воспроизведение закрепленной информации.

В работе сделана попытка выявить влияние повреждения гиппокампа на поведение белых крыс и с помощью методов проверки статистических гипотез.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проводились на белых крысах в хронических опытах. Условный рефлекс вырабатывался на основе электрокожного раздражения в специально для этого оборудованной камере. На правой половине камеры на высоте 7 см смонтирована полка, которую можно в нужный момент опускать и поднимать снаружи. Пол камеры покрыт металлическими пластинками, расположенными параллельно друг другу и включенными в электрическую сеть.

Крысу помещали в экспериментальную камеру и через несколько минут давали условный раздражитель—свет, который подкрепляли болевым электрическим раздражением. Благодаря повышению двигательной активности, связанной с поиском выхода из создавшейся ситуации, крыса случайно прыгала на полку. Эта реакция в процессе эксперимента быстро закрепляется. При подаче условного раздражителя крыса прыгала на полку.

Хирургическую часть работы проводили под эфирным наркозом. Фиксируя животных в стереотаксическом аппарате, с помощью стереотаксических карт мозга крысы [14] производили симметричное двустороннее электрическое повреждение дорсального гиппокампа и зрительной коры.

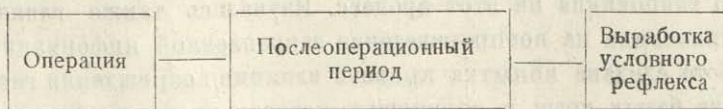
После опытов животные забивались и проводился анатомический контроль повреждения вышеуказанных структур.

Для того, чтобы выяснить функциональную особенность влияний коагуляций дорсального гиппокампа на условно-рефлекторную деятельность белых крыс в разных условиях внешней среды, опыты проводились в двух вариантах.

В первом варианте исследование проводилось в усложненных условиях внешней среды, что больше всего соответствует естественным условиям жизни животных. В этом варианте подкрепление условного раздражения носило случайный характер, оно действовало через разное время после выключения условного раздражения, а иногда, с вероятностью равной 0,2, действовало и одновременно с ним [8].

Во втором варианте влияние коагуляции гиппокампа на поведение животных исследовалось в таких условиях, когда условные и безусловные раздражители с первого дня и до конца эксперимента действовали одновременно, с одинаковой продолжительностью.

В обоих вариантах опыты проводились в двух сериях. В первой серии изучали влияние двусторонней коагуляции дорсального гиппокампа на процесс выработки условно-оборонительной реакции. Порядок проведения опытов следующий:



Во второй серии изучали влияние двусторонней коагуляции гиппокампа на сохранение ранее выработанных навыков. Предварительно у животных вырабатывали условно-оборонительную реакцию, после чего проводили операции. В обеих сериях опыты начинались на 8-ой день после операции.

В каждом варианте животные были разбиты на три группы. Первая—8 животных, у которых был коагулирован дорсальный гиппокамп; вторая—7 животных с коагуляцией зрительной коры; третья—6 интактных животных.

Так как поведение животного носит вероятностный характер, за основную величину была принята вероятность осуществления условной реакции. Для каждого дня отдельно вычисляли вероятность осуществления условной реакции по формуле

$$P = \frac{n}{m},$$

где m —общее число проведенных проб,

n —число проявлений условной реакции.

Средние цифры, полученные при групповой статистической обработке материала, позволили построить графики, характеризующие процесс выработки условно-оборонительной реакции в продолжение всего эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показана выработка условной реакции в среде, в которой подкрепление действует случайным образом. По оси абсцисс отложены

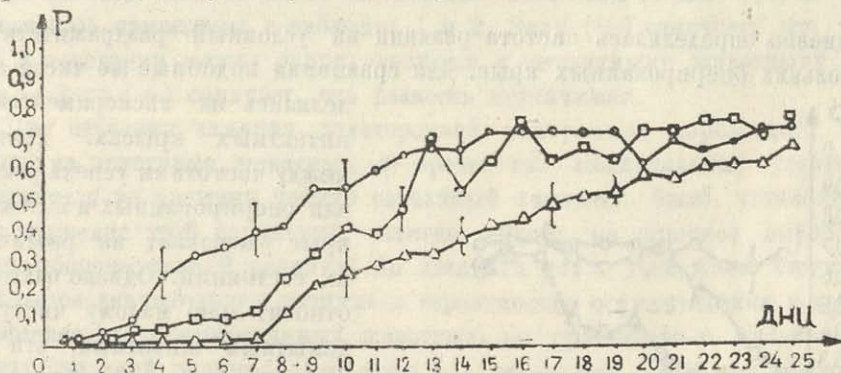


Рис. 1. Кривая выработки условного рефлекса в среде, в которой подкрепление действует случайным образом. Треугольниками обозначена выработка условного рефлекса у животных с разрушенным гиппокампом, квадратами—реакция животных с коагуляцией зрительной коры, кружками—выработка условного рефлекса у интактных животных.

дни, по оси ординат—вероятности реакции. Вертикальными отрезками обозначены дисперсии. Динамика выработки условного рефлекса в среде, в которой условные и безусловные раздражители действуют одновременно, показана на рис. 2.



Графики, характеризующие динамику сохранения условного рефлекса после разрушения гиппокампа и зрительной коры, представлены на рис. 3 и 4.

С целью установления влияния коагуляции гиппокампа на выработку условной реакции и сохранения ранее выработанных защитных навыков,

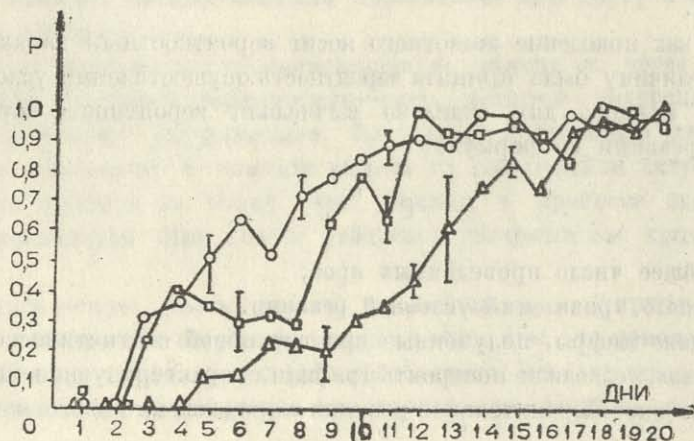


Рис. 2. Кривая выработки условного рефлекса в среде, в которой подкрепление действует одновременно с условным раздражением. Обозначения те же, что и на рис. 1.

ежедневно определялась частота реакции на условный раздражитель для нескольких оперированных крыс. Для сравнения подобные же числа определялись из экспериментов на

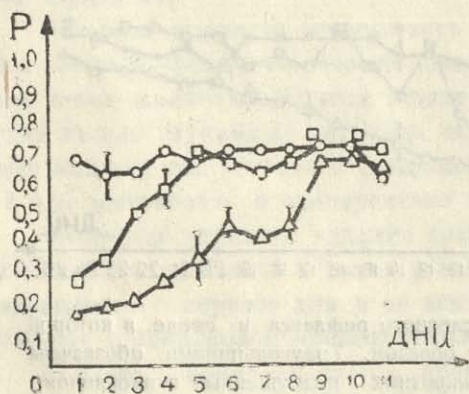


Рис. 3. Кривая сохранения условного рефлекса в среде, в которой подкрепление действует случайным образом. Обозначения те же, что и на рис. 1.

интактных крысах. Разность между частотами успеха реакции для оперированных и интактных крыс указывает на различие в их состоянии. Однако благодаря относительно малому числу подопытных животных, эти различия являются случайными числами с достаточно большим разбросом, поэтому возникает задача об определении достоверности выводов о значимости расхождения между двумя группами крыс. Эту задачу мы решили с помощью применения методики

проверки статистических гипотез. В качестве нулевой гипотезы применялась гипотеза о том, что оперированные и интактные животные не отличаются друг от друга в смысле наших экспериментов, т. е. полагали,

что разность между частотами — величина чисто случайная, не связанная с разницей в состоянии животных. Для проверки гипотезы пользовались t -критерием Стьюдента [15].

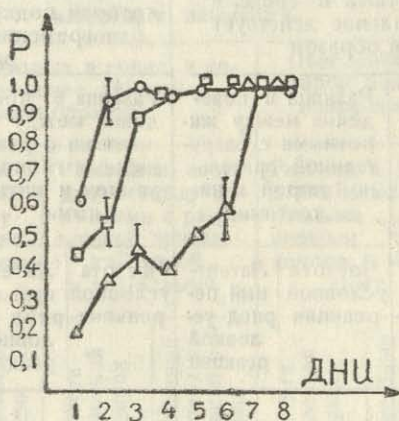


Рис. 4. Кривая сохранения условного рефлекса в среде, в которой подкрепление действует одновременно с условным раздражением. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Результаты опытов после вычисления величины t для уровня значимости 0,05 приведены в таблицах 1 и 2. Знак (—) означает, что разность в поведении между оперированными и интактными животными значимая, а знак (+) означает, что разность незначимая.

При изучении влияния двусторонней коагуляции дорсального гиппокампа на поведение животных в среде, где подкрепление условного раздражителя во времени носило случайный характер, было установлено, что разрушение этой структуры заметно влияет на процесс выработки условно-оборонительной реакции. До двадцати двух дней после операции наблюдается значительная разница в вероятностях осуществления условного рефлекса для оперированных животных, по сравнению с интактными. До двадцати дней разница отмечается и в латентных периодах условного рефлекса. В это время латентный период удлинен до двадцати секунд. Следует заметить, что влияние коагуляции дорсального гиппокампа на выработку условной реакции носит временный характер. На двадцать второй день влияние коагуляции гиппокампа проходит. В последующие дни кривая выработки условного рефлекса у животных с разрушенным гиппокампом все же лежит ниже, чем у интактных животных (рис. 1), но уровень значимости 0,05 после вычисления величины t не выявляет разницы в поведении между этими группами животных.

Двусторонняя коагуляция гиппокампа влияет также на проявление ранее выработанных навыков. Разница в условно-рефлекторной деятель-

Значение величины t при выработке условной реакции

| Дни выработки условного рефлекса | Поведение животных в среде, в которой подкрепление действует случайным образом | | | | Поведение животных в среде, в которой подкрепление действует одновременно с условным раздражителем | | | |
|----------------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| | Разница в поведении между животными с разрушенным гиппокампом и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенной зрительной корой и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенным гиппокампом и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенной зрительной корой и интактными | |
| | Частота условной реакции | Латентный период условной реакции | Частота условной реакции | Латентный период условной реакции | Частота условной реакции | Латентный период условной реакции | Частота условной реакции | Латентный период условной реакции |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 3 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 5 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 6 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 7 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 8 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 9 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 10 | - | + | - | + | - | - | + | + |
| 11 | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 12 | - | + | - | + | - | + | + | + |
| 13 | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 14 | - | + | - | + | - | + | + | + |
| 15 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 16 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 19 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 20 | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 21 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 22 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 23 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 24 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 25 | + | + | + | + | + | + | + | + |

ности оперированных животных по сравнению с интактными отмечается до девяти дней, после чего разница исчезает.

При двусторонней коагуляции зрительной коры налицо другая картина. Разрушение этой структуры вызывает изменения в поведении крыс во время выработки условной реакции в течение двенадцати дней после операции, а при сохранении условного рефлекса—только в течение четырех дней.

Коагуляция дорсального гиппокампа в среде, где подкрепление действует всегда вместе с условным раздражением, вызывает задержку выработки условно-защитной реакции в течение четырнадцати дней, а на проявление ранее выработанных навыков—только в течение шести дней.

Таблица 2

 Значение величины t при сохранении ранее выработанных
 защитных навыков

| Сохранение условного рефлекса в днях | Поведение животных в среде, в которой подкрепление действует случайным образом | | | | Поведение животных в среде, в которой подкрепление действует одновременно с условным раздражением | | | |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| | Разница в поведении между животными с разрушенным гиппокампом и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенной зрительной корой и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенным гиппокампом и интактными | | Разница в поведении между животными с разрушенной зрительной корой и интактными | |
| | частота условной реакции | латентный период условной реакции | частота условной реакции | латентный период условной реакции | частота условной реакции | латентный период условной реакции | частота условной реакции | латентный период условной реакции |
| 1 | — | + | — | + | — | + | — | + |
| 2 | — | ++ | — | ++ | — | ++ | — | ++ |
| 3 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 4 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 5 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 6 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 7 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 8 | — | +++ | — | +++ | — | +++ | — | +++ |
| 9 | + | +++ | + | +++ | + | +++ | + | +++ |
| 10 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| 11 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |

Таким образом, можно утверждать, что повреждение дорсального гиппокампа вызывает более глубокие нарушения в процессе выработки и сохранения условных рефлексов в среде, где подкрепление во времени носит случайный характер, чем в среде, в которой условные и безусловные раздражители действуют одновременно. Эти опыты показали, что после повреждения гиппокампа животные не могут фиксировать в памяти действия условных и болевых раздражителей. Вследствие этого выработка условного рефлекса у этих животных задерживается. Образование условного рефлекса можно рассматривать как одно из важных проявлений памяти. Плохое проявление выработанных навыков и задержка выработки условной реакции, особенно когда подкрепление условного раздражителя носит случайный характер, указывает на то, что гиппокамп играет важную роль в возникновении и закреплении следов памяти, а также в их воспроизведении.

На основании этих экспериментальных данных можно полагать, что ранее выработанные навыки и упроченные условные рефлексы в меньшей степени связаны с функцией гиппокампа, чем более молодые условные рефлексы, что наглядно показано на рисунках 1, 2, 3 и 4. Подводя итоги, можно сказать, что гиппокамп играет более существенную роль в



процессе переработки новой информации, чем в воспроизведении заведенной информации.

В заключение отметим, что при сопоставлении влияния коагуляции дорсального гиппокампа и зрительной коры на выработку условно-оборонительной реакции обнаруживается, что разрушение гиппокампа сильнее замедляет выработку условной реакции, чем разрушение зрительной коры. Заметно понижена частота правильных ответов и удлинен латентный период условной реакции. Эти факты, по-видимому, указывают на то, что дорсальный гиппокамп у крыс в наших условиях опыта играет более существенную роль в выработке условной реакции, чем зрительная кора.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Rampigione, A. Falconer, Electrical stimulation of the hippocampus in man, в книге: „Handbook of Physiology“, vol. II (1960).
2. S. Green, The hippocampus, в книге: „Handbook of Physiology“, vol. II (1960).
3. Дж. Д. Грин, Обонятельный мозг, его отношение к поведению и связь с ретикулярной активирующей системой, в книге: „Ретикулярная формация мозга“ (1962).
4. Дж. В. Пейнз, Висцеральный мозг, его строение и связи, в книге: „Ретикулярная формация мозга“ (1962).
5. Н. А. Тушмалова, К вопросу о роли гиппокампа в условно-рефлекторной деятельности, автореферат кандидатской диссертации (1962).
6. К. Лимаки и Грамтьян, Изменение электрической активности гиппокампа при образовании условных рефлексов, в книге: „Электроэнцефалографическое исследование высшей нервной деятельности“ (1962).
7. А. Тартыгин, Влияние разрушения дорсального отдела гиппокампа на пищевые условные рефлексы у кошек, Журнал высшей нервной деятельности, т. XVI, выпуск 2 (1966).
8. С. Цагарели, Влияние односторонней коагуляции гиппокампа на защитную реакцию, Труды Тбилисского государственного университета, т. 120 (1967).
9. С. Цагарели, Влияние разрушения гиппокампа на пищедобывательные условные рефлексы у крыс, Труды Тбилисского государственного университета, т. 120 (1967).
10. R. L. Isaacson, R. J. Douglas, R. J. Moore, The effect of radical hippocampal ablation on acquisition of avoidance response. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 54, № 6 (1961).
11. Х. Ники, Влияние повреждения гиппокампа на условно-рефлекторное поведение крыс, „Согиаку“, т. 19, № 6 (1962).
12. R. R. Kaada, Somato-motor, Autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of «rhinencephalic» and other structures in primates, cat and dog. Acta physiologica Scandinavica, vol. 24 supplementum, 83 (1951).
13. Дж. Брейди, Палеокортекс и мотивация поведения, в книге: „Механизмы целого мозга“ (1962).
14. I. Groot, The rat hypothalamus in stereotaxic coordinates, Journal of comparative Neurology, 113, № 3 (1959).
15. Н. Бейли, Статистические методы в биологии, Изд. „Иностранная литература“, Москва (1962).



S. N. TSAGARELI, N. SH. GAGOSHIDZE

QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF INFLUENCE OF DORSAL HIPPOCAMP COAGULATION ON THE PROCESS OF SELF-TRAINING AND PRESERVATION OF PROTECTIVE REFLEXES WORKED OUT BY WHITE RATS UNDER DIFFERENT EXTERNAL CONDITIONS

Summary

The influence of two-sided coagulation of dorsal hippocamp on the protective reflex of avoiding conditional painful irritant has been studied both during the process of working out of this reflex and in preservation of reflexes worked out before.

The experimental results after statistical treatment show that earlier worked out reactions and consolidated conditioned reflexes are less connected with the hippocamp function than newer conditioned reflexes.

Т. Г. ЧАНИШВИЛИ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУЛЕНТНЫХ,
УМЕРЕННЫХ И УМЕРЕННО-ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ**

В последнее время бактериальные вирусы — бактериофаги стали объектом пристального и широкого изучения ученых разных специальностей — биологов, физиков, химиков, генетиков. Обладая относительно простым строением, быстрой репродукционной способностью и, что самое главное, будучи удобными для культивирования в лабораторных условиях, бактериофаги были широко использованы при расшифровке механизмов наследственности, изменчивости и целого ряда вопросов на молекулярном уровне. Результатом многолетних творческих поисков и явилась расшифровка наследственного кода, значение которой трудно переоценить.

Глубокому и всестороннему изучению биологии бактериальных вирусов-фагов и их взаимоотношений с клеткой хозяина способствовало ограничение круга исследованных вирусов (по предложению американской школы под руководством Дельбрюка) группой фагов (Т-серии), коллекционированной Демереком и Фано [1] на основании общего хозяина — *E. coli*, В.

При детальном исследовании оказалось, что Т-серия, состоящая из 7 бактериофагов, по своим морфологическим, серологическим, величине фаз взаимоотношений с клеткой хозяина и рядом других свойств делится на 4 группы: Т1; Т2, Т4, Т6; Т3, Т7 и Т5; общим признаком для всех фагов Т-серии является ход и результат естественного инфекционного процесса в клетках, заканчивающегося гибелью последних; а в фагоустойчивых мутантах бактерий, полученных после воздействия фага, фаг не обнаруживается. В силу вышесказанного данные бактериофаги были отнесены к вирулентным.

Еще в 1921 году Борде и Чука [2], Гильденмейстером [3], позднее Байлем [4], Бернетом и Мак-Ки [5] было обращено внимание на существование бактериальных штаммов, способных систематически выделять бактериофаг («лизогенные» штаммы), при этом в некоторых случаях удавалось выделить фаг и после прогрева спор *Bac. megaterium* 899 при 100°, когда все известные до этого времени фаги погибали [6]. В 1950 году Львову с соавторами [7, 8, 9] четко проведенными опытами удалось доказать существование фагов, способных не только убивать бактериальную клетку в результате фаговой инфекции, но с определенной частотой вступать в симбиоз с ней, превращаться в профаг, закрепляться на хромосоме бактерии, репродуцироваться вместе с ней и наследоваться в потомстве хозяина. Под воздействием различных факторов (УФ и другое облучение, химические реагенты и т. д.), не проявляющий себя профаг мог индуцироваться, размножаться и, вы-



зывая гибель хозяина, превращаться в зрелую, свободную фаговую частицу, способную повторить весь ход процесса снова. Данная группа бактериофагов получила название умеренных фагов.

Накопление данных в результате изучения биологических свойств вирулентных и умеренных фагов, классическими представителями которых являются Т-четные фаги: Т2, Т4, Т6, с одной стороны, и фаги: λ , Р1, Р22 и др., с другой — позволило установить, наряду с их основным различающим признаком — способностью лизогенезировать клетку, — и ряд других свойств, характерных только для вирулентных или умеренных фагов.

К наиболее устойчивым признакам нужно отнести:

1. морфологию негативных колоний,
2. взаимосвязь с ядерным аппаратом хозяина,
3. влияние на синтез элементов клетки хозяина,
4. возможность репродукции на клетках хозяина, инактивированных УФ или другим излучением,
5. химическую структуру ДНК (содержание или отсутствие атипичных азотистых оснований и различное соотношение

$\frac{A+T}{G+C}$).

6. различный механизм развития устойчивости бактериальных клеток в отношении фага.

Соответственно, различия между вирулентными фагами можно свести к следующему:

1. Негативная колония вирулентных фагов ясная, центр чистый; умеренных фагов — мутная, центр покрыт ростом устойчивой культуры мутантов [10].

2. Вирулентные бактериофаги сразу же после проникновения разрушают ядерный аппарат хозяина [11, 12]. Умеренные бактериофаги не разрушают ядерного аппарата, а иногда обмениваются с ним генетическими участками или же захватывают участок генома хозяина. Они способны также переносить захваченный от хозяина участок генома на другую бактериальную клетку, придавая этим бактериям новые свойства (трансдукция) [13, 14].

3. С момента проникновения вирулентного бактериофага прекращается синтез элементов клетки и начинается синтез элементов фаговой частицы [15, 16, 17, 18]. При заражении умеренным бактериофагом синтез элементов клетки не прекращается, однако, наблюдается задержка деления в течение 60—70 минут [19, 20, 21].

4. Вирулентные фаги могут размножаться на штаммах, инактивированных УФ или γ лучами, обладая свойством автоматического репродукирования [22, 23]. Умеренные фаги таким свойством не обладают [24, 25].

5. ДНК вирулентного фага может содержать атипичное основание, например, 5-оксиметилцитозин, не обнаруживаемое в клетке хозяина [26], вместе с тем соотношение $\frac{A+T}{G+C}$ может резко отличаться от тех

же компонентов в клетке хозяина [27, 26], ДНК умеренных бактериофагов имеет такой же состав и структуру, как и ДНК хозяина [28].

6. Развитие устойчивости в отношении вирулентных фагов — это спонтанный мутационный процесс, где фаг может иметь значение только как селективный фактор [29, 30]. При этом наблюдается утеря фа-

гового рецепторного участка клетки, в результате чего на устойчивом клоне не наблюдается ни репродукции, ни адсорбции бактериофага. При проникновении же генома умеренного фага в клетку хозяина развивается устойчивость, иммунитет, однако, в данном случае рецептор фага не утрачивается, чем обусловлена адсорбция суперинфицирующего фага [10, 31].

Даже такой краткий перечень дает возможность представить насколько резко различия между вирулентным и умеренным бактериофагами.

Нужно отметить, что в приведенном материале речь идет о свойствах бактериофагов, занимающих «крайнее положение» в группе вирулентных или умеренных бактериофагов.

Как же обстоит дело с остальными фагами, которые не входят в эти «крайние группы»?

Бактериофаги T1, T3, T7 и большинство к настоящему времени наиболее хорошо изученных вирулентных мутантов умеренных фагов не могут быть полностью отнесены ни к одной из приведенных групп. Занимая промежуточное место, данная группа бактериофагов обладает характерными признаками как вирулентных, так и умеренных бактериофагов.

Данные бактериофаги характеризуются следующими признаками вирулентных фагов: 1. они не вызывают лизогенизации, хотя и описаны случаи псевдолизогенизации фагом T7 бактерий *Sh. dysenteriae*, когда фаг удавалось выделить в нескольких генерациях после их первичного контакта, а у клеток развивается устойчивость, носящая фенотипический характер [32]. Аналогичные данные получены также и с фагом T3 [33] и вирулентным мутантом фага P22 [14]; 2. обладают негативной колонией с ясным центром; 3. не принимают участия в развитии фагоустойчивости бактериальных клеток, являясь только селективным фактором [30, 34, 35].

Признаки умеренных фагов: 1. они не вызывают разрушения ядерного аппарата клетки [11], а вызывают лишь слияние ядра в аксиальную хроматиновую нить, в которой происходит дальнейшее развитие фага; 2. сразу же после проникновения в клетку не прекращают синтеза клеточных элементов хозяина [15]; 3. не могут размножаться на клетках хозяина инактивированных УФ или γ -лучами; 4. не содержат

атипичных оснований; а соотношение $\frac{A+T}{G+C}$ приближается к хозяину.

5. в процессе репродукции происходит обмен генетическими участками с хозяином [24, 33, 36].

Принимая во внимание характерные особенности таких фагов, некоторые авторы выделяют их в отдельную группу «полуумеренных» [33], «зависимо вирулентных» [38]. Однако данные названия не получили всеобщего распространения и во многих работах фаги, занимающие промежуточное положение между вирулентными фагами типа T2 и умеренными типа λ , называются или просто вирулентными или вирулентными мутантами умеренного бактериофага.

Следует отметить, что этому обстоятельству способствовало и то, что в течение многих лет ученые в основном манипулировали весьма ограниченным набором фагов, что давало возможность стандартизации методов для глубокого изучения поставленных вопросов, однако, не всег-



да позволяло обобщить полученные закономерности, т. к. на разных системах вирус-клетка получались совершенно различные результаты. Понятно, что изучение целого ряда вопросов на новых системах стало неотложной необходимостью.

Детальное изучение биологических свойств 8 фагов, селекционированных в Тбил. НИИВС из 110 «чистых» линий, активных в отношении отдельных видов микробов группы Шигелла, выявило, что 7 из них, несмотря на морфологическое сходство с фагами Т-серии, оказались вполне обособленными [39]. Отличие состояло в частности в спектре литической активности: дизентерийные фаги были строго специфичны, т. е. их диапазон ограничивался только одним или несколькими видами Шигелл, что позволяло использовать их для идентификации и индикации Шигелл. В силу этого вся серия получила обозначение ДД (дизентерийные диагностические) — от ДД I до ДД VIII.

Опыты проводились с фагом ДД I — Шига-Флекснер, морфологически идентичным фагам Т3, Т7, ДД VII — Флекснер и ДД IV — Шига-Флекснер-Зонне, морфологически идентичными фагу Т1, а также с фагом ДД VI — родственным как по морфологическим, так и серологическим признакам фагам Т2, Т4, Т6.

Морфология негативных колоний у всех взятых в опыт фагов оказалась характерной для вирулентных фагов: негативные колонии, без вторичного роста, за исключением ДД I на штамме Sh. Shiga, где центр негативной колонии обычно покрыт колониями вторичного роста микроорганизмов.

Лизогенизация: как указывалось выше, для фагов Т3 и Т1 характерно при взаимодействии с клеткой давать эффект «ложной лизогенизации» или образование временных комплексов фаг-клетки [14, 32, 33]. При множественности заражения 2:1, 3:1 фагами ДД I, ДД VII развиваются устойчивые клоны бактерий, которые после обработки безудловно нейтрализующей дозой антифаговой сыворотки в течение 2 и 18 часов все же выделяют добавленный к исходной популяции бактериофаг. Данный факт указывает на проникновение и сохранение фагового генома внутри клетки на время, значительно превышающее латентный период и время лизиса, характерное для фага, взятого в опыт.

При дальнейших пересевах таких клонов бактерий происходит отщепление фагочувствительных вариантов и полное освобождение клона от фага в результате вытеснения из популяции фагоустойчивых вариантов, развивающихся значительно медленнее.

Можно предположить, что данное явление нужно объяснить не как псевдолизогенизацию, а как временное проникновение фагового генома в клетку хозяина; закрепления полного генома фага в клетке, по-видимому, в данном случае не происходит, т. к. индуцировать из стабильных фагоустойчивых мутантов зрелую частицу не удается [40].

Изучение химической структуры ДНК фагов ДД I и ДД VII по предварительным данным показало, что нуклеотидный состав азотистых

оснований ни по составу, ни по количественному соотношению $\frac{A+T}{G+C}$

не отличается от ДНК хозяина; $\frac{A+T}{G+C}$ ДНК фагов и клеток хозяина приблизительно равно 1; что касается родственного Т четным фагам фага

ДДI, то в ДНК последнего обнаружено атипичное основание в виде 5-оксиметилцитозина, а соотношение $\frac{A+T}{G+C} = 2$ [42].

При изучении частоты и скорости мутации по Лурия и Дельбрюку [34], Ньюкомбу [35] нами было выявлено, что частота фагоустойчивых мутаций фага ДДИ на Sh. Shiga значительно превышает встречающиеся в литературе цифры (3×10^{-3}). Вместе с тем, наблюдается флуктуация в опыте по Лурия, что указывает на спонтанный мутационный процесс развития фагоустойчивости.

Опыты, поставленные по Ледербергу и Ледербергу [30], выявили заметное расхождение результатов, полученных с фагами ДДИ, ДДИV, ДДVII, с одной стороны, и ДДVI — с другой.

Если на репликах с фагом ДДVI развивались колонии фагоустойчивых мутантов только в зонах, где на исходной чашке в тех же зонах предсуществовали такие же фагоустойчивые клоны, то с фагами ДДИ, ДДИV и ДДVII фагоустойчивые клоны развивались и в тех зонах, где ни на исходной, ни на первых репликах такие клоны не обнаруживались.

Анализ опытов по определению развития фагоустойчивости у бактериального клона [30] показал, что наряду со спонтанным мутационным процессом происходит также и развитие устойчивости к фагу в ходе фагового инфекционного процесса.

У устойчивых клонов, полученных в результате инфекционного процесса, отсутствует фаговый рецептор, в результате чего на данных штаммах не происходит адсорбции бактериофага. Выделить из таких штаммов бактериофаг ни в обыкновенных условиях, ни после облучения УФ лучами не удается.

Для объяснения данного факта можно предложить такую рабочую гипотезу: по-видимому, в данном случае происходит не закрепление в геноме хозяина полного генома фага, а обмен отдельными генетическими локусами. Если случайно при таком обмене затрагивается участок генома хозяина, контролирующий синтез фагового рецептора, то последний не будет образовываться и клон получит возможность размножиться в присутствии селективного фактора — бактериофага [41].

Полученный материал еще раз указывает на принципиальную разницу между истинно вирулентными фагами и фагами, объединяющимися в группу под общим названием «вирулентных».

В некоторых случаях, по-видимому, такая группа фагов стоит ближе к умеренным фагам, чем к вирулентным. Поэтому наиболее целесообразным нужно считать выделение их под названием умеренно-вирулентных.

Ниже приводится схематическая характеристика фагов, разбитых на 3 группы: вирулентные, умеренно-вирулентные и умеренные (схема).

Выделение фагов в умеренно-вирулентную группу, куда должны войти и так называемые вирулентные мутанты умеренных бактериофагов, тем более целесообразно, что большинство встречающихся в природе и изученных до настоящего времени т. н. вирулентных бактериофагов, по-видимому, является именно умеренно-вирулентным.

В заключение следует отметить, что высказанные на VII международном конгрессе микробиологов Бертани мнение о том, что одни и те



же фаги в различных системах могут проявлять себя как вирулентные или как умеренные, по-видимому, правильно только отчасти и касается групп умеренно-вирулентных и умеренных фагов. Трудно представить, что истинно вирулентные фаги, разрушающие ядерный аппарат и прекращающие синтез клетки, когда-либо могли войти в какой-нибудь симбиоз с клеткой.

И, наконец, что более глубокое изучение свойств всех этих групп фагов с применением современных методов генетического анализа позволит разобраться в весьма сложном и пока запутанном вопросе, касающемся таксономии и филогенетического развития бактериальных вирусов.

Краткая характеристика свойств вирулентных, умеренно-вирулентных и умеренных бактериофагов

| Вирулентные фаги | Умеренно-вирулентные фаги | Умеренные фаги |
|--|---|--|
| 1 | 2 | 2 |
| 1. Негативная колония с чистым центром без вторичного роста | Негативная колония с чистым центром, иногда с единичными колониями вторичного роста | Негативная колония с мутным центром, покрытым вторичным ростом |
| 2. Может вызвать только литическую реакцию. Не может вызвать лизогенизацию | Может вызвать литическую реакцию, иногда образует временные комплексы с клеткой | Может вызвать литическую реакцию, а также и лизогенизировать |
| 3. Разрушает в первые же минуты ядерный аппарат клетки хозяина | Не разрушает ядерного аппарата | Не разрушает ядерного аппарата |
| 4. При инфекции сразу же прекращается синтез элементов клетки | Синтез элементов клетки сразу не прекращается | Синтез элементов клетки сразу не прекращается; при этом может задерживаться деление |
| 5. Может репродуцироваться на инактивированных УФ или X лучами клетках хозяина | Не может репродуцироваться на инактивированных УФ или X лучами клетках хозяина | Не может репродуцироваться на инактивированных УФ или X лучами клетках хозяина |
| 6. Не входит в реакцию с хромосомой хозяина | а) может обмениваться генетическими участками с хромосомой хозяина | а) может обмениваться генетическими участками с хромосомой хозяина б) может в зрелую частицу захватить участок генома хозяина |

| 1 | 2 | 3 |
|---|--|--|
| 7. ДНК может содержать атипичные основания, не встречающиеся у хозяина | ДНК не содержит атипичных оснований | ДНК не содержит атипичных оснований |
| 8. Соотношение нуклеотидных оснований может резко отличаться от хозяина | Соотношение нуклеотидных оснований соответствует хозяину | Соотношение нуклеотидных оснований соответствует хозяину. |
| 9. Устойчивость— спонтанный процесс, сопровождается утерей фагового рецептора | Устойчивость может развиться в ходе фаговой инфекции, сопровождается потерей рецептора | Устойчивость в результате появления иммунитета клетки без утери фагового рецептора |
| 10. Белковая оболочка вызывает гибель хозяина (лизис без размножения) | Белковая оболочка не убивает | Белковая оболочка не убивает |

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Demerec, U. Fano, Bacteriophage resistant mutants in *Escherichia coli*, *Genetics* 30, 119, 1945.
2. I. Bordet, M. Ciuca, Determinisme de l'autolyse microbienne transmissible. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 8, 4, 276, 1921.
3. E. Gildemeister, Über das d'Herellesche Phänomen, Berlin, *Klin. Wochschr.* 58, 1355 (1921).
4. O. Bail, Der Colistamn 88 von Gildemeister und Herberg, *Med. Klin (Munich)*, 21, 1271 (1925).
5. F. M. Burnet, M. McKie, Observations on a permanently lysogenic strain of *B. enteritidis gaertneri*, *Austral J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 6, 277 (1929).
6. L. E. Dooren de Long, Den Studien über Bakteriophagie Über *Bac. megatherium* und den darin anwesenden Bacteriophage, *Zent. Bakteriol. Parasitenk (I)*, 120 (1931).
7. A. Lwoff, A. Gutmann, Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogène, *Ann. Inst. Pasteur*, 78, 711 (1950).
8. A. Lwoff, L. Siminovitch, N. Kjeldgaard, Induction de la lyse bacteriophagique de la totalité d'une population microbienne lysogène, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 231, 190 (1950).
9. A. Lwoff, L. Siminovitch, N. Kjeldgaard, Induction de la production de bactériophages chez une bactérie lysogène, *Ann. Inst. Pasteur*, 79, 815 (1950).
10. Г. Стент, Молекулярная биология вирусов бактерий. Москва (1965).
11. S. E. Luria, M. I. Human, Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection. *Bacteriol.*, 59, 551 (1950).
12. R. G. E. Murray, D. H. Gillen, F. C. Heagy, Cytological changes in *E. coli* produced by infection with phage T. 2. *J. Bacteriol.*, 59, 603 (1950).



13. N. D. Linder, L. Lederberg, Genetic exchange in Salmonella, *J. Bacteriol.*, 64, 679 (1952).
14. N. D. Linder, Infective heredity in bacteria, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 18, 261 (1953).
15. S. S. Cohen, Growth requirements of bacterial viruses, *Bacteriol. Rev.*, 13, 1, (1949).
16. S. E. Luria, Bacteriophage: an essay on virus reproduction, *Science*, 111, 507, (1950).
17. A. D. Hershey, M. Chase, Independent functions of virae protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, 36, 39 (1952).
18. L. M. Kozloff, Origin and fate of bacteriophage material, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 18, 209, (1953)
19. F. Jacob, Production de bacteriophages par action de la methylbio (chloréthyl) amine sur des bactéries lysogènes, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 234, 2238 (1952).
20. F. Jacob, Influence de régime carbone sur le développement des bacteriophages chez un *Pseudomonas pyocyaneae*. *Ann. Inst. Pasteur*, 82, 578 (1952).
21. L. Siminovich, F. Jacob, Biosynthèse induite d'un enzyme, pendant le développement de bacteriophages chez *E. Coli K 12*. *Ann. Inst. Pasteur* 83, 745 (1952).
22. S. Benzer, Resistance to ultraviolet light as an index to the reproduction of bacteriophages. *J. Bacteriol.*, 63, 59 (1952),
23. T. F. Anderson, The growth of T. 2 virus on ultraviolet-killed host cells *J. Bacteriol.*, 56, 403 (1948).
24. E. S. Tessman, Growth and mutation of phage T1 on ultraviolet-irradiated host cells, *Virology*, 2, 679 (1956).
25. G. Kellenberger, I. Weigle, Etude au moyen des rayons ultraviolets, de l'interaction entre bacteriophages tempérés et bactérie hôte. *Biochim. Biophys. Acta.* 30, 112 (1958)
26. G. R. Wyatt, S. S. Cohen, The bases of the nucleic acids of some bacteria and animal viruses. The occurrence of 5-hydroxymethyltytosine, *J. Biochem.*, 55, 774 (1953).
27. A. Hershey, I. Dixon, M. Chase. Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T 2. Purine and pyrimidine composition. *J. Gen. Physiol.* 36, 777 (1953).
28. A. Lwoff, Lysogeny. *Bacteriol. Rev.*, 17, 269 (1953).
29. S. E. Luria, M. Delbrück, Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, 28, 491 (1943).
30. I. Lederberg, S. M. Lederberg, Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63 (1952).
31. М. Адамс, „Бактериофаги“.
32. Li Koibong, L. Barksdale, L. Garmise. Phenotypic alterations associated with the bacteriophage carrier state of shigella dysenteriae *J. Gen. Microbiol.*, 24, 355 (1961).
33. D. K. Fraser, Host range mutants and semitemperate mutants of bacteriophage T 3. *Virology*, 3, 527 (1957).
34. S. E. Luria, M. Delbrück. Interference between bacterial viruses. II. Interference between inactivated bacterial virus of the same strain and of a different strain. *Arch. Biochem.*, 1, 207 (1942).
35. H. B. Newcombe, Delayed phenotypic expression of spontaneous mutation in *E. coli*, *Genetics*, 33, 447 (1948).

36. A. D. Hershey, A. Garen, D. K. Fraser, I. D. Hudis, *Growth and inheritance in bacteriophage*. Carnegie Inst. Wash. Year book, 53: 210-211 (1954).
37. G. S. Stent, Mating in the reproduction of bacterial viruses. *Adv. virus Res.*, 5, 95 (1958).
38. I. F. Whitfield, Lysogeny, *Brit. Med. Bull.*, 18, 56 (1962).
39. Т. Г. Чанишвили, Введение и изучение „видовых“ бактериофагов, идентифицирующих основные виды дизентерийных микробов. Труды, т. V, II меж-институтск. конф. по бактериофагу. 18—21 ноября 1959 г., Тбилиси (1963).
40. Т. Г. Чанишвили, Л. Г. Чанишвили, Изучение динамики лизиса и механизма прорастания вторичных дизентерийных бактерий при воздействии „видовых“ дизентерийных бактериофагов, Труды, т. V, II межинст. конф. по бактериофагу 18—21 ноября 1959 г., Тбилиси (1963).
41. Т. Г. Чанишвили, К механизму образования фагоустойчивых форм микроорганизмов. Сб. работ симпозиума по генетике бактериофагов, Тбилиси, ноябрь 1966 г. (в печати).
42. Т. Биркадзе, И. Г. Чиракадзе, Т. Г. Чанишвили, Изучение химического состава дизентерийных диагностических бактериофагов. Сб. трудов Тбил. НИИВС, Тбилиси (1967), (в печати).

T. G. CHANISHVILI

BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF VIRULENT, TEMPERATE AND TEMPERATE VIRULENT BACTERIOPHAGES

Summary

On the ground of literary material and self-observation, which were conducted on the series of the diagnostic bacteriophages of dysentery, selected in Tbilisi Research Institute of Vaccines and Sera in 1957—1958, it is possible to think, that all the bacteriophages existing in nature can be divided into three principal groups: virulents, temperate virulents and temperates.

If for the true virulent bacteriophages characteristic is the property of automatism, the lack of possibility of lysogenation for the temperates—on the contrary, the possibility of lysogenation and the presence of undamaged host genome in reproduction is necessary. The temperate virulent bacteriophages, apparently, occupy an intermediate place: they have no possibility to provoke the true lysogenation but they come into temporary symbiosis with the host, exchanging the genetic material with it.

Study of a great number of bacteriophages, the host of which is shigella (more than 120 pure lines), shows the wide spreading of the temperate virulents in nature, which are described simply as virulents in literature.

The subsequent detailed investigation in the given field can favour the determination of questions of both the phylogenetic development of the bacterium viruses and the taxonomy of the latter.



М. М. ЗААЛИШВИЛИ

О ТРЕТЬЕМ КОМПОНЕНТЕ МЕХАНОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ

Еще в 1942 г. Сент-Дьердьи [1] показал, что водный экстракт мышцы усиливает сокращение поперечнополосатой мышцы. В 1949 г. Чапо [2] установил, что для сокращения нитей миозина В мышцы матки под влиянием АТФ требуется присутствие водорастворимого белкового фактора (х-фактора). Однако на эти важные данные не было обращено должного внимания. Немалую роль в этом, по-видимому, сыграло то, что вследствие неправильно подобранного температурного режима экстракции (экстракция должна проводиться при 20—25°C) полученный исследователями экстракт часто оказывался неактивным.

С 1961 года нами подробно изучалась механохимия сокращения плеченочных нитей миозина В гладкой мышцы под влиянием АТФ и установлено, что водорастворимый белок, который, как правило, переходит в миогеновую фракцию во время экстракции мышцы при комнатной температуре, является необходимым компонентом сократительной системы мышцы. Этот водорастворимый белок был назван протеином М, а сократительный комплекс, состоящий из миозина В (актомиозина) и протеина М,—миозином МВ [3, 4, 5, 6]. Таким образом, в случае гладких мышц субстратом сокращения является не актомиозин, а комплекс из миозина и протеина М,—миозин МВ [5]. Оказалось, что протеин М термостабилен (не теряя активности, выдерживает нагревание при 100° в течение 10 минут), сохраняет активность при диализе и осаждается сульфатом аммония в пределах 0,2—0,5 насыщения. Протеин М выпадает в осадок в изоэлектрической точке (рН 5, 6); он не обладает аденозинтрифосфатазной и миокиназной активностями. На основе этих свойств был разработан метод получения чистого препарата протеина М [7].

В настоящей работе мы поставили себе целью охарактеризовать некоторые физико-химические и молекулярные параметры протеина М, а также рассмотреть роль протеина М в механохимии мышечного сокращения.

МЕТОДИКА

Миозин В гладкой мышцы получали следующим методом: желудок кролика освобождался от слизистой оболочки, измельчался, замораживался на испарителе холодильника и растирался в фарфоровой ступке. Растертая мышца в продолжение 24 часов экстрагировалась шестикратным объемом буферного раствора, содержащего 0,6 М КСl, 0,05 М NaHCO₃, 0,02 М глицина и 0,05 М трис, pH 7,5. Нерастворимая часть удалялась центрифугированием, а миозин В осаждался разведением центрифугата водой до ионной силы 0,27. Выпавший осадок центрифугировался при 3000 g в продолжение 20 минут и затем растворялся в растворе, содержащем 0,6 М КСl и 0,05 М трис буфера, pH 7,5. В целях дальнейшей очистки миозин В переосаждался бидистиллятом еще три-четыре раза.

Чистый препарат протеина М получали следующим методом [8]: освобожденная от слизистой оболочки и хорошо измельченная мышца желудка экстрагировалась тремя объемами воды или буферным раствором, содержащим 0,2 М сахарозы, 10⁻³М АТФ, 5·10⁻³М MgCl₂ и 0,05М трис, pH 7,5, при комнатной температуре (20—25°C) экстракт центрифугировался при 105.000 g и прозрачный центрифугат нагревался до 100° в течение 10 минут. После охлаждения и удаления коагулированных белков прозрачный белковый раствор насыщался до 0,2 насыщения сульфатом аммония. Осадок удалялся центрифугированием, и протеин М высаливался добавлением сульфата аммония до 0,5 насыщения. Спустя 30 минут, выпавший осадок протеина М отделялся центрифугированием, растворялся в воде, и полученный белковый раствор диализировался против воды до полного удаления сульфата аммония. Из полученного белкового раствора протеин М осаждался добавлением 0,1 N HCl до pH 5,6.

Протеин М поперечнополосатой мышцы выделяли из препарата миозина В методом, предложенным нами для гладкой мышцы желудка. Протеин М скелетной мышцы можно получить также из остатка мышечного фарша, после удаления из него миогена и миозина, 0,6 М КСl-ом. Из остатка готовят водный экстракт при комнатной температуре, из которого протеин М выделяется изложенным выше методом. Из 100 г мышцы получается 0,06—0,1 г белка.

Актин получали по методу Штрауба [1] с той разницей, что экстракцию ацетоновой пудры водой производили при +1°C.

Получение пленочных нитей и изучение их сократительной способности проводились по ранее описанной методике [8].

Коэффициент седиментации определяли методом скоростной седиментации на ультрацентрифуге Спинко модели Е при 597000 об/мин. и 20°. Коэффициент седиментации (S) рассчитывали по формуле:

$$S = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \ln x}{dt}, \quad (1)$$

где ω —угловая скорость ротора, x —расстояние частицы от центра вращения, а t —время центрифугирования. Коэффициент седиментации белка, зависящий от концентрации его растворов (c), определяли экстраполированием кривых $\zeta_{20,\omega} = f(c)$ до нулевой концентрации ($\zeta_{20,\omega}^0$) [9].

Коэффициент диффузии (D) определяли в поляризационном диффузиметре Цветкова [10]. Благодаря высокой чувствительности прибора концентрация исследуемого раствора может быть снижена на один порядок по сравнению с нижним пределом доступным рефрактометрическим методом. Таким образом, для получения значения коэффициента диффузии, соответствующего $c \rightarrow 0$, достаточно ставить опыт при одной низкой концентрации раствора белка и не строить кривую концентрационной зависимости $D = D(c)$. Коэффициент диффузии D вычисляли методом максимальной ординаты δ_m и площади Q под интерференционной кривой по формуле:

$$\Phi\left(\sqrt{k} \cdot \frac{a}{2}\right) = a \cdot \frac{\delta_m}{Q}, \quad (2)$$

где $K = 1/4Dt$, a —постоянная прибора ($= 0,111$), t —время, а Φ —интеграл вероятности. Значение подинтегральной функции находили по таблицам и строили прямую $1/4K = f(t)$, по наклону которой вычисляли коэффициент диффузии протеина M [11].

Плотность белкового раствора определяли пикнометром объемом 10 мл при 20°C. Парциальный удельный объем (\bar{v}) рассчитывали по формуле:

$$l - l_0 = \frac{m - m_0}{v} = (1 - \bar{v} \cdot \rho) \cdot c, \quad (3)$$

где m —вес белкового раствора, m_0 —вес растворителя объемом v , c —концентрация белка в мг на мл, l и l_0 —плотности белкового раствора и растворителя, соответственно [11].

Вязкость измеряли вискозиметром Оствальда со спиральным капилляром длиной 3 м и сечением 1,3 мм при 20°. Время истечения бидистиллята равнялось 97 сек.

Вращательную способность и дисперсию оптического вращения определяли на автоматическом фотоэлектрическом спектрополяриметре, работающем в диапазоне 2600—6000 Å; точность измерения в интервале длины волн 4000—6000 Å была равна 0,001°. Измерения производили при 20° в кювете длиной 10 см при шести разных длинах волн. Температура в кювете поддерживалась постоянной с помощью ультратермостата с точностью 0,03°. Спиральность рассчитывали как по уравнению Моффита [12], так и по методу Шехтера и Блоута [13]. Кривая плавления белка снималась при 4600 Å; температура в кювете повышалась со скоростью 0,2 град/мин.

Давление мономолекулярного слоя и его площадь определяли на поверхностных весах Ленгмюра-Адама. Вязкость и упругость вычисляли по



логарифмическому декременту затухания и периоду колебания стеклянного диска, погруженного в подкладку. Поверхностный потенциал мономолекулярного слоя определяли электродинамическим конденсатором, частота колебаний которого равнялась 400–500 герц. В качестве подкладки были использованы растворы KCl с концентрациями 0,01, 0,1 и 0,6 M .

Концентрацию белка определяли по методу Кьелдаля после осаждения белка 10% ТХУ и полного отмывания его от триса 1,5% ТХУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена зависимость $m - m_0/v$ от концентрации белка при 20°. Наклон прямой, который согласно уравнению (3) равен $1 - \bar{v} \cdot \rho$, имеет значение 0,278, что соответствует парциальному удельному объему

0,722 мл/г. Парциальный удельный объем протеина M можно рассчитать также из значений специфических объемов аминокислот, входящих в состав белка [14, 15] по формуле: $\bar{v} = \sum \bar{v}_i \cdot w_i / \sum w_i$, где v_i — парциальный удельный объем аминокислоты, а w_i — вес аминокислоты в граммах на 100 г белка (см. табл. 1).

Значение v_i протеина M , полученное из его аминокислотного состава, равно 0,74.

На рис. 2 изображено изменение приведенной удельной вязкости раствора протеина M в 0,05 M трисе (рН 7,5) при 20° в зависимости от концентрации белка. Как видно из рис. 2, для протеина M наблюдается сильная положительная концентрационная зависимость $\eta_{уд}/c$. Характеристическая вязкость раствора $[\eta] = \left(\frac{\eta_{уд}}{c} \right)_{c \rightarrow 0}$, определяемая отрезком, отсекаемым прямой на оси ординат, равна 4,7, что указывает на высокое значение отношений осей кинетической единицы протеина M . Значение величины отношения осей (a/v) можно рассчитать по формуле [16]:

$$v(a/b) = \frac{100 \cdot [\eta]}{\bar{v} \cdot \left(1 + \frac{w}{v \cdot \rho} \right)} = \frac{(a/b)^2}{15 \left(\lg \frac{2a}{b} \right) - 1,5} + \frac{(a/b)^2}{5 \left(\lg \frac{2a}{b} \right) - 0,5} + 0,933, \quad (4)$$

Таблица 1

Аминокислотный состав протеина М

| Аминокислота | Молекул. вес аминокислотного остатка М | Парциальный удельный объем аминокислотного остатка v_i | Весовой % аминокислотного остатка w_i | Объемный % аминокислотного остатка $v_i w_i$ | Число аминокислотных остатков на 100000 г. белка |
|--------------------------|--|--|---|--|--|
| 1. Аланин | 71.04 | 0.74 | 8.45 | 6.25 | 120 |
| 2. Аргинин | 156.08 | 0.70 | 9.62 | 6.73 | 62 |
| 3. Аспарагиновая кислота | 115.08 | 0.80 | 8.71 | 6.97 | 76 |
| 4. Валин | 99.08 | 0.86 | 2.93 | 2.52 | 30 |
| 5. Гистидин | 137.08 | 0.67 | 1.50 | 1.00 | 11 |
| 6. Глицин | 57.03 | 0.64 | 0.78 | 0.50 | 14 |
| 7. Глютаминовая кислота | 129.08 | 0.66 | 31.68 | 20.91 | 247 |
| 8. Изолейцин | 113.08 | 0.90 | 2.85 | 2.56 | 25 |
| 9. Лейцин | 113.08 | 0.90 | 10.15 | 9.14 | 90 |
| 10. Лизин | 128.08 | 0.82 | 12.70 | 10.41 | 100 |
| 11. Метионин | 131.18 | 0.75 | 2.05 | 1.54 | 16 |
| 12. Оксипролин | 113.06 | 0.68 | — | — | — |
| 13. Пролин | 97.08 | 0.76 | — | — | — |
| 14. Серин | 87.08 | 0.63 | 3.10 | 1.95 | 36 |
| 15. Тирозин | 163.08 | 0.71 | 1.98+ | 1.41 | 12 |
| 16. Треонин | 101.10 | 0.70 | 2.45 | 1.71 | 24 |
| 17. Триптофан | 186.08 | 0.74 | 0.30++ | 0.22 | 2 |
| 18. Фенилаланин | 147.08 | 0.77 | — | — | — |
| 19. 1/2-цистин | 111.09 | 0.63 | — | — | — |
| Сумма | | | 99.25 | 73.82 | 865 |

Специфический объем протеина $\bar{v} = \sum w_i v_i / \sum w_i = 0,744$.

где w — степень гидратации белка, выраженная в граммах воды на гр. белка. Так как для протеина М $[\eta] = 4,7$, $\bar{v} = 0,722$, а $w/\bar{v} \cdot \rho = 0,106$, из уравнения (4) следует, что отношение осей молекулы протеина М равно 100.

Препарат протеина М в центробежном поле ультрацентрифуги дает лишь один пик (рис. 3). На рис. 4 приведены кривые зависимости коэффициента седиментации от концентрации белка для двух препаратов протеина М. Как видно из рис. 4, экспериментальные точки хорошо ложатся на прямые, изображающие концентрационную зависимость. На основании экстраполирования прямых $S_{20,w} = f(v)$ к бесконечному разбавлению мы получили, что коэффициент седиментации $S_{20,w}^0$ протеина М равен 4,3.

На рис. 5 приведена кривая зависимости $1/4 k = f(t)$. Коэффициент диффузии протеина М при 25°, определенный по тангенсу угла наклона прямой, равен $1,09 \cdot 10^{-7}$, откуда следует, что при 20° $D = 1,072 \cdot 10^{-7}$.

Из полученных экспериментальных данных можно рассчитать молекулярный вес (М), коэффициент асимметрии (f/f_0) протеина М по формулам Сведберга [9]:

$$M = \frac{RTS}{D \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}, \quad (5)$$

$$\frac{f}{f_0} = 10^{-8} \cdot \left(\frac{1 - \bar{v} \cdot \rho}{D^2 \cdot S \cdot \bar{v}} \right)^{-1/3}, \quad (6)$$

где R —газовая постоянная. Расчет дает, что молекулярный вес протеина M равен 352000, a —коэффициент дисимметрии. Согласно Онкли [17], фрик-

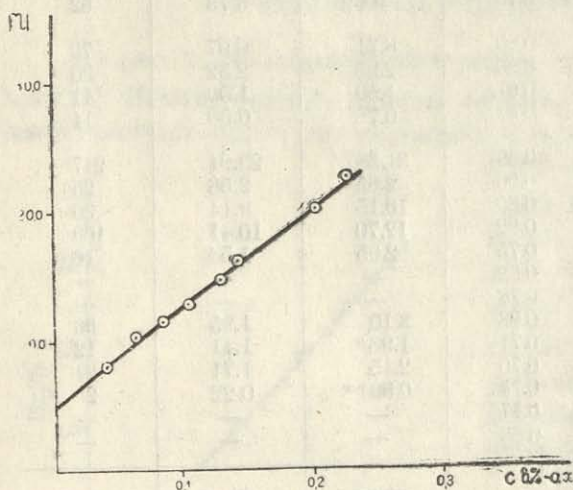


Рис. 2. Зависимость приведенной удельной вязкости ($\eta_{уд}/c$) протеина M гладкой мышцы от концентрации белка. Состав и pH буферного раствора и условия опыта см. рис. 1.

ционный коэффициент (f/f_0), значение которого зависит лишь от соотношения осей асимметричной частицы, можно рассчитать из произведения

$$\frac{f_c}{f_0} = \frac{f}{f_0} \cdot \left(1 + \frac{w}{\bar{v} \cdot \rho} \right)^{-1/3}, \quad (6')$$

в котором второй множитель обусловлен гидратацией молекулы. Для протеина M $w/\bar{v} \cdot \rho = 0,106$ (см. ниже) и $f/f_0 = 4,27$. Из [6'] следует, что $f/f_0 = 4,13$. Отсюда, согласно [14,18], $a/v = 104$.

Величину и форму молекулы протеина M можно также определить из значений β -функции Шераги и Манделькерна [19]

$$\beta = \frac{r_0 \cdot N \cdot S_{10:w}^0}{1 - \bar{v} \cdot \rho} \cdot \left(\frac{[\eta]}{M^2} \right)^{-1/3}, \quad (7)$$

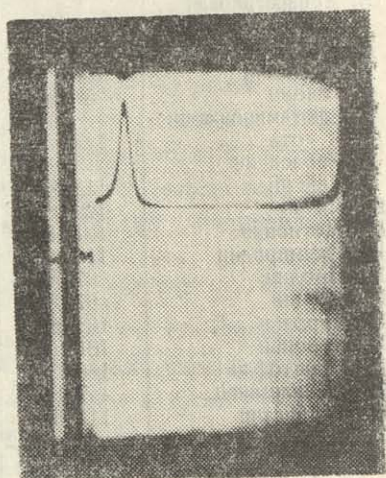


Рис. 3. Седиментационная диаграмма протеина M гладкой мышцы, полученная при измерении скорости седиментации методом наклонной щели (угол 60°). Концентрация протеина M 4,4 мг. штрих на мл $5 \cdot 10^{-2}$ М трис— NCl буфера, pH 7,5; температура опыта 20°C . Число оборотов ротора 59780 в мин. Диаграмма снята в 56 минуте после достижения скорости. Направление седиментации слева направо.

$$\beta = \frac{D \cdot \eta_0 \cdot ([\eta] \cdot M)^{1/3}}{K \cdot T} = \left[\frac{N \cdot \nu(a/b)}{16200 \cdot \pi^2} \right]^{1/3} \cdot \frac{f_e}{f_0}, \quad (8)$$

а эффективный объем (ν_e), согласно уравнению Симхи [16],

$$[\eta] = N \cdot \nu_e / 100M) \cdot \nu(a/b), \quad (9)$$

где N —число Авогадро, а η_0 —вязкость растворителя (0,05 М трис, рН 7,5).

Подставляя экспериментальные значения $S_{20,0}^0 = 4,3 \cdot 10^{-13}$, $[\eta] = 4,7$ в (7) и $D = 1,072 \cdot 10^{-7}$ и $[\eta] = 4,7$ в (8), получаем значения $\beta = 3,224 \cdot 10^6$ и $3,2245 \cdot 10^6$, соответственно. В расчетах использованы значения: $M = 3,517 \cdot 10^5$, $1 - \bar{\nu} \cdot \rho = 0,278$ и $\eta_0 = 0,0103$ пуаз. Для расчета a/b и ν примем, что $\beta = 3,224 \cdot 10^6$. Из протабулированных значений β , как функции a/b [19], получается, что осевое отношение кинетической единицы протеина M a/b

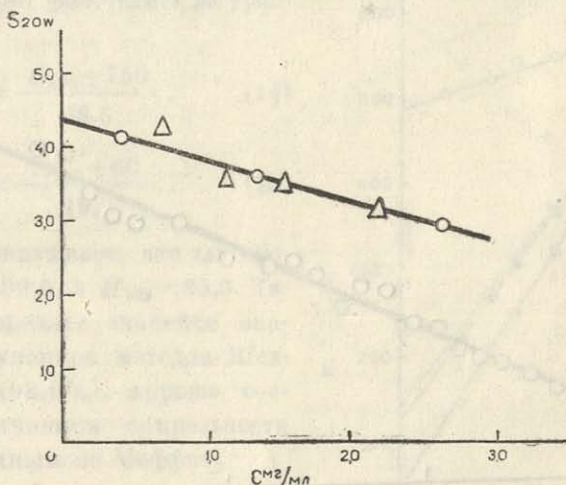


Рис. 4. Зависимость коэффициента седиментации протеина M от концентрации. Состав и рН буферного раствора и условия опыта см. рис. 1. Число оборотов ротора 59780 в мин.

равно $100(f_e/f_0 = 4,066$ [14,18]), что хорошо согласуется со значением a/b , полученным из вискозиметрических данных. Когда a/b (т. е. $\nu(a/b)$), известно, ν_e можно определить из уравнения (9). Выразив $\nu(a/b)$ через β и подставляя соответствующие значения в (8), получим, что для протеина M

$$\nu(a/b) = \frac{16200 \pi^2}{N} \cdot \left(\frac{f_e}{f_0} \right)^3 \cdot \beta^3 = 605.$$

Тогда из (9) следует, что $\nu_e = \frac{470}{605} = 0,777$ и $\frac{\nu_e}{\nu} = \frac{0,777}{0,722} = 1,076$. Это



указывает на незначительное набухание молекулы протеина $M(w \approx 0,076$ и $w/\bar{v} \cdot \rho = 0,106)$.

На рис. 6 представлены данные дисперсии оптического вращения для протеина M , обработанные согласно уравнению Моффита,

$$R\lambda \cdot \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2} = a + b \cdot \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}, \quad (10)$$

где $R\lambda = \frac{3M_0[\alpha]\lambda}{(n\lambda^2 + 2)100}$, M_0 —средний молекулярный вес аминокислотного остатка ($M_0 = 115$), $n\lambda$ —показатель преломления растворителя при длине волны λ , $[\alpha]\lambda$ —удельное вращение белкового раствора, $\lambda = 212$ мкм. Так как для 100%-ной α -спиральной конфигурации $v = -630$, то процент

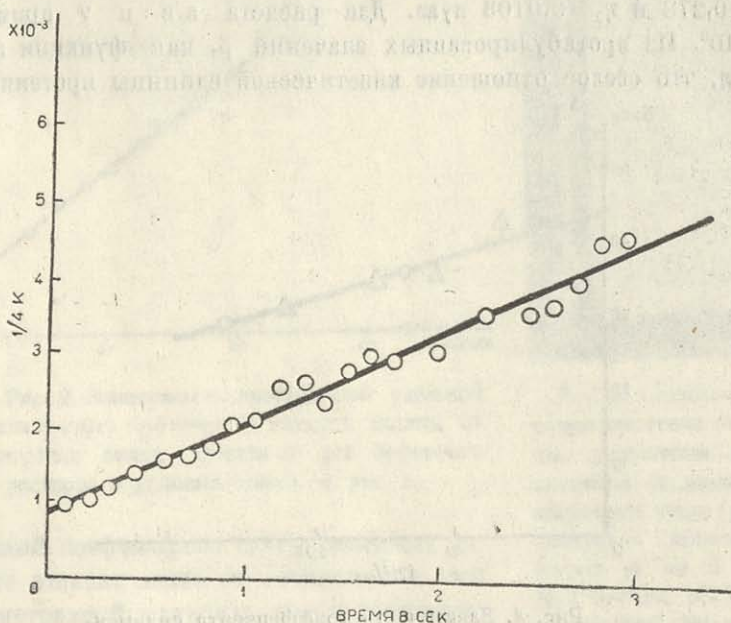


Рис. 5. Графическое изображение функций $1/4k=f(t)$ для протеина M гладкой мышцы. Температура опыта 25°C . Состав и рН буферного раствора см. рис. 1.

спиральности можно определить из отношения $x = \frac{100 \cdot v}{630}$. Из наклона

прямой (рис. 6, кривая I) следует, что для протеина M $v = -624$, поэтому процент спиральности этого белка равен 99%.

Недавно Шехтер и Блоут [13] показали, что дисперсия оптического вращения полипептидов и белков может быть представлена двучленным уравнением Друде

$$[\varphi] = \frac{A_{193} \cdot \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{225} \cdot \lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}. \quad (11)$$

Для оценки спиральности белка по методу Шехтера и Блоута строится кривая, выражающая зависимость $R \cdot \frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda_{193}^2}$ от $\frac{\lambda_{225}^3}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$ (рис. 7). Константы A_{225} и A_{193} рассчитываются из углового коэффициента (k) (уравнение 12) и отрезка (b), отсекаемой прямой на оси ординат (уравнение 13)

$$A_{225} = \frac{K \cdot \lambda_{193}^2}{\lambda_{225}^2 - \lambda_{193}^2}, \quad (12)$$

$$A_{193} = b - A_{225} \cdot \frac{\lambda_{225}^3}{\lambda_{193}^3}. \quad (13)$$

Из рис. 7. видно, что для протеина M $k = -704$, а $b = -34$. Поэтому $A_{225} = -1956$ и $A_{193} = 2626$. Определив константы A_{193} и A_{225} , спиральность (H_{193} и H_{225}) протеина M в процентах можно рассчитать из уравнений

$$H = \frac{A_{193} + 750}{36,5}, \quad (14)$$

и

$$H_{225} = \frac{A_{225} + 60}{19,9}. \quad (15)$$

Расчет показывает, что для протеина M $H_{193} = 92,5$, а $H_{225} = 95,3$. Таким образом, среднее значение спиральности, полученное методом Шехтера и Блоута (93,9%), хорошо совпадает со значением спиральности (99%), полученным по Моффиту.

Для водных растворов белков константы A_{193} и A_{225} связаны линейным соотношением (11)

$$A_{225} = -0,55 \cdot A_{193} - 430. \quad (16)$$

Как видно из рис. 8, для протеина M , так же как и для всех остальных структурных белков мышцы, условие (16) хорошо выполняется.

На рис. 9. изображен переход спираль—клубок (плавление) протеина M ; как видно из рис. 9, плавление начинается при 32°C и завершается при 56° С.

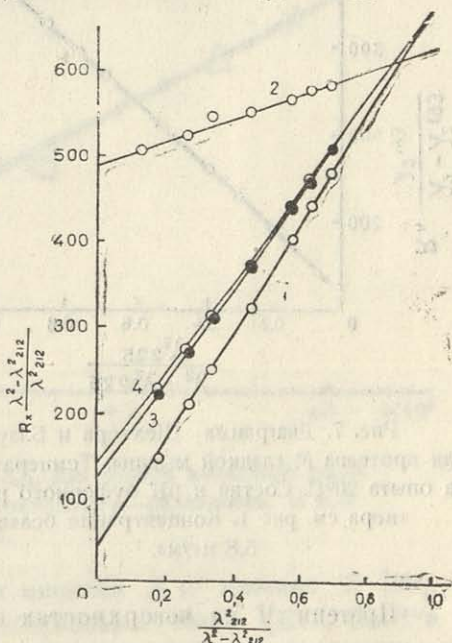


Рис. 6. Диаграмма Моффита для протеина M гладкой мышцы. Состав и рН буферного раствора см. рис 1. Температура опыта 20°C. Концентрация белка 5,8 мг/мл. 1—нативный протеин M , 2—денатурированный протеин M ($t=56^\circ\text{C}$), 3 и 4—ренатурированный протеин M . Нагретый до 56° раствор протеина M быстро охлаждался до 5° , и дисперсия оптического вращения определялась сразу же (кривая 3) и после 19-часовой ренатурации (кривая 4).

На рисунках 10 и 11 представлены кривые зависимости коэффициента седиментации и приведенной удельной вязкости раствора протеина *M* поперечнополосатой мышцы от концентрации белка. Как видно из кривых, коэффициент седиментации ($S_{20,0}^0$) и характеристическая вязкость $[\eta]$ протеина *M* поперечнополосатой мышцы в 0,05 *M* трисе (рН 7,5) и при 20°, соответственно, равны 4,3 и 4,8. Из этих данных следует, что размеры и формы молекул протеина *M* поперечнополосатых и гладких мышц одинаковы.

На рис. 12 изображено изменение удельной вязкости протеина *M* гладкой мышцы в зависимости от концентрации *KCl*. Как видно из рис. 11, удельная вязкость протеина *M* в отсутствие солей очень велика; она

выше удельной вязкости миозина и тропомиозина. Однако добавление небольших количеств *KCl* вызывает ее значительное снижение, а выше 0,15 *M KCl* вязкость протеина *M* приближается асимптотически к величине $\eta_{уд} = 0,4$. Из этого следует, что кинетическая единица протеина *M* с молекулярным весом 350.000 и отношением осей 100 в отсутствие солей является сополимером, который, подобно тропомиозину, в растворах нейтральных солей дезагрегируется на первичные частицы. Следует отметить, что протеин *M* в отличие от тропомиозина Бейли вызывает сокращения пленочных нитей миозина В.

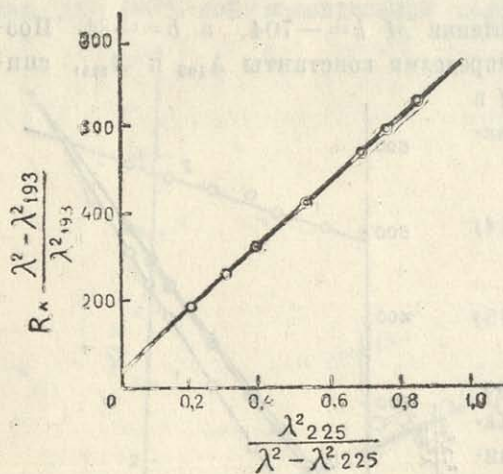


Рис. 7. Диаграмма Шехтера и Блаута для протеина *M* гладкой мышцы. Температура опыта 20°C. Состав и рН буферного раствора см. рис. 1. Концентрация белка 5,8 мг/мл.

Протеин *M* на поверхностях 0,01 и 0,1 *M KCl* образует мономолекулярные слои, площади которых, определенные экстраполяцией кривых изотерм к нулевому поверхностному давлению, равны 1,07 и 1,19 м²/мг. Исходя из этих значений площадей, толщины монопленок на этих подкладках равны 11,9 и 10,8 Å, соответственно. На 0,1 *M KCl* мономолекулярная пленка протеина *M* характеризуется определенным значением поверхностного потенциала. При сжатии монослоя от 0,1 до 1,4 дина/см скачок потенциала увеличивается на 83 Мв (от 206 до 289 Мв).

Поверхностная вязкость и упругость мономолекулярного слоя протеина *M* с возрастанием поверхностного давления увеличиваются (рис. 13 и 14). Значения поверхностной вязкости и упругости протеина *M* также существенно зависят от ионной силы раствора соли в подкладке, как

это имеет место для мономолекулярных слоев других мышечных белков [20], увеличение ионной силы растворов снижает значения вязкости (рис. 13) и упругости (рис. 14) монослоя протеина *M*.

Однако по своим физико-химическим свойствам мономолекулярный слой протеина *M* существенно отличается от монослоев других мышечных

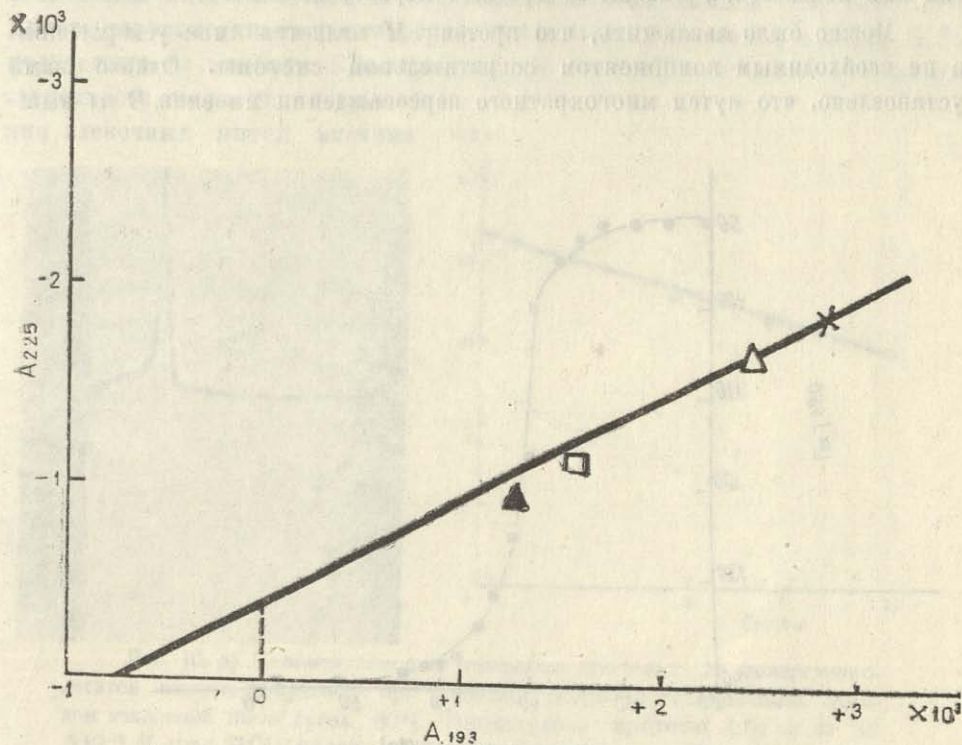


Рис. 8. Кривая зависимости A_{193} от A_{225} для белков мышечной ткани. △—N-меромиозин, □—миозин, △—тропомиозин, ×—парамиозин, 14 и.—протеин *M*.

белков. В отличие от миогена *A*, актина миозина *A* и миозина *B* [20], которые на поверхностях растворов нейтральных солей (KCl , $CaCl_2$ и $MgCl_2$) образуют высоковязкие и упругие мономолекулярные планки, протеин *M* на поверхности KCl образует монослой с низкой поверхностной вязкостью и упругостью. Как видно из рис. 15, поверхностная вязкость мономолекулярного слоя протеина *M* на поверхности $0,1 M KCl$ в несколько раз ниже вязкости монослоя миогена *A* и в 15—20 раз ниже, чем поверхностная вязкость мономолекулярного слоя миозина *A*. Вязкость монослоя протеина *M* на $0,1 M KCl$ составляет лишь десятые доли поверхностных пуаз (рис. 13 и 15). Поверхностная упругость монослоя протеина *M*, нанесенного на $0,1 M KCl$, на один порядок ниже, чем упругость монослоя миогена *A* и на два порядка ниже, чем упругость мономолекулярного слоя миозина *A* (рис. 16).



Нами было установлено, что пленочные нити миозина *B* желудка, свободные от белков, растворимых при ионной силе 0,27, на 15—20-ой минуте после воздействия АТФ укорачиваются лишь на 30%, в то время как в присутствии протеина *M* сокращение нитей миозина *B* под влиянием АТФ на первой же минуте достигает 50—60% (3,5) (в опытах был использован миозин *B* третьего переосаждения).

Можно было заключить, что протеин *M* является лишь ускоряющим, а не необходимым компонентом сократительной системы. Однако нами установлено, что путем многократного переосаждения миозина *B* из мыш-

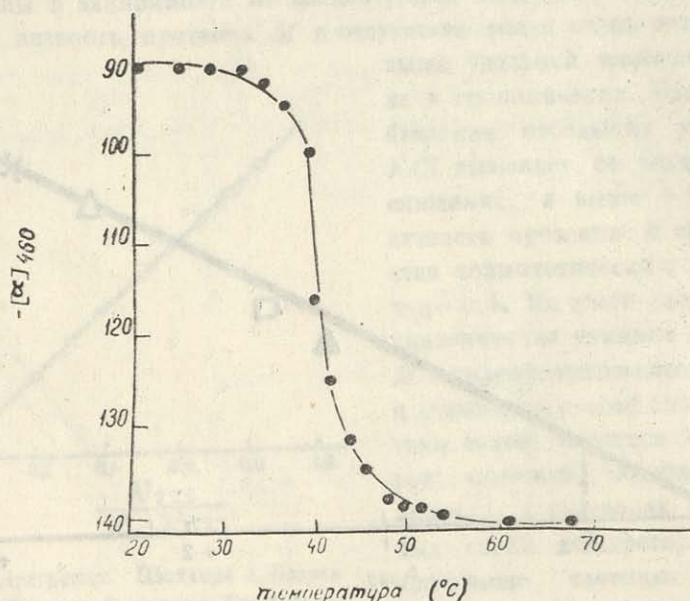


Рис. 9. Плавление вторичной структуры протеина *M* гладкой мышцы. Состав и pH буферного раствора см. рис. 1. Концентрация белка 4,1 мг/мл.

цы желудка получается препарат, пленочные нити которого совсем не сокращаются под влиянием АТФ (рис. 17, кривая 1), в то время как нити миозина *MB* под влиянием того же макроэрга в первую же минуту укорачиваются на 50—60% (рис. 17, кривая 2). Из этих экспериментов следует, что протеин *M* является не ускоряющим сокращения фактором, а одним из основных компонентов маханохимической системы.

На рис. 18 представлена зависимость сокращения пленочных нитей миозина *MB*, полученного из миозина *B* и протеина *M* гладкой мышцы, от концентрации ионов *Mg*. Как видно из рис. 14, сокращение пленочных нитей миозина *MB* оптимально при 10^{-2} *M* *MgCl*₂.

Скорость сокращения пленочных нитей миозина MV прямо пропорциональна концентрации АТФ. Как и в случае неочищенного водного экстракта [5] для максимального сокращения нитей миозина MV , полученных из миозина B и протеина M гладкой мышцы, требуется концентрация АТФ ($2,5 \cdot 10^{-6}$ м/мл) в два раза меньше, чем для максимального сокращения нитей миозина B поперечнополосатой мышцы [5,9] (рис. 19). Кривая зависимости скорости сокращения пленочных нитей миозина MV , полученных из миозина B и протеина M , от qH , совпадает с кривой зависимости скорости сокращения пленочных нитей миозина

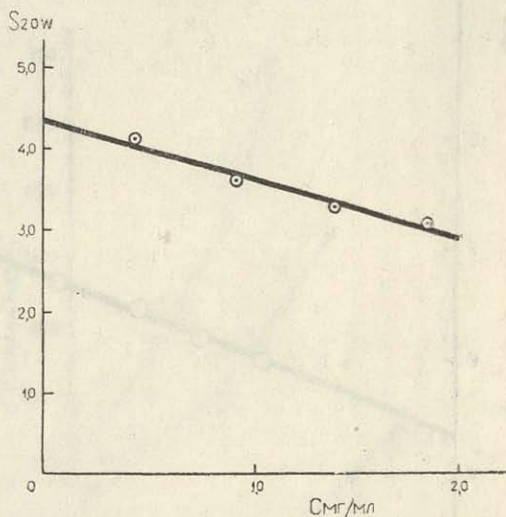
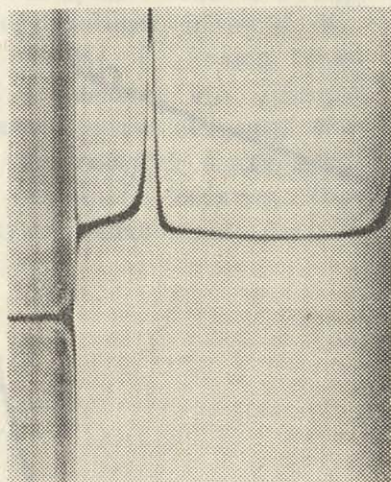


Рис. 10. а) Седиментационная диаграмма протеина M поперечнополосатой мышцы, полученная при измерении скорости седиментации методом наклонной щели (угол 60°). Концентрация протеина $1,84$ мг на мл $5 \cdot 10^{-2}$ M трис HCl буфера, pH $7,5$. Температура опыта 20° . Число оборотов ротора 56100 в мин. Диаграмма снята на 64 мин. после достижения скорости. Направление седиментации слева направо.

б) Зависимость коэффициента седиментации протеина M поперечнополосатой мышцы от концентрации. Состав и pH буферного раствора и условия опыта см. рис 1. Число оборотов ротора 56100 в м.

MV , полученных из миозина B и неочищенного водного экстракта гладкой мышцы [5] (рис. 20). Оптимум сокращения пленочных нитей миозина MV гладкой мышцы лежит в интервале pH $7,5-8,5$.

В результате изучения зависимости скорости сокращения пленочных нитей миозина MV от концентрации KCl выяснилось, что концентрация $5 \cdot 10^{-2}$ M , обычно применяющаяся в подобных исследованиях, вовсе не оптимальна. Оптимальная концентрация KCl лежит в физиологической зоне $0,09-0,13$ M (рис. 21).

Таким образом, сокращение пленочных нитей миозина MV оптимально при $0,09$ M KCl , 10^{-2} M $MgCl$, pH $7,5-8,5$ и $2,5 \cdot 10^{-3}$ M АТФ.

Как выше было отмечено, протеин *M*, вопреки предыдущим данным [2,5], является термостабильным. Он выдерживает кратковременное нагревание при 100° [8]. С повышением температуры до 44° увеличивается сокращение пленочных нитей миозина *MB* (рис. 16, кривая 1). Достопримечательно то, что ход кривых зависимости АТФ-азной активности миозина [6] и скорость сокращения пленочных нитей миозина *MB* от температуры (рис. 22) совпадают. Так как протеин *M* является термостабильным белком, надо полагать, что падение скорости сокращения

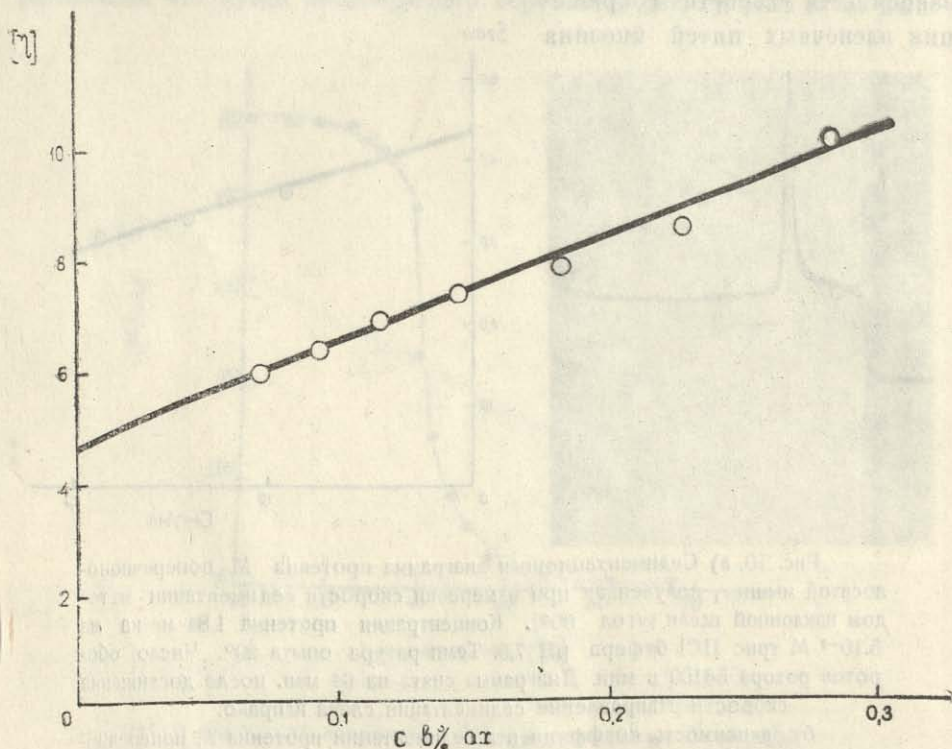


Рис. 11. Зависимость приведенной удельной вязкости ($\eta_{уд}/с$) протеина *M* поперечнополосатой мышцы от концентрации белка. Состав и pH буферного раствора и условия опыта см. рис. 1.

пленочных нитей миозина *MB* обусловлено не тепловой денатурацией протеина *M*, а инактивацией (акто) миозина.

Как нами было отмечено, плавление вторичной структуры протеина *M* начинается при 32° и завершается при 56°. Однако нити миозина *MB*, полученные из миозина *B* и нагретого до 56°, а затем быстро охлажденного протеина *M*, сокращаются так же интенсивно, как и нити, реконструированные из миозина *B* и ненагретого протеина *M* (рис. 23). Тем не менее, это значит, что спиральная структура протеина *M* не существенна для процесса сокращения. Действительно, выяснилось, что хотя

после тепловой денатурации остается лишь 20% спиральности (рис. 6, кривые 3 и 4), при охлаждении нагретого до 56° препарата происходит почти полное восстановление спиральности молекулы протеина *M* (до 87%; рис. 6, кривые 3 и 4).

Сополимер протеина *M* диссоциирует на первичные частицы (рис. 12) в интервале концентраций *KCl* (0,05—0,13 *M*), при котором наблюдается сокращение пленочных нитей миозина *MB* (рис. 21). Если высокая спиральность молекулы этого белка на самом деле необходима для сокращения, надо полагать, что она представлена и в первичных частицах протеина *M*.

В 1964 г. Эбаши и др. [21] установили, что препарат актина содержит белковый фактор, усиливающий взаимодействие миозина с актином. Этот белковый компонент, который

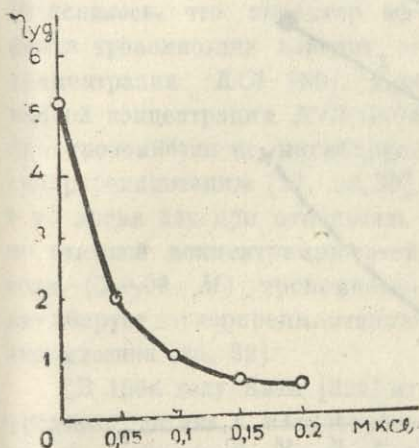


Рис. 12. Изменение удельной вязкости протеина *M* гладкой мышцы от концентрации *KCl*. Состав и P_H буферного раствора и условия опыта см. рис. 1. Концентрация белка 2,25/мл.

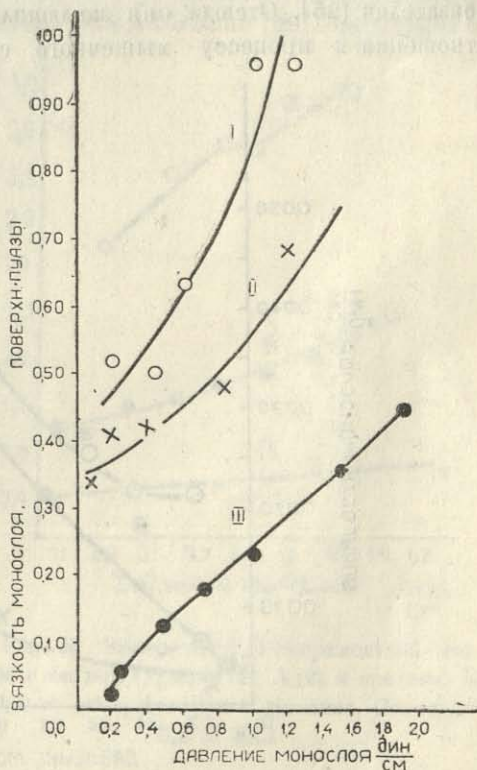


Рис. 13. Зависимость поверхностной вязкости монослоя протеина *M* от поверхностного давления и концентрации *KCl* в подкладке 1—0,01; 2—0,1; 3—0,6 *M* *KCl*.

по аминокислотному составу и некоторым иным свойствам схож с актином, был назван α -актинином [22]. По данным Эбаши, из 100 г поперечнополосатой мышцы можно получить 0,5 [22]—1,0 [21] г актинина, в то время как, согласно нашим данным, из 100 г мышцы выход протеина *M* равен 0,05—0,06 г. Как было показано выше, спиральность протеина *M* равна 94%, по данным же Маруяма и Хама [23] молекула α -актинина не содержит спиральной структуры.



0410353210

Различные значения коэффициента седиментации, спиральности, выхода препаратов и механохимической активности α -актина и протеина M позволяют заключить, что протеин M и α -актинин являются разными белками.

В 1967 году Моммаерте и др. [24] установили, что взаимодействие α -актина с актином приводит к образованию поперечных связей между тяжами актина (или актомиозина). Ими же было установлено, что для суперпреципитации актомиозина, измеренной по синерезису актомиозинового геля и по изменению мутности суспензии актомиозина, α -актинин не обязателен [25]. Отсюда они заключили, что α -актинин не имеет прямого отношения к процессу мышечного сокращения и является веществом

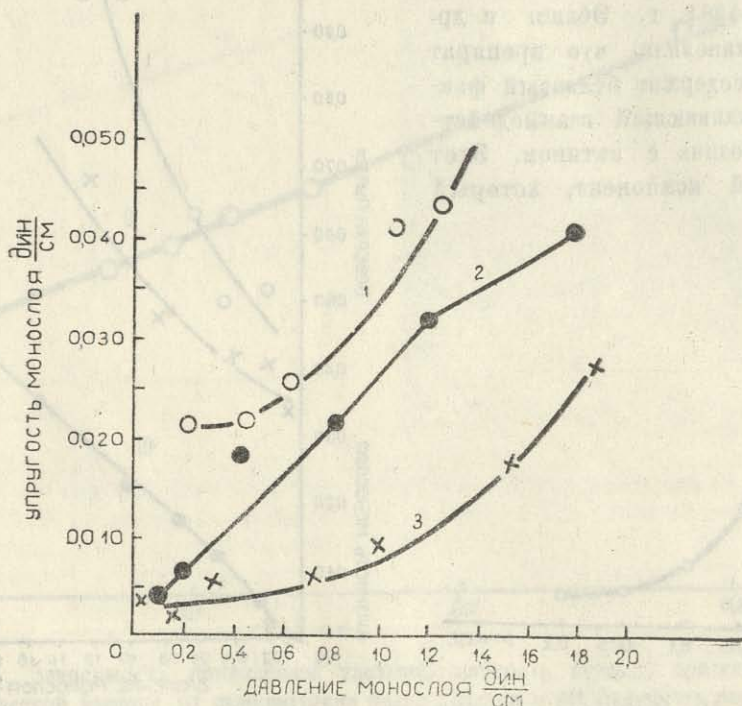


Рис. 14. Зависимость поверхностной упругости монослоя протеина M от поверхностного давления и концентрации KCl в подкладке
1—0,01; 2—0,1; 3—0,6 М KCl .

α -диска, соединяющим между собой концы нитей актина [24—26]. Действительно, согласно нашим данным, фракция, выделенная из белков, растворимых в воде при комнатной температуре, сульфатом аммония до 0,2 насыщения, не вызывает укорочения пленочных нитей актомиозина.

В присутствии нативного тропомиозина Эбаши синтетический актомиозин становится высокочувствительным к ионам кальция, усиливающего синерезис актомиозинового комплекса, к расслабляющему действию хелатных агентов и к физиологически расслабляющему фактору [27, 28].

Сент-Дьердьи и Каминар [29] установили, что, в то время как миозин *B* окрашивается метахроматически толуидиновым синим, актомиозин не всегда обладает метахромазией. Выяснилось, что миозин *B* состоит из миозина, актина и третьего белка — метина, который и обуславливает метахромазию.

Азума и Ватанабе установили, что главным компонентом метина является тропомиозин [30], а минорный компонент метина действует на суперпреципитацию актомиозина аналогично тропомиозиноподобному белку Эбаши [31], т. е. лишь в его присутствии ЭГТА вызывает ингибирование суперпреципитации актомиозина. Согласно данным Эбаши [29], тропомиозин, приготовленный по Бейли, не ингибирует суперпреципитацию. Катц [32] недавно сообщил, что вследствие образования Ф-актин-тропомиозинового комплекса, тропомиозин ингибирует суперпреципитацию актомиозина. Выяснилось, что характер эффекта тропомиозина зависит от концентрации *KCl* [30]. При низкой концентрации *KCl* (0,04 *M*) тропомиозин не ингибирует суперпреципитацию [27, 28, 30], в то время как при относительно высокой концентрации этой соли ($\geq 0,09$ *M*) тропомиозин ингибирует суперпреципитацию актомиозина [30, 32].

В 1966 году Катц [32а] из фракции актина, полученного путем экстракции апетоновой пудры при 25–27°, выделил фракцию белка, которая делает синтетический актомиозин, реконструированный из чистого актина и миозина, чувствительным к ЭГТА. В отсутствие агентов, связывающих кальций, эта белковая фракция действует на реконструированный актомиозин подобно тропомиозину, приготовленному классическим методом, а именно он ингибирует активируемую магнием АТФ-азную активность во время фазы просветления и повышает ее после суперпреципитации. Однако в отличие от тропомиозина, приготовленного классическим методом, лишь в присутствии этой фракции проявляется ингибирующее действие ЭГТА на активируемую магнием АТФ-азную активность реконструированного актомиозина. Значение коэффициента седиментации и зависимость удельной вязкости от ионной силы этой белковой фракции и тропомиозина одинаковы. Однако аминокислотный состав и характерис-

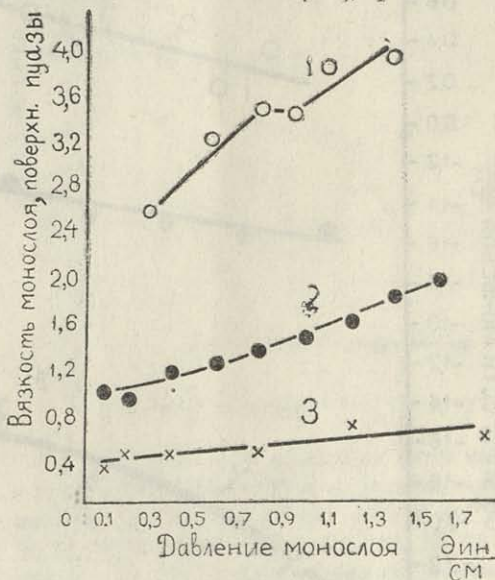


Рис. 15. Зависимость поверхностной вязкости миозина (1), миогена А (2) и протейна М (3) от поверхностного давления. Подкладка 0,1 *M* *KCl*.



тическая вязкость этих белков сильно отличаются. В белковой фракции Катца содержатся значительно высокое количество пролина и фенилаланина по сравнению с тропомиозином. Катц полагает, что чувствительность актомиозина к хелатам кальция обусловлена как раз богатой этими аминокислотами фракцией или же „нативной“ формой тропомиозина [32a].

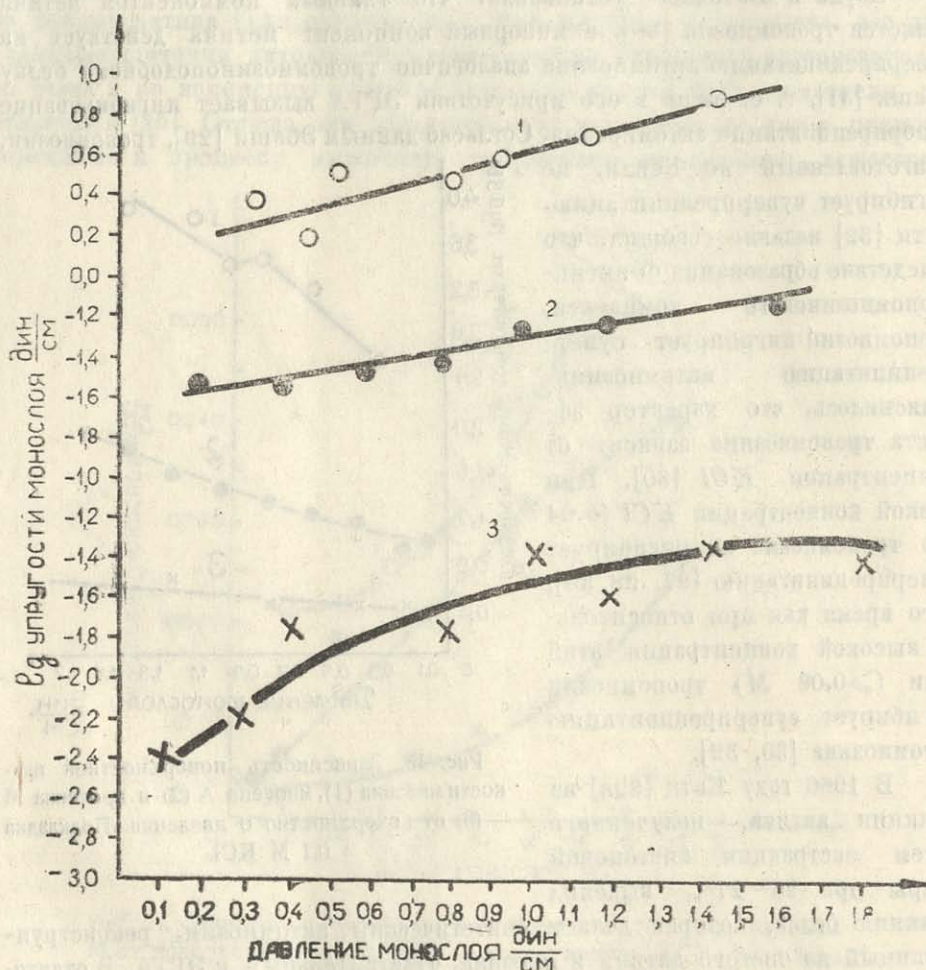


Рис. 16. Зависимость поверхностной упругости миозина (1), миогена А (2) и протеина М (3) от поверхностного давления. Подкладка 0,1 М КСІ.

Следует отметить, что фракция нативного тропомиозина Эбаши [27, 28], лишь в присутствии которого синтетический актомиозин проявляет чувствительность к ионам кальция и ЭГТА, сама по себе не оказывает воздействия на суперпреципитацию синтетического актомиозина: изменение оптической плотности синтетического актомиозина под влиянием АТФ, как в присутствии нативного тропомиозина, так и в его отсутствие, одинаково (контрольные кривые *a* и *b* на рис. 7 [33] и рис. 4 и 5 [28]). В

отличие от этого, сокращение пленочных нитей миозина В гладкой мускулы под влиянием АТФ наблюдается лишь в присутствии протеина М (рис. 17). Таким образом, запуск механического эффекта мышцы триггерной реакцией превращения АТФ происходит только в присутствии протеина М. Все эти факты указывают на то, что между миозином В и актомиозином нельзя ставить знака равенства и что миозин В, кроме актина и миозина, содержит и другие важные с физиологической точки зрения белки. Действительно, в последнее время накопились экспериментальные данные о различии между синтетическим актомиозином и миозином В. Впервые Блумом [34], а затем Гергели [35] и Фон Хиппель, Шахманом и др. [36] было установлено, что изменения интенсивности светорассеивания синтетического актомиозина и миозина В, возникшие в результате добавления АТФ, неодинаковы. Кроме того, Перри и Грей [37], Вебер и Виникур [38], Маруяма и Гергели [39] установили, что ЭДТА вызывает расслабление миозина В, а на синтетический актомиозин он не действует. Хелатон кальция—ЭДТА, в присутствии физиологической концентрации АТФ и Mg^{++} , также ингибирует суперпреципитацию миозина В, но не всегда в состоянии ингибировать суперпреципитацию некоторых препаратов синтетического актомиозина [см. 30]. Однако, как выясняется, разница между миозином В и синтетическим актомиозином обусловлена не миозиновой, а активной частью механохимической системы [6,7]. В продолжение 15 лет, время от времени, в литературе появлялись сведения о том, что различные методы получения ацетоновой пудры и экстракции белка ведут к препаратам актина с различными свойствами [40,41]. Драбиковски и Гергели [42, 43] установили, что температура экстракции ацетоновой пудры, получаемой по методу Фойера и др. [44] или по Ульбрихту и др. [45], существенно влияет на вязкость растворов Г- и Ф-актина. Различные значения

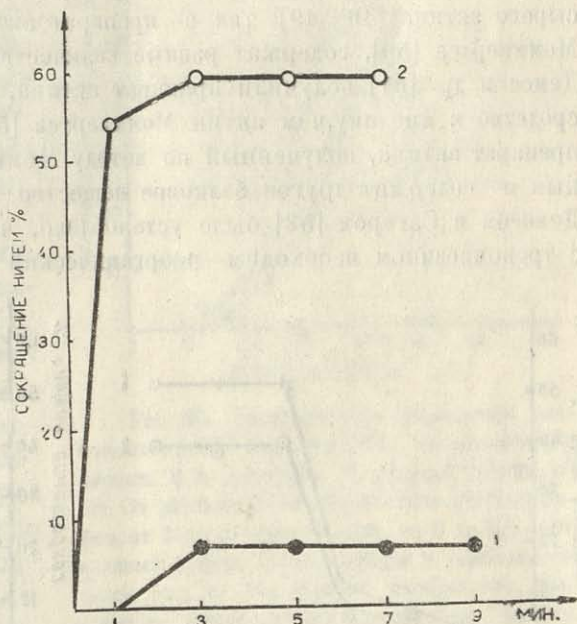


Рис. 17. Сокращение пленочных нитей миозина В в присутствии (кривая 2) и отсутствии (кривая 1) протеина М. Состав среды: 0,05 М КСl, 10^{-2} М $MgCl_2$ и 0,05 М трис-НСl буфер, рН 7,5; 2,5 М АТФ при 37° . На кривых изображены сокращения нитей в %-ах через одну минуту после добавления АТФ.

неодинаковы. Кроме того, Перри и Грей [37], Вебер и Виникур [38], Маруяма и Гергели [39] установили, что ЭДТА вызывает расслабление миозина В, а на синтетический актомиозин он не действует. Хелатон кальция—ЭДТА, в присутствии физиологической концентрации АТФ и Mg^{++} , также ингибирует суперпреципитацию миозина В, но не всегда в состоянии ингибировать суперпреципитацию некоторых препаратов синтетического актомиозина [см. 30]. Однако, как выясняется, разница между миозином В и синтетическим актомиозином обусловлена не миозиновой, а активной частью механохимической системы [6,7]. В продолжение 15 лет, время от времени, в литературе появлялись сведения о том, что различные методы получения ацетоновой пудры и экстракции белка ведут к препаратам актина с различными свойствами [40,41]. Драбиковски и Гергели [42, 43] установили, что температура экстракции ацетоновой пудры, получаемой по методу Фойера и др. [44] или по Ульбрихту и др. [45], существенно влияет на вязкость растворов Г- и Ф-актина. Различные значения

вязкости актина обусловлены различным содержанием тропомиозина в препарате актина. Экстракция ацетоновой пудры при низкой температуре ($0-2^{\circ}\text{C}$) значительно снижает содержание тропомиозина в препарате актина [44,45]. В настоящее время твердо установлено, что как препараты сырого актина [46—49], так и препарат актина, очищенный по методу Моммаертса [50], содержат разные количества тропомиозина. В 1958 году Демос и др. [51] получили препарат актина, который имел более высокое сродство к миозину, чем актин Моммаертса [52]. Они также полагают, что препарат актина, полученный по методу Моммаертса, не является гомогенным и содержит другое белковое вещество — тропомиозин. В 1963 году Демосом и Сагером [53] было установлено, что для взаимодействия актина с тропомиозином необходим неорганический фосфат и что ингибитор,

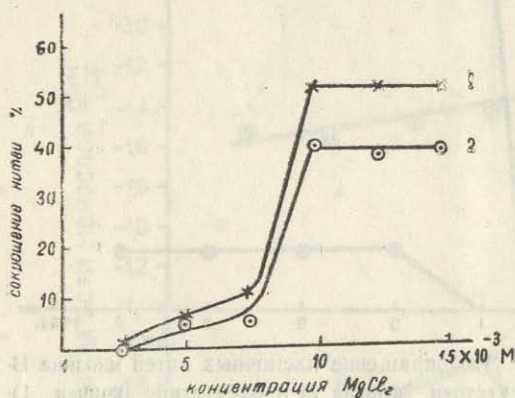


Рис. 18. Зависимость сокращения плевочных нитей миозина М полученного из миозина В и протенина М гладкой мышцы, от концентрации ионов магния. Состав и рН буферного раствора и условия опыта см. рис. 17. На кривых изображены сокращения нитей в %-ах через одну (кривая 1) и три (кривая 2) минуты после добавления АТФ.

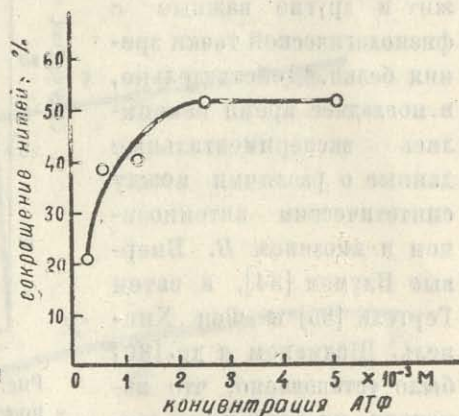


Рис. 19. Зависимость сокращения плевочных нитей миозина МВ, полученного из миозина В и протенина М гладкой мышцы, от концентрации АТФ. Состав и рН буферного раствора и условия опыта см. рис. 17. На кривой изображены сокращения нитей в %-ах через одну минуту после добавления АТФ.

содержащийся в сыром экстракте актина, снимает эффект неорганического фосфата [53].

Из изложенного следует, что разница между препаратами актина обусловлена различным содержанием в них тропомиозина и тропомиозиноподобных белков.

Согласно данным Перри и Корси [54], актин и тропомиозин *in Situ* также тесно связаны между собой. Функция тропомиозина в мышечной деятельности до последних лет оставалась невыясненной, хотя давно было высказано предположение, что тропомиозин тормозит взаимодействие между актином и миозином [55, 56]. В настоящее же время твердо установ-

лено, что тропомиозиноподобный белок или его фракции (протейн М, тропонин и др.) играют существенную роль во взаимодействии актина с миозином и в суперпреципитации актомиозина [3—7, 27—33].

Одной из важных проблем раскрытия механизма мышечного сокращения является вопрос трансформации химической энергии, аккумулированной в макроэргических связях АТФ в механическую работу.

Если мышечное сокращение обусловлено АТФ-азной активностью, то нити миозина *MB*, обладающие в 10—20 раз меньшей АТФ-азной активностью, чем нити миозина *B* поперечнополосатой мускулатуры, должны сокращаться в 10—20 раз медленнее. В действительности же нити миозина *MB* под влиянием АТФ сокращаются с такой же скоростью, как и нити миозина *B* поперечнополосатой мышцы. С другой стороны известно, что АТФ-аза активируется ионами кальция, тормозящими процесс сокращения пленочных нитей. (Подразумевается, что для триггерной реакции

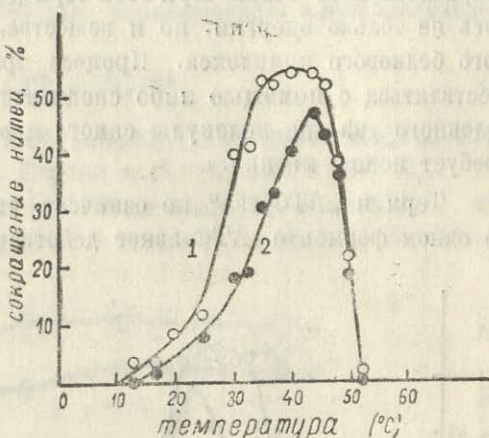


Рис. 20. Зависимость сокращения пленочных нитей миозина *MB*, полученного из миозина *B* и протейна *M* гладкой мышцы, от pH. От pH 6 до 7—использован цитратный буфер, от 7 до 9—трис-буфер, от 9 до 9,6—гликолевый буфер. Состав среды и условия опыта см. рис. 17. На кривых изображены сокращения нитей в %-ах через одну минуту (кривая 1) и три (кривая 2) после добавления АТФ.

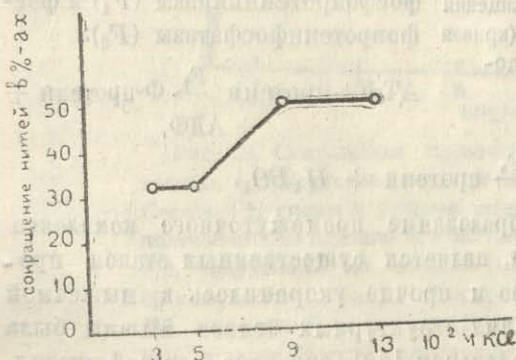


Рис. 21. Зависимость сокращения пленочных нитей миозина *MB*, полученного из миозина *B* и протейна *M* гладкой мышцы, от концентрации KCl. Состав и pH буферного раствора и условия опыта см. рис. 17. На кривой изображены сокращения нитей в %-ах через одну минуту после добавления АТФ.

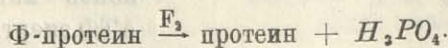
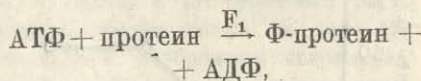
сокращения необходима пороговая концентрация $Ca \geq 10^{-7} - 10^{-5}$ [38]). Сокращение нитей происходит только в присутствии ионов магния. При гидролизе АТФ энергия, аккумулированная в макроэргических фосфатных связях, выделяется в виде тепла, а не в виде свободной энергии. Тепловую же энергию мышца не может использовать для выполнения механической работы.

Процесс сокращения является эндэргоническим и может быть осуществлен сопряженным с ним экзергоническим процессом. Энергия, аккумулированная

в макроэргической фосфатной связи АТФ, должна перейти на молекулу актомиозина без диссинации, вызывая тем самым структурные изменения сократительного белка. При этом термодинамические условия требуют переноса не только энергии, но и вещества, т. е. фосфорилирования сократимого белкового комплекса. Процесс трансфосфорилирования может осуществляться с помощью либо специальной трансфосфореразы, либо определенного участка молекулы самого миозина. Этот процесс в свою очередь требует ионов магния.

Термин „АТФ-аза“ не означает, что речь идет об одной реакции или об одном ферменте. АТФ-азное действие может быть обусловлено несколькими ферментами (реакциями).

Любую полиферментную реакцию клетки, протекающую с участием АТФ, можно рассматривать как АТФ-азную реакцию [57, 58], т. е. „... АТФ-аза в классическом его понимании не существует. АТФ-азная реакция—это просто сумма всех тех процессов, в результате которых АТФ расщепляется на АДФ и фосфат...“ [57]. Стимулируемую Na^+ и K^+ аденозинтрифосфатазу ($NaKATPase$) и миозиновую АТФ-азу можно также рассматривать в этом отношении, как совокупность двух ферментов—фосфопротеинкиназы (F_1) и фосфопротеинфосфатазы (F_2):



Предположение о том, что образование промежуточного комплекса ферментной реакции—фосфомиозина, является существенным этапом процесса мышечного сокращения, старо и прочно укоренилось в мышечной биохимии. Гипотеза фосфорилирования структурных белков мышцы была впервые выдвинута в 1941 году Калькарром [59], согласно которой миозин в фазе сокращения мышцы может действовать как акцептор, а в фазе расслабления—как донатор фосфата. Поэтому механизм реакции можно представить следующим образом:

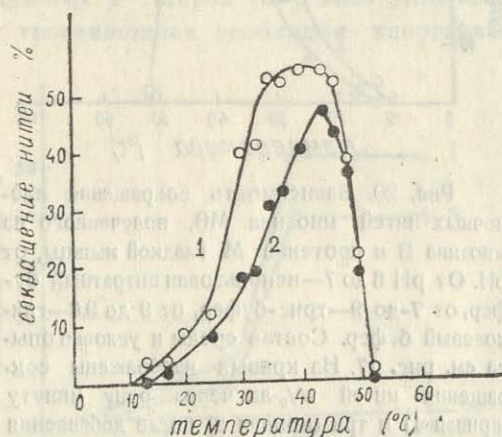
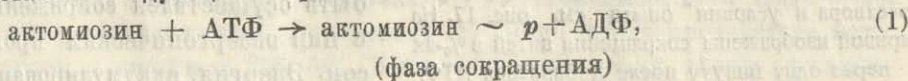
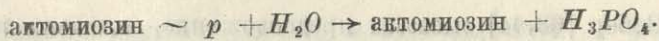
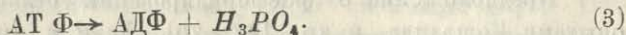


Рис. 22. Зависимость сокращения пленочных нитей миозина MB, полученного из миозина В и протеина М гладкой мышцы, от температуры. Состав и рН среды и условия опыта см. рис. 17. На кривых изображены сокращения пленочных нитей в %-ах через одну (кривая 1) и три (кривая 2) минуты после добавления АТФ.



(фаза расслабления)

Суммирование реакции (1) и (2) дает классическую аденозинтрифосфатазную реакцию



Связывание отщепленного от АТФ фосфата с миозином впервые было продемонстрировано в 1946 году Э. Сорени и О. Чешинога [60, 61].

В 1948 г. Рисеман и Керивуд [62] высказали предположение, что сократительный элемент мышцы представляет собой гибкую нить поли-

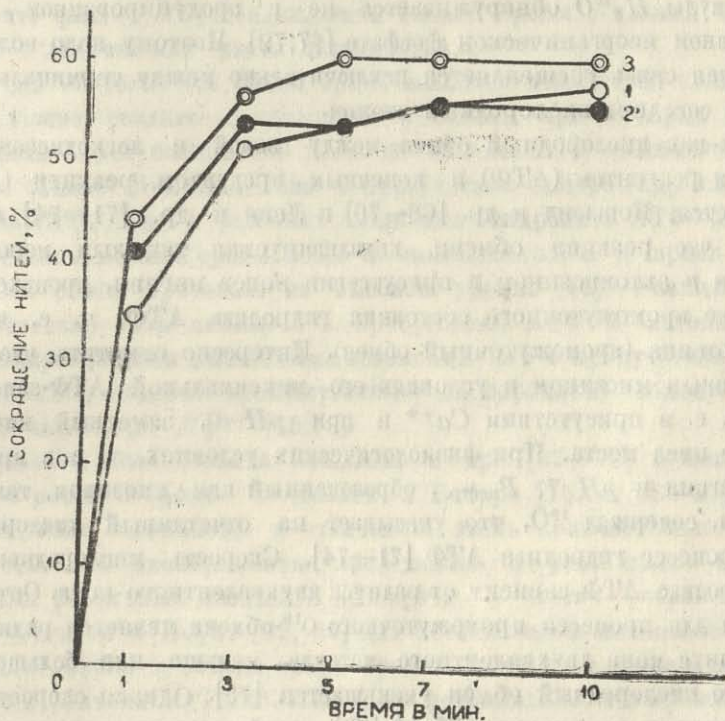


Рис. 23. Сокращение пленочных нитей миозина МВ гладкой мышцы, в присутствии не нагретого и нагретого протеина М. Состав РН среды и условия опыта см. рис. 17. 1—миозин МВ, полученный из миозина В и не нагретого протеина М. 2—миозин МВ, полученный из миозина В и нагретого до 40° в течение 80 мин., а затем быстро охлажденного протеина М. 3—миозин МВ, полученный из миозина В и нагретого до 56° в течение 150 мин., а затем быстро охлажденного протеина М. На кривых изображены сокращения нитей в %-ах через одну минуту после добавления АТФ.

электролита, заряд которого изменяется при фосфорилировании его сериновых остатков за счет АТФ.



В 1955 году Вебер [63,64] высказал предположение, согласно которому фосфорилирование сократительного белка есть одна из первых реакций процесса сокращения, а Ульбрехт и Ульбрехт [65, 66] экспериментально подтвердили это [32].

Предположение о фосфорилировании белков подтверждается также опытами Кошлэнда и др. [67—70], Леви и др. [71—74], которые при инкубировании тяжелого меромиозина, миозина и актомиозина с АТФ в присутствии H_2O^{18} показали высокий уровень O_{18} в $P_{неорг.}$, отщепленном от АТФ мышечными белками.

В результате гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты миозином ^{18}O молекулы $H_2^{18}O$ обнаруживается не в продуцированном АДФ, а в отщепленном неорганическом фосфате [67,72]. Поэтому надо полагать, что химическая связь расщепляется исключительно между терминальным фосфором и соседним кислородным атомом.

Так как кислородный обмен между водой и легкодиссоциируемым исходным реагентом (АТФ) и конечным продуктом реакции ($P_{неорг.}$) не наблюдается, Кошлэнд и др. [68—70] и Леви и др. [71—74] пришли к выводу, что реакция обмена, катализируемая тяжелым меромиозином, миозином и актомиозином в присутствии ионов магния, происходит лишь на уровне промежуточного состояния гидролиза АТФ, т. е. на уровне фосфопротеина (промежуточный обмен). Интересно отметить, что в опытах с очищенным миозином в условиях его максимальной АТФ-азной активности, т. е. в присутствии Ca^{++} и при pH 9, заметный кислородный обмен не имел места. При физиологических условиях, т. е. в присутствии ионов магния и pH 7, $P_{неорг.}$, образованный как миозином, так и актомиозином, содержал ^{18}O , что указывает на отчетливый кислородный обмен в процессе гидролиза АТФ [71—74]. Скорость кислородного обмена при гидролизе АТФ зависит от радиуса двухвалентного иона. Оптимальным радиусом для процесса промежуточного O^{18} -обмена является радиус Mn^{++} . Если радиус иона двухвалентного металла меньше или больше радиуса Mn^{++} , то кислородный обмен уменьшается [73]. Однако скорость обмена еще достаточно высока для Mg^{++} [73], необходимого для сокращения, и очень низка для Ca^{++} , тормозящего процесс сокращения [68, 71—73].

Что образование промежуточного комплекса является чрезвычайно важным этапом процесса мышечного сокращения, следует из работы Иоунт и Кошлэнда, которые четко показали, что мышечное сокращение и промежуточный кислородный обмен одинаково зависят от природы субстрата и металл-иона [69].

В 1961 году Демпси и Бойер [75] выяснили, что в присутствии АТФ миозин и актомиозин могут катализировать также другой тип реакции кислородного обмена—обмен кислорода неорганического фосфата среды с кислородом H_2O^{18} (обмен среды). В 1963 году Демпси и др. [76] сообщили, что, хотя обмен среды преобладает над промежуточным обменом, однако, последний может быть обнаружен в присутствии высокоочищенных

препаратов миозина или при применении АТФ в качестве субстрата. С другой стороны, согласно данным Леви и сотр. [74], обмен среды мал по сравнению с промежуточным обменом.

В 1966 году Ильин [77], на основании исследования влияния миозина и актомиозина на кислородный обмен между H_2O^{18} и $P_{неорг.}$ среды, установил, что в то время как в присутствии актомиозина наблюдается отчетливый катализ изотопного обмена O^{18} между H_2O^{18} и $P_{неорг.}$ в среде, не содержащей АТФ, миозин, вопреки данным Демпси и др. [76], на изотопный обмен кислорода (в растворах с концентрациями фермента от 2 до 8 мг/мл) влияния не оказывает. Если это на самом деле так, надо допустить, что фактор, обуславливающий „обмен среды“, должен быть сосредоточен в „актиновой“ части актомиозина.

Вследствие того, что обмен среды является процессом, зависящим от времени, можно создать специальные условия, при которых величина обмена среды будет бесконечно мала, по сравнению с величиной промежуточного обмена. Действительно, в присутствии быстро гидролизруемого нуклеотида (ИТФ) или в условиях активации гидролиза АТФ (например, динитрофенолом) обмена среды вовсе не наблюдается, в то время как промежуточный обмен протекает на высоком уровне [70]. Реакция обмена среды, катализируемая миозином в присутствии АТФ и актомиозином и глицирилизированными мышечными волокнами как в присутствии, так и в отсутствие АТФ, подобно промежуточному кислородному обмену, требует в качестве кофактора Mg^{++} [75,76].

Результаты исследования Коупленда и др. [67—70] и Леви и др. [71—74], с одной стороны, и Демпси и Бойера [75,76, 78—81], — с другой, качественно одинаковы и отличаются лишь количественно, что обусловлено тем, что эксперименты проводились в различных условиях и применялись различные энзимные препараты. В целях устранения этого различия, Свенсен и Иоунт [82, 83] для исследования интенсивности промежуточного обмена и обмена среды применяли чистые препараты миозина и тяжелого меромиозина (ТММ). Ими было установлено, что промежуточный O^{18} -обмен протекает гораздо интенсивнее, чем обмен среды. Обменные свойства в присутствии ТММ и миозина почти одинаковы. Из полученных экспериментальных данных авторы заключают, что кислородный обмен присущ самому миозину и не обусловлен примесями [82,83].

В 1967 году Р. Бенсон, Мэри Демпси и Е. Бенсон [84] в результате изучения временного хода кислородного обмена между водой и фосфатом при гидролизе АТФ миофибриллами скелетных мышц крысы, выяснили, что фосфат, отщепленный от АТФ, во время скрытого периода содержит такое количество O^{18} , которое ожидается в результате гидролиза АТФ. После этого скрытого периода отмечается кислородный обмен между водой и $P_{неорг.}$, скорость которого приближается к скорости гидролиза АТФ. Хотя кислородный обмен между водой и $P_{неорг.}$ среды (обмен среды)



можно обнаружить как в отсутствие АТФ, так и во время гидролиза АТФ в присутствии высокой концентрации $P_{\text{неорг.}}$ среды (> 30 мм), интенсивность кислородного обмена между водой и промежуточным комплексом — миозин— Mg^{++} —АТФ (промежуточный обмен) гораздо больше интенсивности обмена среды. Качественно подобная картина была получена и в случае миофибрилл сердечной мышцы [85]. Скрытый период кислородного обмена объясняется образованием промежуточного миозинфосфатного комплекса [84].

Скорость высвобождения $P_{\text{неорг.}}$ непосредственно после добавления аденозинтрифосфата (начальная вспышка) несколько раз выше, чем в последующей стационарной фазе [86—89]. Начальная вспышка отщепления ортофосфата гасится сульфгидрильными реагентами, ЭДТА, неорганическим пирофосфатом; она исчезает после диализа миозина и вновь восстанавливается ионами Mg (или Mn); в то время как ионы Ca ее не восстанавливают. Подавление начальной вспышки ингибиторами ЭДТА и неорганическим пирофосфатом всегда сопровождается ингибированием мышечного сокращения [90]. Изолированные миофибриллы и глицеринизированные фибриллы, освобожденные диализом от Mg^{++} , не сокращаются под влиянием АТФ, если одновременно не добавляются ионы магния; последние не заменяются ионами кальция [89, 91]. Аналоги АТФ, которые, как и АТФ, уменьшают светорассеяние актомиозина [89, 92—94] и расщепляются со скоростями подобными гидролизу АТФ, не высвобождают ортофосфат при взаимодействии с ферментом начальной вспышкой и не вызывают сокращения миофибрилл [89; 95—97]. Эти опыты указывают на то, что между начальной вспышкой и мышечным сокращением существует тесная связь.

Так как начальная вспышка требует ионы Mg и сульфгидрильные группы миозина, Тономура и сотр. [89] допустили, что начальная вспышка обусловлена фосфорилированием миозина аденозинтрифосфатной кислотой. Исследования освобождения H^+ -ионов и ортофосфата при взаимодействии миозина с АТФ [98], особенно до установления состояния равновесия, привели Тономура и сотр. к заключению, что миозиновая АТФ-аза расщепляет АТФ или простым гидролизом, проходя стадию комплекса Михаэлиса, или путем гидролиза, при котором до высвобождения $P_{\text{неорг.}}$ комплекс Михаэлиса превращается в реактивный миозинфосфатный комплекс [89, 99—108]. Многие исследователи [76, 102—103] безуспешно пытались изолировать фосфомиозин. Лишь Тономура и сотр. удалось показать существование фосфомиозина и выделить его в условиях начальной вспышки [89, 101].

Чрезвычайно важным в пользу доказательства существования фосфомиозина является тот факт, что миозин активно связывается с нуклеофильным реагентом с пара-нитротроифанолом лишь в присутствии ионов магния и АТФ [89, 106—108] с образованием комплекса пара-нитротроифенил-миозина (НТФ-миозина). По-видимому, в присутствии Mg^{++} , в ре-

в результате взаимодействия АТФ с миозином, образуется новая, доступная нуклеофильной атаке связь [89]. Кинетические данные [99, 107, 109] также указывают на то, что при АТФ-азной реакции актомиозинового типа АТФ гидролизуется, в основном, через образование миозинфосфатного комплекса, причем, как показали Имамуре и др. [101], при связывании Ф-актина с миозином скорость расщепления миозинфосфатного комплекса может увеличиться более чем в 100 раз. Степень укорочения изолированных миофибрилл при добавлении Mg АТФ прямо пропорциональна количеству АТФ, гидролизованного АТФ-азой актомиозинового типа [110, 111].

Исходя из того, что пара-нитрофенолизация 1 моля участков, связывающий фосфат на моль миозина полностью тормозит как АТФ-азную активность, так и суперреципитацию актомиозина, можно заключить, что образование реактивного миозинфосфатного комплекса является обязательным этапом при взаимодействии миозина с АТФ [111].

ЭГТА, вещество, являющееся специфическим хелатоном для Ca^{++} , снижает примерно на один порядок как миофибрилярную АТФ-азную активность, так и кислородный обмен фосфата. Отсутствие скрытого периода обмена в присутствии ЭГТА, по-видимому, является результатом ингибирования реакции отщепления неорганического фосфата на какой-либо фазе последовательной цепи реакций взаимодействия миозина с АТФ. Таким образом, до перехода $P_{неорг.}$ в среду может наблюдаться дополнительный кислородный обмен [84]. Это наблюдение представляет собой особый интерес, так как на сегодняшний день хорошо установлено, что процесс сокращения имеет место лишь при определенной концентрации Ca^{++} ($\geq 10^{-7} - 10^{-5} M$) [38].

Поляские ученые [102], изучившие взаимодействие меченого АТФ — P^{32} с сократительными белками, показали, что во время ферментативного расщепления АТФ меченый $P_{неорг.}$ связывается с белками.

Тесная корреляция между „начальной вспышкой“ отщепления $P_{неорг.}$ и мышечным сокращением и отсутствие таковой между активностью АТФ-азы в стационарной фазе и сокращением [89, 111], с одной стороны, и поразительное сходство специфического влияния ионов и нуклеотидов на O^{18} -обмен и на сокращение мышцы [69, 70, 73] — с другой, подтверждают гипотезу о том, что фосфорилирование миозина является первичной реакцией мышечного сокращения.

Данные Кошлэнда и др. [67—70], Леви и др. [71—74], Бойера [81], Бенсона и др. [84], Тонумура и др. [87—90, 93—97, 99—101, 106—111], Свенсона и Иоунт [82—83] однозначно указывают на то, что образование промежуточного миозинфосфатного комплекса является важной и ключевой реакцией мышечного сокращения, хотя природа этого фосфорилдериивата еще до конца не выяснена и нет единого мнения о механизме кислородного обмена.



Ввиду того, что: 1) во время начальной вспышки гидролиза АТФ миозином скрытый период кислородного обмена не наблюдается [46] и 2) при связывании Ф-актина с миозином скорость расщепления миозин-фосфатного комплекса увеличивается более чем в 100 раз [42], важно исследовать роль актина в кислородном обмене и в образовании фосфо-риямиозинового комплекса. Так как в миозине В кроме самого актина сосредоточен еще третий важный компонент механохимической системы — протеин М [3—7], важно в обмене АТФ отдельно исследовать как роль самого актина, так и протеина М. Возможно, что протеин М играет роль не только структурообразователя, обеспечивая межмолекулярное сцепление молекул глобулярного актина с образованием Ф-актина (и Ф-актомиозина), но является и активным компонентом мышечного сокращения. Не исключено, что именно протеин М существенно влияет на скорости образования и расщепления фосфомиозина. Надо полагать, что в ближай-шее время удастся выявить детали механизма взаимодействия субстрата сокращения с АТФ и роль отдельных компонентов этого белкового комп-лекса в триггерной реакции сокращения.

Согласно Сент-Дьердьи, „Если бы энергетика клетки основывалась на самопроизвольных спонтанных реакциях, то весь механизм срабатывал бы бесполезно, как часы без маятника“. И поэтому живая клетка никогда не применяет самопроизвольных реакций, которые не поддаются управле-нию. Для того, чтобы энергия, сосредоточенная в молекулах АТФ, могла быть передана белку и израсходована с пользой, миозин должен расщеп-лять связанную с ним АТФ, находящуюся в виде комплекса с магнием [112]. Связывание АТФ с миозином осуществляется положительными зар-ядами, каковыми, вероятно, являются ионы магния, образующие элект-ростатические связи с отрицательными группами белка.

С другой стороны, механохимическая система мышцы представляет собой хорошо отрегулированную лабильную систему, структура которой легко перестраивается с изменением условий. В этом молекулярном прев-ращении существенную роль играют ионы кальция. Электрическое возму-щение, распространяющееся через саркоплазматический ретикулум, вызы-вает высвобождение из пузырьков ретикулума ионов кальция. Как только концентрация ионов кальция достигает $\sim 10^{-5} M$, наступает максимальное сокращение всей механохимической системы волокна. Во время фазы рас-слабления ионы кальция вновь возвращаются к пузырькам саркоплазмати-ческого ретикулума. Накопление кальция прекращается как только кон-центрация свободного кальция в окружающей пузырьки среде падает до $2-3 \cdot 10^{-9}$ [113]. Таким образом, саркоплазматический ретикулум сни-жает концентрацию ионов кальция в окружающей среде до величины, лежащей ниже порогового значения сократительной активности механохи-мической системы мышцы. Концентрация ионов кальция (кальциевый насос) в пузырьках саркоплазматического ретикулума приводится в дейс-

твие лишь АТФ и активируется ионами кальция, также $NaKA$ и Na^+K^+ -насос-ионами натрия и калия. Таким образом, в результате активного переноса ионы кальция концентрируются в мембранах пузырьков эндоплазматической сети [115]. Уровень концентрации ионов кальция можно считать регуляторным и пусковым механизмом мышечного сокращения.

Из изложенного экспериментального материала следует, что степень сокращения механохимической системы (плечных нитей) гладких и скелетных мышц существенным образом зависит не только от концентрации ионов кальция, но и от рН среды и от концентрации ионов магния и калия. Таким образом, изменение структуры акторкатализатора зависит от многих факторов и вряд ли регулируется лишь изменением концентрации ионов кальция. С другой стороны, сама механохимическая система тоже является сложной многокомпонентной системой, состоящей, по крайней мере, из миозина, актина и протеина М.

Согласно Моно и Жакобу [114], изменения структуры молекул фермента (молекулярные превращения) можно рассматривать как один из механизмов регуляции процесса. Один и тот же белок приобретает различные ферментативные свойства в результате присоединения себе подобной или другой белковой молекулы. Взаимопревращение глутаматдегидрогеназы в аланиндегидрогеназу является следствием взаимодействия молекул одного и того же фермента друг с другом [115]. Превращение неактивной фосфорилоразы *b* в активную фосфорилоразу *a* происходит под влиянием АТФ и специального фермента—фосфорилоразокиназы, в присутствии ионов магния. Процесс фосфорилирования сопровождается димеризацией белка—две молекулы фосфорилоразы *b* с молекулярным весом 2,42 · 10⁵ образуют одну молекулу фосфорилоразы *a* с молекулярным весом 4,95 · 10⁵. Под влиянием другого фермента—фосфатазы фосфорилоразы, происходит отщепление от фосфорилоразы *a* связанной фосфатной группы в виде неорганического фосфата. При этом фосфорилоразы *a* вновь распадается на две равные молекулы фосфорилоразы *b*. Это превращение тесно связано с процессом мышечного сокращения [11 *b*]. Инактивация фосфорилоразы *a* ферментом является регуляторным механизмом обмена гликогена в мышце.

Система миозин—актин—протеин М—расслабляющий фактор является превосходным примером такой регуляции ферментативной активности, так как АТФ-азная активность и механохимические свойства миозина резко меняются Ф-актином и другими компонентами системы. Переход механохимической системы из активной формы в пассивную и степень механохимической активности регулируются одно-и двухвалентными ионами, концентрация которых контролируется физиологическими условиями [88].



ВЫВОДЫ

Как в гладких, так и в поперечнополосатых мышцах субстратом сокращения является не актомиозин, а комплекс из миозина, актина и протеина *M*. Таким образом, запуск механического эффекта мышцы триггерной реакцией превращения АТФ происходит только в присутствии протеина *M*.

Кинетическая единица протеина *M* в отсутствие солей является сополимером со следующими гидродинамическими показателями. Характеристическая вязкость $[\eta]=4,7$ децилитр/г, парциальный удельный объем $\bar{v}=0,722$ мл/г, коэффициент седиментации $S_{20,0}^0=4,3$ (в единицах Сведберга), коэффициент диффузии $D_{20}=10,72 \cdot 10^{-7}$ см²/сек. Отсюда следует, что молекула протеина *M* характеризуется молекулярным весом $3,52 \cdot 10^5$ и отношением осей 100. Отношение эффективного гидродинамического объема к парциальному специфическому объему равно 1,076, что указывает на незначительное набухание молекулы протеина *M*.

Удельная вязкость протеина *M* в отсутствие солей очень велика. Однако добавление небольшого количества хлористого калия вызывает значительное снижение вязкости, а при более высоких концентрациях ($\geq 0,15$) *KCl* вязкость протеина *M* асимптотически приближается к постоянной величине. Из этого следует, что кинетическая единица протеина *M* с молекулярным весом $3,52 \cdot 10^5$ и отношением осей 100 в отсутствие солей является сополимером, который, подобно тропомиозину, в растворах нейтральных солей дезагрегируется на первичные частицы.

Степень спиральности этого тропомиозиноподобного белка равна 94%. Протеин *M* начинает плавиться при 32°, и плавление завершается при 56°C.

Протеин *M* на поверхности *KCl* образует мономолекулярный слой, толщиной 11—12 Å, при сжатии которого от 0,1 до 1,4 дина/см скачок потенциала изменяется от 206 до 289 Мв. Поверхностная вязкость и упругость монослоя протеина *M* с возрастанием поверхностного давления увеличиваются, а увеличение ионной силы растворов в подкладке снижает значения поверхностной вязкости и упругости монослоя протеина *M*. Однако в отличие от миогена А, актина, миозина А и миозина В, которые на границе фаз водный раствор—воздух образуют высоковязкие и упругие пленки, протеин *M* на поверхности *KCl* образует мономолекулярный слой с низкой поверхностью и упругостью.

Различные значения гидродинамических параметров и механохимической активности α -актинина и протеина *M* позволяют заключить, что протеин *M* и α -актинин Эбаши являются разными белками.

Для максимального сокращения пленочных нитей миозина *MВ*, полученных из миозина *В* и протеина *M* гладкой мышцы, требуется концентрация АТФ ($2,5 \cdot 10^{-6}$ м/мл) в два раза меньшая, чем для максималь-



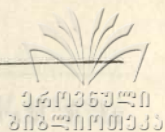
образовании фосфомиозина. Не исключено, что именно протеин *M* существенно влияет на процесс образования и расщепления фосфомиозина.

Сократительная система мышцы (миозин—актин—протеин *M*—расслабляющий фактор) является тонко отрегулированной механохимической системой: во-первых, АТФ-азная активность и механохимические свойства миозина резко меняются актином и другими компонентами системы и, во-вторых, переход механохимической системы из одного состояния в другое и степень ее активности регулируются одно- и двухвалентными ионами, концентрация которых контролируется физиологическими условиями. Ферментная система превращения АТФ миозином при мышечной деятельности и сама хемодинамическая система мышцы являются превосходным примером аллостерической регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Сент-Дьердьи. О мышечной деятельности. М., Медгиз (1947).
2. А. Ссаро et al. Acta physiol. scand., 19, 100 (1949).
3. Г. В. Микадзе. Сообщения АН ГССР, 31, 195 (1963).
4. М. М. Заалишвили, Г. В. Микадзе, Т. Т. Сургуладзе и Н. А. Гачечиладзе. Первый всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов. вып. 2, Л. (1964), с. 104.
5. М. М. Заалишвили и Г. В. Микадзе. Биохимия, 29, 801 (1964).
6. М. М. Заалишвили, Г. В. Микадзе, Т. Т. Сургуладзе, Н. А. Гачечиладзе, С. В. Джибладзе. Всесоюзная конференция по мышечной биохимии. Тезисы докладов. Л. (1966), с. 52.
7. М. М. Заалишвили, Г. В. Микадзе и Т. Т. Сургуладзе. Сообщения АН ГССР, 44, 99 (1966).
8. М. М. Заалишвили и Г. В. Микадзе. Биохимия, 24, 612 (1959).
9. T. S. Svedberg and K. O. Pedersen. The Ultracentrifuge. Clarendon Press, Oxford (1940).
10. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин и С. Я. Френкель. Структура макромолекул в растворах. Из-во „Наука“ (1964).
11. Аналитические методы белковой химии. Под ред. П. Александера и Р. Блока. ИЛ (1963).
12. W. I. Moffit. J. Chem. Phys., 25, 467 (1956).
13. E. Shechter and E. K. Blout. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 51, 695 (1964).
14. E. J. Cohn and J. T. Edsall. Proteins, Amino Acids and Peptids. Reinhold, N. Y. (1943).
15. T. L. McMeekin and K. Marshall. Science, 116, 142 (1952).
16. R. Simha. J. Phys. Chem., 44, 25 (1940).
17. J. L. Oncley. Ann. N. Y. Akad. Sci., 41, 121 (1941).
18. F. Westley and J. Cohen. Biopolymers, 4, 201 (1966).
19. Н. А. Scheraga L. Mandelkern. J. Amer. Chem. Soc., 75, 175 (1953).
20. М. М. Заалишвили. Биохимия, 16, 321 (1951); Труды Горийского гос. пед. института 3, 279 (1956);
М. М. Заалишвили, А. Р. Егиазарова. Биохимия, 29, 223, (1964); Биофизика, 11, 785 (1966); Биофизика, 11, 532 (1966).
21. S. Ebashi, F. Ebashi and K. Maruyama. Nature, 203, 645 (1964).
22. S. Ebashi. XXIII Internat. Congr. physiol. Sciences, Tokyo, Japan, September 1—9. Symposium VII. Structure and function of muscle (1965), p. 405.

23. K. Maruyama and H. Hama. Second Internat. Biophysics Congress, Vienna (1966).
24. E. J. Briskey, K. Seraydarian and W. F. H. M. Mommaerts. *Biochim. Biophys. Acta*, 133, 424 (1967).
25. E. J. Briskey, K. Seraydarian and W. F. H. M. Mommaerts. *Biochim. Biophys. Acta*, 133, 412 (1967).
26. K. Seraydarian, E. J. Briskey and W. F. H. M. Mommaerts. *Biochim. Biophys. Acta*, 133, 399 (1967).
27. S. Ebashi. *Nature*, 200, 1010 (1963).
28. S. Ebashi and F. Ebashi. *J. Biochem.*, 55, 604 (1964).
29. A. Szent-Györgyi and B. Kaminer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 50, 1033 (1963).
30. N. Azuma and S. Watanabe. *J. Biol. Chem.*, 240, 3847 (1965).
31. N. Azuma and S. Watanabe. *J. Biol. Chem.*, 240, 3852 (1965).
32. A. M. Katz. *J. Biol. Chem.*, 239, 3304 (1964).
- 32a. A. M. Katz. *J. Biol. Chem.*, 241, 1522 (1966).
33. S. Ebashi, H. Iwakura, H. Nakajima, R. Nakamura and Y. Ooi. *Biochem. Z.*, 345, 201 (1966).
34. J. J. Blum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 43, 176 (1953).
35. J. Gergely. *J. Biol. Chem.*, 220, 917 (1956).
36. P. H. Von Hippel, H. K. Schachman, P. Appel and M. F. Morales. *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 504 (1958).
37. S. V. Perry and T. C. Grey. *J. Biochem.*, 64, 5 P (1956).
38. A. Weber and S. Winieur. *J. Biol. Chem.*, 236, 3198 (1961).
39. K. Maruyama and J. Gergely. *J. Biol. Chem.*, 237, 1100 (1962).
40. T. C. Tsao and K. Bailey. *Biochim. Biophys. Acta*, 11, 102 (1953).
41. N. Grubhofer and H. H. Weber. *Z. Naturforsch.*, 16, 435 (1961).
42. W. Drabikowski and J. Gergely. *J. Biol. Chem.*, 237, 3412 (1962).
43. W. Drabikowski and J. Gergely. *Biochemistry of muscle contraction*, Ed. by J. Gergely. London (1964), p. 125.
44. G. Feuer, F. Molner, E. Pettko and F. Straub. *Acta Physiol. Hung.*, 1, 150 (1948).
45. M. Ulbrecht, N. Grubhoffer, F. Jaisle and S. Walter. *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 443 (1960).
46. K. Laki and J. Cairns. *Fed. Proc.*, 18, 85 (1959).
47. K. Laki and J. Cairns. *Fed. Proc.*, 18, 355 (1959).
48. K. Laki and J. Standert. *Arch. Biochem. Biophys.*, 86, 16 (1960).
49. K. Laki, K. Maruyama and D. R. Kominz. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 323 (1962).
50. A. Martonosi. *J. Biol. Chem.*, 237, 2795 (1962).
51. J. Demos, J. C. Dreyfus and C. R. Schapiro. *Acad. Sci.*, 247, 1254 (1958).
52. W. F. H. M. Mommaerts. *J. Biol. Chem.*, 198, 445 (1952).
53. J. Demos and L. Sagaert. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11, 378 (1963).
54. S. V. Perry and A. Corsi. *Biochem. J.*, 68, 5 (1958).
55. J. R. Bendall. Цит. по статье Needham в книге: „The Structure and Function of muscle“, vol. 2, Acad. Press, Inc., N. Y. (1960), p. 55.
56. G. Maréchal and W. S. H. M. Mommaerts. *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 53 (1963).
57. Э. Раккер и Р. Ву. Лимитирующие факторы гликолиза в клетках асцитной опухоли и эффект Пастера. Обсуждение доклада в книге: „Регуляция клеточного обмена“, Изд. Иностранной литературы, М. (1962), с. 270.
58. K. P. Wheeler and R. Whitham. *J. Biochem.*, 85, 495 (1962).



59. H. M. Kalkar. *Chem. Revs.*, 28, 71 (1941).
60. Э. Т. Сорени, О. П. Чепинога. Докл. АН СССР, 52, 323 (1946).
61. Э. Т. Сорени и О. П. Чепинога. Укр. биох. журн.
62. J. Riseman and Kirkwood. *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2820 (1948).
63. H. H. Weber, III Congrès Internat. Biochimie. Bruxelles (1955). Conférences et reports, Liège (1956), p. 356.
64. H. H. Weber. *The Motility of Muscle and Cells*. Harvard University Press, Cambridge (1958).
65. G. Ulbrecht and M. Ulbrecht. *Biochim. Biophys. Acta*, 11, 138 (1953).
66. G. Ulbrecht, M. Ulbrecht and H. J. Wustrow. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 110 (1957).
67. D. E. Koshland and E. Klarke. *J. Biol. Chem.*, 205, 917 (1953).
68. D. E. Koshland, Z. Budenstein, A. Kowalsky. *J. Biol. Chem.* 211, 279 (1954).
69. R. C. Yount and D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.*, 238, 1708 (1963).
70. D. E. Koshland and H. M. Levy. Evidence for an intermediate in ATP hydrolysis by myosine*. В кн: *Biochemistry of Muscle Contraction*, ed. by J. Gergely, (1964), p. 87.
71. H. M. Levy and D. E. Koshland. *Am. Chem. Soc.*, 80, 3164 (1958).
72. H. M. Levy and D. E. Koshland. *J. Biol. Chem.*, 234, 1102 (1959).
73. H. M. Levy, N. Sharon, E. Lindemann and D. E. Koshland. *J. Biol. Chem.*, 235, 2628 (1960).
74. H. M. Levy, E. M. Ryan, S. S. Springhorn and D. E. Koshland. *J. Biol. Chem.* 237, P 1730 (1962).
75. M. E. Dempsey and P. D. Boyer. *J. Biol. Chem.*, 236, p. 6 (1961).
76. M. E. Dempsey, P. D. Boyer and E. S. Benson. *J. Biol. Chem.*, 238, 2708 (1963).
77. Л. А. Ильин. Всесоюзная конференция по мышечной биохимии, Тезисы докладов, Ленинград (1966), с. 57.
78. P. D. Boyer, D. E. Hultquist, J. B. Peter, G. Kreil, R. A. Mitchell, M. De Luca, J. W. Hinkson, L. G. Butler and R. W. Meyer. *Fed. Proc.*, 22, 1080 (1963).
79. P. D. Boyer. *Science*, 141, 1147 (1963).
80. M. De Luca, K. E. Ebner, D. E. Hultquist, G. Kreil, J. B. Peter, R. W. Meyer and P. D. Boyer. *Biochem. Z.*, 338, 512 (1963).
81. P. D. Boyer. Oxygen exchange and oxidative phosphorylation studies as related to possible phosphorylations accompanying muscle contraction. В кн.: *Biochemistry of Muscle Contraction*. Ed. by J. Gergely. (1964) с. 94.
82. J. R. Swenson and R. G. Yount. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 765 (1965).
83. J. R. Swenson and R. G. Yount. *Biochem. Z.*, 345, 395 (1966).
84. R. W. Benson, M. E. Dempsey and E. S. Benson. Kinetik relationships between phosphate oxygen exchange and hydrolytic cleavage of adenosine triphosphate catalyzed by myofibrils. *Inform. exchange group N. 4. Scient. meto* 139. 1/24/67.
85. M. E. Dempsey, F. T. Kwiatkowski and J. A. Nelson. Second Internat. Biophysics Congress, Vienna (1966).
86. A. Weber and W. Hasselbach, *Biochim. Biophys. Acta*, 15, 237 (1954).
87. Y. Tonomura and S. Katagawa. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 15 (1957).
88. Y. Tonomura and S. Katagawa. *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 135 (1960).
89. Ю. Тономура, Т. Каназава и К. Секия. Фосфорилирование и конформационная перестройка миозина при его взаимодействии с аденозинтрифос-

фатной кислотой. В кн.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. Изд. „Наука“, М. (1964), с. 227.

90. S. Kitagawa and Y. Tonomura. *J. Res. Inst. Catalysis. (Hokkaido Univ.)*, 8, 91 (1960).
91. C. A. Ashley, A. Arasimavicius and G. H. Nass. *Exptl. Cell Res.*, 10, 1 (1956).
92. M. F. Gellert, P. V. Von Hippel, H. K. Schachman, M. F. Morales. *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 1384 (1959).
93. T. Nihei and Y. Tonomura. *J. Biochem.*, 46, 1355 (1959).
94. I. Morita and Y. Tonomura. *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 5172 (1960).
95. M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, K. Yagi and Y. Tonomura. *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 2679 (1961).
96. M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa and Y. Tonomura. *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 74 (1964).
97. N. Azuma, M. Ikehara, E. Ohtsuka, Y. Tonomura. *Biochim. Biophys. Acta*, 60, 104 (1962).
98. I. Green and W. F. H. M. Mommaerts. *J. Biol. Chem.*, 202, 541 (1953).
99. T. Kanazawa and Y. Tonomura. *J. Biochem. (Tokyo)*, 57, 616 (1965).
100. T. Tokiwa and Y. Tonomura. *J. Biochem. (Tokyo)*, 57, 616 (1965).
101. K. Imamura, T. Kanazawa, M. Tada and Y. Tonomura. *J. Biochem. (Tokyo)*, 57, 627 (1965).
102. J. Gruda, J. Kakol, W. Niemierko. *Acta biochim. polon.*, 9, 215 (1962).
103. F. Buchthal, A. Deutsch, G. G. Knappeis and Munch-Petersen. *Acta physiol. scand.*, 16, 326 (1949).
104. J. Gergely and K. Maruyama. *J. Biol. Chem.*, 235, 3174 (1960).
105. L. Sartolelli, H. J. Fromm, R. W. Benson and P. D. Boyer. *Biochemistry*, 5, 2877 (1966).
106. S. Kitagawa and Y. Tonomura. *Biochim. Biophys. Acta*, 57, 416 (1962).
107. Y. Tonomura, S. Kitagawa and J. Yoshimura. *J. Biol. Chem.*, 237, 3660 (1962).
108. S. Kitagawa, K. K. Chiang and Y. Tonomura. *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 83 (1964).
109. Y. Tonomura, K. Yagi, S. Kubo and S. Kitagawa. *J. Res. Inst. Catalysis, Hokkaido Univ.*, 9, 256 (1961).
110. K. Takahashi, T. Mori, H. Takamura and Y. Tonomura. *J. Biochem. (Tokyo)*, 57, 637 (1965).
111. Y. Tonomura and T. Kanazawa. *J. Biol. Chem.*, 240, p 4110 (1965).
112. А. Сент-Дьердьи. Биоэнергетика. Изд. Физико-математической литературы, М. (1960), с. 87.
113. В. Хассельбах и Г. Вебер. Внутриклеточная регуляция мышечного сокращения. В кн.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. Изд. „Наука“. М. (1964), с. 237.
114. Ж. Моно и Ф. Жакоб. Общие выводы. Телеономические механизмы в процессах клеточного обмена, роста и дифференцировки. В кн.: Регуляторные механизмы клетки. Изд. „Мир“, М. (1964), с. 477.
115. F. Томкинс и К. Йилдинг. Структурные изменения глутаматдегидрогеназы как механизм регуляции ее активности. В кн.: Регуляторные механизмы клетки. Изд. „Мир“, М. (1964), с. 459.
116. E. G. Krebs and E. H. Fischer. *Adv. in Enzymol.*, 24, 263 (1962).



M. M. ZAALISHVILI

ON THE THIRD COMPONENT OF THE SMOOTH MUSCLE MECHANICAL-CHEMICAL SYSTEM

Summary

In the smooth muscle a substrate of contraction is not actomyosin, but a complex of myosin, actin and protein M—myosin MB. Thus triggering of the mechanical effect of the muscle by the reaction of ATP transformation takes place only in the presence of the protein M.

The kinetic unit of the protein M in the absence of salts is a copolymer with the following hydrodynamical properties: the intrinsic viscosity $[\eta]=4.7$ deciliters, the partial specific volume $v=0.722$ ml/g, the sedimentation constant $S_{20,w}^{\circ}=4.3$ (in Svedberg's units), the diffusion constant $D_{20}=1.07 \times 10^{-7}$ cm²/sec. Hence it follows that a molecule of the protein M is characterized by the molecular weight 3.52×10^5 and the axial ratio 100. The ratio of effective volume to the partial specific volume is equal to 1.076 that shows a slight swelling of the molecule of the protein M.

The specific viscosity of the protein M in the absence of salts is very high; however, an addition of a small amount of potassium chloride causes an essential decrease of viscosity and at higher concentrations (≥ 0.15) of KCl the viscosity of the protein M approaches asymptotically the constant value. Hence it follows that the molecule of the protein M with the molecular weight 3.52×10^5 and the axial ratio 100 is a copolymer in the absence of salts. This copolymer dissociates like tropomyosin into primary particles in solutions of neutral salts.

The helix content of this tropomyosin-like protein is equal to 94%. The protein M begins to melt at 32°C and melting finishes at 56°C.

The protein M forms a monomolecular layer on the surface of KCl which is 11–12 Å thick, at its compression from 0.1 to 1.4 dyne/cm the potential changes from 206 to 289 mv. The surface viscosity and elasticity of the protein M monolayer increase with the increase of the surface pressure and an increase of the ionic strength of solutions in the substrate decreases the values of the surface viscosity and of the elasticity of the protein M monolayer. However, in contrast to myogen A, actin, myosin A and myosin B, which form highly viscous and elastic films on the interface of water solution and the air, the protein M forms a monomolecular layer with low surface viscosity and elasticity on the surface of KCl.

Different values of hydrodynamical parameters and mechanical activity of α -actinin and M protein allow to conclude that the protein M and α -actinin of Ebashi are different proteins.

To obtain the maximum contraction of the myosin MB fibres (layer threads), obtained from the myosin B and protein M of the smooth muscle, the concentration of ATP (2.5×10^{-6} m/ml) should be twice as small as that for maximum contraction of the myosin B fibres of striated muscle. The contraction of the myosin B fibres of striated muscle. The contraction of the myosin fibres of striated muscle is optimal at 10^{-4} M $MgCl_2$, while the rate and the extent of the contraction of fibres of myosin MB of the smooth muscle are the highest at 10^{-2} M $MgCl_2$. The optimum of contraction of fibres of smooth muscle myosin MB is in the wide range of pH 7.5—8.5 and in the case of the film fibres of the myosin B the maximum contraction of fibres is observed at pH 7.6. It was found that the concentration 5×10^{-2} M KCl is not optimal for contraction of fibres of the smooth muscle myosin MB. The optimal concentration of KCl is in the physiological zone 0.09—0.13M. With an increase of temperature to $44^\circ C$ the contraction of fibres of the smooth muscle myosin MB increases. As the protein M is thermostable one should think that a decrease of the rate of the myosin MB contraction is caused not by heat denaturation of the protein M: but by the inactivation of (acto) myosin.

It has been found that at thermal denaturation of the protein M only 20% of the helix content is left and after renaturation of the heated preparation the helix content of the molecule of the protein M is almost completely restored (to 87%). The copolymer of the protein M dissociates into primary particles in the range of KCl concentration required for the optimal contraction of fibres of the myosin MB. If the high helix content of a molecule of this protein is really required for contraction, then it should be represented in the primary particle of the protein M as well.

The protein M of the striated muscle is characterized by physico-chemical properties of the protein M of the smooth muscle. The coefficient of sedimentation and the intrinsic viscosity of the protein M of a skeletal muscle are equal to 4.3×10^{-13} and 4.8, respectively. A molecule of this protein, like the protein M of the smooth muscle, has high helix content.

The muscle contraction is endergonic and is realized by the conjugated exergonic process of ATP conversion. The energy of macroergic phosphate bond of ATP must be transferred to the protein complex without dissipation, thus causing structural changes of the contracting system. Here thermodynamical conditions require the transfer not only of energy, but of the substance as well, i. e., the transfer of the terminal phosphate group of ATP to actorcatalyst. The data of a number of authors indicate positively that the formation of an intermediate myosinphos-

phate complex is the main, key reaction of muscle contraction. The nature of this phosphoryl derivative is not completely determined and there is not any single opinion on the mechanism of isotopic exchange between water and the inorganic phosphate isolated from ATP. As in the myosin B there is the protein M in addition to actin, it is important to study their role in the formation of phosphomyosin. It is not excluded that the protein M influences essentially not only the process of actin polymerization but also formation and breakdown of phosphomyosin and actin-myosin interactions.

СПИСОК АВТОРОВ

- Бакрадзе Н. Г.—Институт физики АН ГССР (Тбилиси).
Бурджанадзе Т. В.—Институт физики АН ГССР (Тбилиси).
Гагошидзе Н. Ш.—Проблемная лаборатория кибернетики Тбилисского государственного университета.
Заалишвили М. М.—Институт физиологии АН ГССР, Тбилисский государственный университет.
Кафиани К. А.—Институт молекулярной биологии АН СССР (Москва).
Козлов Ю. Н.—Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова.
Козлова Н. В.—Институт экспериментальной морфологии АН ГССР им. А. Н. Натишвили (отдел биофизики), (Тбилиси).
Кольс О. Р.—Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова.
Лимаренко И. М.—Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова.
Монаселидзе Д. Р.—Институт физики АН ГССР (Тбилиси).
Рачкус Ю. А.—Институт молекулярной биологии АН СССР (Москва).
Саламатина Н. В.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Натишвили АН ГССР (Тбилиси).
Тарусов Б. Н.—Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова.
Тимофеева М. Я.—Институт молекулярной биологии АН СССР (Москва).
Туманишвили Г. Д.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Натишвили АН ГССР, Лаборатория биофизики Тбилисского государственного университета.
Федоров Г. Е.—Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета им. М. Ю. Ломоносова.
Цагарели С. Н.—Проблемная лаборатория кибернетики Тбилисского государственного университета.
Чанишвили Т. Г.—Тбилисский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток Минздрава СССР.

LIST OF AUTHORS

- Bakradze N. G.—Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Burjanadze T. V.—Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Chanishvili T. G.—Inst. of Vaccine and Serum. Ministry of Public Health (Tbilisi).
- Fedorov G. E.—Moscow State University.
- Gagoshidze N. Sh.—Problem Laboratory of Cybernetics, Tbilisi State University.
- Kafiani C. A.—Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
- Kols O.—Moscow State University.
- Kozlov U. P.—Moscow State University.
- Kozlova N. V.—Department of Biophysics, The Natishvili Experimental Morphology Institute, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Limarenko I.—Moscow State University.
- Monaselidze D. R.—Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Rachkus I. A.—Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
- Salamatina N. V.—Department of Biophysics, The Natishvili Experimental Morphology Institute, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Tarusov B. N.—Moscow State University.
- Timofeeva M. I.—Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
- Tsagareli S. N.—Problem Laboratory of Cybernetics, Tbilisi State University.
- Tumanishvili G. D.—Department of Biophysics, The Natishvili Experimental Morphology Institute, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
- Zaalishvili M. M.—Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi State University.

Редактор издательства Б. А. Микадзе
Художник Г. А. Надирадзе
Технич. редактор И. В. Хуцишвили
Корректор Л. Р. Размадзе

LIST OF AUTHORS

Б. Кривош, В. С. — Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).

И. Чавчавадзе, Т. Т. — Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).

С. Кривош, В. С. — Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).

Б. Кривош, В. С. — Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).

И. Чавчавадзе, Т. Т. — Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).

Подписано в печать 25. X. 1968

Формат бумаги 70×108/16

Печатных листов 10,15

Учетно-издат. листов 8,93

Заказ № 621

УЭ 11675

Тираж 500

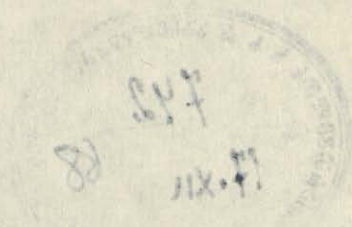
Цена 1 рубль

Издательство Тбилисского университета,

Тбилиси, просп. И. Чавчавадзе, 1

Типография Тбилисского университета,

Тбилиси, просп. И. Чавчавадзе, 1



თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
წიგანთა განყოფილება, ტომი 130, ბიოფიზიკის სერია, 1

ბიოფიზიკისა და თეორიული
ბიოლოგიის საკითხები

(რუსულ ენაზე)

თბილისის უნივერსიტეტის გამომცემლობა

თბილისი 1968

68-742

84
ՀԱՅԿԵՍՏԱՆԻ
ՏՈՅԵՆՈՒԹՅԱՆ
1968