

290

1969
B-134


ՆԱԿԱՅԵՆԿԱՆ
ՆՈՒՆԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆ

136



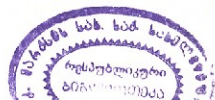
ИЗДАТЕЛЬСТВО ТБИЛИССКОГО УНИВЕРСИТЕТА
TBILISI UNIVERSITY PRESS



**PROBLEMS OF BIOPHYSICS
AND
THEORETICAL BIOLOGY**

11081.

**ВОПРОСЫ БИОФИЗИКИ
И
ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

EDITORIAL BOARD

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

СОДЕРЖАНИЕ

О. И. Епифанова, В. В. Терских — Периоды покоя, или «нулевые» состояния в клеточном цикле и их биологическое значение.	7
А. А. Костомарова — О взаимоотношении желтка и бластодермы в эмбриогенезе костистых рыб.	31
Т. В. Бурджанадзе — Корреляция между аминокислотным составом и вторичной структурой белков.	37
А. И. Зотин — Термодинамическая теория развития и роста животных. . . .	45
В. Б. Акопян, А. П. Закарая — Влияние ультразвука низких интенсивностей на раствора ароматических аминокислот.	57
И. В. Козлова — О трех центрах видимой флуоресценции печени куриного зародыша.	65
З. А. Метрели — Влияние температуры на электрическую активность мышечного веретена лягушки.	71
Г. М. Мревлишвили — Калориметрическое исследование состояния воды в грене шелкопряда в процессе её развития.	83
Г. Д. Туманишвили, Н. В. Саламатина — Действие экстракта ядерной фракции гомогената печени взрослой курицы на скорость роста печени 11-дневного куриного зародыша.	89
Г. Д. Туманишвили, В. А. Гогичаишвили — Особенности действия ядерной и цитоплазматической фракций печени куриного зародыша на рост печени зародышей одиннадцати дней инкубации.	97
И. Л. Каландадзе, М. М. Заалишвили, П. Ш. Надирашвили — Выделение и физико-химические свойства ДНК чистых ядер поперечно-полосатой мышцы.	107
Список авторов.	115

CONTENTS

O. I. Epifanova, V. V. Terskikh—The resting periods of "null" states in the cell cycle and their biological significance	29
A. A. Kostomarova—On interrelation between yolk and blastoderm in embryogenesis of bony fish	35
T. V. Burjanadze—Correlation between aminoacid composition and secondary structure of proteins	44
A. I. Zotin—Thermodynamical theory of animal growth and development	55
V. B. Akopyan, A. P. Zakaraya—Action of ultrasound of low intensities on solutions of aromatic aminoacids	63
N. V. Kozlova—On three centres of visible fluorescence of chick embryo liver	69
Z. A. Metreveli—Influence of temperature on electrical activity of muscle spindle of the frog	80
G. M. Mrevlishvili—Calorimetric studies of water state in silkworm eggs during their development	88
G. D. Tumanishvili, N. V. Salamatina—Action of nuclear fraction extract of adult hen liver homogenate on the rate of 11-day-old chick embryo liver growth	94
G. D. Tumanishvili, V. A. Gogichashvili—Peculiarities of action of chick embryo nuclear and cytoplasmic liver fractions on growth of 11-day old chick embryo liver	106
M. M. Zaalishvili, I. L. Kalandadze, N. Sh. Nadirashvili—Isolation and physical and chemical properties of DNA from pure nuclei of skeletal muscle	113
List of Authors	115

О. И. ЕПИФАНОВА, В. В. ТЕРСКИХ

ПЕРИОДЫ ПОКОЯ, ИЛИ «НУЛЕВЫЕ» СОСТОЯНИЯ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О G_0 -ПЕРИОДЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

С того времени, как в классической работе Говард и Пелка [1] митотический цикл был подразделен на четыре периода: митоз (M), пресинтетический (G_1), период синтеза ДНК (S) и премитотический (G_2), — внимание исследователей устремилось на определение продолжительности этих периодов и их соотношения. По мере изучения вопроса постепенно утвердилось мнение, что большую часть цикла, а в медленно пролиферирующих тканях — подавляющую, занимает пресинтетический период G_1 , который в некоторых случаях может длиться месяцы и даже годы [2].

Однако в дальнейшем было показано, что опухоли, растущие *in vivo*, а также многие нормальные ткани могут содержать значительную по размерам фракцию неразмножающихся клеток. Отношение числа пролиферирующих клеток к общему числу клеток популяции получило название фракции роста [3, 4], или пролиферативного пула [5]. В этих же работах были предложены различные приемы для экспериментального определения указанной величины с помощью метода радиоавтографии.

Введение понятия о пролиферативном пуле имело большое значение для дальнейшего развития представлений о митотическом цикле. Прежде всего, стало очевидным, что понятие «митотический цикл» не включает в себя всех событий «жизненного цикла клетки», или «клеточного цикла».

В свое время Квастлер и Шерман [6] высказали мысль о том, что в определенный момент своего жизненного цикла клетка «принимает решение», будет ли она в дальнейшем делиться или дифференцироваться. Предполагалось, что это происходит в ранней интерфазе, вскоре после деления клетки. Отсюда следовало, что между окончанием митоза и началом дифференциации или же вступлением клетки в новый митотический цикл должен существовать еще какой-то промежуток времени, другими словами, еще один период клеточного цикла. Квастлер и Шерман рассчитали, что для клеток эпителия тонкого кишечника мыши период «принятия решения» лежит в пределах 4-х часов после окончания митоза; по данным лаборатории Ламертона [7] в кишечнике крысы он составляет 7,5 часов. Олерт и др. [8] назвали этот период жизни клетки «обратимым постмитотическим состоянием» (*reversible postmitotischer Zellbestand*), подразумевая, что клетки в это время способны как к дифференциации, так и к синтезу ДНК. Буллоу же [9] предложил



термин «дихофаза» (фаза выбора пути), которым он обозначает период, следующий за митозом и предшествующий пресинтетическому периоду G_1 .

На основании собственных обширных исследований кинетики клеточной популяции костного мозга, а также данных других авторов, полученных на модели регенерирующей печени, Лайта и сотрудники [10] предложили концепцию о существовании в пределах ткани двух популяций клеток: (1) покоящейся или дремлющей (dormant) популяции и (2) популяции, находящейся в активном состоянии — либо пролиферации, либо дифференциации. Первая представляет собой самоподдерживающуюся популяцию стволовых клеток (stem cells), дающую начало как пролиферирующим, так и дифференцирующимся клеткам.

Следует сразу же оговориться, что в понятие «стволовые клетки» Лайта вкладывает несколько иной смысл, чем другие авторы. Так Лёблон [11] называет стволовыми клетками всю совокупность пролиферирующих (делящихся) клеток в обновляющихся тканях, противопоставляя их дифференцированным. В качестве примера ткани, состоящей только из стволовых клеток, он приводит базальный слой эпителия пищевода, где пролиферативный пул равен 100%. Во всех обновляющихся тканях стволовые клетки непрерывно поставляют дифференцированные, поддерживая свой собственный фонд (stock). Лайта [12, 17] также рассматривает стволовые клетки как самоподдерживающуюся популяцию, с возможным выходом (output), клеток для дифференциации, но без поступлений (input) со стороны других популяций. Самоподдерживающиеся популяции должны создаваться в определенный момент развития системы. Так, весь организм многоклеточного животного можно рассматривать как популяцию стволовых клеток, возникающих из единственной оплодотворенной яйцеклетки без каких-либо последующих пополнений. Однако, если в одних системах (например, в корневой меристеме бобов) все стволовые клетки участвуют в митотическом цикле, то в других системах (костный мозг, печень) стволовые клетки могут выходить из цикла и неопределенно долгое время пребывать в состоянии покоя, поставляя по мере необходимости делящиеся и дифференцирующиеся клетки.

Что происходит в печени после частичной гепатэктомии? Приблизительно через 15 часов после операции (рис. 1) начинается синтез ДНК (1), активно продолжающийся в течение 7—8 часов, после чего, минуя короткий (2—3 часа) период G_2 , клетки вступают в митоз (2). По мнению Лайты [13, 14], если бы клетки печени в нормальных условиях действительно находились в пресинтетическом периоде в течение нескольких месяцев и даже лет, а затем весь этот период сократился бы под влиянием стимула до 15 часов, то радиоактивность ДНК начала бы нарастать сразу (3). Поскольку, однако, этого не происходит, остается предположить, что у клеток печени имеется стадия настоящего покоя (состояние «вне цикла»), из которой клетки по мере необходимости переходят в митотический цикл. Следуя принятой терминологии, Лайта [13] и Квастлер [15] обозначают эту стадию как G_0 -период, или фазу G_0 (рис. 2).

В сущности говоря, период G_0 представляет собой не что иное, как «фазу принятия решения» Квастлера и Шермана, «фазу обратимого постмитотического состояния» Олверта и др., или же «дихофазу» Буллоу, о которых шла речь выше. Квастлер [15] полагает, что периоды M , G_1 , S и G_2 не исчерпывают структуру клеточного цикла. Он обращает вни-

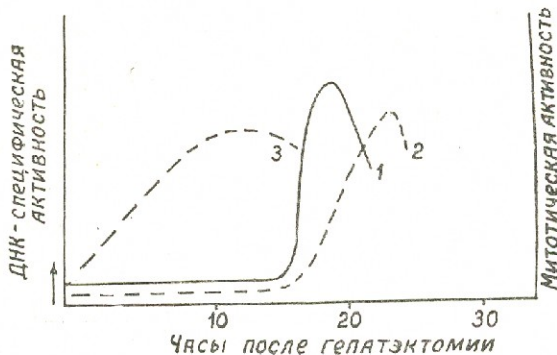


Рис. 1. Схематическое изображение последовательности событий в регенерирующей печени (Laittha, 1964)

- 1—Изменение удельной радиоактивности ДНК при введении меченого предшественника (показатели, определяемые в эксперименте).
- 2—Изменение митотической активности (показатели, определяемые в эксперименте).
- 3—Изменение удельной радиоактивности ДНК или митотической активности, ожидаемое в случае замедленного прохождения клетками митотического цикла.

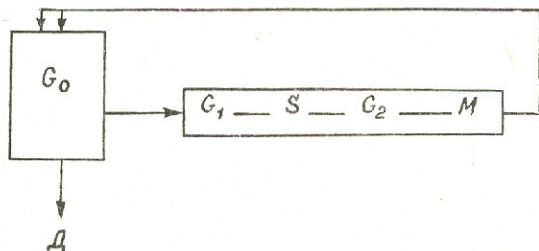


Рис. 2. Схема клеточного цикла с обозначением периода покоя G_0 (Laittha, 1964, 1966). G_1 , S, G_2 и M—периоды митотического цикла.

мание на то, что популяции, которые только пролиферируют, крайне редко встречаются в организме млекопитающих. Как правило, такие популяции бывают заключены в систему, содержащую один или несколько видов непролиферирующих зрелых клеток. В других случаях система может содержать одну и более популяций потенциально способных к пролиферации клеток, которые прогрессируют очень медленно или же под влиянием стимула. Такую популяцию и следует обозначать

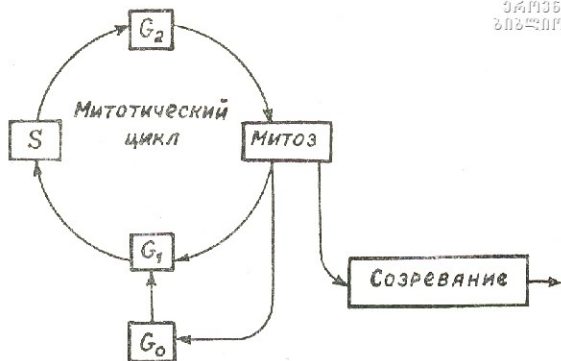


Рис. 3. Схема клеточного цикла по Квастлеру (Quastler, 1963) и Волфбергу (Wollfberg, 1964). Обозначения те же, что на рис. 2.

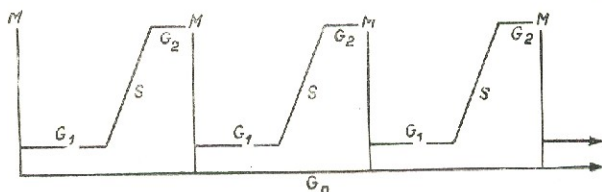


Рис. 4. Схема клеточного цикла по Джулберту и Лайте (Julbert, Laitha, 1965). Обозначения те же, что на рис. 2.

как популяцию, находящуюся в фазе G_0 . Таким образом, по мнению Квастлера, клеточный цикл состоит по меньшей мере из шести периодов, или отделов (compartments), которые изображены на рисунке 3. Согласно представлениям Лайты и сотрудников (13, 14, 16, 17), клетки в G_0 -периоде представляют собой популяцию с неограниченными пролиферативными возможностями (рис. 4). По окончании митоза (M) клетка может немедленно вступить в следующий митотический цикл (периоды G_1-S-G_2-M) или же перейти в состояние вне цикла (G_0), откуда она в любое время может быть снова вовлечена (triggered) в цикл. Это вовлечение — событие случайное, статистическая вероятность которого, а, следовательно, и средняя продолжительность периода G_0 зависит от скорости обновления популяции.

ЗНАЧЕНИЕ ПЕРИОДА G_0 ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ СОСТАВА КЛЕТочНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В настоящее время имеется еще очень мало сведений о механизмах, регулирующих состав клеточной популяции. По-видимому, в нормаль-

ном организме популяция стволовых клеток находится в стационарном состоянии, то есть в ней всегда поддерживается постоянное число клеток. По мнению Лайты [12], для регуляции размеров всей популяции клеткам, находящимся в пролиферативном (митотическом) цикле, не нужно сигнализировать о своем существовании; информация обратной связи ограничивается клетками в периоде G_0 . Кинетическая модель такой популяции представлена на рис. 2. Клетка, получившая стимул к дифференциации, выходит из периода G_0 . Для пополнения фонда стволовых клеток другая клетка одновременно вступает в митотический цикл, и по окончании митоза обе дочерние клетки переходят в период G_0 . Поскольку клетки в периоде G_0 не организованы в анатомически распознаваемый орган, Лайта полагает, что за поддержание постоянного числа клеток ответствен какой-либо гуморальный фактор, возможно, ингибитор, который вырабатывают сами клетки, находящиеся в G_0 -периоде. Уменьшение числа клеток в G_0 -периоде в случае дифференциации может снижать уровень ингибитора и тем самым позволять части клеток переходить из периода G_0 в период G_1 . При этом клетки в G_0 -периоде не обязательно должны быть гомогенными; существенно, что все они находятся в неактивном по отношению к митотическому циклу состоянии [18].

Представление о возможности существования в жизненном цикле клеток периода покоя, или «нулевого» состояния приводит к необходимости пересмотра прежних концепций о соотношении процессов деления и дифференциации клеток. Простая констатация их антагонистичности в настоящее время уже не удовлетворяет исследователей, перед которыми возникают следующие вопросы. Дифференцируются ли клетки прямо из периода G_0 , как это следует из схемы Лайты, или же они предварительно проходят митотический цикл, делятся и лишь после этого приступают к дифференциации? В том случае, если клетка может дифференцироваться, вступив в митотический цикл, из какого периода цикла способна она перейти в дифференцированное состояние, и все ли периоды равноценны в этом отношении? И, наконец, в течение скольких генераций сохраняют делящиеся клетки способность репродуцировать сами себя так, чтобы они могли потом редифференцироваться, и нужен ли в этом случае предварительный переход в состояние G_0 , то есть выход клеток из цикла?

Лайта [12] утверждает, что способностью к дифференциации обладают только клетки в G_0 -периоде; клетки же в митотическом цикле нечувствительны или в значительно меньшей степени чувствительны к дифференцирующим стимулам. В обзоре, посвященном рассмотрению вопросов происхождения и дифференциации стволовых клеток гемopoтической системы, И. Л. Чертков и А. Я. Фриденштейн [19] приводят данные, подтверждающие точку зрения Лайты: в опытах разных авторов, изучавших действие эритропоэтина на гемопоэз, показано, что прерращение стволовой клетки костного мозга в проэритробласт осуществляется в условиях блокирования митозов колхицином или колцемидом.

Однако эти данные не исчерпывают вопроса. В обширной литературе, посвященной исследованию первичной эмбриональной индукции, имеются многочисленные указания на то, что индуктивному образованию новой ткани неизменно предшествуют волны синтеза ДНК и митозов [20, 21, 22]. Проведя подробное радиоавтографическое изучение Вольфовской регенерации хрусталика из верхней радужины у взрослых тритонов, Эйзенберг и Ямада [23, 24, 25] также пришли к заключе-



нию, что все клетки радужины, участвующие в регенерации хрусталика, должны пройти период размножения, предваряемый синтезом ДНК. При этом синтез ДНК происходит в клетках радужины в то время, когда они еще сильно пигментированы, и продолжается при одновременной депигментации и после ее завершения, но прекращается с началом дифференциации волокон хрусталика.

Холцер [26] полагает, что размножение клеток, как зрелых, так и в эмбриональных тканях, является необходимой предюдией клеточной трансформации при дифференциации, о чем свидетельствует неизменно высокий уровень митотической активности в эмбриональных тканях. Он высказывает любопытную мысль о том, что митоз имеет тенденцию «упрощать» клетки, делая их более чувствительными к трансформирующим влияниям окружающей среды. Кроме того, информация, заключенная в ядре и необходимая для последующей дифференциации, может освобождаться или активизироваться в процессе последовательных митотических циклов.

Паряду с этим, имеются данные о том, что клетки могут проходить митотический цикл и одновременно дифференцироваться. При радиоавтографическом изучении кинетики клеточных популяций формирующейся глазной чашки крысы в период от 15-го до 18-го дней развития А. А. Заварзину и О. Г. Стреловой [27] удалось выявить в пигментном эпителии на всех исследованных стадиях наличие клеток, синтезирующих ДНК, значительно позже начала дифференциации этой части глаза. В отличие от Стокдейла и Холцера [28], показавших, что в культуре скелетных мышечных волокон синтез ДНК и деление клеток прекращаются уже при первых признаках появления миофибрилл, Л. Н. Жикин и Л. Ф. Андрусца [29] наблюдали одновременно протекавшие процессы размножения ядер и их дифференциации в одном и том же волокне развивающейся мышцы 15-дневного зародыша крысы. П. П. Румянцев и И. Л. Соколовская [30] установили, что в миокарде новорожденных крысят до 50% ядер мышечных волокон, содержащих миофибриллы, синтезируют ДНК. На основании этого авторы делают заключение, что в исследованных клетках одновременно обеспечиваются дифференциация и прохождение митотического цикла. При этом продолжительность всех периодов цикла возрастает, что, по мнению авторов, связано с функционированием клетки в двух направлениях: подготовки к митозу и обеспечении специфической функции, в данном случае — образования сократимых белков. Не отрицая существования конкурентных отношений между синтезом ДНК и синтезом сократимых белков в гистогенезе миокарда крысы, авторы полагают, однако, что синтез ДНК блокируется не по принципу «все или ничего», а градуально, постепенным накоплением критической массы специфического белка.

Имеются и другие работы, в которых также показано, что дифференциация может начинаться и при частичной способности клеток к прохождению митотического цикла [31—33]. В то же время эти работы не содержат фактов, которые позволили бы ответить на вопрос о том, из какого периода митотического цикла клетка может перейти в дифференцированное состояние. В этом направлении более определенные данные получены в последнее время в лабораториях Холцера и Стокдейла.

Многолетнее изучение процессов миогенеза, в опытах на курином эмбрионе *in vitro* с применением методов радиоавтографии и флуорес-

цирующих антител позволило Холцеру и сотрудникам сделать важное наблюдение, что при слиянии миобластов в миотубы в образовании последних принимают участие только такие клетки, которые не синтезируют ДНК. Точно так же миотубы никогда не содержат в своем составе делящихся клеток. Это наблюдение повлекло за собой естественное предположение, что изменение свойств клеточных мембран, обуславливающее слияние клеток, может происходить только в определенный момент клеточного цикла [34]. В опытах с применением колхицина было показано, что клетки не могут сливаться в состоянии митоза [35]. Зная продолжительность отдельных периодов митотического цикла исследуемой культуры на стадии слияния миобластов [36], Оказаки и Холцер [37] провели серию опытов по инкубации культуры в среде, содержащей H^3 -тимидин, с последующей фиксацией материала через такие промежуточные времена, чтобы можно было наблюдать поведение меченых клеток как в S-периоде, так и по мере перехода их в другие периоды цикла. В результате этих опытов было установлено, что клетки могут сливаться только по окончании митоза, то есть в периоде G_1 . Комбинируя метод радиоавтографии с методами флуоресцентной и поляризационной микроскопии, Оказаки и Холцер показали в этой же работе, что клетки, находящиеся в периодах S, G_2 и в митозе, не способны также к образованию миозина и не содержат миофибрилл.

В чем причина того, что изменения поверхностных свойств клетки, приводящих ее к слиянию с другой клеткой, не могут наступить в этих периодах цикла? Одно возможное объяснение, по мнению Оказаки и Холцера, заключается в том, что, когда миогенная клетка вступает в S-период, ее поверхность подвергается изменениям, препятствующим ей участвовать в слиянии. Другое, более вероятное предположение состоит в том, что миогенные клетки вообще не могут сливаться до тех пор, пока они проходят митотический цикл. По-видимому, как полагают авторы, в процессе размножения миогенных клеток должно произойти «критическое» деление, в результате которого одна или обе дочерние клетки выйдут из цикла. Учитывая, что между окончанием митоза и завершением слияния проходит 5—8 часов, а процесс слияния занимает не более 2-х часов, можно считать, что после митоза остается отрезок времени, равный 3—6 часам, в течение которого клетка может «принять решение» о выходе из митотического цикла. В этот период, очевидно, происходит приобретение клеточными мембранами некоторых свойств, необходимых для слияния, а также для активации и приведения в действие аппарата, участвующего в синтезе миозина.

Провода рассуждения о выходе из цикла, Оказаки и Холцер имеют в виду, собственно говоря, уже начало дифференциации, которому предшествует 3—6-часовой отрезок периода G_1 (по их определению, ранний G_1). Однако их данные не исключают того, что выход клеток из цикла (иначе—переход в G_0) может осуществляться и раньше—сразу же или вскоре после митоза, с последующей дифференциацией через 3—6 часов уже из периода G_0 . Таким образом, из работ Холцера и сотрудников следует, что клетки исследованной ими системы (1) должны пройти ряд митотических циклов перед дифференциацией, (2) не могут приступить к дифференциации, не закончив митотический цикл, и (3), прежде чем перейти к дифференциации, выходят из митотического цикла.

Вопрос о соотношении дифференциации и прохождения клетками митотического цикла успешно исследуется в лаборатории Стокдейла



на другой модели — эксплантатах молочной железы мыши, культивируемых в среде с различным содержанием гормонов. Было показано [38], что молочная железа мыши, извлеченная в середине беременности после 48-часовой инкубации в среде с тремя гормонами: инсулином, пролактином и гидрокортизоном, подвергается дифференциации, характеризующейся многократным усилением синтеза казеина и специфическими изменениями клеток альвеолярного эпителия. Этим изменениям всегда предшествует значительный подъем интенсивности синтеза ДНК (максимум — через 24 часа после начала инкубации), за которым следует пик митозов.

Оказалось, что такие же сдвиги в синтезе ДНК в митотической активности может вызывать и один инсулин, однако, в отсутствие пролактина и гидрокортизона он не способен стимулировать синтез казеина [39]. Таким образом, в этих опытах выявились принципиальные различия в реакции «пролиферативных» и «дифференцировочных» тенденций клеток молочной железы на гормональные воздействия. Вместе с тем, полученные данные позволяют предположить, что синтез ДНК, а, возможно, и митоз являются необходимым условием инициации синтеза казеина. Это предположение было подтверждено в опытах с колхицином, который препятствовал стимуляции синтеза казеина под влиянием трех гормонов, однако, не снижал его уровня в контроле и в присутствии инсулина.

Стокдейл и Топпер [39] пришли к заключению, что эпителий молочной железы состоит из двух популяций клеток: (1) неделящихся клеток, которые образуют казеин со скоростью, не подверженной влиянию гормонов, и (2) клеток, которые не могут приступить к образованию казеина, предварительно не разделившись. Первая группа клеток ответственна за поддержание основного уровня синтеза казеина. Вторая группа клеток вступает в S-период и в митоз под влиянием инсулина, но к образованию казеина дочерние клетки становятся способными лишь в присутствии пролактина и гидрокортизона.

В следующей работе [40] на той же модели было показано, что в то время как инсулин действует в G₁- и S-периодах митотического цикла, вызывая инициацию синтеза ДНК, пролактин требуется для осуществления дифференциации лишь по окончании митоза. Однако присутствие гидрокортизона необходимо до завершения деления; в какой именно период цикла — остается пока неизвестным. Интересно, что при дифференциации меланобластов в меланоциты в органической культуре эксплантатов рыбы индуцирующие гормоны (АКТГ и МСГ) также должны присутствовать в среде до наступления митоза, предшествующего дифференциации [40].

Таким образом, из результатов исследований лаборатории Стокдейла, так же как и из работ Холцера и сотрудников, следует, что клетки не могут начать дифференциацию, не вступив предварительно в митотический цикл, и что дифференциация происходит лишь после завершения митоза. Правда, в работах Стокдейла и др. не был подвергнут специальному исследованию вопрос о выходе клеток из цикла в связи с дифференциацией. Однако предположение о существовании в эпителии молочной железы популяции клеток, завершающих под влиянием инсулина митотический цикл, но не способных приступить к дифференциации в отсутствие двух других гормонов, позволяет рассматривать эти клетки как находящиеся в периоде G₂, поскольку они не пролиферируют и не являются дифференцированными. Такие клетки будут с

тественно дифференцироваться сразу из G_0 -периода, как это предполагает схема Лайты (см. рис. 2). Однако значительную часть дифференцирующих стимулов, как следует из данных работ Стокдейла и др., они получили не в периоде G_0 , а в процессе прохождения митотического цикла. Стокдейл и Топпер [39] полагают, что внешние факторы, определяющие дифференциацию, действуют именно в период усиленной клеточной пролиферации, что противоречит представлениям Лайты о нечувствительности к дифференцирующим стимулам клеток, проходящих митотический цикл.

Обсуждая полученные результаты, Стокдейл и Топпер подчеркивают, что не деление клетки как таковое, а окружающая среда, в которой образуются клетки, определяет, утратят или сохранят они свои специфические функции. В связи с этим уместно вспомнить, что к такому же заключению пришел в свое время Лёблон [11], исследуя поведение отдельных пар дочерних клеток многослойного плоского эпителия пищевода в разное время после введения крысам H^3 -тимидина. Миграция одной или обеих клеток из базального слоя в шиповатый носила в его опытах случайный характер и, следовательно, свидетельствовала против того, что дифференциация дочерних клеток обусловлена событиями предшествующего митоза (то есть против гипотезы о так называемом дифференцирующем митозе). Лёблон пришел к заключению, что переход клеток в шиповатый слой связан с чисто механической причиной — увеличением давления в базальном слое в результате деления клеток, что и обеспечивает последующую дифференциацию. Сходной точки зрения придерживаются Буллоу и Лоуренс [42], развивающие ее применительно к многослойному эпидермису: «выбор клеткой пути» между подготовкой к следующему митозу или же к специфической функции (синтез кератина), в первую очередь, определяется положением клетки в ткани, то есть окружающими ее условиями.

Что касается причин, заставляющих клетку мигрировать из зоны пролиферации, то вопрос этот далеко не так прост и вряд ли исчерпывается предположением об изменении давления внутри клеточного слоя. Конигсберг и Хаушка [43] считают в равной мере вероятными как потерю клеткой контакта с базальной мембраной, так и влияние, оказываемое на базальный слой дифференцированными клетками шиповатого слоя. Гипотезе Лёблона противоречат также данные О. С. Франкфурта [44], обнаружившего при радиоавтографическом исследовании многослойного плоского эпителия преджелудка мыши корреляцию поведения дочерних клеток при переходе из базального слоя в шиповатый: меченые клетки появлялись в шиповатом слое значительно позже, чем это могло бы происходить при случайном характере их миграции под действием механического фактора. Анализ этих же данных позволил заключить, что клетки не дифференцируются, будучи в периодах S и G_2 , и что их переход в шиповатый слой может произойти лишь через определенное время после деления, — вывод, полностью согласующийся с данными лабораторий Холцера и Стокдейла.

На основании того, что обычно специфические белки обнаруживаются в клетке до морфологических признаков дифференциации, О. С. Франкфурт предполагает, что после окончания митоза процессы подготовки к синтезу ДНК и синтез специфических белков могут протекать в клетке одновременно, но в половине клеток критическое количество цитоплазматического продукта достигается раньше, чем они вступают в S -период, и такие клетки дифференцируются, в то время как



остальные начинают синтез ДНК и делятся. К этому можно добавить, что переход клеток в период G_0 , то есть выход из цикла, осуществляется по-видимому, в то время, когда подготовка к синтезу специфического продукта и ДНК либо не начиналась, либо находится в самой начальной стадии, исход которой не может быть предопределен.

Анализ различных направлений дифференциации зародышевых клеток позволяет считать [45], что, если в одних случаях действующий агент приходит в группу клеток извне (индукция), то в других он порождается самими клетками и действует в зависимости от своего распределения в группе. При этом один и тот же агент, в зависимости от его концентрации, может переводить дифференциацию на следующую ступень, в чем проявляется регуляция по принципу положительной обратной связи.

Под влиянием стимула или травмы клетки могут дедифференцироваться. Здесь также следует обратить внимание на тот факт, что дедифференциация не означает немедленной пролиферации клеток, как это часто предполагают, исходя из будто бы антагонистических свойств клеточного деления и дифференциации. Так, например, при дедифференциации пигментных клеток сетчатки куриного эмбриона в культуре происходит постепенное изменение концентрации меланина, предшествующее клеточному делению [46, 47]. Дедифференциация мышечного волокна в процессе регенерации соматической мускулатуры у крысы связана с разрушением структуры миофибрилл и распадом сократимой субстанции, что является ответственным за начало синтеза ДНК мышечными ядрами (Жинкин и Андреева, [49]). Таким образом, и при дедифференциации определяющим фактором является критическая концентрация специфического цитоплазматического продукта, но в отличие от дифференциации — ее снижение. И в том, и в другом случае проявляется регуляция по принципу отрицательной обратной связи. [48, 49]. Предшествует ли дедифференциации переход клетки хотя бы на короткий срок в «нулевое» состояние, остается в настоящее время неизвестным.

В общей проблеме соотношения процессов дифференциации и митотического деления одним из важнейших является вопрос о генетической обусловленности клеточной трансформации. Холцер [26] формулирует его следующим образом: закодирована ли эта трансформация таким образом, чтобы при соответствующих условиях реализоваться после митоза, или же она является следствием локальной индукции в постмитотическом периоде, и, если закодирована, то на сколько поколений? По-видимому, способность к редифференциации является достаточно устойчивым признаком. При культивировании хрящевых клеток Холцер наблюдал ее на протяжении семи клеточных поколений, а Кун [50] — тридцати пяти. Однако при сравнении между собой генетических механизмов, обуславливающих проявление специфической функции и клеточного деления, последние оказываются более устойчивыми к воздействию. Так, в опытах Оказки и Холцера [34, 35] миобласты с включенным в молекулу ДНК бромдезоксиридином продолжают делиться, но перестают синтезировать миозин. По этому поводу Холцер [26] делает два предположения: (а) либо синтез специфических молекул находится под более непосредственным генетическим контролем, то есть для его осуществления требуется быстрая активация генетического аппарата, (б) либо существует избыток генов, регулирующих деление, по сравнению с генами, регулиющими специфическую функцию.

Буллоу и Лоуренс [41, 51] высказывают гипотезу, согласно которой в организме млекопитающих большая часть исходных генетических тенденций оказывается блокированной уже в эмбриональном периоде, во взрослом состоянии действуют лишь те гены, которые контролируют синтез ферментов, ответственных за основные метаболические процессы, а также митоз и специфические тканевые функции.

На рис. 5 представлена схема регуляции жизненного цикла клеток по Буллоу и Лоуренс, из которой следует, что в процессе приобретения тканевой специализации клетки должны последовательно пройти через определенные фазы (периоды) развития. Слева изображены клетки, проходящие митотический цикл (МЦ). Незрелые клетки — это клетки, закончившие деление, в которых начинается подготовка к синтезу специфического продукта для осуществления тканевой функции. В зрелых клетках синтез специфического продукта уже полностью завершен. Наконец, под гнущимися клетками подразумеваются такие клетки, которые еще функционируют, но обречены на отмирание. Эти последние клетки характеризуются двумя особенностями: они уже не в состоянии вступить в митоз, и синтез специфических белков в них определяется долгоживущей информационной РНК (и-РНК). Примером

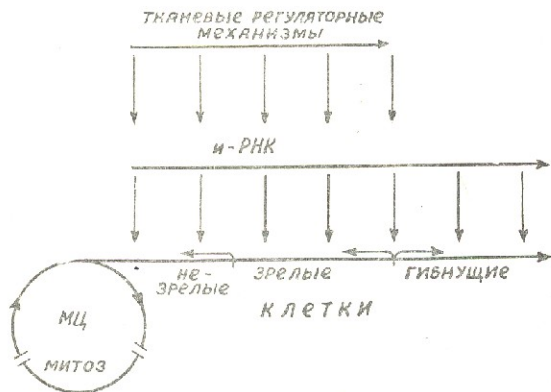


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая прохождение клетками всех периодов жизненного цикла, по Буллоу и Лоуренс (Bullough, Laurence, 1966). МЦ — митотический цикл.

таких клеток могут служить ретикулоциты, нейроны, поперечно-полосатые мышцы и некоторые другие клетки. Действительно, при изучении дифференцирующихся клеток было показано, что синтез специфических белков в них может происходить и в условиях блокированного синтеза РНК [52, 53].

По мнению Буллоу и Лоуренс, такие клетки прошли фазы незрелого и зрелого состояния в эмбриональном и раннем постнатальном периоде развития организма.



На рис. 6, также взятом из работы Буллоу и Лоуренс, представлены изменения, происходящие в жизненном цикле клеток эпидермиса (А) и эпителия влагалища (Б) под влиянием митогенных стимулов: в первом случае — нанесения повреждения, во втором — действия эстрогена. В нормальном эпидермисе клетки умеренно пролиферируют, постепенно созревают и отмирают; в эпителии влагалища в отсутствие эстрогенов митотическая активность ничтожна, и клетки находятся преимущественно в зрелом состоянии, но почти не вырабатывают кератина. В обеих тканях стимуляция в первую очередь вызывает «вспышку митозов», а затем и усиление тканевой функции за счет большого числа вновь образующихся клеток, быстро проходящих все фазы жизненного цикла; отсюда, в частности, постоянно наблюдаемое обилие ороговевающих клеток во влагалище во время эструса. Таким

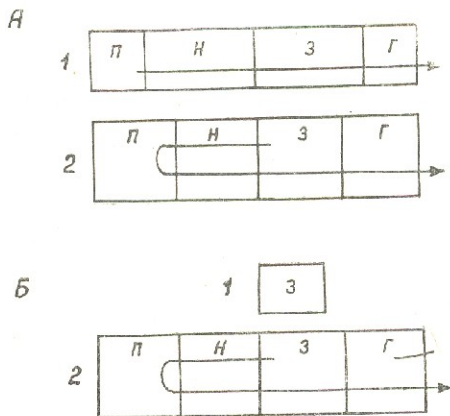


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая изменения динамики клеточных популяций в эпидермисе и эпителии влагалища под влиянием митогенных стимулов.

А — эпидермис: 1 — нормальный, 2 — поврежденный;
Б — эпителий влагалища: 1 — в отсутствие эстрогена,
2 — в присутствие эстрогена;

П — пролиферирующие клетки, Н — незрелые клетки,
З — зрелые клетки, Г — гибнущие клетки.

образом, пользуясь этими схемами, Буллоу и Лоуренс делают попытку обосновать необходимость предварительных делений для последующей дифференциации.

В заключение можно сказать, что однозначная связь между процессами дифференциации и прохождения клеткой митотического цикла не установлена. По-видимому, в некоторых случаях клеткам достаточно одного стимула, и они могут дифференцироваться прямо из периода G_0 , как это имеет место при образовании проэритробластов. Однако значительно чаще им требуется предварительно пройти митотический

цикл (для эпителия молочной железы первым стимулом в этом случае является инсулин), и лишь после этого они становятся способными к дифференциации (второй и третий стимулы — гидрокортизон и пролактин). Существенно при этом, что к восприятию соответствующих стимулов (гидрокортизон) клетки способны и в момент прохождения цикла. Завершение митоза само по себе не означает перехода к дифференциации, и клетка снова может выйти в «нулевое» состояние, если отсутствует третий необходимый стимул (пролактин). В этом состоянии клетка имеет равную возможность как для подготовки к синтезу ДНК, так и для подготовки к синтезу специфического продукта, продолжительность периодов G_1 и G_0 , и поэтому «выбор пути» еще не определен. В этом смысле можно думать, что как при редифференциации, так и при редифференциации клетка неизбежно должна пройти через «нулевое» состояние, которое, однако, в некоторых случаях может быть таким кратковременным, что уловить его существующими методами невозможно.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРИЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ КЛЕТОК В ПЕРИОДЕ G_0

После того, как Лайтой и Квастлером было сформулировано представление о возможности существования в клеточном цикле G_0 -периода, стали появляться экспериментальные работы, в которых были сделаны попытки не только выявить этот период в отдельных тканях, но и определить его продолжительность. Первое исследование в этом направлении было выполнено в лаборатории Квастлера Вольфсберг [18], которая изучала методом радиоавтографии кинетику клеточной популяции многослойного эпителия преджелудка мыши. Определив продолжительность митотического цикла базального слоя этой ткани на основании индекса меченых клеток и продолжительности S-периода, Вольфсберг получила величину, равную 260 часам, во много раз превосходящую значение продолжительности митотического цикла, полученное по методу меченых митозов (30 часов). Она предположила, что часть клеток по выходе из митоза проходит относительно короткий (~14) период G_1 , а остальные переходят в длительную фазу G_0 , представляющую собой резерв зрелых, но не пролиферирующих клеток. С помощью системы уравнений Вольфсберг рассчитала относительную вероятность вступления клетки в периоды G_1 или G_0 , а также вычислила, пользуясь данными об общей продолжительности митотического цикла, выраженной в терминах индекса меченых клеток, и отношении площадей под двумя волнами меченых митозов. Расчеты показали, что около 30% клеток базального слоя эпителия преджелудка мыши находятся в периоде G_0 , продолжительность которого составляет от 15 до 29 суток.

Следует сказать, что к этим расчетам необходимо относиться с известной осторожностью, поскольку данные Вольфсберг не нашли подтверждения в опытах по экспериментальному определению пролиферативного нуля той же ткани с помощью повторных инъекций H^3 -тимидина: через 48 часов 93.3% клеток базального слоя оказывались мечеными на всем протяжении преджелудка [44]. По-видимому, если в базальном слое эпителия преджелудка и имеются клетки в периоде G_0 , то популяция их не столь многочисленна, как это вытекает из расчетов



Вольфсберг. В то же время из результатов других авторов также следует, что базальный слой эпителия преджелудка представляет собой гетерогенную систему клеток, и, таким образом, данный вопрос нельзя считать окончательно решенным.

Уже эти немногочисленные факты показывают, что выявление, а тем более определение продолжительности периода G_0 связано с большими трудностями. Основная сложность заключается в том, что практически невозможно выявить различия между кратковременным пребыванием клетки в состоянии покоя (выходом из цикла) и медленным прохождением пресинтетического периода G_1 . По-видимому, эти различия могут быть в некоторых случаях установлены только по характеру вступления клеток в цикл после периода покоя, подобно тому, как это было сделано Лайтой на модели регенерирующей печени (см. рис. 1).

Оценивая в свое время различные типы ответа ткани на гормональные воздействия, Сусин [55] пришел к заключению, что при стимуляции клеточного деления характер реакции на гормон специфических по отношению к нему тканей (тканей-мишеней) весьма напоминает процессы, протекающие в дифференцирующейся ткани после индукции. Через определенный интервал времени после воздействия происходит кардинальное переключение (switch) всей синтетической активности клеток на процессы, связанные с подготовкой к делению. При этом обнаруживается следующая закономерность: если для достижения эффекта необходимо постоянное присутствие фактора роста в среде, то между эффектом и логарифмом дозы наблюдается линейное отношение; если же стимул является индуктивным (то есть, если кратковременное воздействие вызывает долго длящееся изменение типа синтеза), то получающийся эффект характеризуется кривой кумулятивного типа. Таким образом, характер нарастания синтетической активности в клетке после стимуляции позволяет в известной мере судить о том, имеет ли место ускорение прохождения периода G_1 или же вступление в цикл из периода G_0 .

В этом отношении большой интерес представляют первичные культуры клеток, особенно культура лимфоцитов периферической крови человека, являющаяся одной из типичных моделей массового вступления клеток в митотический цикл под влиянием внешнего стимула. При добавлении к культуре лимфоцитов фитогемагглютинаина (ФГА) буквально в первые же минуты усиливается интенсивность синтеза РНК и белка [56]. Позднее, через 24—30 часов наблюдается резкое усиление интенсивности синтеза ДНК, а через 40—48 часов появляются первые митозы, число которых достигает максимума к 72 часам [57]. При этом кривая нарастания индекса меченых клеток, по данным радиоавтографического исследования с применением H^3 -тимидина, имеет типичный кумулятивный характер (рис. 7), что указывает на массовое вступление клеток в S-период, подобно тому, как это происходит в регенерирующей печени. Такой ход кривой позволяет думать, что ФГА стимулирует размножение лимфоцитов в культуре не путем сокращения продолжительности пресинтетического периода G_1 , а побуждая вступать в митотический цикл клетки, находившиеся до этого в «пуле» состоянии.

Если под влиянием какого-либо стимула клетки начинают вступать в митотический цикл, то это должно проявляться в увеличении пролиферативного пула клеточной популяции. Таким образом, величина пролиферативного пула также может давать представление о фракции клеток, находящихся в периоде G_0 . Определив путем расчетов пролифера-

тивный пул в перевиваемой гепатоме мыши, О. С. Франкфурт [58] показал, что в центре опухоли он составляет 29%, а на периферии — 10%. Отсюда он сделал вывод, что большая часть клеток центральной части опухоли в силу недостаточности кровоснабжения не способна к размножению и находится в периоде G_0 . Та же закономерность была обнаружена и в спонтанных опухолях молочной железы мыши, где процент непролиферирующих клеток значительно различался в разных участках опухоли. Механическое повреждение (разрез бритвой) стимулировало пролиферацию опухолевых клеток, которая начиналась с увеличения

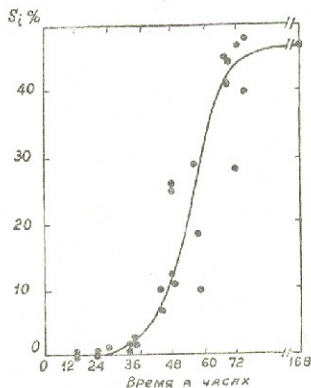


Рис. 7. Процент клеток, синтезирующих ДНК в разные сроки после начала культивирования лейкоцитов периферической крови человека (Mackinney et al., 1962).

S_i —индекс меченых клеток при инкубации в присутствии H^3 —тимидина.

индекса меченых клеток, а в дальнейшем и митотического индекса [59]. О. С. Франкфурт сделал предположение, что в результате нанесения травмы начинают размножаться клетки, бывшие до воздействия в G_0 -периоде, однако вопрос о том, действительно ли находились клетки в периоде покоя, или же они замедленно проходили пресинтетический период, — остался в его работе невыясненным.

По-видимому, в подобных случаях, параллельно с определением величины пролиферативного пула, следует в отдельном опыте устанавливать, как изменяется продолжительность периода G_1 . Этот прием дает возможность производить независимую оценку действия того или иного фактора на каждый из параметров и, таким образом, обнаруживать в пределах исследуемой популяции существование клеток в периоде G_0 . При этом выявление клеток, способных синтезировать ДНК, следует производить на протяжении двух-трех митотических циклов. В противном случае клетки, медленно проходящие период G_1 (если тако-



вые имеются в популяции), не будут учтены при определении пролиферативного пула и могут быть ошибочно приняты за клетки в периоде G_0 .

Кроме того, необходимо иметь в виду, что непролиферирующая фракция клеток в составе опухоли не является гомогенной, а состоит из нескольких субпопуляций: клеток с очень продолжительным циклом, клеток, не проходящих цикл, и, наконец, дегенерирующих клеток [60]. В соответствии с этим, клетки непролиферирующей фракции могут как погибать, так и служить источником возобновления роста опухоли. Однако, несмотря на внешнее сходство кинетики пролиферации, эти опухолевые клетки, как подчеркивают Лайта и Джилберт [61], принципиально отличаются от клеток G_0 -популяции в составе нормальной ткани, которые не могут вступать в митотический цикл по причине дейст-

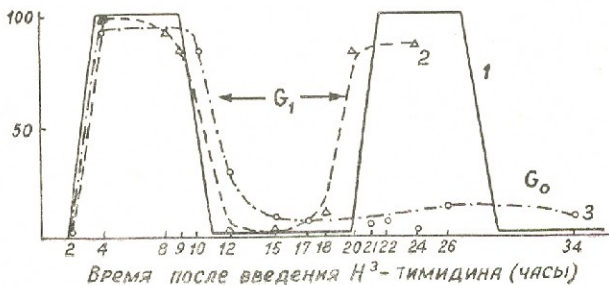


Рис. 8. Процент меченых митозов в разных тканях эмбрионов крысы после однократного введения H^3 -тимидина (Заварзин и др., 1964; по Жинкину, 1965):

- 1 — теоретическая кривая по Кваэстлеру и Шерману (Quastler, Sherman, 1959);
 - 2 — кривая для клеток подчелюстной железы 15-дневного эмбриона крысы;
 - 3 — кривая для клеток поджелудочной железы новорожденной крысы.
- G_1 и G_0 — периоды клеточного цикла.

вия органоспецифического механизма обратной связи, регулирующего стационарное состояние. Подобные системы регуляции отсутствуют в опухолях.

Выявление периода покоя в клеточном цикле возможно не только при вступлении клеток в цикл, но и при выходе из него, как это было сделано, в частности, сотрудниками лаборатории Л. Н. Жинкина [62] при изучении эмбриогенеза млекопитающих. На рис. 8 представлен график из работы А. А. Заварзина и др. [63], на котором хорошо видны различия между ходом кривой меченых митозов для эпителия подчелюстной железы 15-дневного эмбриона крысы (2) и эпителия поджелудочной железы новорожденной крысы (3). Отсутствие второго пика меченых митозов в эпителии поджелудочной железы при переходе от эмбрионального к постнатальному состоянию свидетельствует о прогрессирующем выходе клеток из митотического цикла, иначе говоря, о переходе их в период G_0 .

ПЕРИОДЫ ПОКОЯ И АКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ

Все изложенное позволяет поставить следующий вопрос: только один раз на протяжении своего жизненного цикла клетка может переходить в состояние покоя? Для ответа на этот вопрос целесообразно обратиться к работам Гелфанта [64], который, изучая процессы клеточной пролиферации в эпидермисе мыши в условиях стимуляции (ранение, выщипывание волос), впервые обратил серьезное внимание на возможность длительного прохождения клетками премитотического периода G_2 . Он инкубировал кусочки эпидермиса уха, получившие стимул к пролиферации, в течение 48 часов в среде, содержащей H^3 -тимидин, после чего добавлял в среду на 6 часов колхицин и подсчитывал число митозов. Если бы клетки эпидермиса находились до стимуляции в пресинтетическом периоде G_1 (или в периоде G_0), то в этих условиях должно было бы наблюдаться 100% меченых митозов, однако, определенная фракция митозов всегда оставалась немеченой, что указывало на 48—54-часовое пребывание таких клеток в периоде G_2 . Полученные результаты позволили Гелфанту сделать заключение о том, что регенерационным резервом эпидермиса уха мыши являются клетки как G_1 -популяции (то есть клетки, которые не могут приступить к синтезу ДНК до стимуляции), так и G_2 -популяции (клетки, которые закончили синтез ДНК, но не могут до получения стимула вступить в митоз).

В последующие годы появилось много экспериментальных исследований, выполненных на различных тканях животных и растений [65], в которых была доказана возможность продолжительного (до 16 и более дней) пребывания клеток в периоде G_2 . По аналогии с вышеизложенными рассуждениями Лайты о длительном прохождении клетками G_1 -периода вполне правомерно допустить, что такие клетки не просто медленно проходят G_2 -период, а вступают в него и затем в митоз из периода покоя, в который они переходят, удвоив количество ДНК.

На рис. 9 изображена схема клеточного цикла, на которой нами сделана попытка представить его как систему с чередующимися периодами покоя и активной пролиферации клеток. Закончив деление, клетка может снова вступить в митотический цикл и пройти последовательно периоды G_1 , S и G_2 . Однако она может также выйти из цикла либо сразу после митоза, либо спустя какое-то время (это остается пока неизвестным), и перейти в период G_0 , где может находиться неопределенно долго, пока какой-либо стимул не заставит ее снова вступить в митотический цикл. Выход и вступление клетки в цикл предполагают существенные сдвиги в ее метаболизме, соответствующим образом помечаемые на схеме. Тот же процесс может повториться по окончании S-периода (опять-таки неизвестно, сразу ли по окончании синтеза ДНК или же, наоборот, ближе к концу G_2 -периода). Этот второй период покоя, или выхода клеток из цикла, обозначен на схеме как R_2 —от существующего понятия «resting phase», поскольку нецелесообразно обозначать разные периоды одним и тем же термином G_0 . В соответствии с этим, термин G_0 будет эквивалентен на данной схеме символу R_1 . Постулирование возможности существования в клеточном цикле еще одного периода покоя (R_2) естественным образом предполагает рассмотрение тех же вопросов, которые были сформулированы в отношении периода R_1 (G_0). Наиболее существенным из них является вопрос о том, может ли клетка дифференцироваться, будучи в периоде R_2 , и в каком отношении это находится с прохождением ею митотического цикла. Исходя из тех материалов, которые были изложены во втором разделе



настоящей статьи, как будто бы можно считать общепризнанным, что дифференциация клеток наступает лишь после завершения митоза, либо в начале периода G_1 , либо после выхода в период G_0 . Однако исследователи, высказывавшие эту точку зрения, не имели в виду и не рассматривали системы, в которых клетки могут длительное время пребывать в постсинтетическом периоде, иначе говоря, выходить в период R_2 .

Между тем, в обширной литературе, посвященной явлению так называемой соматической полиплоидизации дифференцирующихся клеток, можно встретить немало указаний на возможность дифференциации клеток с удвоенным содержанием ДНК. К такому заключению пришел, например, Уокер [66], изучая процессы полиплоидизации клеток переходного эпителия мочевого пузыря мыши. Эту возможность рассматривает в своем обзоре Л. Н. Жинкин [67]. Радиоавтографическое исследование клеточных циклов и дифференциация клеток различных тканей в эмбриогенезе млекопитающих позволяет предполагать, что, по крайней мере, в некоторых из них клетки переходят в дифференцированное состояние, закончив синтез ДНК, то есть в периоде G_2 [20, 68—71].

В свое время Уилсон и Моррисон [72] предложили схему митотического цикла, на которой был выделен «нулевой» период, следующий за периодом синтеза ДНК; по мнению авторов, «нулевой» период представляет собой стадию относительного покоя, в течение которой клетки при соответствующих условиях подвергаются дифференциации. Если же дифференциации не происходит, то клетки вступают в «антефазу» (синоним периода G_2 по терминологии Буллоу) и затем переходят в митоз. Схема Уилсона и Моррисона не получила распространения, однако, она отразила один весьма существенный момент, а именно, что клетка может «принимать решение» о выборе пути не только по завершении митоза, но и после окончания синтеза ДНК.

В недавно выполненном методом радиоавтографии исследовании И. Л. Ерохиной [73] предполагается, что в процессе кардиогенеза у 9-дневных эмбрионов мыши клетки зачатка сердца могут выходить из митотического цикла и дифференцироваться как в периоде G_1 , так и в периоде G_2 . Часть дифференцирующихся ядер на долгое время сохраняет такую же сильную метку (включения H^3 -тимидина), как и ядра, только что синтезировавшие ДНК; это свидетельствует против того, что они могли разделиться до начала дифференциации. Таким образом, в настоящее время можно признать вероятным, хотя и не окончательно доказанным, что клетки способны дифференцироваться, находясь в периоде R_2 . Решение вопроса осложняется тем, что полиплоидия ядра сама по себе не говорит о том, в каком периоде цикла находится клетка. Поскольку процесс полиплоидизации осуществляется либо путем эндомитоза, либо в результате нарушения митоза, а также благодаря слиянию ядер во время митоза [67], то можно думать, что к этому времени клетка уже завершает премитотический период. Таким образом, наличие в какой-либо медленно пролиферирующей ткани резерва полиплоидных клеток не является доказательством их пребывания в периоде R_2 . Для установления этого необходимы специальные методические приемы, позволяющие, как говорит Гелфанд, идентифицировать клетки G_2 -популяции.

Одним из основных способов выявления клеток G_2 -популяции является уже описанный при рассмотрении работ Гелфанда прием подсчета меченых и немеченых митозов на радиоавтографах ткани, получившей стимул к пролиферации. В этих условиях клетки, находившиеся

до стимуляции в периоде G_2 , будут вступать в митоз немечеными, поскольку они уже завершили синтез ДНК. Применение этого приема позволило, в частности, установить, что клетки в периоде R_2 не являются регенерационным резервом печени [74, 75, 76]. В связи с этим следует подчеркнуть, что при экспериментальном определении пролиферативного пула необходимо учитывать не только клетки, синтезирующие ДНК, но и клетки, вступающие затем в митоз [3, 4]. В противном случае при наличии в ткани клеток в периоде R_2 величина пролиферативного пула окажется завышенной.

Другим способом обнаружения клеток G_2 -популяции служит параллельное определение митотического индекса и индекса меченых клеток

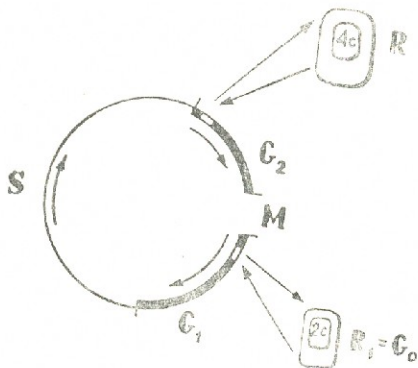


Рис. 9. Схема клеточного цикла, отражающая чередование периодов покоя и активной пролиферации клеток.

R_1 и R_2 — периоды покоя; $2C$ — количество ДНК, соответствующее данному набору хромосом; $4C$ — удвоенное количество ДНК. Белые квадраты на окружности обозначают метаболические сдвиги, происходящие в клетке при выходе из митотического цикла или вступлении в него.

в условиях стимуляции ткани. Если увеличение числа митозов предшествует увеличению числа клеток, синтезирующих ДНК, это говорит о том, что в митоз вступают клетки, бывшие до стимуляции в периоде G_2 . Таким путем были обнаружены клетки G_2 -популяции в эпителии пищевода кур [77]. Существует еще ряд способов выявления клеток G_2 -популяции, в том числе параллельное использование методов цитофотометрии и радиоавтографии [65], однако, ни один из них не позволяет до настоящего времени ответить на вопрос о том, проходят ли такие клетки замедленно период G_2 или же они выходят из митотического цикла и пребывают в состоянии покоя, ожидая соответствующего стимула. Если в отношении периода R_1 (G_0) уже сейчас можно указать на отдельные методические приемы, которые позволяют проводить различия между тем и другим процессом, то применительно к периоду R_2 этот вопрос остается еще совершенно не исследованным.



Может ли одна и та же клетка дважды перейти в состояние покоя на протяжении одного цикла, сначала — завершив митоз, а затем вторично — завершив синтез ДНК? Имеются данные Гелфанта [65], косвенно говорящие против такой возможности. В опытах с повторной стимуляцией пролиферативных процессов в эпидермисе (выщипывание волос и нанесение ранения) и отдельным маркированием с помощью H^3 - и C^{14} -тимидина клеток, вступающих в S-период после первого и второго воздействия, Гелфанту удалось показать, что на второй стимул реагируют те клетки G_1 -популяции, которые являются потомками клеток G_1 -популяции, реагировавших на первый стимул.

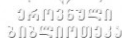
Периоды R_1 и R_2 , по-видимому, не исчерпывают всех возможностей клетки для перехода в состояние покоя. В настоящее время имеются указания на возможность выхода клеток из цикла еще до завершения всего процесса редупликации ДНК, то есть до окончания S-периода [2].

Возможность своевременного выхода клеток из митотического цикла играет, по-видимому, важную роль в процессах межклеточных взаимодействий. Исследуя методом радиоавтографии реакцию тканей матки беременной мыши на изменения гормонального баланса, Л. Н. Жинкин и Н. А. Самошкина [78] пришли к заключению, что клетки эпителия матки в период интенсивного образования и пролиферации дедифференцированных клеток переходят в период G_0 , а в конце беременности в период G_0 переходят соединительнотканые клетки, чем обеспечивается координированное взаимодействие тканей в пределах данной системы.

Существование периодов покоя в клеточном цикле имеет также большое приспособительное значение в жизнедеятельности клетки. Уже на самом раннем этапе эволюции биологические системы должны были иметь приспособления, позволяющие им переносить периодически повторяющиеся неблагоприятные условия среды. Одним из таких приспособлений для клетки явилась ее способность переходить в особое физиологическое состояние — период покоя, или «нулевое» состояние, поскольку в это время клетка не способна ни к размножению, ни к выполнению специфической функции. Можно полагать, что состояние анабиоза, широко распространенное среди микробов, одноклеточных и значительной части многоклеточных растений и животных, а также состояния пониженной жизнедеятельности животных, например, спячка, возможны именно благодаря существованию в клеточном цикле периодов покоя. Так, например, у многоядерного паразитического жгутиконосца *Opalina gaganum* ДНК синтезируется в летне-осенний, активный для простейших, период времени. С прекращением синтеза ДНК в клетке ядра переходят в период G_0 , в котором и пребывают всю зиму [79].

Все вышеизложенное позволяет характеризовать клеточный цикл как совокупности процессов с большими регуляционными возможностями. Периодическое чередование в клеточном цикле периодов активной пролиферации и покоя создает необходимые условия для поддержания постоянства состава всей популяции клеток, своевременно обеспечивая их дифференциацию, возможность взаимодействия данной популяции с другими системами, а также реакцию клеток на изменения окружающих условий.

ЛИТЕРАТУРА


 ИСТИТУТЪ КЪЛЮБИИ
 БИОФИЗИКИ
 АН ССРСР

1. A. Howard, S. R. Pelc, *Heredity*, 1953, Suppl., 6, 261—273.
2. О. И. Елифанова. *Цитология*, 9, 1957, 9, 1033—1056.
3. M. L. Mendelsohn, *Science*, 1960, 132, 3438, 1496.
4. M. L. Mendelsohn, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1963, 28, 5, 1015—1030. Williams and Wilkins.
5. W. E. Kisielleski, R. Baserga, H. Lisco, *Atompraxis* 1961, 7, 3, 81—85.
6. H. Quastler, F. G. Sherman, *Exptl. Cell Res.*, 1959, 17, 3, 420—438.
7. A. B. Cairnie, L. F. Lamerton, G. G. Steel, *Exptl. Cell Res.*, 1965, 39, 2—3, 528—538.
8. W. Oehlert, P. Lauf, N. Seemayer, *Naturwissenschaften*, 1962, 49, 6, 137.
9. W. S. Bullough, *Nature*, 1963, 199, 4896, 859—862.
10. C. W. Gurney, L. G. Lajtha, R. Oliver, *Brit. J. Haematol.*, 1962, 8, 461—466.
11. C. P. Leblond, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1964, 14, 119—150.
12. L. G. Lajtha, *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 1966, 67, 8, Suppl. 1, 133—147.
13. L. G. Lajtha, *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 1963, 60, 2, Suppl. 1, 143—145.
14. L. G. Lajtha, *Medicine*, 1964, 43, 6, 625—633.
15. H. Quastler, The analysis of cell population kinetics. In: *Cell proliferation*, Blackwell Scientific Publications, 1963, Oxford, 18—36.
16. L. G. Lajtha, C. W. Gilbert, D. D. Porteous, R. Alexanian. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 113, 2, 742—752.
17. C. W. Gilbert, L. G. Lajtha, 1965. In: *Cellular radiation biology*, Baltimore, Maryland, 1965, 474—497.
18. M. F. Wolfsberg, *Exptl. Cell Res.*, 1964, 35, 1, 119—131.
19. И. Л. Чертков и А. Я. Фриденштейн. *Успехи совр. биол.*, 1966, 62, 1 (4), 97—114.
20. N. K. Wessels, *J. Cell Biol.*, 1964, 20, 3, 415—433.
21. E. D. Hay, In: *Organogenesis*, Holt Rinehart and Winstone, N. Y. 1965, 315—336.
22. A. C. Marchok, H. Hermann, *Develop. Biol.*, 1967, 15, 2, 129, 155.
23. S. Eisenberg, T. Yamada, *Amer. Zool.*, 1965, 5, 4, 717—718.
24. S. Eisenberg, T. Yamada, *Amer. Zool.*, 1965, 5, 4, 718.
25. S. Eisenberg, T. Yamada, *J. Exptl. Zool.*, 1966, 162, 3, 353—367.
26. H. Holtzer, In: *General physiology of cell specialization*. McGraw—Hill N. Y., 1964, 89—90.
27. А. А. Заварзин и О. Г. Строева. В кн.: *Исследование циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток*. «Наука», М.-Л., 1964, 116—125.
28. F. E. Stockdale, H. Holtzer, *Exptl. Cell Res.*, 1961, 24, 3, 508—520.
29. Л. Н. Жинкин и Л. Ф. Андреева. В кн.: *Морфология и цитохимия клеток*. Изд-во АН СССР, 1963, М.-Л., 12—22.
30. П. П. Румянцев и И. Л. Соколовская. В кн.: *Исследование клеточных циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток*. «Наука», 1964, М.-Л., 71—82.
31. R. D. Cahn, M. B. Cahn, R. Lasher, *J. Cell Biol.*, 1967, 35, 2 (pt 2), 20A.
32. R. D. Cahn, R. Lasher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1937, 53, 3, 1131—1133.
33. R. E. Priest, L. M. Davies, *J. Cell Biol.*, 35, 2 (pt 2), 107A, 1963.
34. K. Okazaki, H. Holtzer, *J. Cell Biol.*, 1955, 27, 2, 75a.
35. K. Okazaki, H. Holtzer, *J. Histochem. Cytochem.*, 1965, 13, 8, 726—739.
36. R. Bischoff, H. Holtzer, *J. Cell Biol.*, 1936, 31, 2, 13A.
37. K. Okazaki, H. Holtzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 5, 1484—1490.



- 38 F. E. Stockdale, W. Juergens, Y. J. Topper, *Develop. Biol.* 13, 2, 265-281.
39. F. E. Stockdale, Y. J. Topper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1963, 56, 4, 1283-1289.
40. D. H. Lockwood, F. E. Stockdale, Y. J. Topper. *Science*, 1967, 151, 3777.
41. C. D. Foots, T. F. Tchen. *Exptl. Cell Res.* 19 7, 47, 3, 56-605.
42. W. S. Bullough, E. B. Lawrence. In: *Advances in biology of skin carcinogenesis* vol. 7. Pergamon Press, 1963, Oxford-N. Y., 1-36.
- 43 I. R. Konigsberg, S. D. Haushka, In: *Reproduction: molecular, subcellular, and cellular*. Academic Press, 1965, N. Y.-London, 243-290.
44. О. С. Франкфурт, *Цитология*, 1967, 9, 2, 175-184.
45. Г. В. Лопашов, в кн.: *Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы*. «Наука», 1965, М.-Л., 242-270.
46. J. R. Whittaker. *Develop. Biol.*, 1963, 8, 1, 99-127.
47. J. R. Whittaker. *Develop. Biol.*, 1967, 15, 6, 553-574.
48. A. D. Glinos, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 90, 2, 592-602.
49. Л. Н. Жинкин, Л. Ф. Андреева, *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*, 1963, 41, 6, 30-39.
50. H. G. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 1, 65-73.
51. W. S. Bullough, *The evolution of differentiation*. Academic Press, London-N. Y., 1967.
52. D. Yaffl, M. Feldman, *Develop. Biol.*, 9, 1964, 3, 347-356.
53. D. Yaffe, S. Fuchs, *Develop. Biol.* 1967, 15, 1, 33-50.
54. P. Dürmer, E. D. Müller, *Exptl. Cell Res.*, 1969, in press.
55. M. M. Swann, *Cancer Res.*, 1958, 18, 10, 1118-1160.
56. B. G. T. Pogo, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 4, 805-812.
57. A. A. Jr. Mackinney, F. Jr. Stohlman G. Brocher, *Blood*, 1962, 19, 3, 349-353.
58. О. С. Франкфурт, *Цитология*, 1965, 7, 3, 386-393.
59. О. С. Франкфурт, *Цитология*, 1966, 8, 3, 370-377.
60. M. L. Mendelsohn. In: *Cellular radiation biology*. Baltimore, Williams and Wilkins, Maryland, 1965, 498-513.
61. L. G. Lajtha, O. W. Gilbert, 1937. In: *Advances in biological and medical physics*, vol. 2. Academic Press, N. Y., 1-25.
62. Л. Н. Жинкин, в кн.: *Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы*. «Наука», 1965, М., 231-233.
63. А. А. Заварзин, Г. П. Орлова, Л. Я. Жорно, в кн.: *Исследование клеточных циклов и мегаблизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток*. «Наука», М.-Л., 51-59.
64. S. Gelfant, 1962. *Exptl. Cell Res.*, 26, 2, 395-403.
65. S. Gelfant, 1966. In: *Methods in cell physiology*. Academic Press, New York, vol. 2 359-395.
66. B. E. Walker, 1959. *Texas Reports Biol. Med.*, 17, 3, 375-384.
67. Л. Н. Жинкин, *Архив анат., гистол. и эмбриол.*, 1962, 42, 1, 3-21.
68. M. Owen, S. Maerpherson, 1969, *J. Cell Biol.*, 19, 1, 33-34.
69. W. E. Starkey, 1963. *Brit. Dental J.* 115, 4, 143-153.
70. А. А. Заварзин, Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе клеточитающих, «Наука», Л., 1967.
71. А. К. Досидуя, *Цитология*, 9, 9, 1957, 1967.



72. G. V. Wilson, J. H. Morrison, *Citologia*, 1959, 24, 1, 48—49.
 73. И. Л. Ерохина, *Цитология*, 1968, 10, 2, 162.
 74. E. Stocker, *Verh. Deutsch. Ges. Pathol.* 1966, 59, 53—74.
 75. А. М. Полежаук, *Цитология*, 1967, 9, 6, 652—657.
 76. A. G. Matthysse, J. G. Torrey, *Exptl. Cell Res.* 1967, 48, 2, 484—498.
 77. J. L. Cameron, G. Cleffman *J. Cell Biol.*, 1964, 21, 2, 169.
 78. Л. М. Зинкин, К. А. Самосюкина, *J. Embriol. Exptl. Morph.*, 1967, 17, 3, 593—605.
 79. В. К. Нилова. Автореф. канд. дисс., 1967, 11.

O. J. EPIFANOVA, V. V. TERSKIKH

THE RESTING PERIODS OR „null“ STATES IN THE CELL CYCLE AND THEIR BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Summary

The review is concerned with the transition of cells into a specific physiological state—resting period, in which they may stay for an infinitely long time, without experiencing division or differentiation, but fully preserving both of these potentials. Under the effect of definite external stimuli such cells may be triggered into mitotic cycle, divide and differentiate.

No direct correlation between the onset of the differentiated state and the transition of cells through the mitotic cycle has been established. It cannot be excluded that sometimes cells may differentiate directly from the resting period. However, there is a large body of evidence that the entry of cells into mitotic cycle is a necessary prerequisite for subsequent differentiation. The susceptibility of cells to differentiative stimuli is retained during the mitotic cycle. The completion of mitosis itself does not define the fact that a cell should undergo differentiation: in the absence of an adequate stimulus it may pass again into a resting period.

Special methods of experimental revealing of cells in the resting period are discussed. The authors think that a cell may pass into a resting period throughout different stages of its life cycle. Periodic alternation of resting periods and periods of active proliferation in the cell cycle produces necessary conditions for the population—size control, providing cell differentiation, interaction of the given population with other systems as well as the reaction of cells to the changing environment.

А. А. КОСТОМАРОВА

О ВЗАИМОТНОШЕНИИ ЖЕЛТКА И БЛАСТОДЕРМЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КОСТИСТЫХ РЫБ

Яйца костистых рыб, подобно яйцам птиц и рептилий, по своему строению принадлежат к телолецитальному типу: то есть та часть плазмы, из которой впоследствии разовьется зародыш, отделена от питательного материала — желтка. Анимальная часть яйца, состоящая из цитоплазмы, в яйцах телолецитального строения может занимать больший или меньший объем (относительно объема целого яйца), но в любом случае, именно она (как полагают долгое время) и обладает всеми морфогенетическими потенциями, обуславливающими развитие яйцеклетки. Роль другого составляющего яйцо компонента — желтка, определялась как пассивная: желток, по мнению исследователей, не принимает участия в развитии, выполняя только функцию обеспечения зародыша необходимыми питательными веществами, потребляемыми в ходе развития. Однако в литературе постепенно стал накапливаться материал, говорящий о мультифункциональности желтка в яйцах костистых рыб. Выяснилось, в частности, что глицериды желтка, оформленные в виде жировых капель, выполняют у некоторых рыб роль гидростатического аппарата, осуществляя эту функцию до наполнения воздухом плавательного пузыря личинки [1, 2]. Желток выюна содержит 1/3 всего запаса гликогена яйца, являющегося основным субстратом аэробного гликолиза в эмбриогенезе этого вида, а также запас глюкозо—1—фосфата, глюкозо—6—фосфата и фруктозо—1,6—дифосфата, поступление которых из желтка в зародыш является одним из факторов, регулирующих гликолиз в эмбриональном развитии [3, 4]. У зародышей лососевых рыб в желтке диффузно распределены или находятся в растворенном виде в жировых каплях каротиноидные пигменты, являющиеся, по мнению некоторых авторов [5], дополнительной дыхательной системой зародыша, интенсивность развития которой отражает экологические условия развития икры [6].

Экспериментально-эмбриологический анализ роли желтка в развитии костистых рыб привел к представлению о том, что существует определенная связь между количеством желтка, размерами и строением личинки. Так, при удалении отдельных частей желточного мешка у представителей семейства карповых рыб [7] удалось вызвать не только уменьшение общих размеров личинки, но и деформацию отдельных органов и тканей, наряду с нарушением нормальных пропорций личинки. Дальнейшее изучение развития изолированной от желтка бластодермы костистых рыб в условиях культивации *in vitro* привело к формулированию положения о том, что вплоть до достижения определенной (для



данного вида) стадии развития бластодерма не может развиваться без непосредственного контакта с желтком. Наступление этой стадии урочено у разных видов к разному возрасту зародышей. Так, бластодерма *Fundulus* становится способной к развитию после ее отделения от желтка, начиная со стадии 32-х бластомеров [8], а бластодерма щуки и лососевых рыб дифференцируется *in vitro* только после ее изоляции на стадиях бластулы и гастрюлы [9]. Эти различия в способности бластодермы костистых рыб к развитию при изоляции от желтка трактовались как следствие различного соотношения объемов цитоплазмы и желтка [10], а приобретение бластодермой способности к развитию *in vitro* тем, что, вероятно, из желтка в бластодерму на ранних стадиях развития переходят какие-то вещества, необходимые для начала дифференцировки. Это предположение было сформулировано Оппенгеймером еще в 1936 году, впоследствии оно было подтверждено рядом исследователей [10, 11, 12, 13], но о природе этих гипотетических веществ, времени и способе их поступления в бластодерму из желтка до последнего времени ничего не было известно.

Нами была предпринята попытка проанализировать механизмы, определяющие дифференцировку бластодермы выюна методом культивации *in vitro* в средах различного состава [14, 15]. Было изучено развитие изолированной от желтка бластодермы выюна на последовательных стадиях дробления, образования бластулы и гастрюляции. Средами культивации служили солевой раствор Стейнберга, среда 199 и среда 199 с добавлением 2% бычьей сыворотки. В результате опытов было показано, что бластодерма выюна, изолированная от желтка на стадиях от 8 бластомеров и до средней бластулы, способна к дроблению как в солевом растворе, так и в питательных средах, но не способна к дифференцировке. Начиная со стадии средней бластулы (6,5—7,5 часов развития при t 21,5°), изолированная бластодерма выюна приобретает способность к дифференцировке во всех изученных средах. В питательной среде развитие осуществляется до более поздней стадии, чем в солевом растворе, но стадия начала дифференцировки остается постоянной. Рассмотрим, с какими факторами связано наступление у бластодермы выюна способности к развитию в условиях изоляции от желтка.

Как следует из приведенных выше данных, приобретение бластодермой выюна способности к дифференцировке урочено к стадиям средней бластулы (6,5—7,5 часов развития при t 21,5°С). Начало этого процесса совпадает во времени с наступлением 1 периода морфогенетической активности ядер бластодермы выюна [16, 17, 18, 19]. Биохимическая природа морфогенетической активности ядер была изучена в серии работ [20, 21, 22].

Известно, что первичная эмбриональная дифференцировка связана с поступлением и-РНК в цитоплазму и последующим синтезом белка на рибосомах. Кафиани и др. [21, 22, 23] удалось отметить наличие двух разных периодов синтеза и-РНК ядер бластодермы выюна, различающихся по своей интенсивности. Интенсивность синтеза мала на стадиях раннего дробления (до 6 часов развития), после чего наблюдается резкая активация синтеза на стадиях бластуляции (начиная с 6—7 часов развития). Показано, что вся, или почти вся РНК, выдаваемая ядрами, в период наступления морфогенетической активности является информационной РНК и, следовательно, началу морфогенетического периода соответствует активация генетического аппарата ядра. По дан-



ным Спириным и др. [20], в этот период и-РНК синтезируется в виде информосом. Таким образом, можно полагать, что интенсификация синтеза информационной РНК ядер бластодермы является молекулярной основой I периода морфогенетической функции ядер, и наступление у клеток бластодермы способности дифференцироваться *in vitro* связано с активацией генетического аппарата ядер. Но сама по себе интенсификация синтеза и-РНК еще не объясняет того факта, почему бластодерма выюна, изолированная от желтка на более ранних стадиях, чем средняя бластула, не способна к развитию *in vitro*, а, следовательно, — к синтезу новых белков. В связи с этой возникшей проблемой следует напомнить гипотезу Оппенгеймера [8] о том, что для осуществления гастрულიции и появления эмбриональных закладок в изолированных зародышевых дисках *Fundulus* необходимо проникновение в зародыш некоторых гипотетических веществ из желтка. Очевидно, желток костистых рыб играет и морфогенную роль. Косвенным путем это предположение было подтверждено Тунгом и др. [11], которым удалось центрифугированием яиц караса сразу после оплодотворения получить 41% дифференцированных зародышей после изоляции от желтка анимальной части центрифугированных икринок, тогда, как без влияния центрифугации анимальные части, изолированные сразу после оплодотворения, не дифференцируются. Центрифугированием, очевидно, морфогенные элементы желтка смещаются в сторону анимального полюса икринок. Devillez [12] провел временные комбинации бластодермы лосося на стадии морулы с желтком поздней гастрюлы. У таких искусственно составленных зародышей эпиблия проходила нормально, но зародыш не формировался: на стадии половины обрастания весь зародыш представлял собой только дефектную нервную пластинку. Следовательно, желток поздней гастрюлы лосося уже не содержал в себе каких-то формативных веществ, необходимых для нормального развития зародыша. Таким образом, ранний отрыв бластодермы от желтка, несмотря на активацию генетического аппарата ядер и выдачу информации в цитоплазму, препятствует морфологическому выражению морфогенетической функции ядер.

Из наших опытов, а также из данных других авторов следует, что культивация изолированной бластодермы телелепитальных яиц в питательных средах продвигает дифференцировку [24, 25]. Мы показали, что культивация изолированной бластодермы выюна в среде 199 в среде 199 с сывороткой усиливает их дифференцировку и повышает выживаемость изолятов. Однако, заменяя желток синтетической питательной смесью, не удастся вызвать начало дифференцировки бластодермы при ее изоляции на более ранних, чем средняя бластула, стадиях развития. Отсюда следует, что стадия, на которой бластодерма выюна становится способной к развитию *in vitro*, детерминирована в онтогенезе и не может быть изменена с помощью среды культивации. Очевидно, в культуре не удастся моделировать некоторые компоненты желтка, имеющие морфогенное значение. Следовательно, для начала дифференцировки бластодермы выюна, кроме наступления периода морфогенетической функции ядер, выражающегося в интенсификации синтеза и-РНК, необходим еще и контакт с желтком. Исследование динамики рибосомальной РНК в онтогенезе выюна, проведенное Айтхожиным, Белидиной и Спириным [26], показало, что, несмотря на постоянство содержания рибосомальной РНК из расчета на икринку, ее содержание в изолированных бластодисках нарастает вплоть до стадии поздней бластулы



(9 часов развития), после чего оно остается постоянным. На электронных микрофотографиях, сделанных со срезов через перибласт зародышевой выюна, на стадиях, когда содержание рибосомальной РНК возрастает, видно, что перибласт заполнен рибосомами, которые, очевидно, проникают из желтка в бластодерму. Томас [27] также обнаружил в желтке *Brachydanio rerio* рибосомы. Таким образом, в результате перехода уже готовых рибосом из желтка в бластодерму и создается возможность осуществления белкового синтеза, предшествующего морфологической дифференцировке. По мнению Спиринга и др. [20], эти рибосомы, в дальнейшем репрограммируемые новой информационной РНК, синтезированы материнским ядром овоцита в процессе овогенеза. Синтез рибосомальной РНК в овогенезе амфибий неоднократно отмечался [28, 29]. Остается неясным лишь вопрос о том, каким образом рибосомы проникают из желтка в зародыш? Нам кажется, что объяснение этому факту дано в работе Светлова и др. [30], где описано наличие разветвленной цитоплазматической сети, пронизывающей всю толщу желтка. В этой цитоплазматической сети методом цейтраферной кино съемки на ранних стадиях развития обнаружено непрерывное струйчатое движение от вегетативного к анимальному полюсу. С помощью этих токов к зародышевому диску выюна и транспортируется, очевидно, как питательный материал желтка, так и формативный его элемент в виде рибосом.

Подводя итог вышесказанному, мы можем составить схему, объясняющую наступление способности изолированной бластодермы выюна к дифференцировке следующим образом. На стадии средней бластулы (6,5—7,5 часов развития) происходит интенсификация синтеза и-РНК, а, следовательно, интенсификация генетического аппарата ядер бластодермы (начало I периода морфогенетической функции ядер по Нейфаху). Выход информации в виде и-РНК [22, 23] или зиформосом [20] во времени совпадает с поступлением готовых рибосом (белок синтезирующих систем цитоплазмы) из желтка в зародыш по каналам цитоплазматической сети перибласта. Бластомеры, содержащие рибосомы (и гранулы желтка), присоединяются к бластодерме путем деления клеток перибласта [13]. Поступающая генетическая информация ядер бластодермы реализуется в виде морфологически обнаруживаемой дифференцировки при культивации бластодермы *in vitro*, начиная со стадии средней бластулы. Эта схема, построенная в результате эмбриологических и биохимических данных, вероятно, может быть использована при изучении механизмов, определяющих наступление времени дифференцировки бластодермы и у других видов костистых рыб, хотя она не претендует на универсальность.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Г. Крыжановский, Н. Н. Дислер и Е. Н. Смирнова, (1953), Тр. ИМЖ, вып. 10.
2. Н. Н. Дислер, (1957), Тр. ИМЖ, вып. 20, 3—70.
3. Ю. Г. Юровицкий, Л. С. Мильман, (1965), Докл. АН СССР, 163, 781—783.
4. Л. С. Мильман, Ю. Г. Юровицкий, (в печати).
5. А. И. Смирнов, (1950), Докл. АН СССР, 73, 609—612.
6. С. Г. Соин, (1956), Зосл. журн., 35, 1362—1369.



7. С. Г. Крыжановский. Зool. журн., 19, 456—470.
8. J. M. Oppenheimer, 1936, J. exp. Zool., 72; 247—269.
9. C. Devillers, (1961), Advanc. Morphol. 1; 379—380.
10. T. C. Tung, C. Y. Chang and Y. F. Y. Tung (1945), Proc. Zool. Soc., 115; 175—188.
11. T. C. Tung, S. C. Wu, Y. F. Y. Tung, (1955), Acta Biol. exp. Sinica, 4; 365—383.
12. C. Devillers, (1952), Bull. Soc. Zool. Fr., 77, 304—309.
13. C. Devillers, (1961), Advanc. Morphol., 1, 379—380.
14. А. А. Костомарова и А. А. Нейфах, (1964), Журн. общ. биол., 25, 386—388.
15. А. А. Костомарова. В сб.: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы, Москва, Изд. «Наука», 160—168.
16. А. А. Нейфах. (1961), Журн. общ. биол., 22, 42—57.
17. А. А. Нейфах. (1965), В сб.: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы, Москва, Изд. «Наука», 38—59.
18. А. А. Neufakh, (1964), J. Embryol. exp. Morphol., 7; 173—192.
19. А. А. Neufakh, (1964), Nature, 201; 880—883.
20. А. С. Спири, Н. В. Белицкая и М. А. Айтхожин. (1965), В сб.: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы. Москва, Изд. «Наука», 18—37.
21. К. А. Кафиани и М. Я. Тимофеева. (1964), Докл. АН СССР, 154, 721—724.
22. М. Я. Тимофеева, К. А. Кафиани, А. А. Нейфах. (1967). В сб.: Структура и функции клеточного ядра, Москва, Изд. «Наука», 201—206.
23. К. А. Кафиани и М. Я. Тимофеева. (1965), В сб.: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы. Москва, Изд. «Наука», 61—68.
24. J. P. Trinkaus and J. W. Drake, (1953), J. exp. Zool., 132, 311—348.
25. N. I. Spratt, (1948), Chemical control of development. The Chemical Basis of development, Baltimore. J. Hopkins press., 629—612.
26. М. А. Айтхожин, Н. В. Белицкая и А. С. Спири, (1964), Биохимия, 29, 169—175.
27. R. Thomas, (1967), J. cell Biol., 35, Abstr. VII, Ann. meet. Amer. Soc. cell Biol., 189 A.
28. D. D. Brown, (1964), J. exp. Zool., 157; 169—175.
29. J. V. Gurdon, D. D. Brown, (1965), J. mol. Biol., 12, 27—35.
30. П. Г. Светлов, В. Д. Быстров и Г. Ф. Корсакова. (1962), Архив анат. гист. и эмбриол., 42 (1), 22—37.

А. А. KOSTOMAROVA

ON INTERRELATION BETWEEN YOLK AND BLASTODERM IN EMBRYOGENESIS OF BONY FISH

Summary

The paper is a review of published and own data on participation of yolk of bony fish in differentiation of egg blastoderm. The information is given on the character of the development of loach blastoderm (*Misgurnus fossilis*), isolated from the yolk at successive stages of division of blastula formation, gastrulation, cultivated in salty and nutri-

57413363770
20220000000

ent media. It is shown that an isolated loach blastoderm acquires a capacity for differentiation at all stages of cultivation studies, beginning from the stage of the middle blastula (6.5—7.5 hours of development at $t=21.5^{\circ}$). The development is realized with greater completeness in a nutrient medium than in a salt solution, but the stage of differentiation start remains constant. On the basis of the published and own data the following scheme is suggested, which explains the appearance of the capacity of an isolated blastoderm for differentiation. An intensification of the genetic apparatus of blastoderm eggs takes place at the stage of the middle blastula in the form of intensification of m-RNA synthesis. The yield of information to cytoplasm coincides in time with the entrance of ready ribosomes from the yolk into blastoderm along the channels of cytoplasmic net of periblast. Blastomeres containing ribosomes (protein synthesizing systems of cytoplasm) join blastoderm due to division of periblast cells. The obtained genetic information of blastoderm nuclei is realized in the form of morphologically found differentiation at cultivation of blastoderm *in vitro*.

Т. В. БУРДЖАНАДЗЕ

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ И ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКОВ

Данные последнего десятилетия по изучению структуры белков привели к той общепринятой точке зрения, согласно которой высшие ступени организации белковой молекулы (вторичная, третичная, четвертичная) предопределены ее первичной структурой. Убедительным подтверждением этой концепции могут быть не только классические работы по расшифровке структуры отдельных глобулярных белков (гемоглобин, миоглобин, лизоцим) [1, 2, 3], но и многочисленные данные по обратной денатурации ряда белков [4, 5].

Не менее важным обстоятельством, подтверждающим концепцию роли первичной структуры в определении последующих ступеней организации белка, можно считать, по-видимому, сам факт существования в природе двух классов биополимеров. С одной стороны, белки с вытянутой конформацией—фибрилярные белки (коллаген, тропомиозин, парамиозин, L-меромиозин), с другой стороны, белки, имеющие свернутую шарообразную форму—глобулярные. Установлено, что степень спиральности фибриллярных белков (80%—100%) значительно выше, чем спиральность глобулярных белков (30%—50%). Основываясь лишь на данных общего аминокислотного состава, нетрудно показать, что аминокислотный состав белков имеет прямую связь со вторичной структурой. Процентное содержание полярных аминокислот (в особенности аспарагиновой и глутаминовой) в фибриллярных белках значительно больше, чем в глобулярных. Для глобулярных белков отношение числа полярных аминокислот к неполярным колеблется от 0,7 до 1,3, в то время как для фибриллярных белков оно принимает значения от 1,6 до 2,3.

В последнее время в литературе отмечалось, что подразделение структуры белка на вторичную и третичную по классификации Линдерштрöm-Ланга имеет чисто формальный характер [6]. На самом деле, имеются данные [7, 8, 9], указывающие на то, что процесс образования пространственной структуры белка во всех ступенях ее организации (вторичная, третичная, четвертичная) должен протекать одновременно. Очевидно, такой подход к проблеме структуры белка должен рассматривать вопрос о взаимодействии вторичной и третичной структур. Или, выражаясь на языке сил, ответственных за стабилизацию свернутой конформации белка, это


 06/13/2013
 18:41:19

взаимодействие должно означать взаимозависимость водородных, фобных связей.

Важной особенностью гидрофобных взаимодействий, как известно, является их зависимость от окружающей среды. Для белков они приобретают существенное значение в полярном растворителе (вода). В менее полярном растворителе (спирт) гидрофобная связь ослабляется и, как было показано [8,9], это приводит к значительной перестройке нативной структуры белка. Вместе с увеличением степени спиральности белка имеет место перестройка третичной структуры, выражающаяся в увеличении характеристической вязкости [8, 9].

Таблица 1

Процентное содержание спиральных форм в воде и этиленхлоргидрине

Б е л о к	% α-спиральных форм в водных растворах	% α-спиральных форм в этиленхлоргидрине	Прирост α-спиральных форм в процентах
1. Яичный альбумин	31	72	41
2. Рибонуклеаза	27	64	37
3. Гистон	25	63	38
4. Бычий сыв. альбум.	55	60	5
5. Лизоцим	35	48	13
6. Пепсин	0	37	37
7. Инсулин	38	40	2
8. β-лактоглобулин [19]	20	70	50
9. Глобин М	47	80	33
10. Глобин Н	12	67	55

Значительное увеличение степени спиральности белка при замене воды на менее полярный этиленхлоргидрин было наблюдаемо для многих белков. В таблице I приводятся данные, взятые из работы Урнеса и Доти [10] и Шехтера и Вааута [11]. Из таблицы видно, что почти для всех белков (исключая бычий сывороточный альбумин и инсулин) увеличение степени спиральности происходит в среднем на 35% и в два раза превосходит первоначальное значение, а в некоторых случаях даже больше. Объяснение этого факта основывается на том предположении, что при замене растворителя (вода-спирт) уменьшается конкурирующее действие водородных связей среды на пептидную водородную связь ($CO...HN$) [10]. С другой стороны, если учесть то обстоятельство, что в этом процессе участвует больше половины аминокислот, то процесс перестройки вторичной структуры должен сопровождаться не только перестройкой поверхности белковой молекулы, но и существенной перестройкой внутренней части белковой глобулы. Следовательно, хотя конкурирующее действие водородных связей воды на пептидную водородную связь может играть

решающую роль в этом процессе, но не менее важной должна быть роль гидрофобных взаимодействий. Эти взаимодействия могут вызывать резкое переуглубление полипептидной цепи белка и, тем самым, нарушать вторичную структуру.

В работе Перутца, Кендрью и Ватсона [12] было изучено влияние распределения полярных и неполярных аминокислот на вторичную структуру гемоглобина. Основным результатом работы является установление того факта, что внутренняя часть глобинов заполнена неполярными остатками. Вместе с тем, в α -спиральных участках, в которых наблюдается чередование внутренних и внешних положений, неполярные аминокислоты располагаются во внутренней части молекулы, в то время как полярные аминокислоты располагаются на поверхности белка с интервалом 3,6 остатка. Этот результат полностью согласуется с представлениями, развитыми Криком [13], согласно которым максимальная спиральность и стабильность суперспиральной структуры фибриллярных белков обеспечивается чередованием полярных и неполярных аминокислот именно таким образом.

Другой важный вывод, который был сделан в упомянутой работе Перутца, Кендрью и Ватсона, заключается в понижении степени спиральности при нарушении последовательности расположения полярных и неполярных аминокислот, как это имеет место в случае цитохрома С. Анализируя подобным образом другие глобулярные белки с известной последовательностью аминокислотных остатков и с низким содержанием спиральных структур, мы не нашли какую-либо закономерность в их расположении.

Таким образом, имеют место три обстоятельства, указывающие на роль боковых групп аминокислот в определении степени спиральности белков: 1) существуют два класса биополимеров с различной степенью внутримолекулярной упорядоченности, отличающиеся друг от друга отношением числа полярных аминокислот к неполярным: фибриллярные белки с высоким содержанием α -спиральных структур и глобулярные — с низким содержанием спиральных структур; 2) ослабление гидрофобных взаимодействий вследствие замены полярного растворителя (воды) на менее полярный (спирт) ведет к значительному увеличению степени спиральности; 3) в тех случаях, когда нет строгой периодичности в расположении полярных и неполярных аминокислот, увеличение относительного содержания неполярных аминокислот в белке должно приводить к понижению степени спиральности (как это имеет место в случае цитохрома С и других глобулярных белков).

Мы попытались провести статистический анализ корреляционной зависимости между аминокислотным составом, в частности степенью „гидрофобности“, и степенью спиральности белков, для которых имелась возможность из имеющихся данных получить сопоставимые результаты по двум вышеупомянутым характеристикам. Результаты анализа представлены



ниже. В качестве меры характеристики степени „гидрофобности“ (или „гидрофильности“) белков нами было выбрано отношение суммарного объема полярных аминокислот к суммарному объему неполярных— P_1 (параметр, введенный Фишером [14]).

Ранее было изучено влияние суммарного количества аминокислот, не образующих α -спираль („антиспиральные“ остатки) [15]. Было показано, что для 35 белков высокая корреляция (с коэффициентом корреляций 0,7) между этими двумя параметрами наблюдается в том случае, если за „антиспиральные“ остатки брать серин, треонин и пролин. Эти данные нами использовались для двумерного регрессионного анализа и получения эмпирической зависимости между степенью спиральности и параметрами, характеризующими первичную структуру белка.

МЕТОДИКА

Статистический анализ корреляционной зависимости между параметром P_1 и степенью спиральности белков был проведен для 31 случая. Данные по спиральности белков были взяты из различных работ [10, 11, 17, 19]. Данные по аминокислотному составу белков были использованы из работы Тристрама и Смита [18]. При классификации аминокислот мы придерживались общепринятой точки зрения [1]. В качестве полярных нами принимались следующие аминокислоты: серин, треонин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, а также аспарагин и глутамин, аргинин, гистидин и лизин. Остальные аминокислоты рассматривались как неполярные. Вычисление отношения полного объема полярных аминокислот к объему неполярных проводилось по формуле [14] $P_1 = \frac{\sum n_i V_i}{\sum n_k V_k}$, где $n_i V_i$ и $n_k V_k$ —произведение числа данной полярной (i) и неполярной (k) аминокислоты на соответствующий объем V .

Для двумерного корреляционного и регрессионного анализа в качестве второй независимой переменной (обозначим ее через P_2), характеризующей аминокислотный состав белков, использовалась величина $1/N_1$ в процентах, где N_1 —суммарное число аминокислот серина, треонина и пролина на 1000 остатков. Такой выбор параметра P_2 обусловлен гиперболической зависимостью между процентным содержанием α -спиральных форм и суммарным количеством серина, треонина и пролина [15]. Такая запись P_2 дала возможность при двумерном регрессионном анализе найти плоскость регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

В таблице 2 представлены все необходимые данные для статистического анализа корреляционной и регрессионной зависимости между

тремя исследуемыми параметрами: процентным содержанием α -спиральной формы Y , отношением полного объема полярных аминокислот к неполярным P_1 и числом «антиспиральных» остатков P_2 .

Таблица 2

Данные по аминокислотному составу и степени спиральности различных белков

Белок	P_1 *	P_2 *	Процент спиральных форм Y	Y_B **	Разность $Y_B - Y$
1. Парамиозин кролика	1,49	7,90	95	68	-27
2. Тропомиозин кролика	1,77	12,30	90	101	+11
3. Легкий меромиозин кролика	1,60	9,52	82	81	-1
4. Миозин кролика	1,31	7,51	63	67	+4
5. Тяжелый меромиозин кролика	1,15	6,99	49	48	-1
6. Бычий сывроточный альбумин	1,1	6,19	55	43	-12
7. Яичный альбумин	0,79	5,92	31	26	-5
8. Рибонуклеаза	1,17	4,15	26	38	+12
9. Миоглобин кита	1,60	8,34	75	76	+1
10. Ферригемоглобин лошади	0,84	6,17	75	—	—
11. Лизоцим	0,85	5,93	35	29	-6
12. Фибриноген	1,87	4,98	33	51	+18
13. G-актин кролика	0,99	5,32	34	33	-1
14. α -амилаза бактериальная	0,91	6,62	31	35	+4
15. Каталаза бычьей печени	0,93	8,06	51	41	-10
16. Бычий гормон роста	0,99	5,72	42	35	-7
17. Карбоксипептидаза из эритроцитов быка	0,82	4,42	30	20	-10
18. Гликогенфосфорилаза B кролика	0,91	8,97	27	44	+17
19. Гистон из тимуса теленка	0,81	6,59	20	29	+9
20. Миокиназа кролика	1,14	7,18	48	48	0
21. Лактадегидрогеназа кролика	1,00	6,72	42	40	-2
22. α -химотрипсин бычий	0,76	3,92	14	16	+2
23. Химотрипсиноген бычий	0,85	3,61	19	25	+6
24. Пепсин	0,57	3,92	0	6	+6
25. Пелсиноген свиной	0,69	4,00	11	13	+2
26. Дрожжевая эндолаза	0,82	6,11	30	20	-10
27. Белок BTM	0,91	3,92	30	24	-6
28. β -лактоглобулин B	0,93	6,14	20	36	+16
29. Папаин	0,69	6,70	31	24	-7
30. Тяжелый меромиозин фракция I (20)	1,29	10,00	66	67	+1
31. Тяжелый меромиозин фракция II (20)	1,04	6,80	24	42	+18

1. Корреляция между α -спиральностью и параметром P_1

На рисунке представлены данные для 31 белка, взятые из таблицы 2 в виде зависимости % α -спиральности от P_1 . Из рисунка видно, что в расположении точек наблюдается резко выраженная тенденция. С увеличением параметра P_1 , т. е. с увеличением полного объема полярных аминокислот по отношению к объему неполярных, степень спиральности белков увеличивается. Вычисляя коэффициент корреляции по формуле [16].

* Объяснение в тексте.



$$r = \frac{N \sum P_1 Y - \sum P_1 \sum Y}{\sqrt{[N(\sum P_1^2) - (\sum P_1)^2][N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

где N — число случаев, а Y — % α -спиральности, мы нашли значение коэффициента корреляции $r=0,65$. Для 30 белков, исключая ферригемоглобин лошади, коэффициент корреляции составляет 0,75. Поскольку корреляция с коэффициентом $r=0,7$ принимается значимой [16], то полученная нами величина указывает на высокую корреляционную зависимость между содержанием α -спиральных форм и параметром P_1 .

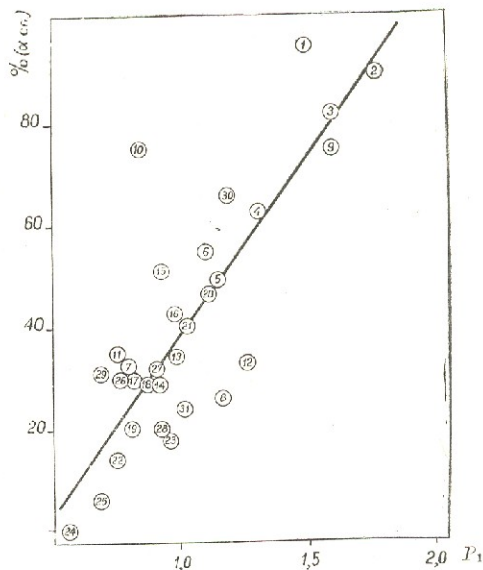


Рис. Зависимость процентного содержания α -спиральных форм от отношения полного объема полярных аминокислот к неполярным. АВ—линия регрессии.

линия с коэффициентом $r=0,7$ принимается значимой [16], то полученная нами величина указывает на высокую корреляционную зависимость между содержанием α -спиральных форм и параметром P_1 .

II. Двумерный регрессионный анализ

Целью двумерного регрессионного анализа между процентным содержанием α -спиральных форм (Y) и другими двумя параметрами, характе-

рисующими первичную структуру белка $\left(P_1 = \frac{\sum n_i V_i}{\sum m_k V_k}; P_2 = \frac{1}{N_1} \right)$

было получение эмпирической зависимости, которая позволила бы с определенной точностью по данным общего аминокислотного состава определить процентное содержание α -спиральных форм в белке. Регрессионный анализ с двумя независимыми переменными (P_1 и P_2) был проведен на основании предположения, что точки расположены около некоторой плоскости в пространстве. Хотя, возможно, имеет место более сложная зависимость между процентным содержанием спиральных форм и параметрами P_1 и P_2 , однако, линейный регрессионный анализ нами был использован ввиду его простоты.

Найденная нами по методу наименьших квадратов плоскость регрессии

$$Y_b = 51P_1 + 4P_2 - 38,3,$$

где $P_1 = \frac{\sum n_i V_i}{\sum m_k V_k}$ и $P_2 = \frac{1}{N_1}$, может быть использована как эмпирическая зависимость, которая по данным общего аминокислотного состава белков позволяет установить процентное содержание α -спиральных форм.

В последней графе табл. 2 приводятся разности между значениями спиральности белков, вычисленными по вышеприведенной формуле и наблюдаемыми экспериментально по дисперсии оптической активности. Стандартное отклонение от плоскости регрессии, вычисленное нами из данных последней графы с использованием формулы дисперсии для двумерного регрессионного анализа $S^2 = \frac{1}{N-3} \sum (Y_b - Y)^2$, равно $S = 10\%$. Если учесть то обстоятельство, что данные по степени спиральности белков, полученные методом дисперсии оптической активности, имеют такую же надежность, наблюдаемое отклонение от плоскости регрессии можно считать удовлетворительным.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. F. Perutz, M. G. Rossman, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, *Nature*, 185, 416 (1960).
2. J. G. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. E. Hart, D. R. Davies, D. S. Phillips, V. C. Shore, *Nature*, 185, 422 (1960).
3. C. C. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, C. T. North, D. C. Phillips, V. Sarma, *Nature*, 206, № 4986 (1965).
4. N. Misslounise, Johnson, D. C. Phillips, *Nature*, 206, № 4986 (1965); T. Takagi, T. Isemura, *J. Biochemistry*, 52, 814 (1962); F. H. White, *J. Biol. Chem.*, 236, 1853 (1961).
5. D. M. Young, W. F. Harrington, W. W. Kielley, *J. Biol. Chem.*, 237, 3116 (1962).



6. О. Б. Птицын, Успехи современной биологии, 63, 1 (1967).
7. Д. Филиппс, Молекулы и клетки, в. 3 (1968).
8. С. Е. Бреслер, В. П. Кушнер, С. Я. Френкель, Биохимия, 24, 658 (1959).
9. R. E. Weber, C. Tauford, J. Amer. Chem. Soc., 81, 3255 (1955).
10. P. J. Urnes, P. Doty, Advances in Protein Chemistry, 16, 401 (1961);
П. Доти, Современные проблемы биофизики, т. 1 (1961).
11. E. Shechter, E. R. Blout, Proc. Nat. Acad. of Sci., USA, 695 (1964).
12. M. F. Perutz, J. Kendrew, H. Watson, J. Molec. Biol., 13, 669 (1968); см.
также „Химия и технология полимеров“, № 2 (1967).
13. F. H. Crick, Acta Crystallographica, 6, 689 (1953).
14. H. F. Fisher, Proc. Nat. Acad. of Sci. USA, 51, 1285 (1964).
15. B. Havsteen, J. Theoret. Biol., 10, 1 (1966); см. также „Химия и технология
полимеров“, № 2 (1967).
16. А. Хельд, Математическая статистика, изд. ИЛ (1956).
17. Jirgensons, J. Biol. Chem., 240, 1064 (1965).
18. G. R. Tristram, R. H. Smith, Advances in Protein Chemistry, 18, 227
(1963).
19. Timashoff, R. Townsend, L. Mescanti, J. Biol. Chem., 241, (1966).
20. Lowey Susan, Science, 145, 597 (1964).

T. V. BURJANADZE

CORRELATION BETWEEN AMINOACID COMPOSITION AND SECONDARY STRUCTURE OF PROTEINS

Summary

On the basis of the data of statistical analysis for 31 proteins between aminoacid composition and the extent of α -helix existence of proteins, it is shown that content of α -helical forms expressed in per cent correlates with the ratio of the total volume of polar aminoacids to non-polar ones—P. When this ratio is increased the extent of helical state increases as well. Two dimensional regression analysis was also made with the use of the data of work (15) in which it has been shown that there is some dependence between per cent content of α -helical forms and total amount of „nonhelical“ aminoacids. An empirical dependence on the basis of this analysis has been obtained, this dependence allows with the accuracy of 10% to determine the extent of α -helix formation in proteins by the data of the general aminoacid composition.

А. И. ЗОТИН

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ РАЗВИТИЯ И
РОСТА ЖИВОТНЫХ¹

Термодинамическая теория развития и роста впервые² была высказана бельгийскими учеными Пригожиным и Виаем еще в 1946 году [1,2]. Она была опубликована в такой краткой и конспективной форме, что до сих пор не получила широкого распространения и вызывает как положительное, так и отрицательное отношение [3-8]. Иногда даже высказывают сомнения, можно ли вообще называть теорию Пригожина-Виаем (независимо от того, правильна она или нет) теорией развития. Необходимо, поэтому, кратко остановиться на определении теории, которую можно было бы называть теорией развития животных.

Теорией развития, с моей точки зрения, следует называть систему представлений, которая, во-первых, отвечает на вопрос, почему происходит развитие, т. е. вскрывает движущие силы развития; во вторых, не противоречит основным законам и твердо установленным теориям из других областей знаний; в-третьих, не противоречит имеющимся экспериментальным данным и может объяснить достаточно широкий круг фактов; в-четвертых, имеет конструктивный характер, т. е. способна предсказывать новые факты, закономерности, соотношения и открывать новые пути исследования процессов развития; в-пятых, должна охватывать не только эмбриональное развитие животных, но и другие явления биологии развития (рост, старение, смерть, регенерацию, заживление ран, злокачественный рост и т. д.). Всем этим условиям, как будет видно из дальнейшего изложения, удовлетворяет термодинамическая теория развития и роста При-

¹ Редакция настоящего сборника поместила статью А. И. Зотина в порядке дискуссии. Нельзя не признать, что по ее поводу может быть высказан ряд возражений. Постановка вопроса автором кажется спорной. Однако рассматриваемая проблема, несомненно, требует немедленного решения. Редакция приглашает специалистов принять участие в обсуждении настоящей статьи, чему будет уделено место в последующих выпусках Сборника.

² Значительно раньше сходные представления высказаны известным советским ученым Э. С. Бауэром [9, 10]. В настоящее время, однако, еще преждевременно сопоставлять эти две теории, так как взгляды Э. С. Бауэра трудно перевести на язык современной термодинамики необратимых процессов. Во всяком случае это—задача самостоятельного историко-научного исследования.



гожина-Виама. Во избежание недоразумений, отметим еще один момент. В зародышевом развитии следует различать два круга явлений: зародышевые должны быть созданы общие теории: процесс непрерывного усложнения морфологической организации зародышей по мере развития, т. е. дифференцировка, и сам факт изменения, сам факт развития зародышей. Действительно, вопрос о том, почему вообще происходят изменения зародыша во время развития, какие силы вызывают эти изменения, не менее закономерен, чем вопрос о причинах появления различий в разных частях зародыша, причинах дифференцировки. Теория Пригожина-Виама отвечает на первый вопрос, оставляя в стороне проблему дифференцировки.

1. Согласно теории Пригожина-Виама, к процессам развития и роста приложимо основное соотношение термодинамики необратимых процессов и открытых систем, согласно которому

$$\frac{ds}{dt} = \frac{1}{T} \sum_k J_k X_k, \quad (1)$$

где S —энтропия, T —абсолютная температура, J_k —термодинамические потоки, X_k —термодинамические силы.

Принимается, что во время развития, роста и старения происходит непрерывное снижение удельной скорости продукции энтропии и приближение системы к стационарному состоянию. Стационарное состояние живых систем, как и неживых, характеризуется минимальной и постоянной скоростью продукции энтропии. Таким образом, термодинамическая теория Пригожина-Виама указывает направление изменений во время развития (движение системы в направлении к стационарному состоянию) и движущие силы этого процесса (термодинамические силы X_k из уравнения [1]).

Известно, что термодинамика необратимых процессов описывает явления, происходящие вблизи от стационарного состояния, это так называемая область линейности феноменологических уравнений. Поэтому линейность между термодинамическими потоками и силами в рассматриваемом процессе является необходимым условием применения термодинамики необратимых процессов [2, 11]. Следовательно, должно выполняться условие

$$J_j = \sum_k L_{kj} X_k, \quad (2)$$

где L_{kj} —феноменологические коэффициенты.

Для того, чтобы решить вопрос о том, осуществляются ли эти условия во время развития и роста животных, мы должны рассмотреть некоторые существующие уравнения роста животных. Известно большое чис-

ло эмпирических формул и уравнений роста [12—14]. Нами, в частности, предложено следующее уравнение роста [15]:

$$\frac{1}{P} \frac{dP}{dt} = k(T_m - t), \quad (3)$$

где P —вес животного, t —возраст, T_m —максимальный возраст, k —константа роста.

Из этого уравнения следует, что удельный поток изменения веса животного $\frac{1}{P} \cdot \frac{dP}{dt}$ линейно связан с силой, которая пропорциональна или равна разности $(T_m - t)$. По нашему мнению [16], уравнение (3) лучше других подтверждается экспериментальными данными. Но даже если приписать в качестве более правильного уравнение Робертсона [12, 13]

$$\frac{1}{P} \frac{dP}{dt} = k(P_m - P), \quad (4)$$

или любое другое уравнение роста, в котором удельная скорость роста пропорциональна градиенту сил, вывод о наличии линейности между потоками и силами в процессе роста останется неизменным. Таким образом, во время роста (включая рост в зародышевом развитии) процесс изменения связан с наличием термодинамической силы, которая, по нашему мнению, пропорциональна градиенту времени $(T_m - t)$. Возможно, однако, что термодинамическая сила, вызывающая развитие и рост, имеет и иной вид.

Второй важнейший вопрос, который имеет прямое отношение к теории Пригожина-Виама, относится к проблеме характеристики стационарного состояния живых систем. Этот вопрос нами подробно обсужден в предыдущем сообщении [7, 8], поэтому здесь имеет смысл отметить только вывод, к которому мы пришли на основании рассмотрения некоторых экспериментальных данных. В живых системах, в отличие от неживых, имеют место два вида стационарного состояния: живые системы в каждый данный момент времени находятся в стационарном состоянии и в то же время, в соответствии с теорией Пригожина-Виама, они непрерывно приближаются к конечному стационарному состоянию. То и другое стационарное состояние определяется как состояние с постоянной и минимальной скоростью продукции энтропии, т. е. в обоих случаях для характеристики стационарного состояния используется теорема Пригожина [2, 11].

2. Если принять, что удельная скорость продукции энтропии пропорциональна удельной скорости теплопродукции, то, согласно теории Пригожина-Виама, во время развития, роста и старения должно происходить непрерывное снижение удельной скорости теплопродукции. В этом



случае теории Пригожина-Виама подтверждается данными литературы об основном обмене [1, 7, 8].

Для примера, на рис. 1 показаны данные об изменении основного обмена во время роста и старения людей. Из рисунка видно, что действительно во время роста и старения происходит непрерывное снижение удельной скорости теплопродукции, рассчитанной по дыханию.

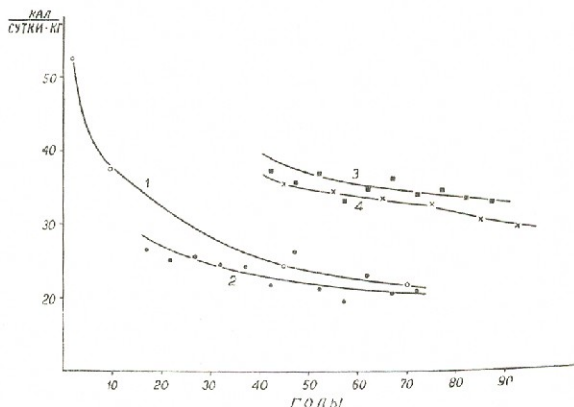


Рис. 1. Изменение основного обмена во время роста и старения людей: 1—из [13], 2—из [33], 3—из [32], 4—из [34].

Подобного же рода наблюдения можно в большом количестве найти в работах, посвященных изучению дыхания и основного обмена во время роста беспозвоночных [17—19], рыб [20] и многих видов птиц и млекопитающих [13, 21—25]. Имеет смысл, поэтому, подробнее остановиться только на тех данных, которые, по мнению некоторых авторов, противоречат теории Пригожина-Виама.

К. С. Трипчер [5] на основании литературных данных о скорости теплопродукции зародышей амфибий, птиц и млекопитающих пришел к выводу, что теория Пригожина-Виама не применима к зародышевому развитию животных. Действительно, у зародышей жаб [26], кур [27] и мышей [28] скорость теплопродукции возрастает на ранних стадиях развития, достигает максимума и лишь после этого начинает снижаться.

Разберем сначала данные, полученные при изучении развития млекопитающих. У мышат [28], как и у многих других животных и человека [22, 24, 25, 29], после рождения основной обмен и скорость теплопродукции в расчете на единицу веса тела сначала возрастает, проходит через максимум, а затем снижается. Это, однако, еще не означает, что удельная скорость продукции энтропии после рождения изменяется в

такой же последовательности. Дело в том, что после рождения у млекопитающих происходят сложные изменения, связанные с возникновением терморегуляции, свойственной взрослым животным. Температура тела животного после рождения падает, а затем начинает постепенно возрастать, приближаясь к нормальному уровню [29]. Следовательно, при расчете скорости продукции энтропии на первых стадиях развития млекопитающих после рождения необходимо учитывать, что $T \neq \text{const}$, а так как температура тела животных в это время повышается, то увеличение скорости теплопродукции не означает увеличения скорости продукции энтропии (напомним, что $\frac{ds}{dt} = \frac{1}{T} \frac{dQ}{dt}$, где Q — теплопродукция). Следует также учитывать, что после рождения млекопитающие попадают в условия, резко отличные от предыдущей внутриутробной жизни. Эти условия отличны и от условий жизни взрослого организма, так как родившиеся детеныши имеют другую температуру тела и другой тип терморегуляции, чем взрослые животные. Сравнивать уровень основного обмена, поэтому, в период после рождения с основным обменом более поздних и более ранних стадий развития нельзя. Характерно, что для внутриутробного развития млекопитающих получены совершенно иные данные по основному обмену, чем для только что родившихся животных: на протяжении изученных стадий внутриутробного развития происходит непрерывное снижение уровня основного обмена (см. табл. 1).

Таблица 1.

Теплопродукция (непрямая калориметрия) зародышей коров во время внутриутробного развития (из [24]).

Возраст в днях	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280
кал кг сутки	1562	848	476	287	171	171	159	146	130	106

Птицы и рыбы. На примере птиц, рыб и амфибий особенно ясно, что выводы К. С. Трипчера не верны [30]. Дело в том, что К. С. Трипчер использовал данные, полученные при изучении скорости теплопродукции целых яиц, без пересчета на собственный вес зародышей. Если сделать такого рода пересчет, то оказывается, что во время развития рыб и кур удельная скорость теплопродукции не возрастает, а непрерывно снижается во время зародышевого развития [30]. К. С. Трипчер [31] не согласился с этой критикой, ссылаясь на то, что данные о теплопродукции кур приведены, начиная только с 5-го дня инкубации, а для форели — с 22-го дня развития. Он считает, что как раз в это время (до 5-го дня инкубации у кур и до 22-го дня развития у форели) должно происходить увеличение удельной скорости продукции энтропии. Однако измерения теплопро-

дукции яиц кур, на которые ссылаются К. С. Тринчер и автор [27], поэтому работы, проводили не с пятого дня развития, а со второго [27], поэтому можно (используя данные по сухому весу зародышей других пород кур [26]) рассчитать удельную скорость теплопродукции со второго дня развития. Как видно из табл. 2, снижение удельной скорости теплопродукции происходит со значительно более ранних стадий развития кур, чем 5-ый день инкубации. Сходные данные получены при изучении дыхания зародышей утки, начиная с третьего дня инкубации [35].

Таблица 2.

Изменение удельной скорости теплопродукции яиц кур (из [27]) в расчете на единицу сырого веса зародышей (из [26]) в первые дни инкубации.

Возраст в днях	2	3	4	5	6	7
кал / г. сутки	6750	1300	670	337	247	200

Вывод о непрерывном снижении удельной скорости теплопродукции во время зародышевого развития подтверждается и наблюдениями над интенсивностью дыхания изолированных зародышей птиц. В табл. 3 приведены наблюдения дыхания изолированных зародышей утки со второго дня инкубации. Происходит непрерывное снижение интенсивности дыхания со второго до седьмого дня развития, до которого продолжались измерения [36]. У изолированных зародышей кур снижение интенсивности дыхания происходит с первого дня инкубации [37]. Таким образом, с самых ранних стадий развития зародышей происходит непрерывное снижение интенсивности дыхания и теплопродукции. Это означает, что теория Пригожина-Виама полностью применима к зародышевому развитию животных.

Таблица 3.

Дыхание изолированных от желтка зародышей утки (из [36]).

Дни развития	2	3	4	5	6	7
ММ ³ О ₂ / М ₂ N. сутки	3004	1282	1047	496	323	209

Теория Пригожина-Виама применима не только к процессам развития, роста и старения, но и к любым процессам, описываемым биологией развития, таким, как регенерация, злокачественный рост, рост в клеточных и тканевых культурах и т. д. Для примера приведем данные об

изменении интенсивности дыхания [38, 39] и аэробного гликолиза [40] во время регенерации конечностей аксолотля. Как видно из рис. 2, во второй половине процесса регенерации происходит быстрое снижение интенсивности гликолиза и дыхания, которое в конце процесса достигает уровня контроля. Сходные данные получены при изучении дыхания и

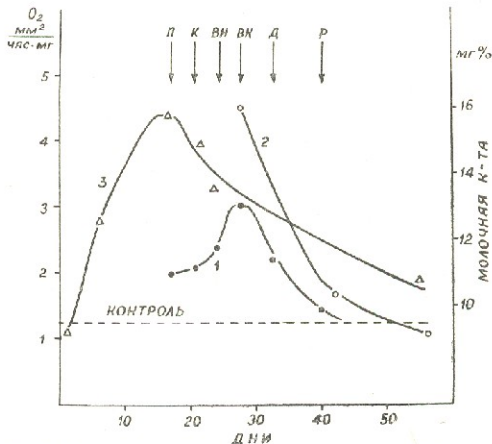


Рис. 2. Изменение интенсивности дыхания (1—из [38], 2—из [39]) и гликолиза (3—из [40]) на разных стадиях регенерации конечности аксолотля.

Обозначения: п—регенерационная почка, к—конус, ВН—начало внутренней дифференцировки, ВК—конус внутренней дифференцировки, д—наружная дифференцировка, р—рост.

гликолиза при регенерации червей, печени и при заживлении ран [7, 8]. Вопрос о том, как следует понимать процесс увеличения скорости дыхания и гликолиза в первую половину регенерации, будет ясен из дальнейшего изложения. Следует только отметить, что подобное увеличение происходит не только на начальных стадиях регенерации, но и в начале процесса злокачественного роста (см. рис. 3), при воснаении, повреждении и ранении.

3. Какие же следствия, вытекающие из теории Пригожина-Виама, позволяют использовать ее в качестве основы для дальнейшей работы в области термодинамики и энергетики биологии развития? С целью лучшего уяснения данного вопроса все основные положения, вытекающие из термодинамической теории развития, даются нами в виде схемы [см. рис. 3]. На рисунке показано, что во время развития, роста и старения происходит снижение удельной скорости продукции энтропии и приближение системы к конечному стационарному состоянию. Так как развитие нового орга-



низма начинается с высокого уровня удельной скорости продукции энтропии, то, очевидно, должен существовать период в жизни организма, когда имеет место обратный процесс, процесс отклонения от стационарного состояния, сопровождающийся переходом к высокому уровню удельной скорости продукции энтропии. На рис. 3 такое отклонение от стационарного состояния показано в четырех пунктах: во время оогенеза, на начальных стадиях повреждения и заживления ран, на начальных стадиях регенерации и злокачественного роста. Явления, которые наблюдаются в это время, с точки зрения термодинамической теории развития представ-

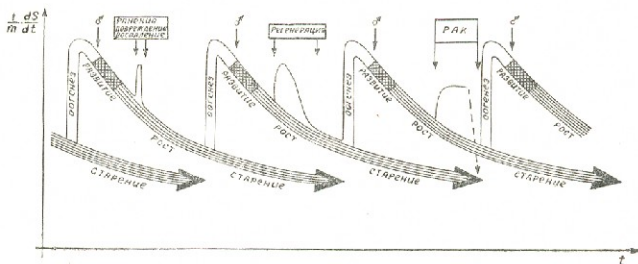


Рис. 3. Схематическое изображение процессов развития, роста, старения, повреждения, воспаления, регенерации и злокачественного роста с точки зрения термодинамической теории развития и роста Пригожина-Виаи.

ляют чрезвычайный интерес не только для теоретической биологии, но и для практических вопросов регуляции процессов старения, регенерации и злокачественного роста. Поэтому следует, хотя бы кратко, обосновать положение о том, что именно в этих пунктах происходит отклонение живых систем от стационарного состояния.

С точки зрения термодинамики необратимых процессов представляется маловероятным, чтобы изолированная, отдельно существующая система, какой является зародыш или растущий организм, могла сама собой при неизменных внешних параметрах устойчиво отклоняться от стационарного состояния. В то же время в оогенезе, когда возникающий новый организм входит еще фактически в состав материнского организма, устойчивое отклонение от стационарного состояния вполне возможно, так как оно может осуществляться за счет компенсирующих процессов, протекающих в других частях организма. Это не противоречит термодинамике, так как в отдельных частях системы могут происходить процессы, сопровождающиеся отклонением от стационарного состояния за счет процессов, протекающих в других частях системы [2, 11]. Следовательно, термодинамически вполне допустимо предположение о том, что отклонение живой системы от стационарного состояния и переход на высокий уровень продукции энтропии происходит в оогенезе (см. рис. 3). Фактичес-



кие данные по этому вопросу малочисленны, но все же они не противостоят сделанному выводу [7, 8]. Например, по наблюдениям К. Аллен-Шеркей [42], до начала образования желтка ооциты лягушки потребляют $0,69 \text{ мм}^3$ [час] мг кислорода (при $16-20^\circ\text{C}$), к началу образования желтка—1,49, а к концу желткообразования—1,20. Для других видов амфибий, рыб и морских ежей получены несколько иные результаты. Однако вывод о том, что в какой-то период оогенеза имеет место увеличение интенсивности дыхания, а затем уменьшение—остается верным во всех случаях [7, 8].

Вторым важным пунктом, в котором происходит отклонение биологической системы от стационарного состояния в сторону омоложения, является начальный период регенерации и заживления ран. Этот вывод также не противоречит термодинамике, так как, с одной стороны, регенерирующая часть животного входит в состав целого организма, т. е. является частью более общей системы, с другой—при нанесении раны, особенно в первое время после ранения, меняются внешние параметры системы. Экспериментальные данные, рассмотренные выше (см. рис. 2), подтверждают вывод о том, что на ранних стадиях регенерации происходит отклонение системы от стационарного состояния, сопровождающееся увеличением интенсивности дыхания и гликолиза, т. е. увеличением удельной скорости продукции энтропии. Только после достижения известного уровня удельной скорости продукции энтропии возможны изменения регенерирующей конечности аксолотля, сопровождающиеся уменьшением удельной скорости продукции энтропии.

Наконец, исходя из тех же соображений, можно считать, что при возникновении злокачественного роста также происходит отклонение от стационарного состояния, но таким неудачным образом, что система не переходит в фазу уменьшения удельной скорости продукции энтропии (рис. 3 и [41]). Отличие злокачественного роста от регенерации и заживления ран состоит в том, что: 1) основным источником для теплопродукции в раковых клетках является гликолиз, а не дыхание и гликолиз, как при регенерации; 2) после подъема уровня удельной скорости продукции энтропии не происходит его снижения, как это имеет место при регенерации и при других процессах развития и роста [7, 8].

4. Исходя из термодинамической теории развития и роста Пригожина-Виама, можно сформулировать и поставить перед биологией развития две группы задач: 1) дальнейшее экспериментальное и теоретическое обоснование этой теории, 2) выяснение механизмов регуляции скорости теплопродукции во время развития, оогенеза, на начальных стадиях регенерации и злокачественного роста.

Первая группа задач. В области теории необходима дальнейшая работа по уточнению понятия стационарного состояния для живых систем; решение вопросов, связанных с отклонением живых систем от стационарного состояния; вопросов правильного выбора потоков и сил при рассмо-



трени процессов роста и дифференцировки; построение термодинамической теории роста и т. д. В области экспериментального обоснования теории необходимо получение дополнительных данных об интенсивности теплопродукции в оогенезе, во время зародышевого развития, при регенерации, при злокачественном росте, в зависимости от размеров тела животного и т. д.

Вторая группа задач. С точки зрения теории Пригожина-Виама важнейшими пунктами, в которых происходит отклонение живых систем от стационарного состояния, являются оогенез, начальные стадии регенерации и заживления ран, начальные стадии злокачественного роста. Механизм регуляции скорости теплопродукции в этих ключевых пунктах имеет большое значение для многих проблем биологии развития. Этот механизм, очевидно, связан в основном с механизмом регуляции дыхания и гликолиза. Следовательно, исследование механизма регуляции дыхания и гликолиза в этих пунктах, так же, как исследование механизма регуляции дыхания и гликолиза в зародышевом развитии, является одной из главных задач энергетики биологии развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Prigogine, J. M. Weame. 1946. *Experientia*, 2, No. 11, 451—453.
2. И. Пригожин. 1960. Введение в термодинамику необратимых процессов. ИЛ, М.
3. А. Г. Пасынский. 1957. Усп. совр. биол., 43, № 3, 263—274.
4. А. Г. Пасынский. 1933. Биофизическая химия, Изд. высш. школы, М.
5. К. С. Тринчер. 1965. Биология и информация, Наука, М.
6. М. В. Волькенштейн, Ю. П. Сырников. 1936. Биофизика, 11, № 2, 379—380.
7. А. И. Зотин, В. С. Зотина. 1967. *J. Theoret. Biol.*, 17, No. 1, 49—58.
8. А. И. Зотин, Р. С. Зотина. 1969. *Ж. общ. биол.*, 1, 94—110.
9. Э. С. Бауэр. 1935. Теоретическая биология, Изд. ВИЭМ, М—Л.
10. Б. П. Токин. 1935. Теоретическая биология и творчество Э. С. Бауэра. Изд. ЛГУ, Л.
11. П. Б. де Гроот. 1956. Термодинамика необратимых процессов, Гос. изд. техн.-теорет. литер., М.
12. П. Б. Гофман. 1938. Усп. совр. биол., 9, № 4, 39—51.
13. S. Brody. 1945. *Bioenergetic and Growth*, Reinhold Publ. Corp., N. Y.
14. Г. Г. Винберг. 1963. Усп. совр. биол., 61, № 2, 274—293.
15. Р. С. Зотина, А. И. Зотин. 1957. *Ж. общ. биол.*, 27, № 1, 82—92.
16. А. И. Зотин, Р. С. Зотина. 1968. Биофизика (13, 340—343).
17. E. Zenthen. 1953. *Quart. Rev. Biol.*, 28, No. 1, 1—12.
18. В. С. Ивлев. 1959. *Ж. общ. биол.*, 29, № 2, 94—103.
19. Ю. Б. Бызова. 1955. *Ж. общ. биол.*, 26, № 5, 555—562.
20. Г. Г. Винберг. 1956. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб, Изд. Белорусск. ун-та, Минск.
21. F. G. Benedict. 1933. *Vital Energetics*, Carnegie Inst., Washington.
22. В. І. Махилько. 1933. Праці н/д зоол.—биол. ін-т, Сект. загал. фізіол., 6, 138—168.

23. J. Needham. 1942. *Biochemistry and Morphogenesis*, Univ. Press, Cambridge.
24. А. В. Нагорный, В. Н. Никитин, И. Н. Буланкин. 1963. Проблема старения и долголетия, Госиздат мед. литер., М.
25. Е. М. Беркович. 1964. Энергетический обмен в норме и патологии, Медицина, М.
26. J. Needham. 1931. *Chemical Embryology*, Univ. Press, Cambridge.
27. C. Romijn, W. Lockhorst. 1930. *J. Physiol.*, 150 No. 1, 232—249.
28. Э. Кальве, А. Прат. 1933. Микрокалориметрия, ИЛ, М.
29. С. Джалинео. 1959. Усп. совр. биол., 47, № 1, 108—120.
30. А. И. Зотин. 1966. *Биофизика*, 11, № 3, 554—557.
31. К. С. Тринчер. 1966. *Биофизика*, 11, № 6, 1097—1100.
32. В. С. Асатнани. 1962. Биологические таблицы, т. 3.
33. М. Лаббе, А. Стевенин. 1931. Основной обмен, Госмедиздат УССР, Харьков—Киев.
34. N. W. Shock. 1955. *J. Chronic Diseases*, 2, No. 6, 637—703.
35. В. И. Махивько, Е. Е. Сердюк. 1954. Труды ЦИИ ин-та биол., Харьк. гос. ун-т, 21, 153—168.
36. М. Я. Шевцова. 1955. Материалы симп. по основн. пробл. возрастной физиологии и биохимии, Изд. Харьк. ун-та, 251—262.
37. F. S. Philips. 1941. *J. Exp. Zool.*, 86, No. 2, 257—289.
38. Д. Е. Рывкина. 1942. *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 1—2, 17—29.
39. В. С. Фаустов, Б. Карлсон. 1967. *Дока. АН СССР*, 176, № 3, 728—730.
40. М. В. Владимирова. 1935. Труды Лаб. эксп. зool. и морфол. животн., 4, 119—133.
41. Г. Ач Ф. Б. Штрауб. 1954. *Дока. АН СССР*, 95, № 5, 1021—1024.
42. К. А. Мещерская. 1935. *Архив анат., гистол. и эмбриол.*, 14 № 4, 656—667.

A. I. ZOTIN

THERMODYNAMICAL THEORY OF ANIMAL GROWTH AND DEVELOPMENT

Summary

Processes of growth and development can be considered from the point of view of Prigogine—Weame thermodynamical theory. According to this theory the main relation of thermodynamics for irreversible processes can be used for processes of growth and development. It is accepted that during development, growth and aging a continuous decrease of the specific rate of entropy production takes place and an approach of the system to a stationary state. From equations of growth, suggested by different authors, it follows that during growth the process of alteration is associated with the existence of a thermodynamical force.

One may conclude, using the experimental data, that in living systems, contrary to non living ones, two types of stationary states occur: living systems are in a stationary state at each given moment of time and at the same time they approach continuously to the finite stationary state. Both stationary states are determined as states with constant and minimum rate of entropy production.

0249353320
2022070933

If to take that the specific rate of entropy production is proportional to the specific rate of heat transfer, then according to Prigogine-Weame theory, a continuous decrease of the specific rate of heat production should take place during development, growth and aging. This statement is well confirmed by experimental data.

There are periods in the organism life when a deviation of the system from a stationary state takes place and that is followed by a transition to a high level of the specific rate of entropy production. Such a deviation from the stationary state takes place in four cases: during oogenesis, at initial stages of damages and wound healing, at initial stages of regeneration and malignant growth. The analysis shows that the conclusion on the temporary deviation of the living system from the stationary state does not contradict thermodynamics.

В. Б. АКОПЯН, А. П. ЗАКАРАЯ

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НИЗКИХ ИНТЕНСИВНОСТЕЙ НА РАСТВОРЫ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

Физиологические эффекты, вызываемые ультразвуком, известны давно и объясняются, как правило, теплом, генерируемым на границах сред с различным акустическим сопротивлением. Однако в последнее время появились сообщения, что ультразвук низких интенсивностей способен значительно изменять свойства биологических макромолекул. Так, наши исследования показали, что количество SH-группи актомиозина, его характеристическая вязкость, а также форма спектров и величина поглощения в ультрафиолете находятся в сложной зависимости от интенсивности приложенного ультразвука [1].

Предлагаемая работа была предпринята для выяснения некоторых вопросов, возникших при интерпретации полученных нами ранее данных [1].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве источника ультразвука использовался медицинский генератор с фиксированной частотой излучения (880 кГц.) и ступенчатой регулировкой интенсивности от 0,05 до 4 Вт/см².

Интенсивность излучения контролировалась ультразвуковыми весами ИМУ—2 и прокалиброванным кварцевым приемником. Озвучивание проводилось в тонкостенном стеклянном бюксе, укрепленном в специальном термостатирующем держателе [2]. Температура в процессе озвучивания не превышала 30°C. Время озвучивания во всех случаях равно 5 минутам. Для опытов использовалась бидистиллированная вода, насыщенная различными газами при помощи ранее описанного приспособления [2], а также стандартные препараты фенилаланина, тирозина и триптофана, растворенные в бидистилляте или фосфатном буфере (рН 6, 8).

Все измерения производились непосредственно после ультразвуковой обработки.

Спектры поглощения снимались на спектрофотометре СФ—4а, концентрация водородных ионов измерялась рН-метром ЛПУ—01, удельный объем определяли вискометрическим методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что под действием ультразвука существенно изменяются спектры поглощения растворов ароматических аминокислот.

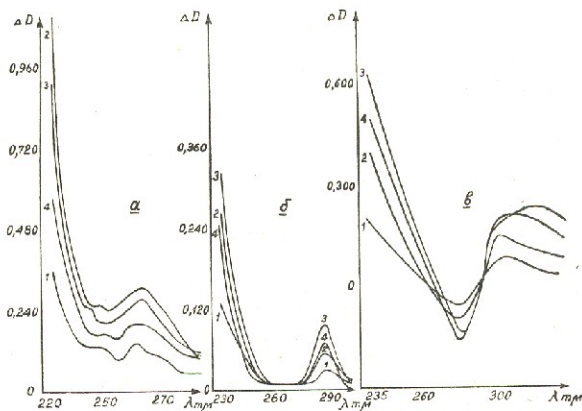


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения: а) фенилаланина ($C=200\gamma/\text{мл}$); б) тирозина ($C=100\gamma/\text{мл}$) и в) триптофана ($C=25\gamma/\text{мл}$). Рядом с кривыми указаны интенсивности ультразвука в $\text{вт}/\text{см}^2$.

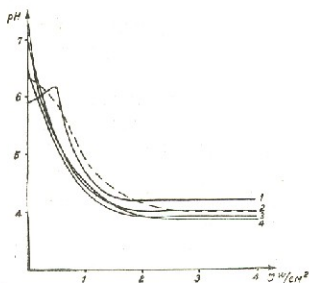


Рис. 2. Зависимость максимального поглощения растворов: 1) фенилаланина, 2) тирозина, 3) триптофана, 4) их смеси (в соотношении 5:3,5:1) и 5) актомиозина от интенсивности приложенного ультразвука.

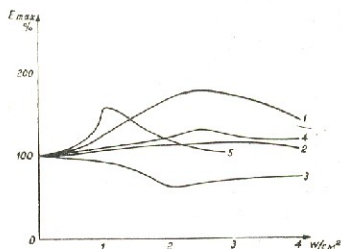


Рис. 3. Зависимость pH водных растворов: 1) фенилаланина, 2) тирозина, 3) триптофана, 4) их смеси и воды (дано пунктиром) от интенсивности ультразвука.

На рис. 1 приведены дифференциальные спектры поглощения водных растворов фенилаланина (а), тирозина (б) и триптофана (в). Видно из приведенных данных, форма спектров аминокислот и величина поглощения (рис. 2) находятся в сложной зависимости от интенсивности приложенного ультразвука.

Раствор, содержащий все три аминокислоты (взяты в тех же соотношениях, в каких они встречаются в актомоцине), даёт суммарный эффект, и спектры поглощения совершенно не похожи на спектры белка (рис. 2).

Далее, нами было замечено, что рН исследуемых растворов уменьшается с возрастанием интенсивности ультразвука и при 2 вт/см^2 становится равным $\sim \text{pH} 4$ (рис. 3).

Озвучивание аминокислот, растворенных в фосфатном буфере (рН 6,8), не вызывает изменения в концентрации водородных ионов, однако, спектры поглощения этих растворов изменяются так же, как и в случае, представленном на рис. 1.

Растворение фенилаланина в предварительно озвученной воде также меняет оптическую плотность этой аминокислоты. Эффект существенно зависит от того, растворялся ли сухой препарат непосредственно в облученной воде, добавляли ли к предварительно озвученной воде высококонцен-

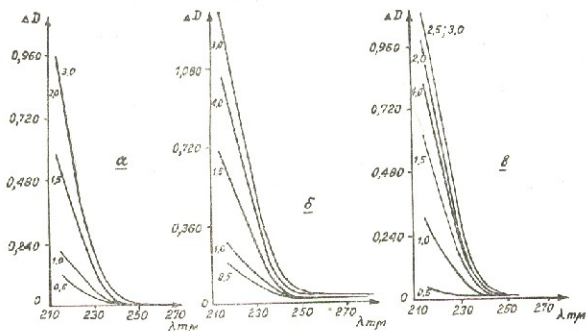


Рис. 4. Дифференциальные спектры поглощения а) воды, б) 0,6 М раствора NaCl и в) фосфатного буфера. Рядом с кривыми указаны интенсивности ультразвука в вт/см^2 .

трированный раствор фенилаланина или действию ультразвука подвергался заранее приготовленный раствор (табл. 1).

Факт повышения концентрации водородных ионов в водных растворах, подверженных действию ультразвука, был отмечен многими авторами. Наши исследования показали, что подобные изменения имеют место и при озвучивании чистой воды (рис. 3). Наряду с изменением рН значительно

повышается коэффициент поглощения воды в области 210 мкм (рис. 4).

Озвучивание в посуде из разных материалов (алексигласс, полиэтилен, политетрафторэтилен, стекло) даёт аналогичные результаты.

Таблица 1

Зависимость D_{max} фенилаланина от интенсивности ультразвука для: 1) растворов ($C=200$ /мл); 2) препарата, растворенного в озвученной воде (до $C=200$ мл); 3) концентрированного раствора, разбавленного в озвученной воде (до $C=200$ /мл).

вт/см	1	2	3
	D_{Max}	D_{Max}	D_{Max}
0	0,235	0,235	0,235
1	0,335	0,260	0,247
2	0,500	0,285	0,250
3	0,510	0,320	0,251
4	0,535	0,300	0,250

Добавление некоторых нейтральных солей почти не влияет на чувствительность воды к ультразвуку. Зависимость рН растворов 0,6 М КСl и NaCl от интенсивности лишь незначительно отличается от кривой изменения рН, полученной при озвучивании чистой воды. Немного различие также и в спектрах поглощения (рис. 4). Что же касается буферных систем, то, например, при озвучивании фосфатного буфера показатель его водородных ионов остается постоянным, хотя спектры поглощения испытывают почти такие же изменения, как и в случае воды (рис. 4).

Свойства, приобретенные водой, обработанной ультразвуком, весьма стабильны. Замораживание, кратковременное кипячение или повторная обработка ультразвуком при температуре 60°C не изменяет ни величины рН, ни вида кривых поглощения (табл. 2).

Таблица 2

Действие на рН озвученной ($I=2,5$ вт/см²) воды: 1) кипячения, 2) замораживания и 3) повторного озвучивания при температуре 60°C .

№ пп	Кипячение		Замораживание		Повторное озвучивание при 60°C	
	до	после	до	после	до	после
1	3,8	3,8	3,9	4,1	3,8	3,8
2	3,8	3,9	3,9	3,9	3,8	3,8

Вода, сразу же после облучения помещенная в запааянные стеклянные ампулы, по крайней мере на неделю сохраняет исходную концентрацию водородных ионов.

О глубине изменений свидетельствует и тот факт, что ультразвуком интенсивностью в $2,5 \text{ Вт/см}^2$ увеличивается удельный объем воды примерно на $0,1\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами изменения в спектрах поглощения растворов фенилаланина, тирозина и триптофана, подвергнутых действию ультразвука, могут быть вызваны изменениями как структуры самих аминокислот, так и свойств растворителя. Для уточнения этого вопроса были проведены опыты с растворением фенилаланина в предварительно озвученной воде, показавшие, что вода, обработанная ультразвуком, способна изменять величину поглощения растворенного в ней фенилаланина.

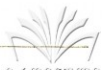
Интересными представляются данные по добавлению в озвученную воду высококонцентрированных растворов этой аминокислоты. Защитный эффект предварительного растворения, по-видимому, объясняется тем, что сначала молекула фенилаланина, взаимодействуя с необлученной водой, гидратируется, и образующая "рубашка" прикрывает молекулу аминокислоты от действия воды с измененными свойствами.

Нами было отмечено значительное понижение рН в водных растворах аминокислот и воде, подвергнутых действию ультразвука. Однако в данном случае не только это определяет изменения в спектрах поглощения, поскольку озвучивание аминокислот в фосфатном буфере при неизменном рН даёт такой же эффект.

Полученные нами изменения в свойствах воды не могут быть вызваны ионами, выделяющимися из стенок бюкса (т. к. применение посуды из различных материалов даёт аналогичный эффект). Образование в ней азотной и азотистой кислот или перекиси водорода также маловероятно, поскольку перечисленные вещества возникают в воде только при кавитации [3], имеющей место при значительно более высоких, чем у нас, интенсивностях ультразвука [4]. Однако возможность появления HNO_2 ; HNO_3 и H_2O_2 нельзя полностью игнорировать, тем более, что имеются отдельные сообщения об обнаружении их в воде, озвученной ультразвуком, и некавитационных интенсивностей [5].

В литературе имеются указания, что под действием ультразвука даже невысоких интенсивностей, в воде могут образовываться молекулы надперекиси Баха H_2O_4 , а также комплексы типа $\text{HO}_2 \cdot \text{O}_2$ и $\text{OH} \cdot \text{O}_2$, в больших количествах которых, по-видимому, могут обеспечить появление значительного числа свободных протонов, определяющих полученное снижение рН. Хорошо вписываясь в полости додекаэдрических образований (модель воды Франка и Квиста [6]), эти комплексы должны будут стабилизировать структуру воды, что, в свою очередь, значительно увеличит время их жизни [7].

Однако, как известно [8], при комнатной температуре вода описывается тетраэдрической моделью и лишь при 35°C возможен переход от тетраэдрической структуры к додекаэдрической [9].



Учитывая, что под действием ультразвука в микрообъемах воды возникают значительные перепады давления, изменяющиеся с частотой ультразвука и вызывающие колебательные движения частиц с большими ускорениями, а также быстрое чередование перегревов и переохлаждений, можно предположить, что в процессе озвучивания такое изменение структуры возможно и при более низких температурах.

Подтверждением этому может служить факт увеличения удельного объема воды, подвергнутой ультразвуковой обработке. Изменения в спектрах поглощения воды и водных растворов солей, по-видимому, вызваны появлением комплексов типа $\text{HO}_2 \cdot \text{O}_2$, $\text{OH} \cdot \text{O}_2$ и молекулами надперекиси Баха.

Весьма интересными представляются результаты опытов по определению устойчивости свойств воды, приобретенных ею в процессе ультразвуковой обработки. И действительно: замораживание, кратковременное кипячение и повторное озвучивание воды при высоких температурах не влияют ни на величину рН, ни на величину поглощения в ультрафиолете, тогда как при замораживании должна была бы восстанавливаться структура льда, а уже при нагревании до $60-65^\circ\text{C}$ — разрушаться додекаэдрические образования. Данное явление, вероятно, можно объяснить только высоким стабилизирующим действием активных комплексов, возникающих в поле ультразвуковых волн [7].

Таким образом, свойства растворов биомакромолекул, помещенных в поле ультразвука, изменятся как за счёт механического воздействия, обусловленного самой природой ультразвука, так и за счёт появления в озвучиваемой среде активных радикалов и комплексов. Существенное влияние на поведение макромолекул должна оказывать и перестройка в структуре самого растворителя — воды, имеющая место при воздействии на неё ультразвуковых колебаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Акоюц, А. П. Закарая, Сообщения АН ГССР, 52, 769, 1968.
2. В. Б. Акоюц, А. П. Закарая, Сборник трудов НИИ курортологии и физиотерапии Грузии, 29, 103, 1967.
3. И. Е. Эльпинер, Ультразвук, М., 1963.
4. М. Г. Сиротюк, Акуст. журн., 8, 255, 1962.
5. С. С. Уразовский, Г. П. Полоцкий, Успехи химии, 9, 835, 1940.
6. S. Frank, A. S., Quist, J. Chem Phys., 34, 604, 1961.
7. Л. Д. Кисловский, В сборнике „Структура и роль воды в живом организме“, ЛГУ, 1966, стр. 171.
8. О. Я. Самойлов, Т. А. Носова, ж. „Структ. химия“, 6, 798, 1965.
9. Ю. В. Гуриков, ж. „Структ. химия“, 4, 824, 1963.

V. B. AKOPYAN, A. P. ZAKARAYA

ACTION OF ULTRASOUND OF LOW INTENSITIES ON
SOLUTIONS OF AROMATIC AMINOACIDS

Summary

The data are given on sensitivity of water and buffer solutions of phenylalanine thyrosin and triptophane as well as of water itself with respect to ultrasound oscillations.

A generator with the frequency 880kc/sec was used as a source of ultrasound of the intensity of radiation from 0.05 to 4 wt/cm². The exposition was constant and equaled 5 minutes.

Experiments have shown that absorption spectra of aromatic aminoacids experience complex changes depending on intensity of ultrasound used. At the same time an appreciable increase of hydrogen ions is determined in solutions of these aminoacids. When phenylalanine was dissolved in previously sounded water the character of the changes remains the same, but the value of the effect is essentially reduced.

The properties of water itself at ultrasound treatment are also changed: an essential absorption in ultra-violet appears, pH of water decreases to pH4, the specific volume increases for 0.1%. The properties acquired by water are very stable. Freezing and not long boiling do not change either the value of pH or the value of absorption.

The data obtained allow to assume an essential role of water in the mechanism of ultrasound action on solutions of biomacromolecules.

Н. В. КОЗЛОВА

О ТРЁХ ЦЕНТРАХ ВИДИМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЗАРОДЫША

Хорошо известно, что при облучении длинноволновым ультрафиолетом восстановленная форма дифосфоиридиннуклеотида (ДПН-Н) флуоресцирует с максимумом 460 мк [1,2]. При связывании ДПН-Н с некоторыми ферментами максимум спектра его флуоресценции сдвигается в коротковолновую область до 440—450 мк [3]. Дюйзенсом и Амецом [2] было показано на различных объектах (дрожжи, люминесцирующие бактерии и хлорелла), что спектры их флуоресценции подобны спектру связанного ДПН-Н, а Чанс и Бальчевский [4], исследуя флуоресценцию митохондрий в видимой области спектра, получили максимум при 443 мк, что также хорошо согласуется с максимумом спектра флуоресценции, связанного с ферментами ДПН-Н. После этого многие авторы исследовали флуоресценцию в видимой области интактных клеток и тканей, используя интенсивность этой флуоресценции в качестве показателя интенсивности дыхательных процессов в клетках (по степени сдвига окислительно-восстановительного состояния ДПН в ту или иную сторону), или для определения реакции ДПН на введение различных метаболитов [5—8]. При этом некоторые авторы отмечали присутствие второго центра—флавинадениннуклеотида (ФАД), способного давать флуоресценцию в видимой области при облучении длинноволновым ультрафиолетом [1,4]. Максимум спектра его флуоресценции находится при 510—535 мк. Таким образом, при облучении тканей длинноволновым ультрафиолетом предполагается два возможных центра видимой флуоресценции: ДПН-Н и ФАД.¹

При исследовании спектра видимой флуоресценции ткани печени куриного зародыша при облучении длинноволновым ультрафиолетом мы получили интенсивную флуоресценцию с максимумом 470 мк [9]. Было высказано предположение о существовании третьего центра видимой флуоресценции в ткани печени куриного зародыша, отличного по спектру и по некоторым свойствам от ДПН-Н. Тот факт, что мы не получили максимума 440—450 мк, характерного для флуоресценции ДПН-Н в ткани,

¹ Восстановленный трифосфоиридиннуклеотид (ТПН-Н) также флуоресцирует при подобном возбуждении, но максимум его флуоресценции совпадает с максимумом флуоресценции ДПН-Н, а интенсивность, по-видимому, много меньше [1].



мы объясняли маскированием последней более интенсивной флуоресценцией с максимумом 470 мкм. При переходе ткани в анаэробные условия флуоресценция с максимумом 470 мкм уменьшалась, а флуоресценция ДПН-Н должна была возрасти [10,11]. В этих более выгодных для проявления максимума ДПН-Н условиях на фоне спектра флуоресценции с максимумом 470 мкм вырисовывался горб в области 440—450 мкм [9].

Целью настоящей работы была более убедительная регистрация флуоресценции ДПН-Н наряду с флуоресценцией с максимумом 470 мкм.

МЕТОДИКА

Объект опытов—печень куринных зародышей 16 и 18 дней инкубации. Были проведены две серии опытов. В первой серии в зародыши *in vivo* предварительно вводился водный раствор цианистого калия (KCN), затем, через 1 час, зародыши вскрывались, из печени готовился гомогенат на 0,25 м сахарозе (1:5), который затем центрифугированием при 600 г разделялся на ядерную и цитоплазматическую фракции.

Из цитоплазматической фракции осаждались митохондрии центрифугированием при 12000 г [12] и в полученному осадку добавлялось 2 мл 0,25 м сахарозы. Во второй серии опытов выделение митохондрий производилось без предварительного введения зародышам KCN . Последний добавлялся к полученным фракциям *in vitro*.

Спектральные измерения производились на спектрофлуориметре, построенном на базе двойного монохроматора ДМР-4 [9]. Все спектры исправлены с учетом дисперсии прибора и спектральной чувствительности фотоумножителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия опытов. Предварительное введение KCN в зародыши было применено для достижения в ткани печени условий, в которых ДПН-Н флуоресцирует наиболее интенсивно из-за максимального восстановления, вследствие ингибирования цепи дыхательных ферментов цианистым калием [13]. Кроме того, интенсивность флуоресценции с максимумом 470 мкм падает при введении KCN [9], что также должно было способствовать наилучшему проявлению максимума 440—450 мкм, характерного для флуоресценции ДПН-Н в ткани. После этого были измерены спектры флуоресценции различных фракций гомогената печени. Результаты показаны на рис. 1. Спектры флуоресценции цитоплазмы, митохондрий и безмитохондриальной цитоплазмы подобны спектру связанного ДПН-Н (максимум 440—446 мкм).

Вторая серия опытов. Спектр митохондрий, выделенных из печени куринных зародышей 18-дневной инкубации без предварительного введения KCN , показан на рис. 2 (верхняя кривая). Мы попытались разделить графически этот сложный спектр, предполагая существование в митохондриях двух центров, дающих флуоресценцию в видимой области. Из рис. 2 вид-

но, что такой спектр получается сложением двух простых спектров флуоресценции с максимумами 450 мкм и 524 мкм, что соответствует флуоресценции присутствующих в митохондриях ДПН-Н и ФАД. Причем, интенсивность флуоресценции ФАД вдвое больше интенсивности флуоресценции ДПН-Н. При разложении спектра митохондрий мы приняты для спектра ДПН-Н полуширину — 90 мкм, близкую к измеренной Дюйзенсом и Амедом [2], а также Чансом и Вальчевским [4]. В доступной нам литературе мы не

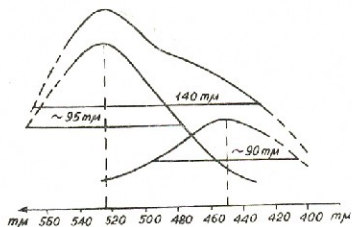


Рис. 1. Спектры флуоресценции различных фракций гомогената печени 18-дневных куриных зародышей, в которые предварительно вводился *KCN*. 1—митохондрии, 2—цитоплазма, 3—безмитохондриальная цитоплазма.

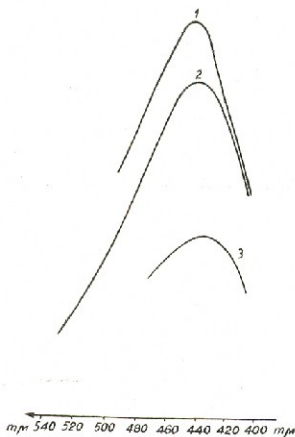


Рис. 2. Спектр флуоресценции митохондрий, выделенных из печени 16-дневных куриных зародышей.

нашли данных о полуширине спектра флуоресценции ФАД, поэтому предположили её приблизительно равной полуширине спектра ДПН-Н.

При добавлении к митохондриальной взвеси *in vitro* цианистого калия ожидалось увеличение флуоресценции ДПН-Н, что мы и получили (см. рис. 3). Разделив спектр флуоресценции митохондрий (с *KCN*) в предположении существования двух центров флуоресценции, мы снова получили два простых спектра с максимумами 450 мкм и 524 мкм (полуширины те же), причем интенсивность флуоресценции ДПН-Н вдвое превышает интенсивность флуоресценции ФАД.

Полуширина сложного спектра флуоресценции митохондрий (с добавлением и без добавления *KCN*) равна 140 мкм.

Типичный спектр флуоресценции цельной печени 18-дневного куриного зародыша показан на рис. 4 (верхняя кривая). Полуширина этого спектра 110 мкм. Уже эта меньшая по сравнению со спектром митохондрий полуширина заставляет усомниться в том, что этот спектр удастся разложить на прежние два простых спектра с максимумами 450 мкм и 524 мкм и полу-



ширинами 90 мкм и 95 мкм соответственно. Как показал анализ, для того, чтобы объяснить спектр печени сложением двух простых спектров с максимумами 440—450 мкм и 510—535 мкм (что соответствует флуоресценции двух центров ДЦН-Н и ФАД), пришлось бы прежде всего принять слишком малую полуширину для спектра ДЦН-Н (меньше 40 мкм). Удовлетворительнее всего удалось разложить этот спектр на три простых спектра. Первый—спектр флуоресценции ФАД (максимум—524 мкм, полуширина—95 мкм), второй—спектр с максимумом 470 мкм, полушириной 70 мкм, третий—максимум около 440 мкм, проявляющийся в виде горба на коротковолновом фронте спектра флуоресценции цельной печени (на рис. 4 показан пунктиром). Необходимо отметить, что при измерении спектров печени заро-

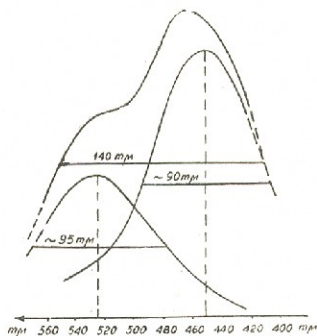


Рис. 3. Спектр флуоресценции митохондрий, к которым был добавлен *in vitro* KCN.

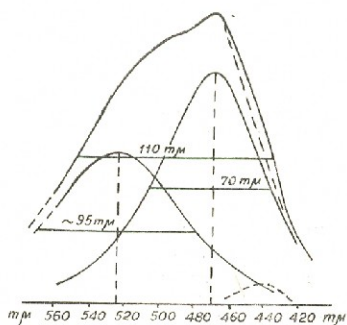


Рис. 4. Спектр флуоресценции цельной печени 18-дневного куриного зародыша.

дышей меньшего возраста [9] мы получали чистый спектр с максимумом 470 мкм и полушириной 70 мкм. Вопрос о причинах появления интенсивной флуоресценции ФАД в печени куриного зародыша 18-дневной инкубации выходит за рамки настоящей статьи и здесь обсуждаться не будет.

Результаты описанных опытов еще раз подтверждают, на наш взгляд, существование в ткани печени куриного зародыша третьего центра, дающего при облучении длинноволновым ультрафиолетом интенсивную флуоресценцию в видимой области с максимумом 470 мкм и полушириной 70 мкм, причем этот центр находится, по-видимому, в безмитохондриальной цитоплазме, что уже было отмечено ранее [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Юденфренд. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, М., 1967.
2. L. N. M. Duysens, J. Amesz *Biochim. et Biophys. Acta*, 24 (1957), 19—25.
3. L. N. M. Duysens, G. H. M. Kronenberg. *Biochim. et Biophys. Acta*, 26 (1957), 437—438.



4. B. Chance, H. Baltseheffsky. *J. Biol. Chem.*, **233** (1958), 736—739.
5. М. С. Шудель, Н. А. Черноградская и др. *ДАН СССР*, **157**, № 2 (1964), 447—450.
6. E. Kohen, C. Kohen, W. Jenkins. *Exptl. Cell Res.*, **44** (1966), 175.
7. E. Kohen, V. Legallais, C. Kohen. *Exptl. Cell Res.*, **41** (1966), 223—226.
8. E. Kohen. *Exptl. Cell Res.*, **35** (1964), 303.
9. Н. В. Козлова. В. сб. „Вопросы биофизики и теоретической биологии“, Труды ТГУ, в. 1, 41—47, 1968.
10. B. Chance, B. Thorell. *Nature*, **181** (1959) № 4601, 931—934.
11. B. Chance, V. Legallais. *Rev. Sci. Instr.*, **30** (1959) № 8, 732—735.
12. G. H. Poogeboom, W. C. Schneider. *J. Biol. Chem.* **197**, 611—620, 1950.
13. F. E. Hunter, Y. F. Levy, and al. *J. Biol. Chem.*, **234** (1959) № 8, 2176—2186.

N. V. KOSLOVA

ON THREE CENTRES OF VISIBLE FLUORESCENCE OF CHICK EMBRYO LIVER

Summary

The confirmation of the fact observed earlier is given in the paper. The fact was that there is one more centre of unknown nature with the maximum 470 m μ in addition to the known centres of fluorescence of chick embryo liver caused by bound DPN with the maximum of 450 m μ and flavoprotein with the maximum of 510—535 m μ .

It has been shown that a complex spectrum of fluorescence of flavoprotein (the maximum 524 m μ , half width 95 m μ), the second-spectrum with the maximum 470 m μ , half width 70 m μ , the third-fluorescence spectrum of bound DPN with the maximum 440m μ seen as a hunch on the short wavelength front of liver spectrum.

З. А. МЕТРЕВЕЛИ

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЧНОГО ВЕРЕТЕНА ЛЯГУШКИ

Мышечное веретено можно рассматривать как систему, дающую информацию о механических изменениях, происходящих в мышце. Оно является биологическим датчиком, реагирующим на величину и скорость механической деформации мышцы и преобразующим эти изменения в закодированную электрическую импульсацию.

Изучение преобразования механической деформации в электрические изменения в мышечном веретене является важным звеном в проблеме выяснения механизма возникновения электрических изменений при раздражении всех возбудимых структур.

Известно, что в зависимости от температуры изменяется функциональное состояние живых систем, меняются параметры их электрической активности. Многие авторы изучали влияние температуры на величину потенциала покоя и потенциала действия нервных и мышечных волокон [1,2,3,4,5]. Получены количественные данные о влиянии температуры на генераторные потенциалы телец Пачини и рецепторов растяжения мышц рака [9,10,11].

Первые данные о влиянии температуры на электрическую активность мышечного веретена лягушки принадлежат Меттюз [6]. Меттюз показал, что с увеличением температуры растёт средняя частота импульсации за первые две секунды после начала растяжения. С увеличением температуры увеличивается также и адаптация. Ответы становятся всё более короткими, так что при 24°C длительность импульсации не превышает 10—15 сек. Меттюз не рассматривает вопроса, при какой температуре достигается максимальная частота для первых двух секунд после растяжения.

Более детально влияние температуры на электрическую активность мышечного веретена лягушки изучено в работе Оттосона [13]. Оттосон проводил опыты на изолированном мышечном веретене IV пальца задней лапки лягушки.

В своих опытах Оттосон показал, что число импульсов за 350 мсек после начала растяжения растёт с увеличением температуры от 2°C до 30°C приблизительно линейно, а после 30°C—быстро падает. Точка максим-



мума числа импульсов приходится на 28° — 36°C . Рециторный потенциал (как его динамическая, так и статическая фазы) не изменяется от 3° до 25° , а выше 25° —уменьшается. Время нарастания и время спада динамической фазы, а также время спада статической фазы уменьшаются с увеличением температуры.

Оттосон отмечает, что охлаждение препарата до исчезновения импульсации при растяжении не вызывает гистерезисных процессов, т. е. при нагревании до прежней (комнатной) температуры ответы повторяются. Если же импульсация при растяжении исчезает с нагреванием, то при охлаждении до прежней температуры ответы не восстанавливаются. Ответы не восстанавливаются и в том случае, если препарат нагревают медленно, но не доходят до температуры исчезновения импульсации. Оттосон отмечает и такой факт: если веретену придать некоторое удлинение и быстро (за 20 сек.) увеличить температуру на 20 — 30° , то получим такой же ответ, как и при добавочном растяжении веретена.

Подобные исследования влияния температуры на мышечное веретено проведены и на теплокровных [12]. Авторы обнаружили, что если температуру мышечного веретена кошки уменьшить по сравнению с нормальной температурой тела (37°), то при 32° в некоторых окончаниях веретена возникает регулярный спонтанный разряд импульсов. Температура, при которой возникает этот разряд, и частота разряда зависят от ионного состава раствора, а именно, от концентрации ионов Ca^{++} и K^{+} . Ответы на растяжение суммируются с этим регулярным разрядом.

Мы задались целью выяснить более детально влияние температуры на параметры импульсации, возникающей в мышечном веретене лягушки

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Опыты проводились на м. *extensor longus digiti IV* лягушки *Rana ridibunda*, содержащей мышечное веретено. Мышца иннервируется веточкой п. *peroneus*, которая до входа в мышцу делится еще на несколько веточек. Проксимальная веточка обычно содержит два чувствительных и одно моторное нервное волокно. После перерезания получали ответы одиночных чувствительных окончаний. Один конец мышцы закреплялся неподвижно с помощью серебряной пластинки, которая служила также одним из отводящих электродов. Второй электрод помещался на п. *peroneus*. Мышца находилась в растворе Рингера, а второй электрод и часть п. *peroneus*—в жидком вазелине. Второй конец мышцы с помощью стального рычага соединялся с растягивающей установкой. Методика получения растягивающей силы и измерения абсолютного удлинения мышцы была описана нами ранее [14]. Для усиления биопотенциалов использовался усилитель переменного тока с коэффициентом усиления $2,5^{\circ}$, 10^4 . Счет импульсов происходил автоматически непосредственно во время эксперимента с помощью специального пересчетного устройства. Камера, в ко-

торой находилась мышца, термостатировалась. Температура препарата и окружающей его жидкости поддерживалась постоянной с точностью 0,5 в пределах от 0 до 45°C. Вся установка была помещена в экранированную камеру.

Для того, чтобы сделать сравнимыми результаты опытов, проведённых на различных препаратах, мышце с помощью специального микрометрического винта придавали такое начальное натяжение, чтобы сила в 1 грамм вызывала одно и то же удлинение для всех препаратов. Величины растяжений выбирались с помощью ограничителя следующим образом: для всех препаратов брались 3 удлинения: одно—меньше, чем удлинение, вызываемое силой в 1 грамм; второе—равное удлинению под действием силы в 1 грамм, а третье,—соответствующее силе в 4—5 грамм. Т. к. все эти удлинения мышцы происходили под действием одной и той же силы 7—8 грамм, скорости нарастания растяжения были одинаковыми для всех удлинений.

В опытах применяли раствор, в состав которого входили: $NaCl$ —0,65%; $CaCl_2$ —0,02%; KCl —0,015%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Изучалась зависимость средней частоты за первые две секунды после растяжения от температуры и от величины растяжения ΔL .

Выяснилось, что частота растёт примерно до 35—37°C (рис. 1). Увеличение частоты в зависимости от температуры, в пределах ошибки, имеет линейный характер. Угол наклона кривых $f(T)$ увеличивается с увеличением растяжения (рис. 1, рис. 2).

Мы исследовали восстановление ответов после нагревания препаратов. Оказалось, что при нагревании препарата до такой температуры, при которой не наблюдается уменьшения частоты, восстановление ответов при достижении исходной температуры происходит для всех растяжений. Если же мы достигаем температуры, когда частота уменьшается (эта температура ниже той, при которой полностью исчезает ответ на растяжение), то при охлаждении до прежней температуры восстановление ответов происходит лишь при малых растяжениях.

Мы проследили также обратный ход температурной зависимости частоты для разных растяжений. Соответствующие графики представлены на рис. 2, где ответы, показывающие обратный ход, отмечены пунктирными кружками. Из этих графиков видно, что для малых растяжений восстановление ответов происходит быстрее и при более высоких температурах. Восстановление происходит также и при больших растяжениях, однако, для этого требуется больше времени. Восстанавливаются ответы для всех растяжений и в том случае, когда нагревание происходит до исчезновения импульсов, однако, на этот раз время восстановления исчисляется часами.



Изучая картину восстановления ответов на растяжение после нагревания, интересно было выяснить влияние растяжения мышцы в нагретом состоянии на эту картину. С этой целью были проведены следующие опыты: а) при температуре в 20° фиксировали ответы на разные удлинения мышцы $\Delta L_1 < \Delta L_2 < \Delta L_3$. Нагревали мышцу до температуры, при которой уменьшается частота без растяжения мышцы. При охлаждении до прежней температуры (20°) ответы на ΔL повторились, а на ΔL_2 и ΔL_3 — уменьшились. Это уменьшение было более значительным при ΔL_3 , чем при ΔL_2 .

б) Во втором опыте, в отличие от первого, при температуре, соответствующей уменьшению частоты, проводились серии растяжений. При охлаждении до прежней температуры (20°) ответы, соответствующие ΔL , увеличивались, при ΔL_2 ответы повторялись, а при ΔL_3 наблюдалось

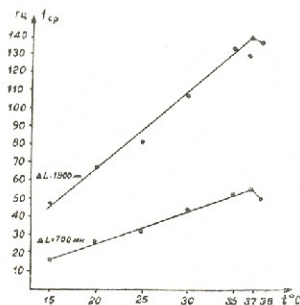


Рис. 1.

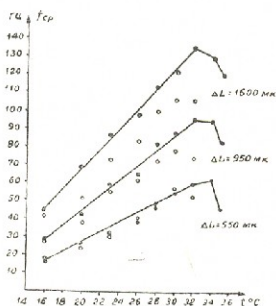


Рис. 2.

незначительное уменьшение. Кроме этого, наблюдалось увеличение частоты спонтанного разряда после нагревания. Даже у тех препаратов, у которых спонтанные разряды первоначально не наблюдались, после нагревания они появлялись.

Было обнаружено и следующее явление: если после нагрева и серии растяжений вторично нагреть препарат, наблюдается увеличение частоты при тех же самых растяжениях. Это увеличение частоты тем больше, чем меньше растяжение и чем выше температура (конечно, всё это имеет место при температурах ниже точки, соответствующей уменьшению частоты).

Вторая серия опытов (на 15 препаратах) проводилась для выяснения характера адаптации в зависимости от температуры для различных растяжений. Мышца растягивалась в течение 20—30 сек. и измерялась

средняя частота импульсов за каждые последующие две секунды. Полученные результаты представлены на рис. 3, 4, 5. По оси ординат отложена средняя частота за каждые две секунды, а по оси абсцисс—помера последовательных 2-секундных интервалов.

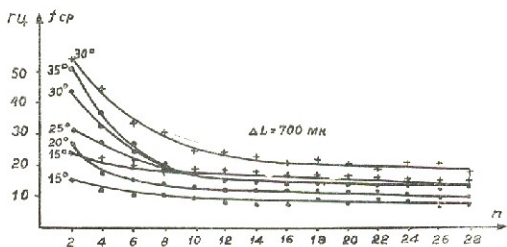


Рис. 3.

Как видно из представленных графиков, величина адаптации растёт как с увеличением температуры, так и с увеличением растяжения, что совпадает с данными Меттюзю. Однако в отличие от кривых, полученных Меттюзом, у нас максимум частоты для всех растяжений после 10 сек

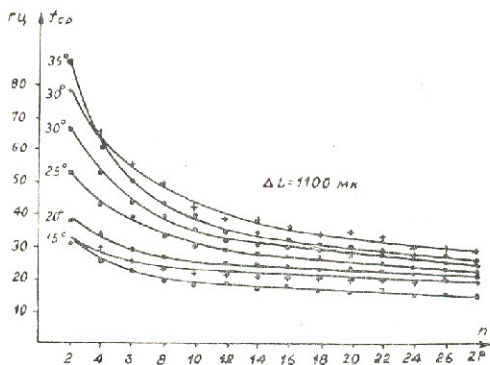


Рис. 4.

получается не при 24°, а при 35—36°C. Кроме того, ответы не становятся короче вплоть до 38—39°. Таким образом, полученная Меттюзом картина в нашем случае наблюдается не при 24°, а при 38—39°C.



Восстановление ответов после нагревания и увеличение ответа при вторичном нагревании имеет такой же характер, как и в опытах первой серии. Это видно из графиков на рис. 3, 4, 5, где ответы при охлаждении и вторичном нагревании отмечены крестиками (+).

Нами были проведены также опыты качественного характера на интактной мышце, где были сохранены все чувствительные окончания. Наблюдались ответы двух-трёх одипочных окончаний одновременно. Ответы этих окончаний мы различали друг от друга по величине амплитуд потенциалов действия.

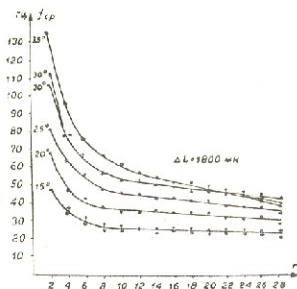


Рис. 5.

При температуре 20°C наблюдалось, что за 30—40 сек. частота импульсов с малой амплитудой быстро падала по сравнению с импульсами двух других окончаний. Однако за 30—40 сек. ответы не исчезали полностью. При повышении температуры частота за первые 2 сек. для всех окончаний увеличивается; однако, уже при 24—25°C длительность импульсации с малой амплитудой не превышает 10—15 сек. При последующем повышении температуры это время уменьшается, тогда как такое уменьшение длительности импульсации не наблюдается для остальных двух окончаний.

Основываясь на качественных наблюдениях, проводимых в течение всех опытов, можно сделать вывод, что по характеру изменения импульсации в ответ на растяжение и спонтанной импульсации в зависимости от температуры, препараты можно разделить на две группы.

1. На препаратах первой группы наблюдалось следующее:

- а) спонтанный разряд импульсов сохранялся вплоть до исчезновения ответов на растяжение;
- б) вблизи температуры 35°C групповые импульсы наблюдались как в спонтанных разрядах, так и в ответах при длительных растяжениях;
- в) при температуре 39—40°C ответы исчезали на установленное растяжение, в то время как при нарастании растяжения импульсы наблюдались.

II. На препаратах второй группы были получены следующие результаты:

- а) при температуре 35—36°C спонтанные разряды исчезали полностью, в то время как ответы при растяжении мышцы сохранялись;
- б) групповые импульсы не наблюдались как в спонтанных разрядах, так и в ответах на длительные растяжения;

в) при температуре 38–39°C одновременно исчезали ответы на нарастающих растяжениях, так и при установившемся растяжении.

Эти качественные наблюдения показывают, что различные окончания дают разную картину температурной зависимости как для импульсации в ответ на растяжение, так и для спонтанного разряда. Таким образом, несовпадение наших результатов с данными Меттвоза объясняется тем, что Меттюз наблюдал ответы окончаний, которые неидентичны тем окончаниям, ответы которых наблюдались в наших опытах. Неидентичностью чувствительных окончаний объясняется также большой интервал колебаний максимального значения частоты в зависимости от температуры 28–36°C, на который указывает Оттосон.

Так как мышечное веретено является рецептором растяжения, нам было интересно выяснить—не являются ли причиной уменьшения частоты при определенной температуре какие-нибудь деформационные изменения мышцы. Для этой цели мы провели отдельную серию опытов на 10 мышечных препаратах. Наблюдения показали, что деформационные изменения мышцы начинаются при той же температуре, при которой начинается уменьшение частоты. При дальнейшем повышении температуры эффект увеличивается, так что при температуре, когда исчезают ответы на растяжение, удлинение мышцы составляло половину той величины, которую она имела при исходной температуре (15°C).

После охлаждения до прежней температуры удлинение мышцы восстанавливалось. Время восстановления увеличивалось с укорочением мышцы.

Несколько опытов было проделано следующим образом. Не дожидаясь полного восстановления удлинения мышцы при охлаждении до 15°C, препарат нагревали вторично. В этих случаях при достижении температуры 28°C происходило быстрое восстановление удлинения, а при дальнейшем повышении температуры наблюдалось даже некоторое увеличение удлинения по сравнению с тем, что имело место до первого нагревания. Температура, при которой начинались деформационные изменения, сдвигалась с 35° до 37°C.

Нами было обращено внимание и на следующее обстоятельство. Как видно из опытов, увеличение частоты импульсов за первые 2 сек. возможно получить двумя путями: либо увеличением удлинения ΔL , либо увеличением температур. И мы можем получить хорошее совпадение частот в диапазоне температур 3–38°C, т. е. вплоть до точки перегиба. Однако выше 25°C совпадение пиков, показывающих падение частоты со временем при длительности растяжения 20–30 сек., не достигается увеличением температуры, т. е. повышение частоты после 10 сек. растяжения посредством повышения температуры выше 25°C малоэффективно, о



чем свидетельствуют кривые на рис. 6 и 7. Создаётся впечатление, что по эффективности два фактора—температура и механическое растяжение не адекватны для длительных растяжений.

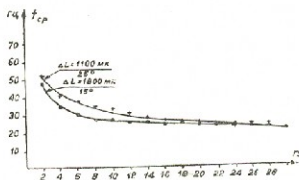


Рис. 6.

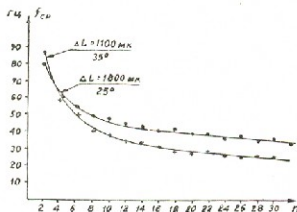


Рис. 7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученный нами результат об увеличении угла наклона зависимостей $f(T)$ с увеличением удлинения мышцы (в случае справедливости закона о прямой пропорциональности величины рецепторного потенциала и частоты разряда [7,9]) находится в противоречии с результатом, полученным Оттосоном, о влиянии температуры на рецепторный потенциал. Согласно данным Оттосона, рецепторный потенциал по величине не изменяется в пределах от 2 до 25°C, а выше 25° уменьшается. Оттосон объясняет увеличение чувствительности (увеличение частоты разряда) увеличением температуры, предполагаемым понижением порога возбудимости нервного волокна и уменьшением рефракторной фазы. Причину же уменьшения рецепторного потенциала — увеличением общей деполаризации аналогично уменьшению потенциала покоя нервного волокна лягушки и гигантского аксона кальмара [1, 2, 3, 4, 5].

Однако, если порог возбудимости и рефракторное время нервного волокна уменьшаются с увеличением температуры, то это уменьшение не должно зависеть от величины удлинения мышцы. Поэтому при определённой температуре, имея удлинения ΔL_1 , ΔL_2 и соответствующие им частоты f_1 и f_2 с увеличением температуры, разность частот $f_1 - f_2$ не должна изменяться, т. е. кривые зависимости $f_1(T)$ и $f_2(T)$ должны быть параллельными, что в действительности не имеет места. Увеличение углов наклона кривых $f(T)$ с увеличением удлинения показывает, что рецепторный потенциал должен увеличиваться с увеличением температуры и это увеличение должно происходить с равной степенью для разных удлинений.

Из наших наблюдений следует, что температура, при которой начинается уменьшение частоты импульсации на растяжение, совпадает с тем-

пературой, при которой начинается деформационное изменение мышцы. Кроме того, обнаруженные нами закономерности восстановления ответов на растяжение после нагревания хорошо совпадают с закономерностями восстановления деформационных свойств мышцы.

Согласно данным Катца [8], терминальные окончания афферентных волокон оканчиваются на двух морфологически разных областях интрафузальных волокон. Одни интрафузальные волокна состоят из ретикулярной области длиной в 100 мк, где почти нет миофибрилл. С обеих сторон этой безмиофибрилльной области лежат участки длиной в 300 мк, в которых такое же количество миофибрилл, какое наблюдается в более полярных областях интрафузальных волокон. Катц предполагает, что ретикулярная часть ответственна за динамическую фазу рецепторного потенциала, а смежные области—за статическую. Некоторые интрафузальные волокна не имеют ретикулярной части и, по предположению, они вносят вклад в статическую фазу рецепторного потенциала. Существованием ретикулярной области объясняется увеличение частоты при раздражении афферентных первичных волокон интрафузальных мышечных волокон. При этом остаётся необъяснённым—какой эффект должен получаться при раздражении афферентных первичных волокон тех интрафузальных мышечных волокон, которые не имеют ретикулярной области.

Основываясь на описанной здесь морфологической картине и на обнаруженном нами факте совпадения уменьшения частоты разряда при растяжении и восстановлении ответов, с одной стороны, с началом деформационных изменений и восстановлением деформации мышцы—с другой, можно объяснить все явления, которые нами наблюдались.

Так, например, если терминальные окончания оканчиваются на интрафузальных волокнах, не имеющих ретикулярной области, то, в зависимости от температуры, должно наблюдаться следующее:

- а) ответы на растяжение с увеличением температуры должны становиться короче по длительности, как это наблюдается в опытах Метьюза и в наших опытах на интактной мышце;
- б) при некоторой температуре спонтанные разряды должны исчезнуть, тогда как ответы на растяжение сохраняются;
- в) групповые импульсы не должны наблюдаться как в спонтанных разрядах, так и при растяжении;
- г) при определённой температуре импульсы должны исчезнуть одновременно как в случае нарастания растяжения, так и для установившегося растяжения.

Если терминальные окончания афферентных волокон оканчиваются на интрафузальных волокнах, имеющих ретикулярную область, то:

- а) спонтанный разряд не должен исчезать вплоть до исчезновения импульсов на растяжение;

- б) должны наблюдаться групповые импульсы как в спонтанных разрядах, так и в ответах при растяжении;
- в) при некоторой температуре ответы должны исчезнуть сменя на установленное растяжение, а затем при парастании растяжения.

Как видно, приведённая классификация на основании морфологического строения интрафузальных волокон хорошо совпадает с той классификацией препаратов, которую мы провели на основании качественных наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА

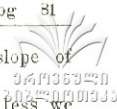
1. H. A. Gasser. Nerve activity as modified by temperature changes. Amer. J. Physiol., 97, 1931, 254—270.
2. A. L. Hodgkin, B. Katz. The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid, J. Physiol., 109, 1949, 240—249.
3. Б. Н. Венрицков. „Биофизика“, т. I, вып. 5, 1959.
4. Ю. И. Аршавский. „Биофизика“, т. III, вып. 2, 1958.
5. Ю. И. Аршавский. „Биофизика“, т. III, вып. 6, 1958.
6. B. H. C. Matthews. The response of a single organ, J. Physiol., 71, 1931, 84—110.
7. B. Katz. Depolarization of sensory terminals and the initiation of impulses in the muscle spindle, J. Physiol., III, 1950, 231—232.
8. B. Katz. The termination of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog, Phil. Trans. Roy. Soc. London ser B, 243, 1961, 221—240.
9. D. Burkhardt, Effect of temperature on the isolated stretch receptor organ of the crayfish, Science, 129, 1959, 392—393.
10. N. Ishiko, W. B. Loewenstein. Temperature and charge transfer in a receptor membrane, Science, 132, 1960, 1841—1842.
11. D. E. Inman, P. Peruzzi. The effect of temperature on the responses of Pacinian corpuscles, J. Physiol. 153, 1961, 280—291.
12. O. C. J. Lippold, J. G. Nichols, J. W. T. Redfearn. A study of the afferent discharge produced by cooling a mammalian muscle spindle, J. Physiol. 153, 1960, 218—231.
13. D. Ottoson. The effects of temperature on the isolated muscle spindle, J. Physiol., 120, 1965, 636—648.
14. Т. В. Зарапов, Ц. А. Лежава, З. А. Метревели. „Биофизика“, т. XI, вып. 3, 1965.

Z. A. METREVELI

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON ELECTRICAL ACTIVITY OF MUSCLE SPINDLE OF THE FROG

Summary

1. The influence of temperature on electrical activity of muscle spindle and deformation properties of the muscle was studied.
2. The dependence of the mean frequency during the first 2 sec after



the beginning of strain is of approximately linear character, the slope of these curves increases with an increase of the strain value.

3. Response recovery after heating proceeds the sooner the less we deviate from the temperature at which a decrease of frequency takes place. And the recovery is more complete for weak strains.

4. At secondary heating responses increase and that increase is stronger for small strains.

5. Heating changes deformation properties of the muscle. These changes begin at the same temperature at which frequency of impulsion decreases.

6. Deformation properties of the muscle are restored at cooling.

Г. М. МРЕВЛИШВИЛИ

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ВОДЫ
В ГРЕНЕ ШЕЛКОПРЯДА В ПРОЦЕССЕ ЕЕ РАЗВИТИЯ

В настоящее время есть все основания считать, что существует определенная связь между функциональным состоянием биологической системы и молекулярной структурой воды в этой системе [1—3]. По мнению некоторых авторов, исследование структурных изменений воды в биосистемах может оказаться ключом к пониманию ряда биологических закономерностей и позволит правильно описать некоторые процессы, протекающие в живом организме [4—7]. К таким процессам можно отнести, например, реакции, связанные с переносом заряда, и играющие, как известно, в процессах жизнедеятельности огромную роль [8].

Ранее нами было показано, что калориметрический метод может быть с успехом применен для исследования состояния воды в биосистемах [9—12]. Было выяснено, что часть воды в биосистемах „связывается“ макромолекулами белковых веществ и другими биополимерами и находится не в своем обычном, а в более упорядоченном состоянии.

В данной работе приводятся результаты калориметрического исследования состояния воды в процессе развития грены шелкопряда.

Калориметрические измерения проводились на абсолютном вакуумном адиабатном калориметре, разработанном специально для исследования состояния воды в биосистемах. Конструкция калориметра, метод обработки данных и расчет поправок подробно описываются в [9]. В калориметрическую ампулу объемом 0,8 см³ помещалось ~150—200 иишек шелкопряда с общим весом ~0,5 г. Измеренная теплоемкость пересчитывалась на граммы сухого веса (сухой остаток определялся непосредственно в ампуле, после проведения калориметрического эксперимента). Охлаждение исследуемого объекта производилось до -100°C, со скоростью 1°C за 6 мин. Увеличение скорости охлаждения может привести к тому, что в результате переохлаждения в кристаллическое состояние перейдет не вся имеющаяся в системе свободная вода [12]. Точность определения теплового эффекта, связанного с перестройкой структуры воды при размораживании грены, достигала $\pm 0,5\%$. Исследования проводились на разных стадиях развития грены.



Образец № 1. Период зимовки, когда зародыши остаются без изменений в яичках (хранение в холодильнике при $+2^{\circ}\text{C}$).

Образец № 2. Грена переносится в термостат, где инкубируется при температуре $+10^{\circ}\text{C}$. Калориметрические измерения производились после 24 ч. инкубации яичек в термостате.

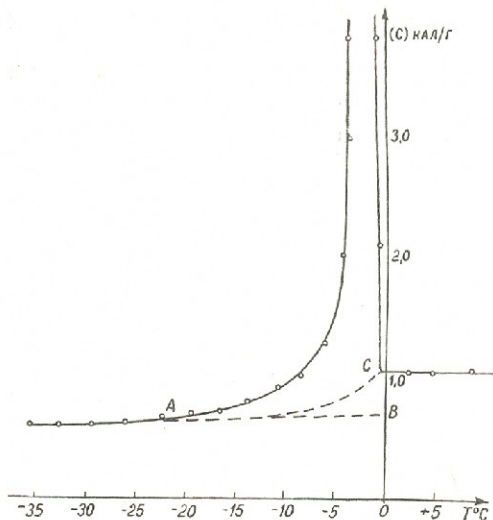


Рисунок. Теплопоглощение при прогреве грены шелкопряда в пересчете на 1 г сухого веса. В процессе размораживания накапливается фаза с более высокой теплоемкостью (расплавившаяся вода), чем лед. Поэтому на процесс плавления идет не вся теплота, лежащая над линией АВ, полученной линией экстраполяции теплоемкости в замороженном состоянии, а лишь теплота над кривой АС, учитывающей возрастание „истинной“ теплоемкости системы с накоплением размороженной фазы [9].

Образец № 3. Грена переносится из холодильника в термостат и инкубируется при температуре $+20^{\circ}\text{C}$. Калориметрические измерения производились после 48 ч. инкубации яичек при этой температуре.

Образец № 4. Калориметрические измерения производились за восемь часов до выхода гусениц из яйцевых оболочек.

На рисунке представлен процесс теплопоглощения при размораживании грены шелкопряда. Как видно из рисунка, при чувствительности,

характеризующей нашу установку, теплопоглощение может быть зарегистрировано начиная с -22°C . Теплопоглощение длится вплоть до $-0,5^{\circ}\text{C}$. Такая растянутость процесса размораживания характерна для всех исследованных нами биологических объектов [10—12] и говорит о микрогетерогенности системы в замороженном состоянии. Результаты определений теплового эффекта размораживания исследованных образцов суммированы в таблице.

Таблица

Образец №	Парциальная удельная эн- тальпия пла- вления	Парциаль- ная удель- ная энтро- пия плавл- ения	Разность энтропии в пересчете на 1 г су- хого веса	Количество связанной воды на 1 г су- хого веса
	Н, кал. ¹	э. е. ²	э. е.	
1	62,99	0,2316	-0,1046	0,359
2	64,56	0,2373	-0,0996	0,341
3	69,28	0,2547	-0,0578	0,232
4	71,36	0,2623	-0,0529	0,181

Как видно из таблицы, энтальпия и энтропия размораживания воды во всех исследованных образцах намного меньше энтальпии и энтропии плавления льда. Для энтропии в пересчете на 1 г сухого веса эта разность составляет значительную величину (четвертая графа таблицы).

В предыдущих работах [11—12] нами было показано, что наблюдаемый дефицит энтропии при размораживании биосистем означает, что упорядоченность воды, содержащейся в исследованных системах, выше упорядоченности обычной воды. Было показано также, что механизм стабилизирующего действия различных тканей на воду не может существенно отличаться от механизма действия различных макромолекул в водных растворах и вода в биосистемах гетерогенна по своему состоянию. Поэтому ее упорядоченность мы характеризовали количеством „связанной“ воды ³.

Как видно из приведенной таблицы, количество связанной воды в процессе развития гренс шелкоприда значительно изменяется. В то время, как количество связанной воды на начальной стадии развития приближается к величине гидратации некоторых макромолекул в растворе [10], конечное значение количества „связанной“ воды (к концу эмбриогенеза) в два раза меньше этой величины.

¹ Удельная теплота плавления льда $H = 79,7$ кал.

² Удельная энтропия плавления льда $S = 0,2919$ э. е.

³ Под „связанной“ водой подразумевается та часть воды, которая не кристаллизуется в лед при понижении температуры и не плавится при последующем прогреве.



Для объяснения этого эффекта вопрос о состоянии и роли воды в процессе эмбрионального развития необходимо рассмотреть в тесной связи с общей проблемой структурного взаимодействия между растворенными веществами (макромолекулы, электролиты, неэлектролиты и др.) и окружающей их водной средой.

Совершенно очевидно, что процесс эмбрионального развития характеризуется особенно интенсивными изменениями структуры системы, вследствие необходимости синтеза многих жизненно важных макромолекул. Эти изменения не полностью обусловлены внешними условиями и связаны с наличием внутренних, относительно автономных механизмов, реализующих определенную генетическую программу [13—14]. Можно предположить, что изменения структуры неводных компонентов (например, структуры макромолекул), сопровождающиеся перестройкой различных групп на их поверхности, должны приводить к изменению упорядоченности воды, содержащейся в системе. Специфическое взаимодействие между молекулами воды является причиной того, что всякое локальное возмущение в структуре воды может распространиться на большие области и влиять на характер реакций, протекающих в системе [15].

При отсутствии в системе каких-либо процессов, любой параметр, который характеризует степень упорядоченности воды в этой системе (например, количество «связанной» воды), принимает некоторое значение, соответствующее термодинамически равновесному состоянию системы. Такому состоянию соответствует, очевидно, период зимовки грены пшкóприда, когда отсутствуют активные метаболические процессы, и состояние зародыша остается неизменным. Если в системе протекает какая-либо реакция, в результате которой меняются концентрация и структура веществ, то должна меняться и степень упорядоченности воды [15]. Как видно из данных, приведенных в таблице, в процессе эмбриогенеза грены в системе протекают реакции, продукты которых уменьшают количество молекул воды, находящихся под влиянием различных структурных элементов. Таким образом, процесс зародышевого развития сопровождается перестройкой структурированных зон воды и приводит к значительной дегидратации неводных компонентов.

Обычно образование «кристаллической» решетки гидратной воды в биосистемах приписывают совместному локальному и дальнедействующему кооперативному воздействию различных групп, имеющих на поверхности макромолекул, на структуру воды [16—19]. Конфигурация же макромолекул обеспечивает наименьшую свободную энергию и наибольшую энтропию системы, выключаящей макромолекулу и окружающую ее воду [18]. Если принять во внимание тот факт, что в биосистемах основными связывающими воду соединениями являются макромолекулы, то для объяснения потери значительной части гидратной воды неводных компонентов в процессе эмбриогенеза можно предположить следующее.

Уменьшение количества „связанной“ воды в процессе зародышевого развития означает, что реакции, протекающие в системе, приводят к уменьшению количества активных групп, взаимодействующих с водой; другими словами, уменьшается общая поверхность соприкосновения макромолекул с молекулами воды. Этот вывод нельзя считать неожиданным. Известно, что образование сложных субклеточных структур, имеющих квазикристаллическое строение, происходит в результате образования упорядоченных ассоциатов из нескольких субъединиц (например, из молекул белков определенной конформации) и последовательного включения одних субструктур в другие [20, 21]. Такие ассоциаты могут образоваться при помощи невалентных [22], например, гидрофобных связей. Образование же гидрофобной связи влечет за собой перестройку структуры воды [17]. Таким образом, построение тех или иных органов и тканей развивающегося зародыша происходит в результате агрегации (концентрирования) различных форм неводных компонентов и сопровождается уменьшением количества молекул воды, образующих структурированные, гидратные оболочки.

Публикуемое сообщение следует рассматривать как предварительное, не претендующее на окончательные выводы и заключения. Однако сам факт значительного изменения количества связанной воды в процессе развития организма может помочь выяснению закономерностей возникновения надмолекулярных структур в этом процессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Bernal, The Structure of Water and its Biological Implications. In: "The State and Movement of Water in Living Organisms". Symp. on the Soc. for Experimental Biology, 1965, 19.
2. Oscar Hechter, Ann. N. Y. Acad. Sci., 125, № 2, 1965, 625.
3. Ling G. Ning, Ann. N. Y. Acad. Sci., 125, № 2, 1965, 401.
4. А. Сент-Дьердьи. Биоэнергетика, М., 1960.
5. L. Pauling, Science, 134, 1961, 15.
6. Herman E. C. Berendsen, Federat. Proc. 25, № 3, P. 1, 1966, 971.
7. П. Л. Привалов, Биофизика, 3, 1958, 738.
8. И. Клотц, в сб. „Горизонты биохимии“, М., 1962.
9. П. Л. Привалов, Г. М. Мревлишвили, Биофизика, II, № 6, 1966, 951.
10. П. Л. Привалов, Г. М. Мревлишвили, Биофизика, 12, № 1, 1967, 22.
11. Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, П. Л. Привалов, в сб. „Биофизика мышечного сокращения“, М., 1966.
12. Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, П. Л. Привалов, Докл. АН СССР, т. 171, № 5, 1966, 1193.
13. Х. Равен. Оогенез, Накопление морфогенетической информации. Изд-во „Мир“, М., 1964.
14. А. Нейфах, в сб. „Общая генетика“, изд-во „Наука“, М., 1965.
15. Ю. П. Сырников, в сб. „Структура и роль воды в живом организме“, Изд-во Ленинградского ун-та, 1966, 58.



16. I. Klotz, *Federat. Proc.* 24, 1965, № 2.
17. G. Nemethy, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 66, 1962, 1773.
18. N. Kausman, *Advan. Protein Chem.*, 14, 1959, 1.
19. A. G. Ouston, *Federat. Proc.*, 25, № 3, P. 1, 1966, 993.
20. Дж. Бернал, Градация структурных единиц при биопоэзе, Тр. симп. „Возникновение жизни на Земле“. Изд. АН СССР, 1961.
21. В. А. Энгельгарт, Перспективы молекулярной генетики, в сб. „Актуальные вопросы современной генетики“. Изд. МГУ, 1966.
22. I. Monod, *Ann. Biol.*, 4, № 3-4, 1955, 231.

G. M. MREVLISHVILI

CALORIMETRIC STUDIES OF WATER STATE IN SILKWORM EGGS DURING THEIR DEVELOPMENT

Summary

Physical state of water is studied in silkworm eggs during their development by means of calorimetric method worked out to study water state in biosystems. It is shown that the amount of "bound" water changes greatly during the development of silkworm eggs. While at an initial state the amount of bound water approaches the value of hydration of some molecules in solutions (0.35 g of H_2O/g of dry weight), the final amount of bound water (by the end of embryogenesis) is twice as small as the value mentioned. The author suggests that a decrease of the amount of bound water during embryo development means that reactions taking place in the system lead to a decrease of the number of main groups interacting with water; in other words, the total surface of the contact between non water components (in particular of macromolecules) and water molecules decreases.

A special role of hydrophobic bounds in formations of complex sub-cellular structures with quasicrystalline structure is emphasized. A conclusion is made that the formation of one organ or other as well as of tissues takes place in a developing embryo due to aggregation (concentration) of different forms of non water components and is followed by a decrease of the number of water molecules forming structural hydratic shells.

Г. Д. ТУМАНИШВИЛИ, Н. В. САЛАМАТИНА

ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ЯДЕРНОЙ ФРАКЦИИ ГОМОГЕНАТА ПЕЧЕНИ ВЗРОСЛОЙ КУРИЦЫ НА СКОРОСТЬ РОСТА ПЕЧЕНИ 11-ДНЕВНОГО КУРИНОГО ЗАРОДЫША

За последнее время нами получены факты, свидетельствующие о том, что клеточные ядра и цитоплазма несут различную функцию в регуляции скорости роста печени куриного зародыша. В частности, ядерная фракция, выделенная из гомогената печени взрослой курицы, вызывает, как правило, задержку в скорости деления клеток печени 11-дневного куриного зародыша и уменьшение скорости синтеза ДНК [1,2].

Поскольку во всех проведенных ранее исследованиях мы пользовались фракцией целых ядер, естественно, мы не имели возможности установить, какие вещества (а быть может вещество) ответственно за упомянутые явления. Целью настоящей работы было получение некоторых предварительных сведений о ядерном факторе, тормозящем деление клеток и синтез ДНК.

МАТЕРИАЛ И ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ОПЫТОВ

В данной серии опытов мы пользовались экстрактом ядерной фракции, полученной из гомогената печени взрослой курицы. Все опыты были проведены на куриных зародышах 11-дневной инкубации. Ядерную фракцию получали путем центрифугирования гомогената при 600 g в растворе сахарозы, концентрация которой была равна 0,25 м [3]. К полученной ядерной фракции в отношении 1:1 добавляли 0,14 м раствора хлористого натрия и экстрагировали при температуре 4°C в течение одного часа. Ядерную взвесь центрифугировали при 600 g в течение 10 минут. Полученный экстракт в количестве 0,04 мл (которому соответствовало 5% сухого вещества) вводили в зародыши. Введение производили через отверстие, продланное в скорлупе и кожистой оболочке яиц. В качестве контроля мы пользовались интактными зародышами, т. е. мы не имели возможность убедиться в том, что введение в зародыши 0,14 м раствора хлористого натрия не влияет на их развитие и рост их печени. Опытные и контрольные зародыши забивались одновременно через 3, 6, 12 и 18 часов. Материал фиксировали в фиксаторе Карнуа и после обы-



чной гистологической обработки заливали в парафин. Срезы толщиной 5 микрон окрашивались по Фельгену.

В качестве показателей скорости роста печени куриных зародышей мы пользовались митотической активностью, концентрацией ядер (число ядер в поле зрения), обозначаемых нами через CN (причем для определения фактического числа ядер в срезе пользовались поправочным коэффициентом, дающим возможность учитывать диаметр ядра [4]), относительным весом печени D_n , представляющим собой отношение веса печени к весу целого зародыша, выраженное в процентах от соответствующих контрольных величин, и количеством ДНК на ядро, которое определяли методом фотографической фотометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в 11-дневные куриные зародыши экстракта из ядерной фракции гомогената печени взрослой курицы вызывает падение D_n . Наиболее резкое падение D_n (см. рис. 1), примерно на 10% от величины контрольных зародышей, происходит на 6-й час опыта. Интересно отметить,

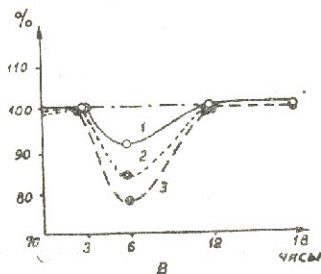


Рис. 1. Изменение относительного веса печени D_n (1), влажного веса (2) и сухого веса (3) после введения в 11-дневные куриные зародыши экстракта ядер печени взрослой курицы. Все показатели выражены в процентах от соответствующих величин, полученных у контрольных зародышей.

что при введении ядерной фракции мы ни разу не наблюдали уменьшение D_n на указанную величину [1]. Ввиду того, что D_n мог изменяться вследствие изменения веса подопытных зародышей, мы учитывали и вес самих зародышей. Однако, как показали результаты измерений (см. таблицу), изменение D_n не является результатом изменения веса самих зародышей, т. е. повышенному относительному весу органа соответствует повышенный средний вес печени зародышей. Падение D_n , по-видимому, является результатом предварительного (3-й час опыта) падения митотической активности (см. рис. 2). Изменения сухого веса печени более или менее соответствуют изменениям ее влажного веса и D_n (см. рис. 1). Все перечисленные выше параметры на 12-й час опыта возвращаются к исходному уровню, не изменяясь до конца опыта.

Изменениям D_n довольно точно соответствует изменение митотической активности и концентрации ядер. Митотическая активность в печени контрольных зародышей в исследуемом промежутке времени (от 3-х до 18

Изменение $D_{п}$, среднего веса зародышей, среднего веса печени и среднего диаметра ядра 11-дневного куриного зародыша после введения экстракта ядерной фракции гомогената печени взрослой курицы

Часы после введения	Число зародышей	Контроль				Экстракт ядерной фракции			
		$D_{п}$	Средний вес зародыша в мг	Средний вес печени в мг	Средний диаметр ядра в μ	$D_{п}$	Средний вес зародыша в мг	Средний вес печени в мг	Средний диаметр ядра в μ
3	15	—	—	—	4.00 ± 0.02	—	—	—	4.76 ± 0.07
6	15	1.78 ± 0.02	4389 ± 120	78 ± 3	3.8 ± 0.10	1.65 ± 0.03	3805 ± 101	68 ± 2	5.2 ± 0.09
12	15	1.77 ± 0.01	4854 ± 139	84 ± 1	3.7 ± 0.06	1.79 ± 0.01	4409 ± 97	78 ± 3	5.03 ± 0.10
18	15	1.88 ± 0.02	5216 ± 151	87 ± 4	3.8 ± 0.12	1.95 ± 0.01	4192 ± 144	99 ± 5	4.2 ± 0.16

часов) проявляет довольно большую стабильность. Она колеблется в пределах $4,9 \pm 0,1$ митоза на 1000 клеток.

При воздействии экстрактом ядерной фракции уже на 3-й час опыта количество митозов на 1000 клеток падает

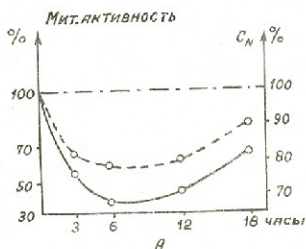


Рис. 2. Изменение митотической активности (сплошная линия) и концентрации ядер (пунктирная линия) в печени 11-дневного куриного зародыша после введения в него экстракта ядерной фракции гомогената печени взрослой курицы. Числа выражены в процентах от соответствующих величин, полученных у контрольных зародышей.

до 50% и достигает минимума на 6-й час опыта (37%), после чего вновь начинается повышение митотической активности (см.рис. 2).

Введение в зародыши экстракта ядерной фракции оказало более рез-

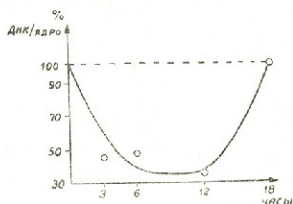


Рис. 3. Изменение среднего количества ДНК в ядрах печени 11-дневного куриного зародыша после введения в него экстракта ядер печени взрослой курицы. Числа выражены в процентах от соответствующих величин, полученных у контрольных зародышей.



кое, по сравнению с ядерной фракцией, влияние и на концентрацию ядер, и на их диаметр. Как видно из таблицы, непосредственным следствием введения экстракта ядерной фракции является повышение среднего диаметра ядер печени зародышей по сравнению с соответствующим контролем. По-видимому, экстракт ядерной фракции не только подавляет митотическую активность и понижает концентрацию ядер, но и приводит также к некоторому увеличению объема цитоплазмы.

Ядерный экстракт оказывает заметное влияние и на среднее количество ДНК в ядрах печени зародышей-реципиентов. Уже в третьему часу после введения экстракта в зародыши количество ДНК на ядро печени зародыша оказывается вдвое меньше обычного, а к 12-му часу оно составляет лишь 35% от этой же величины в контроле. Столь резкое понижение количества ДНК в ядрах сравнимо лишь с падением количества ДНК в ядрах зародышей летальных мутантов [5]. Однако его не удается объяснить изменениями, предшествующими гибели зародышей, поскольку на 18-й час опыта среднее количество ДНК в ядрах печени зародышей, подвергшихся воздействию экстрактом, возвращалось к исходному уровню (см. рис. 3).

Очевидно также, что наблюдаемое нами падение среднего количества ДНК на ядро не может быть объяснено только подавлением синтеза ДНК под влиянием введенного в зародыши ядерного экстракта. Подавление синтеза ДНК могло вызвать истощение запаса клеток, находящихся в G_2 фазе [6]. Однако грубый подсчет показывает, что при митотическом индексе 6/1000 за 12 часов оказывается поделившимися не более 10% всех клеток. Даже если предположить, что за 12 часов опыта делились лишь клетки, относящиеся к популяции G_2 , а синтез ДНК в клетках был полностью подавлен, уменьшение среднего количества ДНК в ядрах печени зародышей не должно превышать 10%. Между тем, введение в зародыши экстракта ядер печени взрослой курицы ведет к падению митотической активности (см. рис. 2). В таких условиях уменьшение количества ДНК в ядрах за счет популяции G_2 должно было быть еще меньше.

В этом отношении небезынтересно сопоставить гистограммы числа ядер с различным количеством ДНК, полученные в различные сроки опыта (см. рис. 4.) Такое сопоставление показывает, что падение среднего количества ДНК происходит не только за счет уменьшения числа клеток с относительно большим количеством ДНК. Под влиянием экстракта ядер печени взрослой курицы в печени зародыша-реципиента наиболее вероятное количество ДНК сдвигается влево. К 12-му часу опыта наиболее вероятными становятся ядра, содержащие ДНК вдвое меньше, чем содержало максимальное число клеток на 3-й час опыта. К 18-му часу опыта

имеет место перемещение максимума числа клеток в сторону относительно больших количеств ДНК. Как показали расчеты, описанное явление не является следствием изменения диаметра ядер и изменения числа фрагментов ядер, попавших в срез.

Поскольку в печени куриного зародыша максимальное число клеток

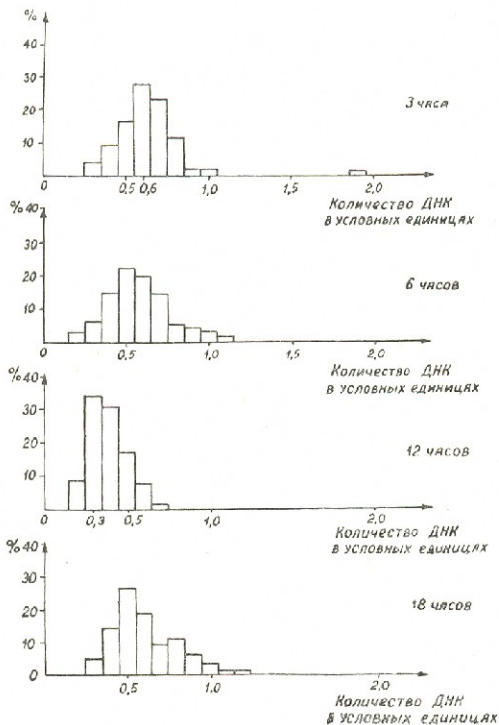


Рис. 4. Процентное содержание клеток с различным количеством ДНК в их ядрах в печени 11-дневного куриного зародыша после введения в него экстракта ядер печени взрослой курицы. Сроки опыта отмечены на рисунке. Количество ДНК выражено в условных единицах

составляют диплоидные клетки, то создается впечатление, что под воздействием ядерного экстракта (через 12 часов после его введения) в печени зародышей появляются клетки, содержащие ДНК в количестве, соответ-



ствующем гаплоидным ядрам. Такое состояние ткани обратимо, и по истечении определенного времени исходное положение дел восстанавливается.

В настоящее время для объяснения обнаруженных нами изменений количества ДНК в печени куриного зародыша могут быть выдвинуты два предположения: либо под влиянием ядерного экстракта, наряду с подавлением синтеза ДНК, происходит интенсивное разрушение ДНК, либо вследствие действия ядерного экстракта ДНК в ядрах печени зародышей становится частично Фельген-отрицательной. В настоящее время проводятся опыты по проверке выдвинутых предположений.

Как мы видим, действие экстракта ядер печени взрослой курицы весьма схоже с действием ядерной фракции печени взрослой курицы. Введение в зародыш ядерного экстракта, как и введение в них ядерной фракции печени взрослой курицы, влечет за собой заметное угнетение роста печени зародышей. Наряду с этим, как ядерный экстракт, так и фракции целых ядер вызывают понижение среднего количества ДНК на ядро в печени зародышей-реципиентов.

Полученные данные позволяют предположить, что ядра клеток печени взрослой курицы содержат фактор, тормозящий размножение клеток печени и понижающий количество ДНК в их ядрах, который может быть извлечен из ядер путем экстракции 0,14 м раствором хлористого натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. D. Tumanishvili, N. V. Salamatina, J. Embr. exp. Morphol., 20, 53, 1968.
2. Н. В. Саламатина, Г. Д. Туманишвили, Сб. „Вопросы биофизики и теоретич. биологии“, Изд. ТГУ, 1968, в. I, стр. 25.
3. G. H. Hogeboom, W. C. Schneider, M. L. Stribich, J. Biol. Chem., 196, 111, 1952.
4. M. Abercrombie, Anat. Rec., 94, 239, 1946.
5. P. S. Chen, N. Farinella—Feruzza, Olhafen—Gandolla. Exp. Cell Res. 31, 538, 1963
6. S. Gelfant, In: "Methods in cell physiology", Ed. by D. M. Prescott, Acad Press Inc., New York, 2, 359, 1966.

G. D. TUMANISHVILI, N. V. SALAMATINA

ACTION OF NUCLEAR FRACTION EXTRACT OF ADULT HEN LIVER HOMOGENATE ON THE RATE OF 11-DAY OLD CHICK EMBRYO LIVER GROWTH

Summary

At an incubation of nuclear fraction of adult hen liver homogenate with the solution of sodium chloride (0.14 M) a factor is accumulated in the solution which at an injection to 11-day old chick embryo inhibits



the liver growth of the latter. Inhibition of embryo liver growth an injection of nuclear extract is manifested by a decrease of mitotic activity, nuclear concentration in the liver and by a decrease of its weight.

An injection of nuclear extract in embryos causes a decrease of DNA mean amount per a nucleus of embryo liver recipient. A decrease of DNA amount is so great (the DNA amount per nucleus of the liver of injected by the extract embryos is 63% as small as in the control) that it cannot be explained only by the depression of DNA synthesis. There exist the following possibilities to explain the fact observed: 1. DNA is destroyed under the action of the nuclear extract; 2. The nuclear extract causes transition of a part of DNA into some other Fölgel-negative state.



Г. Д. ТУМАНИШВИЛИ, В. А. ГОГИЧАИШВИЛИ

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ЯДЕРНОЙ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ФРАКЦИЙ ПЕЧЕНИ КУРИНОГО ЗАРОДЫША НА РОСТ ПЕЧЕНИ ЗАРОДЫШЕЙ ОДИННАДЦАТИ ДНЕЙ ИНКУБАЦИИ

Недавно было установлено, что ядерная и цитоплазматическая фракции гомогената печени взрослой курицы, будучи введенными в 11-дневные куриные зародыши, влияют на рост последних диаметрально противоположным образом.

Цитоплазматическая фракция повышает митотическую активность и концентрацию ядер, увеличивает относительный, абсолютный и сухой вес печени зародышей-реципиентов. Ядерная фракция, напротив, подавляет рост печени зародышей [1—3]. Однако, подавляя рост печени зародышей в целом, ядерная фракция в некоторых случаях ускоряет цитоплазматический рост, вследствие чего вес печени зародышей-реципиентов может несколько увеличиваться [1—3].

Вместе с тем было замечено, что рост-тормозящее влияние значительно меньше выражено у ядер печени 11-дневного куриного зародыша.

Для выявления их рост-тормозящих свойств приходится прибегать к специальным экспериментальным приемам. В то же время, рост-стимулирующая способность цитоплазмы печени 11-дневного куриного зародыша оказалась выраженной меньше, чем цитоплазматическая фракция печени взрослой курицы [1—3].

Упомянутые факты привели нас к заключению, что способность ядерной и цитоплазматической фракций печени влиять на скорость роста печени 11-дневного зародыша меняется в ходе развития зародыша, постепенно приближаясь к «взрослому типу» влияния. Настоящее сообщение включает в себя результаты первых опытов, намеченных для решения поставленной задачи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Разделение гомогената печени зародышей производилось по методу Шоно [4]. С этой целью печень зародышей гомогенизировалась при помощи гомогенизатора Поттера-Эльвейема в растворе сахарозы, плотность которого равнялась 1, 273 (2,2M). Гомогенат фильтровался через



двойной слой марли и центрифугировался при 15000 г. Полученная ядерная фракция представляет собой цитоплазматическую фракцию, содержащий ядра, промывался раствором сахарозы и повторно центрифугировался при 18000 г. Чистота полученной таким образом ядерной фракции проверялась под микроскопом, для чего приготавливались мазки, окрашенные метиленовым синим.

С целью введения какой-либо из полученных фракций в зародыши скорлупу яйца и его кожистую оболочку прокалывали иглой и в проделанное отверстие вводили соответствующую фракцию при помощи микропипетки. Объем введенной жидкости был равен 0,04 мл. Используемые фракции содержали одинаковое количество сухого вещества (7%).

В каждый зародыш, таким образом, вводили по 2,8 мг сухого вещества.

В опытах нами определялись:

1. Митотическая активность (М). Для этого определяли митотический коэффициент, равный числу митозов на 1000 клеток. Митозы считали в 15 полях зрения, что, в среднем, составляло приблизительно 2500 клеток на печенку.

2. Концентрация ядер (C_n) выражалась нами посредством числа ядер в поле зрения. Для подсчета истинного числа ядер в среде нами вводилась поправка на диаметр ядер (см. [5]). Диаметр ядер измеряли окуляр-микрометром. Всего измерялось 100 ядер на зародыш.

3. Относительный вес печени зародышей (D_n) представляет собой отношение веса печени к весу зародыша, выраженное в ‰. Поскольку D_n может изменяться вследствие изменения веса зародышей, D_n следует сопоставлять с весом зародышей и с весом печени. Эти показатели внесены в таблицу.

С целью приготовления микроскопических препаратов фиксацию печени зародышей производили по методу Карнуа. Затем фиксированные кусочки заливали в парафин. Нами приготавливались срезы толщиной 5 мк. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

Зародыши делились на 3 группы. В одну из них вводилась цитоплазматическая фракция печени, во вторую — ядерная фракция, а третья не подвергалась никаким воздействиям и служила контролем. Как известно, введение в зародыши раствора сахарозы не вызывает никаких изменений в их печени [6].

Было проведено два опыта: 1) 11-дневные куриные зародыши подвергались воздействию цитоплазматической и ядерной фракций печени 11-дневных куриных зародышей; 2) 11-дневные куриные зародыши были инъецированы фракциями печени 18-дневного куриного зародыша.

В первом опыте зародыши вскрывались и фиксировались на 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 и 48 часы после введения в зародыши соответствующих фракций. Во втором опыте вскрытие зародышей производилось на 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 и 42 часы после введения фракций в зародыши. Контрольные зародыши исследовались в те же сроки.



Для определения митотической активности, концентрации ядер и среднего диаметра ядер в каждой группе было исследовано по 5 зародышей на каждый срок опыта. Относительный вес определялся путем исследования по 15-ти зародышей на срок в каждой группе в первом опыте и по 10-ти зародышей — во втором.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

1. Действие ядерной и цитоплазматической фракций печени 11-дневного куриного зародыша на рост печени зародышей того же возраста.

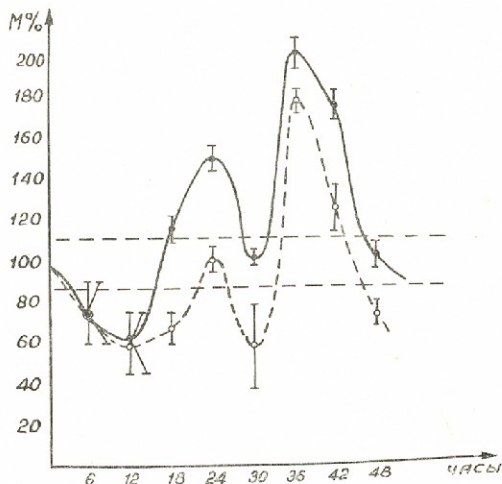


Рис. 1. Изменение митотической активности (М) в печени 11-дневного куриного зародыша после введения в него цитоплазматической (пунктир) и ядерной (сплошная линия) фракций печени 11-дневного куриного зародыша. На рисунке обозначены ошибки средних величин. Пунктирными линиями, параллельными оси абсцисс, дана средняя величина ошибки среднего в контроле. Числа даны в процентах от соответствующих величин, полученных в контрольной группе.

Проведенные опыты показали, что торможение митотической активности в печени зародышей-реципиентов вследствие введения в них ядерной фракции печени 11-дневного куриного зародыша несомненно имело место. Митотическая активность в этом случае оказалась пониженной в первые 12 часов опыта. Однако в дальнейшем наступила вторая фаза действия ядерной фракции, выражающаяся в повышении митотической



активности. При этом, в данном периоде опыта митотическая активность волнообразно менялась, оставаясь несколько повышенной до конца опыта (рис. 1).

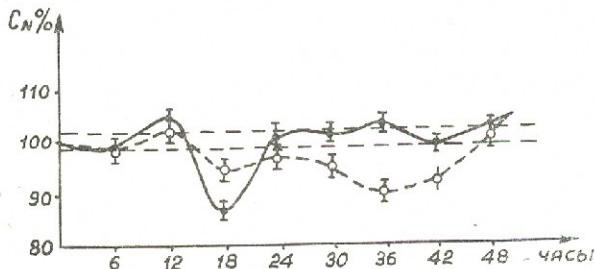


Рис. 2. Изменение концентрации ядер (C_N) в печени 11-дневного куриного зародыша после введения цитоплазматической и ядерной фракций печени 11-дневного куриного зародыша. Обозначения те же, что и на рис. 1. Числа даны в процентах от соответствующих величин, полученных в контрольной группе.

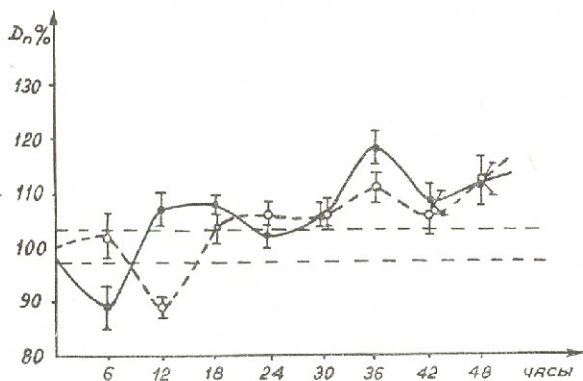


Рис. 3. Изменение относительного веса печени (D_n) 11-дневного куриного зародыша вследствие введения в него цитоплазматической и ядерной фракций печени 11-дневного куриного зародыша. Обозначения те же, что и на предыдущих рисунках. Числа по оси ординат представляют собой проценты от соответствующего контроля.

Что касается концентрации ядер, обычно изменяющейся соответственно митотической активности [1—3], то упомянутое соответствие на-

блюдалось лишь в первой фазе опыта—на 18-ый час опыта C_N оказалась на 15% ниже таковой в контроле. В дальнейшем C_N , вернувшись к исходному значению до конца опыта, оставалась неизменной (рис. 2). Относительный вес печени ($D_п$) после введения в зародыш ядерной фракции печени 11-дневного куриного зародыша сперва понижается, а затем постепенно повышается, достигая максимума к 36-му часу опыта (рис. 3).

Цитоплазматическая фракция печени 11-дневного куриного зародыша, в противоположность цитоплазматической фракции печени взрослой курицы, оказывает на рост печени зародышей-реципиентов действие, очень похожее на действие ядерной фракции. Ее введение в зародыши, подобно введению ядерной фракции, вызывает в первой половине опыта угнетение размножения клеток—митотический коэффициент понижается. Впоследствии митотическая активность испытывает волнообразные колебания, становясь то выше, то ниже исходной величины (рис. 1).

Понижение C_N в случае воздействия цитоплазматической фракцией также имеет место, хотя происходит постепенно и достоверного значения достигает лишь к 36 му часу опыта (рис. 2). $D_п$, вследствие воздействия цитоплазматической фракцией, понижается к 12-му часу опыта, а затем начинает повышаться, хотя и не достигает величины, которая была получена в случае введения в зародыши ядерной фракции (рис. 3).

2. Действие ядерной и цитоплазматической фракций печени 18-дневного куриного зародыша на рост печени зародышей одиннадцати дней инкубации.

Изменения митотической активности в печени 11-дневного куриного зародыша, вызванные введением в него ядерной фракции печени 18-дневных зародышей, по характеру не отличается от таковых, наблюдавшихся в предыдущем опыте. Так же, как и в случае воздействия ядерной фракцией печени 11-дневных куриных зародышей, изменения митотической активности включают в себя две фазы: первая—резкое торможение митотической активности, вторая—постепенное повышение митотической активности, сопровождающееся ее волнообразными изменениями (рис. 4). Однако, если первая фаза опыта мало чем отличается от того, что имело место при применении ядерной фракции 11-дневных зародышей, вторая фаза проявляет некоторые отличия. Последние заключаются в относительно меньших величинах митотического коэффициента, а также в относительно низких значениях концентрации ядер (рис. 4 и 5). Митотическая активность в случае использования ядерной фракции печени 18-дневного куриного зародыша в среднем даже несколько ниже, чем в печени контрольных зародышей. Максимальное же значение митотического коэффициента лишь на 38% превышает соответствующую величину, полученную в контроле, в то время как в опыте с ядерной фракцией печени 11-дневного куриного зародыша максимальное значение митотического коэффициента превышало соответствующую величину контроля на 200% (ср. рис. 1 и 4). Относительный вес печени зародышей вследствие дей-



Таблица

Изменение веса зародышей и веса их печени вследствие введения в них цитоплазматической и ядерной фракции печени 11- и 18-дневных зародышей

Род воздействия	К о н т р о л ь			Цитоплазматическая фракция			Ядерная фракция			
	Число зародышей	Вес зародышей в мг	Вес печени в мг	Число зародышей	Вес зародышей в мг	Вес печени в мг	Число зародышей	Вес зародышей в мг	Вес печени в мг	
Фракция печени 11-дневного зародыша	6	5046 ± 13	94 ± 3	10	5236 ± 9	95 ± 5	10	5228 ± 17	87 ± 5	
	12	5298 ± 12	103 ± 3	13	5790 ± 12	97 ± 2	12	6295 ± 15	114 ± 2	
	18	6122 ± 9	106 ± 4	13	6046 ± 12	109 ± 4	15	5844 ± 11	113 ± 3	
	24	6962 ± 18	128 ± 6	15	6570 ± 13	132 ± 4	15	7110 ± 5	130 ± 8	
	30	6828 ± 11	124 ± 4	14	6559 ± 15	132 ± 5	12	7633 ± 12	146 ± 3	
	36	7250 ± 16	129 ± 4	12	6904 ± 16	132 ± 5	11	6594 ± 27	136 ± 4	
	42	8072 ± 31	165 ± 7	14	8936 ± 19	173 ± 8	14	8512 ± 22	171 ± 5	
	48	9373 ± 21	183 ± 20	13	9770 ± 18	193 ± 5	12	9000 ± 31	192 ± 10	
	Фракция печени 18-дневного зародыша	8	2783 ± 16	52 ± 5	10	2944 ± 17	61 ± 8	10	3150 ± 19	57 ± 9
		6	2940 ± 16	59 ± 5	10	3010 ± 7	67 ± 3	10	3180 ± 15	62 ± 7
9		3110 ± 12	61 ± 5	10	3130 ± 17	76 ± 15	9	3100 ± 10	56 ± 2	
12		3370 ± 12	69 ± 2	9	3420 ± 7	80 ± 2	6	3310 ± 14	64 ± 3	
18		4330 ± 11	93 ± 3	10	4284 ± 14	92 ± 9	7	4380 ± 16	97 ± 3	
24		4820 ± 11	95 ± 2	8	4400 ± 16	90 ± 2	7	4537 ± 25	96 ± 3	
30		6390 ± 4	127 ± 6	10	6720 ± 19	142 ± 4	10	6180 ± 12	122 ± 6	
36		6412 ± 23	131 ± 5	10	6746 ± 18	148 ± 4	7	6157 ± 19	134 ± 4	
42		7617 ± 15	146 ± 3	9	7246 ± 20	152 ± 5	7	7685 ± 24	157 ± 9	

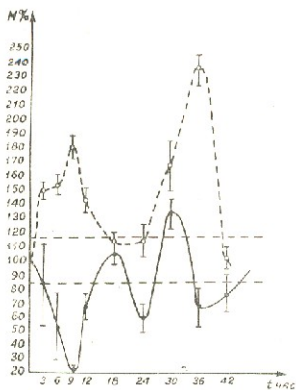


Рис. 4. Изменение митотической активности (M) в печени 11-дневного куриного зародыша вследствие введения в него цитоплазматической и ядерной фракций печени 18-дневного зародыша. Обозначения те же, что и на предыдущих рисунках. Числа выражены в процентах от соответствующих величин контроля.

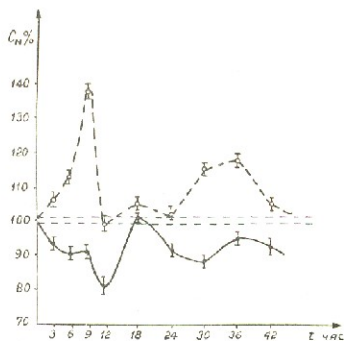


Рис. 5. Изменение концентрации ядер (C_N) в печени 11-дневного куриного зародыша вследствие воздействия цитоплазматической и ядерной фракций печени 18-дневного куриного зародыша. (Обозначения см. на предыдущих рисунках).

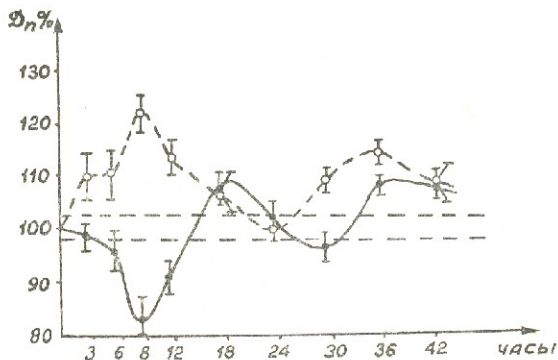


Рис. 6. Изменение относительного веса печени (D_n) 11-дневного куриного зародыша вследствие действия ядерной и цитоплазматической фракций печени 18-дневного куриного зародыша. (Обозначения те же, что и на предыдущих рисунках).



ствия ядерной фракции в первой фазе опыта падает. Вторая фаза характеризуется небольшими колебаниями D_1 , однако, в этом случае вынается меньше, чем при воздействии ядерной фракцией печени 11-дневного зародыша.

Характер действия цитоплазматической фракции печени 18-дневного куриного зародыша на рост печени 11-дневного зародыша существенно отличается от того, что мы наблюдали в предыдущем опыте. Цитоплазматическая фракция вызывает несомненное ускорение роста печени зародышей-реципиентов. Митотическая активность, C_N и D_1 при этом повышаются (рис. 4, 5 и 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показали проведенные опыты, действие ядерной фракции на скорость роста 11-дневного куриного зародыша с развитием зародыша не претерпевает коренных изменений. Как ядра печени зародышей двух исследованных возрастов (11 и 18 дней), так и ядра печени взрослой курицы [см. 1—3] вызывают подавление митотической активности в течение первых 12 часов после их введения в зародыши. Действие ядерной фракции печени зародышей разного возраста все же различно. Различия имеют место во второй фазе опыта, когда митотическая активность ритмично колеблется, достигая временами высоких значений. Чем старше зародыши, тем меньше становится средняя величина митотического коэффициента во второй фазе опыта; понижается также максимальное значение митотического коэффициента (рис. 4). При введении в зародыш ядерной фракции взрослой курицы во второй фазе опыта не наблюдается ни повышения митотической активности, ни ее колебаний [1—3].

Природа второй фазы изменений, наступающих в печени зародышей при введении в них ядерной фракции печени зародышей, неизвестна и исследуется в настоящее время.

Нельзя, однако, отрицать, что ядра печени 11-дневных зародышей проявляют более слабую рост-тормозящую активность, чем ядра печени взрослой курицы; это достаточно убедительно показано ранее [1—3]. По всей вероятности такое усиление рост-тормозящих свойств ядер печени с возрастом обусловлено изменениями во второй фазе опыта.

Более существенные изменения с возрастом зародышей претерпевает действие цитоплазматической фракции печени на рост гомологичного органа. Цитоплазматическая фракция печени 11-дневных зародышей вызывает торможение роста печени зародышей того же возраста, проявляя в этом отношении большое сходство с ядерной фракцией печени. То, что в этом случае средняя величина митотического коэффициента при введении в зародыши цитоплазматической фракции несколько меньше, чем при введении ядерной, еще не означает, что цитоплазматическая фракция сильнее угнетает митотическую активность в печени зародышей-реципиентов. Если предположить, что соответствующие изменения наступают при воздействии цитоплазматической фракцией не-

сколькo позже, чем при использовании ядерной, окажется, что мы каждый раз фиксируем зародыши либо когда максимум митотической активности уже миновал, либо когда он еще не наступил. Тем не менее, в изложенных выше опытах цитоплазматическая фракция печени 11-дневного зародыша угнетает рост печени 11-дневного зародыша, чего не наблюдается в случае использования цитоплазматической фракции печени 18-дневных зародышей. Тормозящее влияние цитоплазматической фракции печени 11-дневного зародыша не имело места в опытах, проведенных ранее [1—3]. Одной из возможных причин изложенных фактов может быть перемешивание ядерных и цитоплазматических факторов при разделении гомогената на фракции. Такое предположение тем более правдоподобно, что в упомянутых нами опытах [1—3] разделение на фракции производили иным способом, при котором выделенная ядерная фракция оказывается несколько менее чистой, чем при использованном нами способе, но зато центрифугирование происходит в течение более короткого времени и вероятность перемешивания цитоплазматических и ядерных факторов значительно меньше. Правда, при таком объяснении приходится сделать спекулятивное предположение об изменении физико-химических свойств ядерных оболочек в процессе развития зародышей. В противном случае различия в характере действия цитоплазматической фракции печени зародышей разного возраста остались бы необъяснимыми.

Обнаруженные нами факты, вне всякого сомнения, требуют дальнейшего исследования.

Вместе с тем следует считать доказанным, что на 18-ый день инкубации цитоплазматическая и ядерная фракции печени зародышей оказывают на рост печени такое же действие, как и соответствующие фракции печени взрослой курицы. Рост тормозящее же влияние ядерной фракции достаточно хорошо выражено уже у 11-дневных зародышей, что позволяет приписать ядерным факторам определяющую роль во внутритканевой регуляции роста органов [см. 1—3 и 6—7].

ЛИТЕРАТУРА

1. G. D. Tumanishvili, A. "Control of Cellular growth in adult organisms", Ed. H. Teir and T. Rytömaa, Acad. Press, New-York and London, 1967, 59.
2. Н. В. Саламатина, Г. Д. Туманишвили, Журн. общ. биол. (в печати).
3. G. D. Tumanishvili, N. V. Salamatina, J. Embryol. Exp. Morphol. 20, 63, 1968.
4. J. Chauveau, Y. Moulé, G. Rouiller, Exp. Cell Res. 11, 317, 1956.
5. M. Abercrombie, Anat. Rec., 94, 239, 1946.
6. Г. Д. Туманишвили, Некоторые вопросы регуляции роста живых тканей. Изд. "Медицинера", Тбилиси, 1965.
7. Г. Д. Туманишвили, в сб: Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы. Изд. "Наука", Москва, 1965, стр. 204.

G. D. TUMANISHVILI, V. A. GOGICHAISHVILI

PECULIARITIES OF ACTION OF CHICK EMBRYO NUCLEAR
AND CYTOPLASMIC LIVER FRACTIONS ON GROWTH OF
11-DAY OLD CHICK EMBRYO LIVER

SUMMARY

11- and 18-day old chick embryo liver nuclear and cytoplasmic fractions were injected to 11-day old chick embryos. As a result of nuclear fraction injection the mitotic activity reduces during the first 12 hours. The concentration of nuclei in liver as well as the liver weight decrease correspondingly. Inhibition of 11-day old chick embryo liver growth is caused by the liver nuclear fraction of both 11-day old and 18-day old embryos. Following the phase of inhibition the second phase of liver tissue response takes place: fluctuations of mitotic activity are created and the latter becomes often appreciably higher than the control value. In case of use of 18-day old embryo nuclear fraction the mean and the maximum value of the mitotic coefficient is lower than at the use of 11-day old chick embryo liver nuclear fraction. One may think that an increase of growth inhibiting capacity of liver nuclei with the embryo age is caused by the changes in the second phase of the reaction in response nuclear fraction injection.

Cytoplasmic liver fraction of 11-day old chick embryo causes inhibition of 11-day old chick embryo liver growth. At the same time cytoplasmic liver fraction of 18-day old chick embryo causes an appreciable stimulation of liver growth for embryos-recipients. May be growth inhibiting capacity of cytoplasmic liver fraction of 11-day old embryo is the consequence of mixing up of cytoplasmic and nuclear factors during the separation of the homogenate into fractions.

The experiments have shown that already nuclei of 11-day old chick embryo liver show growth inhibiting action and that allows to attribute to them a definite role in intratissular regulation of organ growth.

И. Л. КАЛАНДАДЗЕ,
 М. М. ЗААЛИШВИЛИ, И. Ш. НАДИРАШВИЛИ

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК ЧИСТЫХ ЯДЕР ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

Получение чистых ядер мышечной ткани долгое время представляло трудную задачу [1, 2]. Первая попытка выделить ядра из скелетных мышц центрифугированием гомогената при $1,5 \times 10^4 g$ в 2,2 М растворе сахарозы принадлежит Рагозкину и др. [3]. Однако полученная ими фракция не является чистой. Заалишвили и Гачечиладзе [4] с целью получения чистых ядер и миофибрилл центрифугирование мышечного гомогената проводили при $1,2 \times 10^5 g$ в 2,2 М растворе сахарозы. В сильном центробежном поле разделение миофибрилл (уд. в. $d=1,2$), от ядер ($d=1,4$) было полным. Полученная фракция ядер не содержала примеси миофибрилл и других ингрдиентов клетки. Одновременно с Заалишвили и Гачечиладзе [4] Эдельману и сотр. [1] удалось получить препарат чистых ядер из поперечно-полосатых мышц, применяя метод центрифугирования гомогената при $1,6 \times 10^4 g$ в 2,2 М растворе сахарозы. Получение чистых ядер даст возможность изучить физико-химические и ферментные свойства составных компонентов ядер.

Целью настоящей работы является изучение физико-химических свойств ДНК чистых ядер скелетных мышц.

МЕТОДИКА

Получение чистых ядер поперечно-полосатых мышц производилось по ранее описанной методике [4].

Мышцы (*m. psoas*) кролика дважды проводились через охлажденную мясорубку и к полученному фаршу добавлялось 10 объемов холодного раствора, содержащего 0,32 М сахарозы, $MgCl_2$, 5×10^{-3} М и 10^{-2} М гистидиновый буфер (рН=7). Все дальнейшие процедуры проводились также при 0°. Фарш гомогенизировался сначала в гомогенизаторе Уоринга (5×10^3 об/мин) в продолжение 3 мин, а затем в гомогенизаторе Хагана-Поттера-Эльвейема (зазор — 0,2 мм) с тефлоновым нестиком в течение 8,5 мин. Суспензия быстро процеживалась через капроновое сито (100 меш) и центрифугировалась при $6 \times 10^2 g$ в продолжение 15 мин. Полученный осадок вновь суспендировался в 10 объемах вышеуказанного раствора и центрифугировался при $6 \times 10^3 g$ в продолжение 15 мин. Для разделения ядер и миофибрилл полученный осадок суспендировался в 20 объемах



2,2 М сахарозы (уд. в. $d=1,28$) и центрифугировался в ультрацентрифуге VAC-60 при $1,2 \times 10^5 g$ в течение 90 мин.

Чистота препарата ядер контролировалась как световым ($\times 580$), так и электронным микроскопами УЕМ-6с ($\times 32000$).

ДНК из чистых ядер мышечной ткани выделялось по несколько измененному методу Кирби [5, 6].

Ядерный осадок дважды промывался 0,14 М раствором NaCl и суспендировался в 25 мл водонасыщенного фенола (рН=6) и в таком же объеме 5% парааминосалициловой кислоты. После 24-часовой выдержки суспензия центрифугировалась при $4 \times 10^5 g$ в продолжение 45 мин. В результате получалось 3 слоя. Верхний слой содержал водорастворимую ДНК. К полученному раствору добавлялся водонасыщенный фенол рН=6 (20 мл) для депротенизации. Депротенизация проводилась 3 раза и из полученного раствора ДНК осаждалась добавлением 1,5—2 объема этилового спирта. Нитевидный осадок растворялся в 0,14 М растворе NaCl и сохранялся при 0°. Количество ДНК определялось по Дине [7], РНК — по Мейбауму [8], а белок — по Лоури [9]. Нуклеотидный состав ДНК исследовался как методом непосредственного спектрофотометрирования гидролизата ДНК [10], так и методом обычного хроматографического разделения гидролизата на бумаге [11]. Вязкость раствора ДНК изменялась капиллярным вискозиметром. Общая длина и диаметр спирально намотанного капилляра были равны 300 см и 1,3 мм соответственно. Время истечения воды в вискозиметре было равно 96 сек. Гипохромный эффект измерялся по общепринятой методике [12]. Коэффициент седиментации определялся компарированием седиментационных диаграмм, полученных при помощи абсорбционной оптики в ультрафиолетовой части спектра на ультрацентрифуге спинко Е при скорости вращения 42040 об/мин. Молекулярный вес ДНК выводился по значениям характеристической вязкости и константы седиментации согласно Зимма и Крозера [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде чем приступить к исследованию физико-химических свойств ДНК, произвели тщательный анализ препарата ДНК на содержание РНК и белка. Оказалось, что полученный нами препарат ДНК содержит лишь 1,7% РНК и 2,8% белка (табл. 1).

Таблица 1

Единица	РНК/ДНК	Белок/ДНК
мкг	5	8
%	1,7	2,8

Определение нуклеотидного состава ДНК методом непосредственного спектрофотометрирования заключается в следующем [10]: снимаются кри-

вые ультрафиолетового поглощения пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК в интервале 230—290 мк при рН=1 и рП=13. Выбираются характерные точки кривых, по которым строятся тождественные уравнения.

ΣД пуринов — пиримид. осн. = Д пуринов + Д пиримидин, причем каждое уравнение записывается для каждого отдельного основания при тех длинах волн, при которых показатель оптической плотности этого пурино-пиримидинового компонента максимален (табл. 2).

Таблица 2

Молярные экстинкции оснований в 0,1 N HCl и 0,1 N NaOH ($\times 10^{-3}$)

рН Длина волны в мк	1				13			
	249	262,5	271	290	258	262	282,5	290
Аденин	9,46	12,88	10,59	0,52	9,35	10,67	3,52	0,92
Гуанин	11,34	7,45	7,90	3,78	6,30	7,23	7,89	3,76
Цитозин	2,74	7,18	9,92	4,60	2,58	3,31	7,09	4,88
Тимин	4,86	7,82	7,22	0,88	3,28	4,04	4,96	5,14

Используя табличные данные, можно построить систему аддитивных уравнений:

$$\begin{aligned}
 (D_{290,13} - D_{250,1}) \times 10^{-3} &= 4,26 * C_T - 0,28 C_C - 0,02 C_G - 0,20 C_A, \\
 (D_{249,1} - D_{263,13}) \times 10^{-3} &= 5,04 * C_T + 1,58 C_T + 0,16 C_C - 0,11 C_A, \\
 (D_{271,1} - D_{262,13}) \times 10^{-3} &= 6,58 * C_C - 3,18 C_T + 0,07 C_G - 0,08 C_A, \\
 (D_{282,5,1} - D_{282,5,13}) \times 10^{-3} &= 9,51 * C_A + 2,86 C_T + 0,09 C_C + 0,06 C_G,
 \end{aligned} \quad (1)$$

где Д — оптическая плотность гидролизата ДНК, С — молярная концентрация оснований, * отмечены коэффициенты максимальных разностей показателей оптических плотностей при данной разности длин волн в мк-ах.

Для гидролиза ДНК к 1 мл раствора ДНК добавлялось 0,5 мл концентрированной муравьиной кислоты и смесь инкубировалась 30 мин. при 175° в запаянной ампуле. Готовились две такие ампулы с гидролизатом ДНК. После высушивания под вакуумом гидролизованная ДНК в одной ампуле растворялась в 0,1 KCl, во второй — в 0,1 N NaOH. Растворители добавлялись с тем расчетом, чтобы концентрация гидролизата ДНК не превышала 100 мкг. Кислый раствор гидролизата ДНК (рН=1) фотометрировался при четырех длинах волн: 249; 262,5; 271 и 290 мк, а щелочной раствор (рН=13) при 258; 262; 282,5 и 290 мк. Пользуясь таблицами 2 и 3, составляли систему уравнений (1) и, решая ее обычным



способом, получали искомые молярные концентрации пуриновых и пиримидиновых оснований. На основании расчета $A+T/C+G$ устанавливался тип ДНК (табл. 3).

Таблица 3

Эксперимент I

Оптическая плотность гидролизата ДНК	Концентрация оснований мкМ ² /%	$A+T/C+G$	
$D_{290,15} - D_{290,1} = 0,089$	$C_T = 0,210$	31,8	1,5
$D_{249,1} - D_{258,15} = 0,108$	$C_G = 0,141$	21,3	
$D_{271,1} - D_{267,15} = 0,145$	$C_C = 0,120$	18,2	
$D_{262,5,1} - D_{287,5,15} = 0,240$	$C_A = 0,188$	28,5	

Эксперимент II

Оптическая плотность гидролизата ДНК	Концентрация оснований мкМ ² /%	$A+T/C+G$	
$D_{296,15} - D_{290,1} = 0,132$	$C_T = 0,310$	31,6	1,5
$D_{249,1} - D_{258,15} = 0,152$	$C_G = 0,191$	19,4	
$D_{271,1} - D_{267,15} = 0,229$	$C_C = 0,200$	20,4	
$D_{262,5,1} - D_{287,5,15} = 0,357$	$C_A = 0,279$	23,4	

Данные, полученные методом непосредственного спектрофотометрирования, сравнивались с результатами бумажной хроматография гидролизата ДНК.

Таблица 4

Основания	Опыт				
	1	2	3	4	5
Гуанин мкМ %	0,072 21,1	0,107 21,6	0,014 18,4	0,023 20,9	0,071 19,6
Станд. отк.	0,57				
Аденин мкМ %	0,098 28,7	0,140 28,2	0,022 28,9	0,030 27,3	0,108 29,3
	0,41				
Цитозин мкМ %	0,071 20,8	0,108 21,8	0,014 18,4	0,024 21,8	0,075 20,7
	0,66				
Тимин мкМ %	0,100 29,3	0,141 28,4	0,026 34,2	0,033 30	0,103 29,8
	1,01				
$A+T/C+G$	1,40	1,30	1,40	1,34	1,50

Получены кривые зависимости относительной вязкости раствора ДНК от температуры при концентрации ДНК—100 мкг/мл (рис. 1) и оптической плотности раствора ДНК от температуры при концентрации, соответствующей коэффициенту поглощения—0,5 при 270 м μ (рис. 2) [14—17]. Характеристическая вязкость рассчитывалась аналитически, по формуле

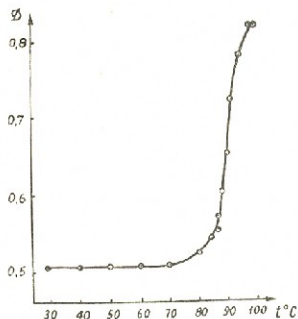


Рис. 1. Зависимость оптической плотности раствора ДНК от температуры; по оси абсцисс отложена температура, а по оси ординат — оптическая плотность раствора ДНК, начальная оптическая плотность которой была 0,5.

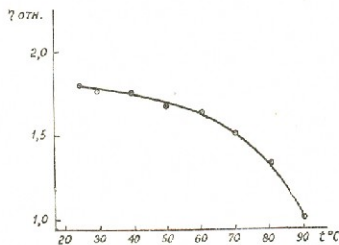


Рис. 2. Зависимость относительной вязкости раствора ДНК от температуры. Концентрация раствора ДНК — 100 мкг/мл. По оси абсцисс отложена температура, по оси ординат — относительная вязкость раствора ДНК.

$$[\eta] = \frac{\alpha [\eta]_2 - [\eta]_1}{z - 1} \quad (2)$$

для разбавленных растворов, где $\alpha = \frac{C_1}{C_2}$, $[\eta]_1$ — приведенная вязкость при первой концентрации C_1 , $[\eta]_2$ — то же при C_2 .

$$\eta_{\text{прив.}} = \frac{\eta_{\text{уд.}}}{C}, \quad \eta_{\text{уд.}} = \eta_{\text{отн.}} - 1, \quad \eta_{\text{отн.}} = \frac{t}{t_0},$$

причем t и t_0 — время истечения в вискозиметре раствора и растворителя с удельными весами d и d_0 [18, 19]. Опытные данные см. в табл. 5.

Таблица 5

О п ы т 1					
C_1 г/мл	C_2 г/мл	t_1 (сек)	t_2 (сек)	t_0 (сек)	$[\eta]$
0,0099	0,0049	334	260	197	79,0



О п ы т 2					
0,0124	0,0049	394	260	197	71,8
Опыт 3					
0,0155	0,0049	485	260	197	66,5

Коэффициент седиментации выводился из седиментационных диаграмм с помощью формулы

$$s = \frac{\ln(x_n/x_m)}{(t_n - t_m) \omega^2} \quad (3)$$

где x_n и x_m — положения границ седиментации, соответственно, во времени t_n и t_m , ω — угловая скорость вращения раствора [20] (табл. 6).

Таблица 6

Концентрация C_0	$\lg x_n$ (мм)	$\lg x_m$ (мм)	t_n (мин)	t_m (мин)	$\Delta \lg x$ (мм)	s (с)
$C_1=0,008$	1,8010	1,7889	20	10	0,0121	23,93
$C_2=0,005$	1,7990	1,7893	20	10	0,0097	19,35
$C_3=0,007$	1,8033	1,7941	20	10	0,0092	18,35
$C_4=0,04$	1,7894	1,7842	20	10	0,0052	10,87

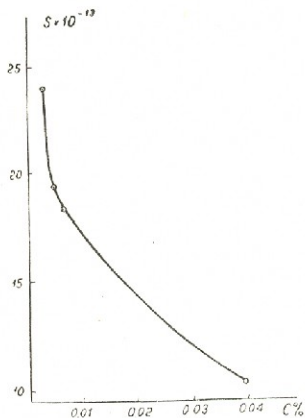


Рис. 3. Зависимость коэффициента седиментации (s) от концентрации (C).

Для каждой концентрации проводились кривые зависимости $\lg x$ от t и по формуле (3) находились соответствующие s , затем строились кривые зависимости s от C (рис. 3).

Экстраполяцией этой кривой на $C=0$ по методу касательных получили значение величины константы седиментации данной ДНК — 26,60 с.

Исходя из значений коэффициента седиментации и характеристической вязкости, можно рассчитать значения молекулярного веса ДНК мышечной ткани по уравнениям Зимма и Крouters [13]:

$$0,425 \lg M = 1,819 + \lg(s - 2,7), \quad (4)$$

$$0,665 \lg M = 2,863 + \lg([\eta] + 5). \quad (5)$$

Расчет по уравнениям (4) и (5) даст значения для молекулярного веса $15,3 \cdot 10^6$ и $14,0 \cdot 10^6$, соответственно.



В Ы В О Д Ы

ДНК из чистых ядер скелетных мышц начинает плавиться при 86°C. Характеристическая вязкость и коэффициент седиментации равны 72,4 дл/г и 26,6 S, соответственно.

Молекулярный вес, рассчитанный по формулам Зимма и Крозера, равен $14,6 \cdot 10^6$.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. C. Edelman, P. M. Edelman, Knigge, Schwartz. *J. Cell Biology*, 27, 365 (1965).
2. С. В. Перри. Совр. проб. биохимии, сб. статей под ред. В. А. Энгельгардта, 41, 161, (1957).
3. В. А. Рагозин, Г. П. Федорова, В. Ф. Машанский. Вопросы мед. химии, 10, 546 (1964).
4. Н. А. Гачечиладзе, М. М. Заалишвили. Сообщ. АН ГССР, X 1:2 (1966).
5. K. Kirby. *Biochem. J.* 61, 405 (1956).
6. K. Kirby. *Biochem. J.* 63, 495 (1957).
7. Z. Dische. *Microchemia*, 8, 4 (1930).
8. W. Mejsbaum, *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117 (1939).
9. H. O. Lowry, T. N. Rosebroug, G. A. Farr, R. I. Randall. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
10. Hu Ping-Cheng, Liu Cheng-Pin, Wu Hui, Liang Chih-Chuan. *Scientia Sinica*, 13, 5 (1964).
11. Нуклеиновые кислоты, под ред. Чаргаффа и Девидсона, тт. 1 и 2, 443.
12. S. Rice, P. Doty. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3937 (1957).
13. В. Н. Zimm, D. M. Crothers. *J. Mol. Biol.*, 12, 525 (1965).
14. J. Margur, P. Doty. *J. Mol. Biol.*, 3, 585 (1961).
15. J. Margur, P. Doty. *Nature*, 183, 1427 (1959).
16. J. Margur, P. Doty. *J. Mol. Biol.*, 5, 109 (1962).
17. H. Devoe, J. Tinoco. *J. Mol. Biol.*, 4, 500 (1962).
18. Д. М. Спитковский. Биофизика, т. I, вып. 4, 319 (1956).
19. Е. С. Роскин. Коллоидн. ж., 15, 3, 455 (1953).
20. В. О. Шпикитер. Совр. методы в биохимии, под ред. Ореховича, т. I, 5 (1964).

M. M. ZAALISHVILI I. L. KALANDADZE, N. SH. NADIRASHVILI

ISOLATION AND PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF
DNA FROM PURE NUCLEI OF SKELETAL MUSCLE

Summary

The paper is devoted to the preparation and investigation of DNA of pure nuclei of muscle tissue. Pure nuclei were obtained by centrifugation of muscle homogenates at $1,2 \times 10^5g$ in a solution of 2,2 m sucrose

06.025320
2022070333

DNA was isolated from pure nuclei of striated muscles by the modified method of Kirby, quantitatively determined by the method of Dische, RNA — by Mejbaum and protein — by Lowry. Analysis of the base composition by a direct spectrophotometric method and a paper chromatography confirmed that DNA from pure nuclei of skeletal muscles is a typical AT-type. The dependences of the optical density and relative viscosity on temperature were investigated. The intrinsic viscosity was calculated by the analytical method. The sedimentation coefficient was obtained from the sedimentation diagrams of DNA — solution by means of an absorption optical system in the ultraviolet region of spectrum. The combination of sedimentation and viscosity data allows estimation of molecular weight of the DNA by Crothers and Zimm.



1. Акопян В. Б.—НИИ курортологии и физиотерапии Грузии (Тбилиси).
2. Бурджанадзе Т. В.—Институт физиологии АН ГССР (Тбилиси).
3. Гогичайшвили В. А.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Нативили АН ГССР (Тбилиси).
4. Епифанова О. И.—Институт молекулярной биологии АН СССР (Москва).
5. Заалишвили М. М.—Институт физиологии АН ГССР, Тбилисский государственный университет.
6. Закарая А. И.—НИИ курортологии и физиотерапии Грузии (Тбилиси).
7. Зотин А. И.—Институт биологии развития АН ССР (Москва).
8. Каландадзе И. В.—Институт физиологии АН ГССР (Тбилиси).
9. Козлова Н. В.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Нативили АН ГССР (Тбилиси).
10. Костомарова А. А.—Институт биологии развития АН СССР (Москва).
11. Метревели З. А.—Тбилисский государственный университет.
12. Мревлишвили Г. М.—Институт физики АН ГССР (Тбилиси).
13. Надирашвили Н. Т.—Институт физиологии АН ГССР (Тбилиси).
14. Саламатина Н. В.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Нативили АН ГССР (Тбилиси).
15. Терских В. В.—Институт молекулярной биологии АН СССР (Москва).
16. Туманшвили Г. Д.—Институт экспериментальной морфологии им. А. Н. Нативили АН ГССР, Тбилисский государственный университет.

LIST OF AUTHORS

1. Akopyan, V. B.—Georgian Scientific Research Institute of Curortology and Physiotherapy (Tbilisi).
2. Burjanadze, T. V.—Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
3. Epifanova, O. I.—Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
4. Gogichaishvili, V. A.—The Natishvili Institute of Experimental Morphology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
5. Kalandadze, I. V.—Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
6. Kostomarova, A. A.—Institute of Developmental Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
7. Kozlova N. V.—The Natishvili Institute of Experimental Morphology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
8. Metreveli, Z. A.—Tbilisi State University (Tbilisi).
9. Mrevlishvili, G. M.—Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian Academy of Sciences (Tbilisi).
10. Nadirashvili, N. T.—Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
11. Salamatina, N. V.—The Natishvili Institute of Experimental Morphology, Academy of Sciences of the Georgian SSR (Tbilisi).
12. Terskikh, V. V.—Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR (Moscow).
13. Tumanishvili G. D.—The Natishvili Institute of Experimental Morphology, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi State University (Tbilisi).
14. Zakaraya, A. P.—Georgian Scientific Research Institute of Curortology and Physiotherapy (Tbilisi).
15. Zotin, A. I.—Institute of Developmental Biology, Academy of Sciences of USSR (Moscow).
16. Zaalishvili, M. M.—Institute of Physiology, Academy of Sciences of Georgian SSR, Tbilisi State University (Tbilisi).

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

შრომები, ტომი 134, ბიოფიზიკის სერია, II

ბიოფიზიკისა და თეორიული
ბიოლოგიის საკითხები

(რუსულ ენაზე)

თბილისის უნივერსიტეტის გამომცემლობა
თბილისი 1969

Редактор издательства Б. А. Микадзе
Техредактор И. В. Хуцишвили
Корректор В. Д. Сердюков

Подписано в печать 6/VIII-69.
Формат бумаги 70×108/16.
Печатных л. 10,15
Учетно-издат. л. 8,1
Заказ 236
УЭ 07031
Тираж 500

Цена 80 коп.

Издательство Тбилисского университета,
Тбилиси, пр. И. Чавчавадзе, 14.
Типография Тбилисского университета,
Тбилиси, пр. И. Чавчавадзе, 1.