

К-14038  
✓ 289823

# ВЕСТНИК

---

ХАРЬКОВСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА

ПРОБЛЕМЫ ОНТОГЕНЕЗА, ГЕТЕРОЗИСА  
И БИОЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

№ 135

69 коп.



Проблемы онтогенеза, гетерозиса и биоэкологии животных, 1976, № 1  
1 — 129, 7.



PRINTED

AT THE  
PRINTING OFFICE

OF THE  
GOVERNMENT

МИНИСТЕРСТВО  
ВЫСШЕГО  
И СРЕДНЕГО  
СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
УССР

# ВЕСТНИК

## ХАРЬКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

---

ПРОБЛЕМЫ ОНТОГЕНЕЗА, ГЕТЕРОЗИСА  
И БИОЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ № 135

---

ИЗДАТЕЛЬСКОЕ  
ОБЪЕДИНЕНИЕ  
«ВИЩА ШКОЛА»  
ИЗДАТЕЛЬСТВО  
ПРИ ХАРЬКОВСКОМ  
ГОСУДАРСТВЕННОМ  
УНИВЕРСИТЕТЕ

Харьков — 1976



Печатается по решению Ученого совета биологического факультета Харьковского государственного университета (протокол № 21 от 8 декабря 1974 г.).

Статьи вестника содержат результаты исследований кафедр биологического факультета и отделов НИИ биологии Харьковского университета по физиологии и биохимии, генетике, систематике, экологии и эволюции животных организмов.

Рассматриваются проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики гетерозиса, биоэкологического изучения фауны беспозвоночных и позвоночных животных и охраны природы.

Вестник рассчитан на научных работников и специалистов.

#### Редакционная коллегия:

проф. *И. Б. Волчанецкий*, проф. *П. А. Калиман*, доц. *А. С. Лисецкий*, проф. *С. И. Медведев*, акад. АН УССР *В. Н. Никитин* (отв. ред.), проф. *Е. В. Парина*, *В. С. Солодовникова* (отв. секр.), проф. *В. Г. Шахбазов*, проф. *Г. Л. Шкорбатов* (зам. отв. ред.).

#### Адрес редакционной коллегии:

310077, Харьков, 77, пл. Дзержинского, 4, Харьковский государственный университет, биологический факультет. Тел. 40-18-64.

Редакция естественнонаучной литературы  
И. о. зав. редакцией *Н. Н. Сорокин*

#### Вестник Харьковского университета

№ 135

Проблемы онтогенеза, гетерозиса и биоэкологии животных

Редактор *А. П. Гужва*

Обложка художника *С. А. Павлова*

Художественные редакторы *А. С. Романова*, *Т. П. Воробienko*

Технические редакторы *Л. Е. Мокроусова*, *Г. П. Александрова*

Корректор *Л. П. Пипенко*

Сдано в набор 8.IX 1975 г. Подписано в печать 7.IV 1976 г.  
Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага типографская № 1. Усл. печ. л. 8,5.  
Уч.-изд. л. 9,9. Тираж 1000. Заказ 2193. БЦ 50100. Цена 69 коп.

Издательство издательского объединения «Вища школа»  
при Харьковском государственном университете.

310003, Харьков, 3, Университетская, 16.

Харьковская городская типография № 16 Областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.

310003, Харьков, 3, Университетская, 16.

© Харьковский государственный университет, 1976.





А. А. КРАСНИЦКАЯ, канд. биол. наук,

Л. Н. БЛОК, канд. биол. наук,

Г. А. АНОХИНА, канд. мед. наук,

В. Н. НИКИТИН, д-р биол. наук

ИРЭ АН УССР. Кафедра физиологии  
человека и животных

## СИНТЕЗ БЕЛКА *IN VITRO* РИБОСОМАМИ ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Согласно литературным данным [1—3], у млекопитающих с возрастом меняется набор молекул РНК, синтезируемых в ядрах и присутствующих в тканях. Mainwaring [4] обнаружил у старых мышей снижение синтетической активности микросом печени при неизменной активности обработанных детергентом рибосом. В бесклеточной системе на хроматине старых крыс как на матрице синтезируется значительное количество молекул РНК, способных стимулировать белковый синтез *in vitro* [5]. Можно предположить, что с возрастом меняется относительная интенсивность белкового синтеза на разных типах молекул *м*-РНК. Определение уровня эндогенного синтеза белка *in vitro* полисомами позволяет оценить синтетическую активность соответствующих классов *м*-РНК.

В настоящей работе исследовали зависимость от возраста уровня эндогенного белкового синтеза *in vitro* следующими препаратами: суммарным препаратом микросом, разделенными в градиенте концентрации сахарозы полисомами с разным содержанием обрывков клеточных мембран, рибосомами, освобожденными от обрывков мембран путем обработки микросом дезоксихолатом натрия. Для выяснения степени участия в белковом синтезе молекул *м*-РНК, имеющих разную устойчивость в условиях инкубации *in vitro*, изучали влияние на уровень синтеза кратковременной преинкубации полисом.

**Методы.** Подопытными животными были крысы линии Вистар возраста 1, 3, 12 и 24 месяца. Суммарный препарат микросом выделяли из постмитохондриального супернатанта гомогената печени центрифугированием при 105 000 *g* по Шапоту и Родионовой [6]. «Детергентные» рибосомы получали, обрабатывая этот препарат 1,5% дезоксихолатом натрия.

Для разделения свободных и прикрепленных к клеточным мембранам полисом постмитохондриальный супернатант гомогената печени центрифугировали при 125 000 *g* в течение 20 часов на холоду в ступенчатом градиенте концентрации сахарозы (2,0 и 1,38 М) с добавлением клеточного сока печени той же



крысы по Blobel a. Potter [7]. Дальнейшую обработку препаратов производили по Shires et al. [8]. Предварительные результаты опубликованы ранее [9].

Получены две полисомные фракции с отношением РНК/белок 0,17—0,22 и 0,49—0,58 (в рибосомах *Escherichia coli* — 0,9). Таким образом, выделены две фракции, резко отличающиеся содержанием обрывков мембран, хотя и не была достигнута полная очистка свободных рибосом. В дальнейшем фракцию с меньшим содержанием белка будем условно называть «свободными», а с большим содержанием — «прикрепленными» полисомами.

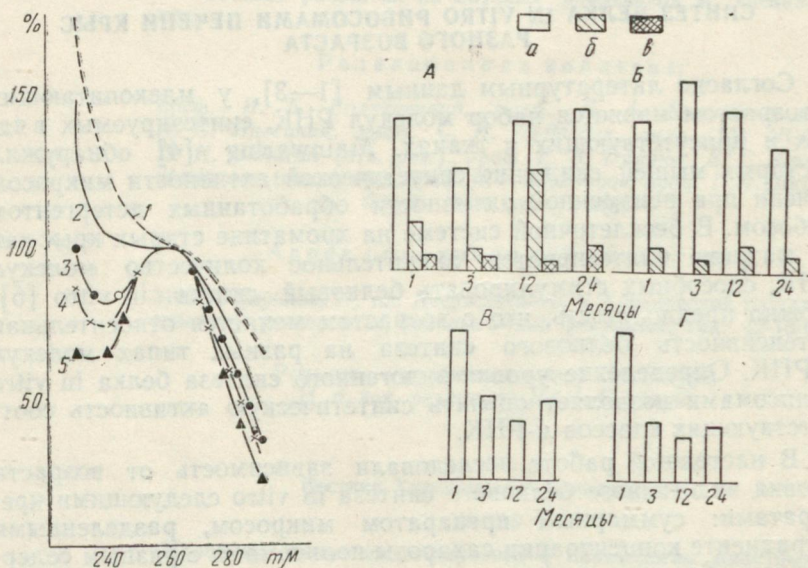


Рис. 1. Спектры поглощения полисомных препаратов:

1 — «прикрепленные»; 2 — микросомы; 3 — «свободные»; 4 — «детергентные» рибосомы; 5 — рибосомы *E. coli*.

Рис. 2. Синтез белка *in vitro* микросомами (А), «детергентными» рибосомами (Б), «свободными» (В) и «прикрепленными» (Г) полисомами печени крыс (в процентах от уровня синтеза непринкубированными частицами одномесячных крыс):

а — непринкубированные частицы; б — принкубация 2,5 мин; в — принкубация 7 мин.

Спектры поглощения исследованных нами препаратов приведены на рис. 1, из которого видно, что препараты «прикрепленных» полисом напоминают суммарные микросомы, а «свободные» сходны с «детергентными» рибосомами. Инкубацию производили по Canoza a. Williams [10].

Уровень белкового синтеза оценивали по включению в кислотонерастворимый осадок  $^{14}\text{C}$ -глутаминовой кислоты (150 мк/мм). Радиоактивность определяли на бумажных фильтрах



после стандартных промывок в жидком сцинтилляторе толуол-РРО-РОРОР, на сцинтилляционном счетчике СБС-1 (точность радиометрии 1—2%, эффективность счета 60—80%).

Для каждого сочетания экспериментальных условий параллельно инкубировали две пробы, за отдельный результат в дальнейших расчетах принимали среднее значение. В каждом опыте вычисляли отношения сравниваемых величин и для серии экспериментов производили вариационно-статистическую обработку [11].

*Результаты и обсуждение.* В исследованных нами препаратах полисом величина отношения РНК/белок и спектры поглощения с возрастом не менялись.

Результаты некоторых экспериментов, приведенные в таблице, показывают, что все исследованные препараты синтезировали белок *in vitro* без добавления экзогенной м-РНК.

**Синтез белка (включение  $^{14}\text{C}$ -глутаминовой кислоты) в бесклеточной системе рибосомами печени крыс**

Частицы	Преинкубация, мин	Имп/мин				без частиц (контроль)
		с частицами из печени крыс, возраст, месяцы				
		1	3	12	24	
Микросомы	—	2870	3240	6740	5020	360
	7	600	735	600	635	
„Детергентные“ рибосомы	—	1375	1670	2190	1460	
	7	660	595	570	654	
Микросомы	—	2700	1360	2770	2080	147
	2,5	534	420	1053	444	
„Детергентные“ рибосомы	—	1300	1040	911	985	
	2,5	366	270	300	252	
„Свободные“ полисомы	—	1031	595	1670	—	353
„Прикрепленные“ полисомы	—	477	451	715	—	
„Свободные“ полисомы	—	1050	911	—	986	420
„Прикрепленные“ полисомы	—	757	645	—	552	

Величину радиоактивности каждой пробы (после вычитания контроля «без частиц») пересчитывали на 1 мг РНК препарата и выражали в процентах от уровня синтеза аналогичными частицами из печени одномесячных крыс. Средние значения относительных величин для нескольких серий опытов (по 10—15) приведены на рис. 2, из которого видно, что синтетическая активность полисомных препаратов меняется с возрастом по-разному. Активность суммарных микросом снижается к трем меся-



цам ( $p < 0,001$ ) и возвращается к уровню одномесячных крыс у 12- и 24-месячных животных. Эта тенденция сохраняется и после кратковременной преинкубации препаратов.

Активность обоих препаратов, разделенных в градиенте сахарозы, снижается к трем месяцам ( $p < 0,001$ ) и не претерпевает в дальнейшем значительных возрастных изменений. Не наблюдается также существенной разницы в характере возрастных изменений активности этих двух препаратов. Согласно современным представлениям [12], препараты с разным содержанием прикрепленных к рибосомам обрывков мембран должны отличаться соотношением синтеза «собственных» белков клеток и белков «на экспорт». Возможно, разная возрастная картина обнаружилась бы в условиях, меняющих уровень и характер белкового синтеза, например, в регенерирующей печени.

Синтетическая активность рибосом, обработанных дезоксихолатом натрия, с возрастом не снижается, что согласуется с данными Mainwaring [4]. Некоторая тенденция к возрастному снижению проявляется только после кратковременной преинкубации этого препарата. По-видимому, обработка дезоксихолатом натрия повреждает компоненты частиц, более всего подверженные возрастным изменениям.

Ни один из исследованных нами препаратов не обнаружил снижения синтетической активности после трех месяцев, т. е. к старости. Активность некоторых полисомных фракций у 12- и 24-месячных крыс возвращалась к уровню одномесячных, что противоречит данным Mainwaring [4]. Характер возрастных изменений различен для разных препаратов полисом, что хорошо согласуется с данными, полученными методом молекулярных гибридов и свидетельствующими об изменении с возрастом тканевого набора классов РНК [1—3].

Наши данные не объясняют затухание с возрастом белкового синтеза в тканях млекопитающих снижением синтетической активности полисом. Очевидно, причины этого затухания следует искать в изменениях систем, регулирующих синтез белка *in vivo*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cutler R. G. Transcription of reiterated DNA sequence classes throughout the life-span of the mouse. — В кн.: *Advances in gerontological research*, 1972, vol. 4, 219 p.
2. Church R. B., McCarthy B. J. RNA synthesis in regenerating and embryonic liver. — *J. Mol. Biol.*, 1967, vol. 23, N 2, p. 459—475.
3. Church R. B., McCarthy B. J. The synthesis of RNA during embryonic life development and its relationship to regenerating liver. — *J. Mol. Biol.*, 1967, vol. 23, N 2, p. 477—486.
4. Mainwaring W. J. P. The effect of age on protein synthesis in mouse liver. — *Biochem. J.*, 1969, vol. 113, N 4, p. 869—877.
5. ДНК-зависимый синтез РНК и белка в ДНК-направляемой белок-синтезирующей бесклеточной системе в присутствии ДНП печени крыс разного возраста. — «Эволюция биохимии и физиологии», 1974, т. 10, № 5, с. 446—450. Авт.: Л. Н. Блок, Н. С. Белоконов, Г. А. Анохина, В. Н. Никитин.



6. Шапот В. С., Родионова Н. П. Высокополимерный компонент рибонуклеиновой кислоты мембран эндоплазматического ретикулума печени крыс. — «Молек. биол.», 1969, т. 3, № 5, с. 785—794.
7. Blobel G., Potter V. P. Ribosomes in rat liver: an estimation of the percentage of free and membrane-bound ribosomes interacting with *m*-RNA in vivo. — «J. Mol. Biol.», 1967, vol. 28, N 3, p. 539—542.
8. Shires T. K., Nagarkar L., Pitot H. C. The association in vitro of polyribosomes with RNA-ase-treated derivatives of hepatic rough endoplasmic reticulum. — «Biochem. J.», 1971, vol. 125, N 1, p. 67—79.
9. Синтез белка в бесклеточной системе микросомами и рибосомами печени крыс разного возраста. — «Докл. АН СССР», 1974, т. 217, № 3, с. 726—729. Авт.: Л. Н. Блок, А. А. Красницкая, Г. А. Анохина, В. Н. Никитин.
10. Ganoza M. C., Williams C. A. In vitro synthesis of different categories of specific protein by membrane-bound and free ribosomes. — «Proc. Natnl. Acad. Sci US», 1969, vol 63, N 4, p. 1370—1376.
11. Спеденер Дж. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М., Сельхозгиз, 1961. 61 с.
12. Redman C. M. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. — «J. Biol. Chem.», 1969, vol. 244, N 16, p. 4308—4315.

УДК 577.1 : 547.96 : 591.1.15 : 612.6

Л. М. БАСАНЕЦ, А. И. КЛИМЕНКО, канд. биол. наук,  
А. Б. МАЛЫШЕВ, Т. Г. МИРОНЕНКО,  
Ю. А. МОРОЗ, канд. биол. наук,  
В. Н. НИКИТИН, д-р биол. наук,  
Е. Э. ПЕРСКИЙ, Л. Я. ПОПОВА, канд. биол. наук,  
Н. Б. САГАЛОВА, Л. Л. СИМИРЕНКО,  
Л. А. УТЕВСКАЯ, канд. биол. наук, М. Я. ШЕВЦОВА  
Отдел молекулярной биологии и  
биофизики онтогенеза НИИ биологии ХГУ

## ИЗУЧЕНИЕ ХРОМАТИНОВОГО И КОЛЛАГЕНОВОГО КОМПЛЕКСОВ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Эксперименты проводили на белых крысах линии Вистар в возрасте 1, 3, 12 и 24 месяца. Хроматин из ядер клеток печени выделяли методами [1, 2] и разделяли на фракции методом [3]. Определение содержания ДНК, гистонов, негистоновых белков и РНК описано в [4]. Методы изучения взаимодействия гистонов и ДНК и определения свободных фосфорных групп в хроматине приведены в [5]. Методы выделения различных фракций белков хроматина, их электрофоретического и хроматографического анализа и изучения их ацетилирования изложены в [7—11]. Определение ДНК-азной активности описано в [13]. Изучение липидов в хроматине проводили согласно [12].

Методы измерения двойного лучепреломления коллагеновых волокон и их рентгенографирования под большими углами приведены в [14, 15]. Хроматографический анализ и изучение денатурации коллагена описаны в [16, 17]. Анализ белков соединительной ткани при пролонгировании жизни крыс изложен в [18].

**Состав и свойства хроматинового комплекса и его компонентов в онтогенезе.** Проведенные исследования выявили определенные возрастные изменения структуры и свойств хроматино-



вого комплекса. В. Н. Никитин и Н. Б. Сагалова [4, 5] показали, что отношение гистоны/ДНК стабильно в период от однемесячного до годовалого возраста и несколько повышается к старости. Отношение негистоновых белки/ДНК остается неизменным до трехмесячного возраста, достоверно понижается к 12 месяцам и в дальнейшем не изменяется. Отношение негистоновых белки/гистоны с возрастом падает. Эти различия достоверны между 1—24- и 3—12-месячными группами животных. С возрастом снижается также содержание РНК в хроматине.

Возрастные различия в содержании гистонов, негистоновых белков и РНК (относительно ДНК) наблюдаются и при анализе отдельных фракций хроматина: диффузного и конденсированного хроматина. Наиболее значительно понижается с возрастом содержание РНК в препаратах диффузного хроматина (рис. 1).

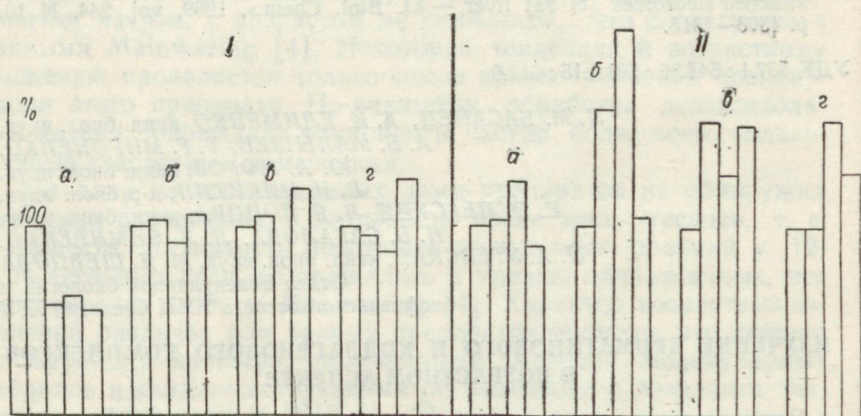


Рис. 1. Относительное содержание различных компонентов во фракциях хроматина ядер клеток печени белых крыс разного возраста: 1 — диффузный хроматин; 2 — конденсированный хроматин; а — РНК/ДНК; б — негистоновые белки/ДНК; в — гистоны/ДНК; г — белок/ДНК.

В работе [6] показано, что электростатическое взаимодействие ДНК и гистонов в суммарном хроматине с возрастом изменяется. При экстракции 2 М NaCl обнаружено, что сила взаимодействия аргининовых гистонов с ДНК в молодом возрасте меньше, чем в зрелом и старом. Результаты спектрофотометрического титрования акридиновым оранжевым, показавшие уменьшение с возрастом животных количества свободных фосфорных групп в хроматине, также подтверждают более сильное взаимодействие гистонов с ДНК в стареющем организме (рис. 2).

В [7, 10] установлено, что степень гетерогенности гистонов хроматинового комплекса и электрофоретическая подвижность их субфракций в ПААГ определяются условиями электрофоре-



за и не зависят от постнатального возраста животных. У животных всех возрастных групп выявлены все пять основных фракций гистонов, определяемых биохимически. На долю минорных компонентов приходится 15—20% анализируемого белка.

По-видимому, полный набор гистоновых белков формируется уже в период эмбрионального развития эукариотов. Он стабилен также при моделировании различной эндокринной ситуации в организме [8] и в условиях пролонгирования жизни лабораторных животных специальной диетой [9].

Вместе с тем, в постнатальном онтогенезе заметно изменяется относительное содержание отдельных фракций гистонов. Эти изменения для некоторых фракций гистонов из цельных ядер

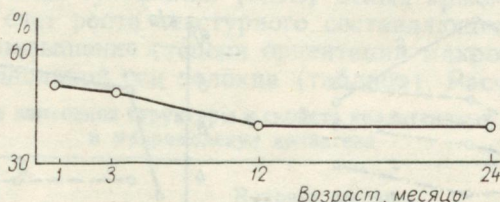


Рис. 2. Содержание свободных фосфатных групп (в %) в хроматине ядер клеток печени белых крыс разного возраста.

и хроматина проявляются неоднозначно [10]. Так, относительное содержание субфракции гистонов *F2a2* (зона 2) ядер в процессе постнатального онтогенеза увеличивается, а в хроматине, наоборот, падает.

Можно допустить, что в ядрах часть гистонов находится в свободном или слабо комплексированном с ДНК (или другими компонентами ядра) состоянии и при выделении хроматина эта часть гистоновых белков отмывается.

Один из вероятных путей регуляции гистонами активности ДНК может быть связан с модификацией данных белков. В связи с этим изучены особенности ацетилирования ядерных белков у животных разного возраста. Показано, что в постнатальном онтогенезе крыс, начиная с трехмесячного возраста, значительно повышается ацетилирование кислых ядерных белков и отсутствуют существенные возрастные изменения во фракции глобулиновых белков (растворимых в 0,14 М NaCl) [11].

Методом фракционирования суммарных гистонов на КМ-целлюлозе получено три хроматографических фракции гистонов. Дальнейшее их разделение электрофорезом в ПААГ показало значительные различия этих фракций в гетерогенности и электрофоретической подвижности в геле. Включение  $^{14}\text{C}$ -ацетата в различные хроматографические фракции гистонов имеет ряд



возрастных особенностей, причем не однозначных для каждой из этих фракций (рис. 3).

Высокий уровень ацетилирования некоторых фракций гистонов у старых животных не согласуется с представлением об исключительно дерепрессорном воздействии ацетилированных гистонов на активность генома. Вероятно, изменение степени репрессии гистонами ДНК путем той или иной химической модификации их молекул может быть лишь одним из многочисленных факторов регуляции активности генома в организме эукариотов, причем влияющим на нее не всегда однозначно.

М. Я. Шевцова [13] установила, что хроматиновый комплекс, выделенный по методу [1], обладает заметной ДНК-азной

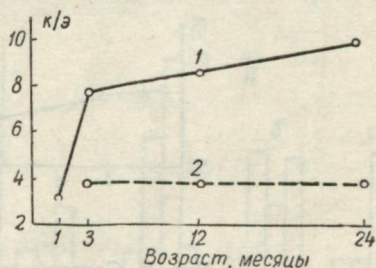
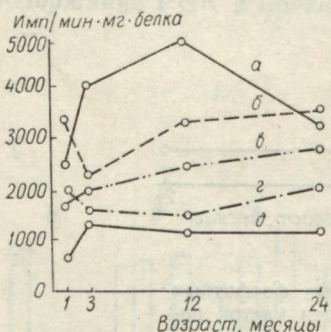


Рис. 3. Включение  $^{14}\text{C}$ -ацетата в белки ядер клеток печени белых крыс разного возраста:

а — гистоны F-1; б — гистоны F-3; в — гистоны F-2; г — глобулиновые белки; д — кислые белки.

Рис. 4. Отношение коллагена к эластину (к/э) в коже в норме и при задерживающем рост питании: а — норма; б — задержка роста.

активностью. Показала, что с хроматином связано около 60% активности нейтральной ДНК-азы ядер клеток печени, в то время как активность кислой ДНК-азы в хроматине составляет около 10% от общей активности этого фермента в препаратах ядер. На протяжении постнатального онтогенеза животных активность кислой и нейтральной ДНК-аз в хроматине не претерпевает заметных возрастных изменений. Высокий уровень активности нейтральной ДНК-азы в хроматиновом комплексе клеток печени белых крыс всех возрастных групп может быть обусловлен ее участием не только в процессах распада ДНК, но также и в процессах репарации молекул ДНК на протяжении возрастного развития организма.

В [12] было показано, что в хроматине, выделенном из печени старых (24-месячных) крыс, наблюдается достоверное снижение содержания фосфолипидов — до 50—60% от уровня фосфолипидов хроматина у одномесячных животных.



При изучении содержания липидов в различных фракциях хроматина было обнаружено [12], что во фракции диффузного (активного) хроматина наблюдается тенденция к снижению содержания фосфолипидов уже у животных 12-месячного возраста. В то же время во фракции конденсированного хроматина наблюдается тенденция к повышению содержания ряда фосфолипидов (серинфосфатид, сфингомиелин, этаноламинфосфатид). Наблюдающееся при старении снижение содержания фосфолипидов наряду с повышением гистонов во фракции диффузного хроматина может явиться фактором, снижающим синтетические возможности хроматина.

*Коллагеновые структуры в онтогенезе.* В [14] обнаружено увеличение двойного лучепреломления (ДЛ) коллагеновых волокон из хвостовых сухожилий (КВС) белых крыс. Это увеличение идет за счет роста текстурного составляющего ДЛ, что указывает на повышение степени ориентации макромолекул относительно продольной оси волокна (таблица). Расчет удельно-

Возрастные изменения структуры и свойств коллагеновых волокон и макромолекул коллагена

Показатель	Возраст, месяцы			
	1	3	12	24
Полное ДЛ КВС	$(2,78 \pm 0,57) \cdot 10^{-3}$	—	—	$(4,47 \pm 0,46) \cdot 10^{-3}$
Собственное ДЛ КВС	$(1,19 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$	—	—	$(1,13 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$
Удельный объем «упорядоченной зоны» в КВС	0,20	—	—	0,43
Угловые размеры рефлексов (радиан)	$d = 2,9 \text{ \AA}$ $1,40 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,02$
	$d = 11,2 \text{ \AA}$ $1,37 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,09$	$0,96 \pm 0,02$
Отношение максимальных интенсивностей рефлексов	$I_2, 9 \text{ \AA} / I_4, 5 \text{ \AA}$ $0,74 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$
	$I_{11}, 2 \text{ \AA} / I_4, 5 \text{ \AA}$ $1,94 \pm 0,06$	$2,00 \pm 0,05$	$2,06 \pm 0,04$	$2,33 \pm 0,05$
$\beta/\alpha$	$0,75 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,09$	
Константы скорости денатурации суммарного коллагена, растворимого в 0,5 М $\text{CH}_3\text{COOH}$ (при 36° С, сек)	$K_1$ $(1,17 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	—	—	$(2,08 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$
	$K_2$ $(6,01 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$	—	—	$(1,20 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$



го объема «упорядоченных зон» в КВС (области ориентированного расположения макромолекул в волокне) показал рост указанного параметра в онтогенезе.

Эти результаты подтверждаются данными рентгенографического исследования КВС под большими углами [15]. При неизменности характерных для коллагена межплоскостных расстояний дифракционные рентгеновские картины претерпевают с возрастом животных определенные изменения. Наиболее важным является уменьшение на рентгенограммах угловых размеров меридионального с  $d \approx 2,9 \text{ \AA}$  и экваториального с  $d \approx 11,2 \text{ \AA}$  рефлексов, что свидетельствует о повышении в онтогенезе степени текстурированности, упорядоченности КВС (см. таблицу). Уменьшение угловых размеров сопровождается изменениями кривых распределения интенсивности этих рефлексов как вдоль дуг, так и в меридиональном и экваториальном направлениях. Отношения максимумов над фоном рефлексов с  $d \approx 2,9 \text{ \AA}$  и  $d \approx 11,2 \text{ \AA}$  к максимуму над фоном рефлекса с  $d \approx 4,5 \text{ \AA}$ , используемого в качестве эталона, непрерывно повышается в онтогенезе (см. таблицу).

Возрастное повышение упорядоченности структуры КВС является важной причиной их стабилизации в онтогенезе. Другая причина — возрастное повышение в коллагене числа поперечных ковалентных связей — внутри- и межмолекулярных. Хроматографическое разделение на КМ-целлюлозе продуктов денатурации коллагена КВС животных разного возраста показало [16], что количество связанных попарно  $\alpha$ -цепей в молекулах коллагена ( $\beta$ -компоненты) повышается в онтогенезе (см. таблицу).

При постоянстве температуры денатурации растворимого коллагена из КВС животных разного возраста обнаружена возрастная зависимость скорости денатурации. Показано, что при аппроксимации кинетики денатурации коллагена двумя последовательными процессами первого порядка скорость обоих процессов повышается в онтогенезе.

Как следует из [18], длительное содержание животных на диете, значительно продляющей их жизнь, приводит к «сдерживанию» возрастных изменений коллагена и эластина. Концентрация суммарного коллагена в коже подопытных животных снижена по сравнению с нормой, а количество его экстрагируемой фракции у старых крыс значительно превышает контрольный уровень. Длительная задержка роста приводит к сохранению высокого уровня эластина на протяжении всего онтогенеза. В результате отношение коллагена к эластину у животных с продленной жизнью сохраняется неизменным, тогда как в норме оно неуклонно растет с возрастом (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о сложном характере возрастных изменений состава и физико-химических свойств ге-



нома клеток эукариот. Эти изменения, по-видимому, отражают нарастание с возрастом дисгармонии интенсивности функций отдельных звеньев синтезирующего аппарата клетки. Приведенные результаты являются начальным этапом в познании этой кардинальной проблемы.

Более однозначная картина наблюдается для возрастных изменений коллагеновых структур, которые заключаются в повышении структурированности и стабильности и могут существенно тормозиться в условиях экспериментального продления жизни.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paul J., Gilmour R. S. Template activity of DNA is restricted in chromatin. — *J. Molec. Biol.*, 1966, vol. 16, N 1, p. 242—244.
2. Marushige K., Bonner J. Template properties of liver chromatin. — *J. Molec. Biol.*, 1966, vol. 15, N 1, p. 160—167.
3. Прияткина Т. Н., Шарыгин А. А., Ашмарин И. П. Двухфазный выход хроматина из клеточных ядер при действии ультразвука. — *«Цитология»*, 1973, № 9, с. 1117—1121.
4. Мартыненко А. А., Никитин В. Н., Сагалова Н. Б. Возрастные изменения в составе хроматина ядер печени белых крыс. — *«Журн. эволюц. биохимии и физиологии»*, 1972, т. 8, вып. 2, с. 128—131.
5. Никитин В. Н., Сагалова Н. Б. ДНП печени белых крыс с пролонгированной жизнью. — В кн.: *Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики*. Киев, «Наукова думка», 1974, с. 211—215.
6. Басанец Л. М. Ступінь депротейнізації сіллю ДНП хроматину печінки щурів різного віку. — *«Доп. АН УРСР»*, 1974, сер. Б, № 7, с. 646—647.
7. Клименко А. И. Анализ суммарных гистонов печени крыс разного возраста при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. — *«Биохимия»*, 1974, т. 1, с. 54—59.
8. Клименко А. И. Электрофоретическое изучение гистонов в постнатальном онтогенезе крыс: влияние адrenaлeктомии. — *«Вопр. мед. химии»*, 1974, т. 1, с. 37—43.
9. Клименко А. И., Хинц Р. Электрофоретический анализ гистонов ядер клеток печени белых крыс в условиях калорийной недостаточности. — *«Вопр. питания»*, 1974, т. 6, с. 16—20.
10. Клименко А. И. Вікова характеристика гістонів із хроматину і цільних ядер клітин печінки білих щурів. — *«Доп. АН УРСР»*, 1974, сер. Б, № 4, с. 372—374.
11. Ацетилование белков ядер клеток печени белых крыс разного возраста. — *«Докл. АН СССР»*, 1974, т. 215, № 6, с. 1491—1492. Авт.: А. И. Клименко, А. Б. Малышев, В. Н. Никитин и др.
12. Попова Л. Я., Мироненко Т. Г. Фосфолипиды хроматина печени в онтогенезе крыс нормальных и с пролонгированной жизнью. — В кн.: *Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики*. Киев, «Наукова думка», 1974, с. 215—219.
13. Шевцова М. Я. Активность нейтральной и кислой ДНК-аз субклеточных фракций печени белых крыс в онтогенезе. — В кн.: *Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики*. Киев, «Наукова думка», 1974, с. 161—165.
14. Перский Е. Э. О возрастных изменениях структуры коллагеновых волокон. — В кн.: *Молекулярная биохимия старения*. Киев, «Наукова думка», 1969, с. 60—63.
15. Перский Е. Э., Утевская Л. А. Рентгенографическое исследование коллагеновых волокон животных разного возраста. — В кн.: *Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики*. Киев, «Наукова думка», 1974, с. 58—62.



16. Утевская Л. А., Перский Е. Э. Хроматографическое изучение продуктов денатурации коллагена крыс разного возраста. — «Журн. эволюц. биохимии и физиологии», 1971, т. 7, с. 425—426.
17. Утевская Л. А., Перский Е. Э. Тепловая денатурация проколлагена животных разного возраста. — В кн.: Молекулярная биология старения. Киев, «Наукова думка», 1969, с. 63—65.
18. Мороз Ю. А. Соединительная ткань кожи белых крыс разного возраста и влияние на нее длительного задерживающего рост питания. — В кн.: Молекулярная биология старения. Киев, «Наукова думка», 1969, с. 149—152.

УДК 577.1.547.96

А. Ф. КОЧЕНКОВ

Отдел молекулярной биологии и  
биофизики онтогенеза НИИ биологии

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС В АСПЕКТЕ ВОЗРАСТА И ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОГО ТЕСТОСТЕРОНА

При исследовании влияния половых гормонов на биосинтез макромолекул в ядрах клеток необходимо учитывать их избирательное действие на различные органы. Эта избирательность определяется наличием или отсутствием (возможно, нахождением в «закрытом виде») рецепторов для гормонов в клетках органов. В связи с этим ткани разных органов можно условно разделить на три группы, исходя из способности «откликаться» на введение половых гормонов. К первой группе относятся целевые ткани органов-мишеней; ко второй — мышечная и другие ткани, участвующие в формировании вторичных половых признаков (мускулатуры по мужскому или женскому типу и т. п.).

В отличие от них, например, мозг можно отнести к третьей группе, на которую половые гормоны не оказывают специфического действия. Следует учитывать, что в ряде экстрагенитальных органов рецепторы, находящиеся в «закрытом виде», могут реагировать с половыми гормонами при особых состояниях организма: в печени рост и синтез белков стимулируется в условиях, когда птицы синтезируют много белка для желтка яиц. Здесь эстрогены прямо связываются с тканью печени (геномом клетки) [1].

Установлено, что тестостеронпропионат не только возвращает количество ДНК и РНК в простате и почках к исходному уровню, но и увеличивает его по сравнению с интактным контролем [2]. В печени под влиянием экзогенного тестостерона отмечено увеличение соотношения и РНК/ДНК [3] и значительное увеличение синтеза рибосомальной РНК [4], что также свидетельствует о действии андрогенов не только на органы-мишени, но и на экстрагенитальную сферу, хотя действие это не однозначно для различных тканей и при различных функциональных состояниях организма [5]. Зависит оно и от возраста жи-



вотных. Установлена возрастная инверсия восприимчивости периферических тканей к действию тестостеронпропионата [6]. Количество рецепторов для ряда гормонов в онтогенезе значительно меняется [1].

В процессах старения важную роль играет количество нуклеиновых кислот и белков в ядрах клеток, а также изменения их соотношений [7]. Обсуждается возможность влияния гормонов на биосинтез нуклеиновых кислот и белков благодаря их взаимодействию с гистонами [5, 8, 9], негистоновыми белками [10], а возможно, и непосредственно с молекулами ДНК [9].

В связи с этим необходимо изучать влияние тестостеронпропионата на концентрацию нуклеиновых кислот и белков в ядрах клеток печени белых крыс разного возраста. Но так как в онтогенезе значительно увеличивается объем (масса) ядер клеток [11], то целесообразно определить не только концентрацию, но и общее содержание нуклеиновых кислот и белков в одном ядре.

Исследовалось влияние тестостеронпропионата, введенного интрамушкулярно в дозе 2,5 мг/100 г веса животных в течение 9 дней, на концентрацию ДНК, РНК, гистонов и их фракций, богатых аргинином и лизином (гистон-1 и гистон-2 соответствен-

Таблица 1  
Возраст и влияние тестостеронпропионата на концентрацию нуклеиновых кислот и белков в ядрах клеток, мг %

Возраст, месяцы	Исследуемая группа	ДНК	РНК	Р РНК Р ДНК	Общий белок	Гистон общий	Гистон-1	Гистон-2	Негистоновые белки
1	Контроль	981,72	200,85	0,195	2793	1290	883	416	1163
	Опыт	988,49	237,12	0,228	3177	1454	1066	388	1471
	Р	>0,10	=0,06	=0,06	=0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
3	Контроль	930,82	221,75	0,227	3042	1121	822	299	1430
	Опыт	933,82	255,57	0,261	3522	1106	960	144	1882
	Р	>0,10	=0,06	=0,05	=0,05	≥0,05	<0,05	<0,03	<0,05
12	Контроль	905,97	211,15	0,222	2531	1099	856	234	1134
	Опыт	921,30	199,54	0,205	2683	1010	779	232	1308
	Р	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	≥0,05	>0,05	>0,10	<0,07
24	Контроль	918,80	194,83	0,202	3212	1472	1149	323	1713
	Опыт	1027,68	225,07	0,209	3773	1690	1251	439	2005
	Р	>0,05	>0,05	>0,05	=0,05	>0,05	>0,05	>0,07	<0,06
Р для возрастных изменений у интактных животных	1—3 мес.	=0,07	<0,06	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	=0,05	>0,05
	3—12 мес.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05
	12—24 мес.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	=0,06	=0,05	=0,05	<0,05



но), и негистоновых белков у крыс-самцов линии Вистар в возрасте 1, 3, 12 и 24 месяца. Получение ядерного препарата из клеток печени и определение в нем количества нуклеиновых кислот и белков описаны в [12, 13]. Вариационно-статистическая обработка результатов проведена по методу Вилкоксона-Манна-Уитни [13]. Достоверными считали различия при уровне значимости разности  $P < 0,05$ .

Оказалось (табл. 1), что концентрация ДНК и РНК у интактных (контроль) животных с возрастом практически не изменяется, только немного уменьшается к старости, что, очевидно, объясняется некоторым превышением возрастания в онтогенезе массы (объема) клеточных ядер над накоплением в них ДНК. Соотношение  $R_{РНК}/R_{ДНК}$  колеблется в узких пределах. Содержание нуклеиновых кислот в среднем в одном ядре значительно увеличивается к старости — соответственно на 52 и 57% для ДНК и РНК (табл. 2), что объясняется процессами полиплоидизации [15]. Ухудшение условий выхода РНК из ядра может также быть одной из причин ее накопления с возрастом.

Концентрация суммарного белка и общего гистона в онтогенезе сохраняется практически на одном уровне, а для гистона-1 и негистоновых белков заметно возрастает только к старости (соответственно на 30 и 47% к 24 мес./1 мес. = 100%). Содержание исследованных белков в одном ядре у интактных животных значительно увеличивается только к 24 месяцам (на 70—126%). Раньше всего накапливается в онтогенезе аргининбогатый белок. Исключением является количественное изменение гистона-2, содержание в одном ядре и концентрация которого постепенно снижаются с возрастом в первую половину онтогенеза, а затем не сколько увеличиваются к старости.

Важным показателем процессов, происходящих в ядре, может служить соотношение ядерных белков с ДНК (табл. 2). Существенно соотношение увеличивается только к 24 месяцам для общего белка и суммарного гистона, а также для гистона-1 и негистоновых белков (на 23, 15, 39 и 58%). При этом увеличение соотношения гистона-1 с ДНК, как и рассмотренное ранее увеличение его содержания в одном ядре, коррелирует с представлением о гистонах, богатых аргинином, как наиболее сильных ингибиторах синтеза РНК и белков [12, 16]. Значительное же увеличение содержания в одном ядре негистоновых белков и их отношения к ДНК не ясно и противоречит уменьшению их содержания в хроматине с возрастом [13]. Возможно, оно в какой-то мере является компенсаторным по отношению к все возрастающей в онтогенезе репрессии генома и связано с предполагаемой способностью этих белков служить активаторами синтеза РНК и белков [17]. Кроме того, следует иметь в виду, что гистоны сосредоточены главным образом в составе хромосом (ДНП), а негистоновые белки находятся и в карิโอплазме. Одновременно в онтогенезе постепенно уменьшается со-



Возраст и влияние тестостеронпропионата на содержание нуклеиновых кислот и белков в одном ядре клеток, пг

Возраст, месяцы	Исследуемая группа	Количество ядер, млн. в 100 мкг ядерной массы	ДНК, пг	РНК, пг	Общий белок, пг	Общий гистон, пг	Гистон-1, пг	Гистон-2, пг	Негистоновые белки, пг	Общий белок		Общий гистон		Гистон-1		Гистон-2		Негистоновые белки	
										ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК
1	Контроль Опыт	59,10	16,61	3,39	47,26	21,98	14,94	7,04	19,68	2,84	1,31	0,90	0,41	0,90	0,41	0,90	0,41	1,18	0,41
		68,75 >0,05	14,38 >0,05	3,44 >0,05	46,21 >0,05	21,15 >0,05	15,50 >0,05	5,64 =0,06	21,40 >0,05	3,21 >0,05	1,47 >0,05	1,08 <0,05	0,39 >0,05	1,08 <0,05	0,39 >0,05	1,08 <0,05	0,39 >0,05	1,49 <0,05	0,39 <0,05
3	Контроль Опыт	52,35	17,78	4,23	58,11	21,41	15,70	5,71	27,31	3,26	1,20	0,88	0,32	0,88	0,32	0,88	0,32	1,53	0,32
		62,78 >0,05	14,87 >0,05	4,08 >0,05	56,10 >0,05	17,62 >0,05	15,29 >0,10	2,29 <0,01	29,98 =0,05	3,50 >0,05	1,18 >0,09	1,03 <0,05	0,15 <0,03	1,03 <0,05	0,15 <0,03	1,03 <0,05	0,15 <0,03	2,02 <0,05	0,15 <0,03
12	Контроль Опыт	49,78	18,19	4,24	50,84	22,07	17,37	4,70	22,78	2,81	1,21	0,95	0,26	0,95	0,26	0,95	0,26	1,25	0,26
		44,44 >0,05	20,73 >0,05	4,49 <0,05	60,37 =0,06	22,72 >0,10	17,51 >0,05	5,22 <0,05	29,43 =0,05	2,91 <0,10	1,10 >0,05	0,84 >0,05	0,26 >0,10	0,84 >0,05	0,26 >0,10	0,84 >0,05	0,26 >0,10	1,42 <0,05	0,26 <0,05
24	Контроль Опыт	36,50	25,18	5,33	88,00	40,33	31,48	8,85	46,93	3,49	1,51	1,25	0,26	1,25	0,26	1,25	0,26	1,86	0,26
		37,39 =0,05	27,48 >0,05	6,02 <0,05	100,91 =0,06	45,20 >0,05	33,49 ≤0,05	11,74 <0,01	53,62 >0,05	3,49 >0,10	1,64 >0,05	1,22 >0,07	0,42 <0,05	1,22 >0,07	0,42 <0,05	1,22 >0,07	0,42 <0,05	1,95 >0,05	0,42 >0,05
Р для возрастных изменений у интактных животных	1—3 мес. 3—12 мес. 12—24 мес.	—0,07	—0,07	—0,05	—0,06	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,05	—0,06	—0,05
		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	—0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		<0,05	<0,05	<0,05	<0,04	<0,03	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,06	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05



отношение гистона-2 с ДНК и составляет у 24-месячных крыс только 64% от уровня одномесячных.

У крыс опытной группы содержание нуклеиновых кислот в одном ядре и их концентрация практически не отличаются от нормы. Введение гормона увеличивает концентрацию общего белка. Концентрация негистоновых белков у младших возрастных групп опытных животных повышена на 11—14%, равно и их содержание (особенно в возрасте 3—12 месяцев). Это соответствует представлению о возможной гормональной стимуляции белкового синтеза [2] и может быть существенным для процессов генной регуляции на уровне транскрипции [17]. В 1 и 3 месяца возрастает концентрация гистона-1 и снижается для гистона-2, как и его содержание в одном ядре у молодых животных (20—60%, возраст 1—3 месяца). Увеличивается оно только к старости (33%). Это может быть связано с тем, что тестостерон, по данным Слайсера, преимущественно связывается с лизинбогатыми гистонами [8]. Вместе с тем на количество общего гистона гормон не оказывает заметного влияния, как и на содержание гистона-1 — 6% у старых животных.

Влияние тестостерона на соотношение общего белка и суммарного гистона к ДНК у животных разного возраста не существенно. Соотношение гистон-1/ДНК у 1- и 3-месячных животных увеличено по сравнению с контролем, а у 12—24-месячных — на уровне нормы. Во всех возрастных группах (в 24 месяца, однако, незначимо) отмечено накопление негистоновых белков на 26, 32, 14 и 5% соответственно для 1-, 3-, 12- и 24-месячных животных, что может быть указанием на один из путей ослабления гормональной активации стареющего генома.

Таким образом, действие тестостерона на печень не является специфическим. Но в ней есть некоторые внутриклеточные (ядерные) рецепторы, которые могут частично «просыпаться» при экзогенном введении гормона у младших возрастных групп животных, у которых еще не закончились процессы роста и дифференцировки организма.

Можно допустить, что предполагаемая дерепрессорная роль гормона способна осуществляться при сохранении постоянной концентрации за счет ослабления связей гистонов-репрессоров с ДНК или их перераспределения на нити хроматина и (или) увеличения концентрации негистоновых белков, обладающих дерепрессорной функцией.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Talwar G. P. Mechanism of Action of Growth Promoting and developmental Hormons. — In: Receedings of the Internat. Union of physiol. Sciences. XXVI Internat. Congress, New Delhi (1974). Abstracts of Lectures and Symposia, 1974, p. 64—65.
2. Kochakian C. D., Harrison D. J. Regulation of Nucleic Acid Synthesis by Androgens. — «Endocrinology», 1962, vol. 70, N 1, p. 99—103.
3. Kidson G., Kirby S. Selective Alteratins of Mammalian Messenger



- RNA, Synthesis: Evidence for Differential Action of Hormones of Gene Transcription. — «Nature», 1964, vol. 203, N 4945, p. 599—605.
4. Тищенко Р. С., Гольбер Л. М. Влияние андрогенов на биосинтез ядерных фракций нуклеиновых кислот в печени крыс. — «Проблемы эндокринологии», 1968, т. 14, № 5, с. 100—104.
  5. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М., «Наука», 1971. 222 с.
  6. Синтетические способности и реактивность тканей животного организма в онтогенезе. — В кн.: Труды конф. по возрастн. изменениям обмена веществ и реактивности организма. Киев, изд. АН УССР, 1951, с. 17—26. Авт.: Никитин В. Н., Голубицкая Р. И., Дрючина Л. А., Семенова З. Л.
  7. Никитин В. Н. Макромолекулярные аспекты старения. — В кн.: Ведущие факторы онтогенеза. Киев, «Наукова думка», 1972, с. 6—43.
  8. Sluysen M. Binding of Hormones to Histones. — In: Proc. Internat. Sympos. Cell Nucl. Metabolism, radiosensitivity London, 1966, p. 75—76.
  9. Епифанова О. И. Гормоны и размножение клеток. М., «Наука», 1965. 243 с.
  10. Салганик Р. И. Гормональная регуляция транскрипции. — В кн.: Механизмы регуляции функции клеточного ядра. Матер. IV Всесоюзн. симпозиума по структуре и функции клеточного ядра. Тбилиси, «Мецниереба», 1972, с. 101—102.
  11. Гребенникова Н. П., Новикова Н. М. Цитологические исследования печени молодых и старых крыс при безбелковой диете, откорме и регенерации. — «Труды НИИ биологии и биол. ф-та ХГУ», 1960, т. 29, с. 149—159.
  12. Клименко А. И. Некоторые данные о соотношении гистон/ДНК в ядрах клеток печени молодых и старых крыс. «Биохимия», 1964, т. 29, с. 820—823.
  13. Мартыненко А. А., Никитин В. Н., Сагалова Н. Б. Возрастные изменения в составе хроматина ядер клеток печени белых крыс. «Журн. эволюционной биохимии и физиологии», 1972, т. 8, № 2, с. 128—131.
  14. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., «Медицина», 1973. 141 с.
  15. Рябинина З. А., Бенюш В. А. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления. М., «Медицина», 1973. 187 с.
  16. Mirsky A. E., Silverman B., Panda N. Blocking by Histones of Accessibility to DNA in Chromatin Addition of Histones. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1972, vol. 69, N 11, p. 3243—3246.
  17. Shea S., Kleinsmith L. S. Template-specific Stimulation of RNA Synthesis by Phosphorylated Non-histon Chromatin Protein. — «Biochem. and Biophys. Res. Commun.», vol. 50, N 2, p. 473—477.

УДК 577.1.547.96

А. Ф. КОЧЕНКОВ

Отдел молекулярной биологии и  
биофизики онтогенеза НИИ биологии

# **ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ И СРОКА ВВЕДЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНПРОПИОНАТА НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА ЯДЕР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС**

Стероидные гормоны, в частности андрогены, существенно влияют на белковый обмен [1]. С возрастанием дозы вводимого тестостерона вызываемое им увеличение веса кастрированных животных становится менее существенным, а при значи-



тельных дозах вес опытных крыс снижается [2]. Обнаружено также фазное действие гормона в зависимости от срока его введения: тестостерон в дозе 1,0 мг до 20-го дня инъекций повышает вес кастрированных животных, который к 40-му дню введения гормона вновь возвращается к исходному уровню; у интактных же животных отмечено прогрессивное уменьшение веса тела и выведение азота, начиная с 10—15 дня [2].

Оказываемое андрогенами влияние на биосинтез нуклеиновых кислот и белков [1, 3, 4] обсуждается в связи с возможностью их взаимодействия с гистонами [1, 5] и негистоновыми белками [6]. Поэтому необходимо изучить влияние тестостеронпропионата на количество нуклеиновых кислот и белков в ядрах клеток печени в зависимости от дозы и срока введения. При выборе ткани (печень) исходили из необходимости установить возможность влияния экзогенного тестостерона на этот экстрагенитальный орган, так как есть указания на то, что рецепторы, находящиеся в печени в «закрытом виде», могут в особых случаях реагировать с половыми гормонами [7].

Исследовалось влияние тестостеронпропионата, введенного внутримышечно в дозах 2,5 и 10 мг/100 г веса животного в течение 3 и 9 дней, на концентрацию ДНК, РНК, гистонов и их фракций, богатых аргинином и лизином (гистон-1 и гистон-2 соответственно), и негистоновых белков у белых крыс-самцов линии Вистар (возраст 3 месяца). Получение ядерного препарата из клеток печени и определение в нем нуклеиновых кислот и белков описано в [8, 9]. Вариационно-статистическая обработка результатов проведена по методу Вилкоксона-Манна-Уитни [10]. Достоверными считали различия при уровне значимости разности  $P \leq 0,05$ .

Установлено (таблица), что при трехдневном введении гормона существенно увеличивается только концентрация общего белка и его соотношение с ДНК (особенно при дозе 10 мг), а также количество негистонного белка при дозе гормона 2,5 мг (на 23%). Тестостеронпропионат в дозе 10 мг/100 г и сроке введения 9 дней вызывает, кроме увеличения отношения общий белок/ДНК, также рост соотношения гистона-1 с ДНК (на 17%). При этом же сроке введения гормон в дозе 2,5 мг вызывает существенное увеличение не только концентрации общего белка (17%), но и гистона-1 и особенно негистоновых белков (на 15 и 32% соответственно), а также их отношений к ДНК. Соотношение гистона-2 с ДНК и его концентрация у опытных животных достоверно уменьшается, что может быть связано с преимущественным, по данным Слайсера [5], связыванием тестостерона с гистонами, богатым лизином.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что хотя для печени действие тестостеронпропионата и не является специфическим, но, во всяком случае у молодых животных, в ней



Количественные изменения нуклеиновых кислот и белков в ядрах клеток печени в зависимости от дозы и срока введения тестостеронпропионата

Срок введения гормона, дни	Доза введения гормона, мг на 100 г веса	ДНК, мг, %	РНК, мг, %	Общий белок, мг, %	Общий гистон, мг, %	Гистон-1, мг, %	Гистон-2, мг, %	Негистоновые белки, мг, %	Общий белок		Общий гистон		Гистон-1		Гистон-2		Негистоновые белки	
									ДНК	мг	ДНК	мг	ДНК	мг	ДНК	мг	ДНК	мг
3	2,5 мг	874,0	217,5	4492	1008	801	207	1756	5,14		1,15		0,92		0,24		2,01	
	P	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05		> 0,05		> 0,05		> 0,05		< 0,05	
	Контроль	930,8	221,7	3042	1121	822	299	1430	3,26		1,20		0,88		0,32		1,53	
	P	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05		> 0,05		> 0,05		> 0,05		> 0,05	
9	10 мг	893,9	209,3	4896	1183	782	373	1544	5,48		1,32		0,87		0,42		1,73	
	2,5 мг	933,8	255,6	3522	1105	960	144	1882	3,50		1,18		1,03		0,15		2,02	
	P	≥ 0,05	> 0,05	= 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05		> 0,05		< 0,05		< 0,05		< 0,05	
	Контроль	930,8	221,7	3042	1121	822	299	1430	3,26		1,20		0,88		0,32		1,53	
	P	≥ 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05		> 0,05		< 0,05		> 0,05		> 0,05	
	10 мг	723,2	181,6	2812	1104	749	339	1195	3,89		1,53		1,04		0,47		1,65	



есть ядерные рецепторы, которые могут взаимодействовать с гормоном, что существенно зависит от дозы и срока действия гормона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М., «Наука», 1971. 222 с.
2. Kochakian C. D., Endahl B. R. Changes in Body Weight of normal and Castrated Rats by different Doses of testosterone propionate. — «Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med», 1959, vol. 100, p. 520—524.
3. Kidson G., Kirby S. Selective Alteration of Mammalian Messenger — RNA Synthesis: Evidence for Differential Action of Hormones on Gene Transcription. — «Nature», 1964, vol. 203, N 4945, p. 599—605.
4. Kochakian C. D., Tillotson C. A. Comparison of the Effect of Inanition Castration and Testosterone of the Muscles of the Male Guinea Pig. — «Endocrinology», 1957, vol. 60, p. 144—149.
5. Sluyser M. Binding of Hormones to Histones. — In: Proc. Internat. Sympos. Cell. Nucl. Metabolism, radiosensitivity, London, 1966, p. 75—76.
6. Салганик Р. И. Гормональная регуляция транскрипции. — В кн.: Механизмы регуляции функции клеточного ядра. Матер. IV Всесоюзного симпозиума по структуре и функции клеточного ядра, Тбилиси, «Мецниереба», 1972, с. 101—102.
7. Talwar G. P. Mechanism of Action of Growth Promoting and Developmental Hormones. — In: Receedings of the Internat. Union of physiol. Sciences. XXVI Internat. Congress, New Delhi (1974). Abstracts of Lectures and Symposia, 1974, p. 64—65.
8. Мартыненко А. А., Никитин В. Н., Сагалова Н. Б. Возрастные изменения в составе хроматина ядер клеток печени белых крыс. — «Журн. эволюционной биохимии и физиологии», 1972, т. 8, № 2, с. 128—131.
9. Клименко А. И. Некоторые данные о соотношении гистон/ДНК в ядрах клеток печени молодых и старых крыс. — «Биохимия», 1964, т. 29, с. 820—823.
10. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., «Медицина», 1973. 141 с.

УДК 577.155.2 : 577.95 + 576.312 : 612.35

П. А. КАЛИМАН,  
Б. ШРЕДЕР  
Кафедра биохимии

#### АКТИВНОСТЬ РНК-азы ЯДЕР И ЯДЕРНЫХ ОБОЛОЧЕК ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

В ядрах эукариотов, кроме транскрипции генетического материала, осуществляется и распад РНК, катализируемый специфическими ферментами. Наличие РНК-азной активности в ядрах гепатоцитов белых крыс и ряда других животных установлено многими авторами [1—6]. Выяснение свойств и функций ядерных РНК-аз имеет большое значение для расшифровки механизмов регуляции белкового синтеза. Особый интерес представляет изучение возрастных особенностей метаболизма РНК.

Задачей настоящей работы явилось изучение локализации, свойств и активности РНК-азы ядер в процессе онтогенеза.



Исследования проводились на белых крысах линии Вистар в возрасте 1, 3, 12, 24 месяца. Животные забивались декапитацией, ядра выделялись на холоду методом дифференциального центрифугирования [7], и чистота их контролировалась микроскопическим путем. Для получения ядерных оболочек ядра подвергали осмотическому шоку в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,2, обломки ядер и неразрушенные ядра удаляли центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, а ядерные оболочки собирали затем центрифугированием при 50 000 g в течение 15 мин [8].

Активность РНК-азы определяли по методу Шапота [9] инкубацией проб в течение одного часа при pH 7,8 и 37°C. Негидролизованную РНК осаждали 0,3 М раствором  $ZnCl_2$  в 60% этаноле. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли при 260 nm на СФ-4А. Одновременно определяли активность РНК-азы в пробах с добавлением *n*-хлормеркурийбензоата (ХМБ) ( $3 \cdot 10^{-4}$  М). Белок определяли по Лоури [10]. Активность фермента выражали в условных единицах ( $\Delta E_{260}$ ) на 1 мг белка за 1 мин. Результаты экспериментов подвергнуты вариационно-статистической обработке [11].

Данные активности РНК-азы и влияния ХМБ на активность фермента в ядрах и ядерных оболочках печени крыс разного возраста приведены в таблице. Как видно из этих данных, ядра и ядерные оболочки обладают примерно одинаковой РНК-азной активностью. По данным некоторых авторов активность РНК-азы во фракции наружных ядерных мембран была в 2,6 раза выше, чем в интактных ядрах [12]. В данных условиях опытов в составе ядерных оболочек были наружные и внутренние ядерные мембраны, поэтому мы не нашли увеличения удельной активности РНК-азы.

В последние годы в связи с выяснением роли РНК-азы в ядрах широко обсуждается вопрос о существовании различных форм РНК-аз. Наличие РНК-азы в хроматино-ядрышковом аппарате клеток было показано ранее [5, 13, 14]. Эта РНК-аза, возможно, играет определенную роль при распаде молекул новообразованной РНК. В литературе обсуждается также вопрос о том, что РНК-аза, локализованная в хроматине, может регулировать функции генома путем дестабилизации ДНК [15] и созданием необходимого фонда предшественников РНК, используемых при ее синтезе [16]. РНК-аза наружных ядерных мембран, возможно, принимает участие в регуляции ядерно-цитоплазматических отношений и препятствует проникновению РНК в ядро из цитоплазмы.

ХМБ значительно увеличивает активность РНК-азы в целых ядрах и в ядерных мембранах. Активирование РНК-азы, ХМБ установлено и другими авторами [4, 5, 12]. По-видимому, ядерные РНК-азы находятся в латентной форме и блокированы естественным ингибитором при участии SH-групп. Наличие такого ингибитора было установлено в ядерном соке [5, 17] и в супер-



Активность РНК-азы (в  $\Delta E_{260}$ ) ядер и ядерных оболочек печени крыс разного возраста (А — без ХМБ; Б — с ХМБ. Достоверность различий:  $P$  — по сравнению с 1 мес.,  $P_1$  — по сравнению с 3 мес.,  $P_2$  — между А ядер и ядерных мембран,  $P_3$  — между Б ядер и ядерных мембран)

Возраст, месяцы	Ядра			Ядерные мембраны			$P_2$	$P_3$
	А	Б	Степень активирования	А	Б	Степень активирования		
1	$0,013 \pm 0,0015$	$0,064 \pm 0,0041$ $P_1 < 0,001$	5,0	$0,013 \pm 0,0024$	$0,080 \pm 0,0073$ $P_1 < 0,01$	5,9	$> 0,05$	$> 0,04$
3	$0,0245 \pm 0,0026$ $P < 0,01$	$0,091 \pm 0,0040$	3,9	$0,023 \pm 0,0031$ $P < 0,05$	$0,112 \pm 0,0041$	4,9	$> 0,05$	$< 0,01$
12	$0,020 \pm 0,0019$ $P < 0,05$	$0,052 \pm 0,0027$ $P_1 < 0,001$	2,6	$0,021 \pm 0,0041$ $P > 0,05$	$0,071 \pm 0,0055$ $P_1 < 0,001$	3,4	$> 0,05$	$< 0,01$
24	$0,021 \pm 0,0024$ $P < 0,05$	$0,058 \pm 0,0060$ $P_1 < 0,01$	2,8	$0,028 \pm 0,0040$ $P < 0,01$	$0,076 \pm 0,0038$ $P_1 < 0,001$	2,7	$> 0,05$	$< 0,05$

натанте гепатоцитов [1, 4, 18, 19], РНК-аза ядерных оболочек активизируется ХМБ в большей степени, чем неразрушенных ядер.

Возрастные особенности активности РНК-азы ядер состоят в ее повышении у 3-, 12- и 24-месячных крыс по сравнению с одномесечными. Между 3- и 24-месячным возрастом изменений активности фермента не отмечено. Активность РНК-азы ядерных оболочек также повышается с возрастом (исключение составили 12-месячные крысы). В литературе мы не встретили данных об активности РНК-азы ядер в онтогенезе. Имеются данные о более высокой активности этого фермента в ядрах гепатоцитов эмбрионов и новорожденных крыс по сравнению со 100- и 200-граммовыми крысами [16].

ХМБ также по-разному влияет на активность РНК-азы ядер и ядерных оболочек печени крыс разного возраста. Наиболее выраженное активирование РНК-азы ХМБ отмечено у 3-месячных крыс. Одной из особенностей активирования РНК-азы ХМБ в зависимости от возраста животных является то, что у молодых животных активность РНК-азы ядерных оболочек в присутствии ХМБ возрастает в 4—5 раз в целых ядрах и в 5—6 раз в ядерных оболочках, тогда как у 12- и 24-месячных крыс фермент активизируется только в 3 раза.

Установленные особенности активности РНК-азы ядер и ядерных оболочек печени крыс разного возраста и характер активирования фермента ХМБ свидетельствуют о том, что наряду с внутриядерным распределением и возрастными особенностями



ми синтеза фермента в механизмах регуляции активности ядерных РНК-аз в онтогенезе имеет место взаимодействие фермента с его специфическим ингибитором.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pirotte M., Desveux V. — Cite in Roth J. S. Ribonuclease IV. Purification and charakterisation of the RNases of rat liver mytochondria. — «J. Biol. Chem.» 1957, vol. 227, N 2, p. 591—604.
2. Schneider W. C., Hogeboom G. H. Intracellular distribution of enzymesX. desoxyribonuclease. «J. Biol. Chem.» 1952, vol. 198, N 1, p. 155—163.
3. De Lamirande G. et coll. Intracellular distribution of acid and alkaline ribonuclease in normal rat livel. «Science», 1954, vol. 119, 3082, p. 351—359.
4. Roth J. S. Ribonuclease VI. Purification and charakterization of the RNases of rat liver mytochondria. — «J. Biol. Chem.», 1957, vol. 227, N 2, p. 581—604.
5. Enzymatic studies on isolated nucleoli of rat liver. — «J. Biol. Chem.», 1966, vol. 241, N 1, p. 71—76. Auth.: G. Siebert, J. Villalobos, J. Steele, H. Busch.
6. Edwards G. S., Wogan G. N. Ribonuclease activity in liver nuclei of aflatoxin-treated rats. — «Life Sciences», 1972, vol 11, part II, p. 685—689.
7. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Striebach H. J. Cytochemical studies V. On the isolation and biochemical properties of liver cell nuclei. — «J. Biol. Chem.», 1952, vol. 196, N 1, p. 111—120.
8. Моноаминоксидазная активность клеточных ядер и ядерных фракций печени мышей в норме и при развитии асцитной саркомы 37. — «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1972, т. 73, № 4, с. 37—39. Авт.: М. Хужанбердиев, С. Н. Кузьмина, В. В. Торкин, И. Б. Збарский.
9. Шапот В. С., Чудинова В. А., Кречетова Р. Д. Методы выделения и определения активности нуклеаз. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., «Медицина», 1964, т. 1, с. 267—281.
10. Protein measurement with the folin phenol reagent. — «J. Biol. Chem.», 1951, vol. 193, N 1, p. 265—675. Auth: D. H. Lowry, N. J. Rosenbrough A. L. Farr, R. J. Rendall.
11. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М., «Мир», 1963, с. 65—76.
12. Скридоненко А. Д., Горчакова Т. А. Рибонуклеазная активность наружной ядерной мембраны гепатоцитов крыс. «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 1973, т. 76, № 7, с. 53—55.
13. Prestayko A. W., Lewis B. C., Busch H. Endoribonuclease activity associated with nucleolar ribonucleoprotein particles from novikoff hepatoma. — «Biochim. Biophys. Acta», 1972, vol. 262, N 1, p. 90—103.
14. Шапот В. С., Кречетова Р. Д., Чудинова И. А. Нуклеазная активность ядерных гистонов и основных белков цитоплазматических и ядерных рибосом. — В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., «Наука», 1970, с. 286—292.
15. Felsenfeld G., Sandeen G., von Hippel P. H. The destabilizing effect of ribonuclease on the helical DNA structure. — «Proc. Nat. Acad. Sci. US», 1963, vol. 50, N 4, p. 644—651.
16. Bresnick E., Sage J., Lanclos K. Ribonuclease activity in hepatic nuclei during development. — «Biochim. Biophys. Acta», 1966, vol. 114, N 4, p. 631—633.
17. Скридоненко А. Д., Горчакова Т. А. Очистка и свойства ингибитора рибенуклеазы из ядерного сока печени крыс. — «Биохимия», 1974, т. 39, № 1, с. 182—187.
18. Ровенский Ю. Р. Биологическая роль нуклеаз в нормальном и опухолевом росте. — «Успехи современной биологии», 1965, т. 59, вып. 3, с. 354—373.
19. Roth J. S. Ribonuclease VII. Partial purification and charakterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fraction. «J. Biol. Chem.», 1958, vol. 231, N 2, p. 1085—1095.



**ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА АКТИВНОСТЬ АЛЬДОЛАЗЫ  
В ЦИТОПЛАЗМЕ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ КРЫС  
РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

Известно, что в тканях животных и человека есть 3 типа альдолазы: А (мышцы), В (печень) и С (мозг), которые отличаются специфичностью; а также рядом свойств (электрофоретические, хроматографические и иммунологические). Кроме этого, они отличаются субстратной специфичностью по отношению к ФМФ и ФДФ, и отношение этих же двух активностей ФДФ/ФМФ составляет существенную характеристику тканевых альдолаз [1—2].

Данные об изменении активности альдолазы в онтогенезе немногочисленные. Имеются сведения о том, что в эмбриональный, а также в ранний постнатальный период в печени животных изменяется соотношение ФДФ и ФМФ, т. е. происходит перераспределение скоростей превращения этих двух субстратов, что свидетельствует об определенных различиях в метаболизме углеводов, которые есть в онтогенезе [3—4]. Поэтому изучение данного вопроса представляет большой интерес для онтобиохимии.

Практически не освещен вопрос о влиянии тироксина на активность альдолаз в онтогенезе. Под действием гормонов щитовидной железы возрастает активность многих ферментов гликолиза-гексокиназы, фосфофруктокиназы, триозофосфатизомеразы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и др. [5—8]. По мнению многих авторов, действие тироксина на активность ферментов углеводного обмена связано с индукцией их синтеза [9—10]. Однако в отношении фруктозодифосфатаальдолазы эти сведения противоречивы. В одних работах показано, что при гипертиреозе повышается активность ФДФА [11], в других отмечается снижение этого фермента под действием тироксина [12]. В некоторых работах указывается, что эта активность не изменяется после введения тироксина [13].

Поэтому представило интерес выяснить, как изменяется активность ФДФА и ФМФА в некоторых органах (печень, почки, сердце и мышцы) интактных крыс разного возраста, а также при гипертиреозе, вызванном введением тироксина.

*Постановка эксперимента и методы.* Исследовались крысы линии Вистар в возрасте 1, 3, 12, 18 и 24-х месяцев. Тироксин вводился внутримышечно в дозе 60 мкг на 100 г веса тела на протяжении шести суток. На седьмые сутки животных убивали. Контролем служили интактные крысы. Объектом исследования являлись печень, почки, сердце и мышцы. Для изучения влияния тироксина на альдолазную активность в печени и почках брались крысы в возрасте 1, 3 и 18 месяцев.



В работе определялись монофосфатальдозная и дифосфатальдозная активности методом Брукса в модификации Товарицкого В. И. и Волуйской Е. Н. по цветной реакции три-озофосфатов с 2,4-динитрофенилгидразином [14]. Активность альдозы выражена так: *мкг фосфотриоз (мкг белка/мин)*. Количество белка определялось по методу Лоури [15].

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке методом Фишера-Стьюдента [16].

*Результаты и их обсуждения.* В табл. 1 представлены данные активности альдозы в печени, почках, сердце и мышце крыс 1, 3, 12, 18 и 24-х месяцев.

Согласно данным, активность альдозы во всех органах значительно увеличивается у 3-месячных крыс, а затем она снижается по мере старения животных. Более заметное снижение активности альдозы в печени и почках старых животных отмечено с субстратом ФМФ.

Таблица 1

Изменение активности ФМФ- и ФДФ-альдозы в органах крыс разного возраста, *мкг фосфотриоз (мг белка/1 мин)*

Возраст, месяцы	Печень		Почки		Сердце	Мышцы
	ФМФ	ФДФ	ФМФ	ФМФ	ФДФ	ФДФ
1	5,71 ±0,31 100%	6,43 ±0,58 100%	4,71 ±0,38 100%	9,18 ±0,53 100%	2,42 ±0,22 100%	19,01 ±0,9 100%
$P_{1-3}$	<0,05	<0,001	<0,02	<0,002	<0,02	0,05
3	6,85 ±0,35 114%	9,28 ±0,31 155%	6,28 ±0,44 126%	12,28 ±0,58 136%	3,46 ±0,32 173%	21,08 ±1,05 114%
$P_{3-12}$	<0,001	<0,001	<0,002	<0,001	<0,01	0,01
12	4,12 ±0,17 69%	4,88 ±0,55 81%	2,45 ±0,17 49%	6,88 ±0,32 76%	9,10 ±0,17 105%	10,04 ±0,32 53%
$P_{12-18}$	>0,05	>0,05	<0,002	<0,05	—	—
18	4,14 ±0,92 69%	5,00 ±0,32 83%	2,90 ±0,22 58%	6,59 ±0,21 82%	—	—
$P_{18-24}$	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	—	—
24	1,98 ±0,10 33%	3,27 ±0,17 55%	1,37 ±0,32 27%	5,23 ±0,35 58%	1,09 ±0,17 55%	7,22 ±0,48 37%



Как видно из табл. 1, обнаружена одна и та же возрастная направленность изменений активности ФМФ- и ФДФ-альдозы во всех органах. Более высокая активность ФДФ-альдозы 3-месячных крыс показана в печени, почках и сердце (соответственно на 55, 36 и 73%). У 12- и 18-месячных крыс активность поддерживается на одинаковом уровне, затем сильно падает к 24-му месяцу.

В литературе имеются немногочисленные и неполные сведения относительно активности альдозы с возрастом. Исследуя активность альдозы в печени плода крысы (за 5 дней до рождения) и до 65-го дня постнатальной жизни, Burch H. B. [17] отмечает некоторое снижение ее активности. Такое снижение было отмечено Ermini N. и др. [17] в красных мышцах на 23% при изучении альдозазной активности в красных и белых мышцах крыс в возрасте 3—7 и 20—30 месяцев. В разных тканях организма по-разному изменяется скорость протекания альдозазной реакции по отношению к ФДФ.

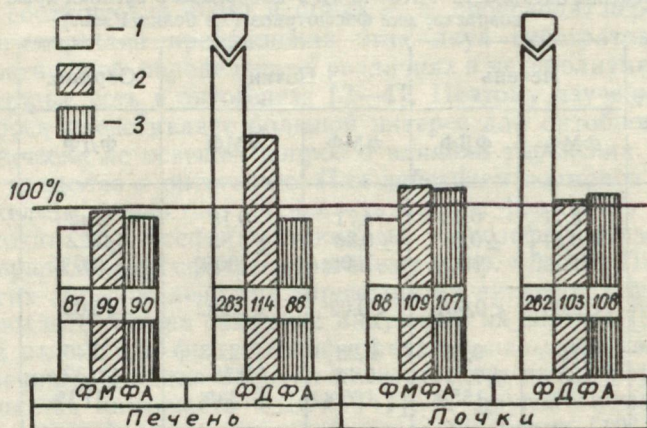


Рис. 1. Влияние тироксина на активность ФМФ- и ФДФ-альдозы в печени и почках крыс разного возраста: 1 — 1 месяц; 2 — 3 месяца; 3 — 18 месяцев.

На рис. 1 приведены данные влияния тироксина на активность альдозы в печени и почках крыс 1, 3 и 18-ти месяцев. Как видно из этих данных, тироксин оказывает существенное действие на активность ФДФ-альдозы в печени и почках лишь у животных одномесячного возраста. На активность ФМФ-альдозы тироксин не влияет. Прирост активности ФДФ-альдозы у одномесячных крыс под действием тироксина составляет 83% в печени и 82% в почках. Это свидетельствует о повышении интенсивности гликолиза под влиянием тироксина. Такая же возрастная тенденция была обнаружена при изучении влияния



тироксина на концентрацию лактата в печени крыс, т. е. содержание молочной кислоты увеличивается только у одномесячных крыс и не изменяется статистически значимо у других возрастных групп.

Повышение активности альдолазы при гипертиреозе в почках отмечается в ряде работ [18, 19], а в отношении печени эти сведения противоречивы, хотя чаще утверждается мнение о понижении активности ФДФА [12—21].

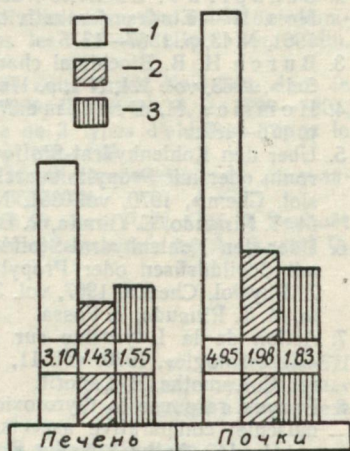
Кроме того, интересно проследить за возрастными изменениями соотношения активности ФДФ/ФМФ-альдолазы, так как оно является важным показателем изменения изозимного спектра альдолазы.

Таблица 2  
Возрастное изменение соотношения  
ФДФ и ФМФ

Ткань	Возраст, месяцы				
	1	3	12	18	24
Печень	1,25	1,34	1,19	1,18	1,69
Почки	1,93	1,97	2,61	2,44	4,80

Рис. 2. Изменение соотношения активности ФДФА и ФМФА в печени и почках крыс разного возраста под влиянием тироксина:

1 — 1 месяц; 2 — 3 месяца;  
3 — 18 месяцев.



В табл. 2 приведены коэффициенты отношений ФДФ/ФМФ в печени и почках крыс разного возраста. Значительное увеличение этого коэффициента наблюдали у 24-месячных крыс (1,69 и 4,80 соответственно). Это, по-видимому, связано со снижением скорости расщепления ФМФ у старых животных. У всех остальных животных этот коэффициент составляет приблизительно 1 и 2 (соответственно в печени и почках), что соответствует литературным данным [21—23].

При гипертиреозе (рис. 2) значительное изменение соотношения ФДФ/ФМФ в печени и почках (примерно вдвое) наблюдается лишь у крыс в возрасте одного месяца. Это, очевидно, свидетельствует о существовании в обоих органах единого механизма действия тироксина на активность альдолазы. Данное явление связано с тем, что альдолаза типа А активна в отношении расщепления ФДФ, а типа В используется только для синтеза ФДФ и расщепления ФМФ при обмене фруктозы [24, 25]. Следовательно, увеличение отношения ФДФ/ФМФ в печени и почках крыс одномесячного возраста после введения



тироксина (за счет ФДФ) свидетельствует о том, что под влиянием гормона повышается лишь активность альдолазы типа А.

Таким образом, с возрастом активность альдолазы повышается от 1-го к 3-м месяцам, затем падает от 3-х к 24-м месяцам во всех исследованных органах. Введение тироксина повышает активность фермента и отношение ФДФ/ФМФ в печени и почках лишь у крыс в возрасте одного месяца.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Penhoët E. E., Kochman M., Rutter W. Isolation of fructose-1,6-diphosphate aldolases A, B and C. «Biochem.», 1969, N 8, p. 4391—4395.
2. Schapira F. L'activité fructose-1-phospho-aldolasique des tissus de mammifères. II — Etudes des activités aldolasiqes du foie. «Bull. Soc. Chem.», 1961, N 43, p. 1367—1375.
3. Burch H. B. Biochimical changes in the pariental rat liver. «Ann. Academ. Sci.», 1963, vol. 111, N 1, p. 176—182.
4. Hommes F., Draisme M. Cité in Burch H. B., 1963, vol. 111, N 1, p. 176—182.
5. Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in den Erythrozyten von mit Trijodthyronin oder mit Propylthiouracil behandelten Ratten. «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», 1970, vol. 351, N 4, p. 479—482. Auth.: N. Bargoni, T. Fossa, M. T. Rinaudo, C. Giunta, R. Bruno.
6. Uder den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in der Niere und im Skelettmuskel vom mit Schilddrüsen oder Propylthiouracil gefütterten Ratten; «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», 1967, vol. 348, p. 303—307. Auth.: N. Bargoni, M. A. Crillo, M. T. Rinaudo, T. Fossa.
7. Action de la L-tyrosine sur quelques étapes du métabolisme énergétique. «Agrossologie», 1970, vol. 11, N 1, p. 15—19. Auth.: M. R. Ornellas, F. Thuret, C. Lamothe, H. Laborit.
8. Enzyme response to thyrotoxicosis and hypothyroidisme in human liver and muscle: comparative aspects. «Eur. J. Clin. Invest.», 1972, vol. 2, N 3, p. 141—149. Auth.: J. Nolhe, D. Pette, B. Bachmaier, P. Kiefhaber, H. Schneider, P. C. Scicba.
9. Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in den Brythrozyten von mit Trijodthyronin oder mit Propylthiouracil behandelten Ratten. «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1970, vol. 351, N 4, p. 479—482. Auth.: N. Bargoni, T. Fossa, M. T. Rinaudo, C. Giunta, R. Bruno.
10. Krause E. G., Wollenberger A. Abhängigkeit der Aktivität einiger Enzyme des Glykogenstoffwechsels des Skelettmuskels der Ratte vom Schilddrüsenstatus. «Acta biol. et med. german.», 1968, vol. 2, N 5, p. 615—624.
11. Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in den Brythrozyten von mit Trijodthyronin oder mit Propylthiouracil behandelten Ratten. «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1970, vol. 351, N 4, p. 479—482. Auth.: N. Bargoni, T. Fossa, M. T. Rinaudo, C. Giunta, R. Bruno.
12. Mach Z. Wplyw zaburzen czynnosci tarczycy na aktywnosc zespolu enzymow. «Patol. pol.», 1971, vol. 22, N 3, p. 447—451.
13. Влияние тироксина на активность некоторых ферментов обмена углеводов и аминокислот в печени морских свинок. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, № 2, с. 165—169. Авт.: А. И. Ангелов, Н. П. Митев, Н. Г. Пашев, А. М. Крышкова.
14. Товарницкий В. Н. Метод определения альдолазы в сыворотке крови. Современные методы в биохимии. М., «Медицина», 1964. 303 с.
15. Protein measurement with the folin phenol reagent. «J. Biol. Chem.», 1951, vol. 193, N 1, p. 265—675. Auth.: D. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. G. Rendall.
16. Бейли Н. Статистические методы в биологии, М., Изд-во иностр. лит., 1962, с. 251—257.



17. Ermini M. Szelényi I. Aktivitat der Aldolase und der Succinatdehydrogenase (SDH) in der weissen und roten Skelettmuskulatur junger und alter Ratten, «Experientia», 1972, vol. 28, p. 403—405.
18. Влияние тироксина на активность некоторых ферментов обмена углеводов и аминокислот в почках морских свинок. — «Проблемы эндокринологии», 1971, т. 17, с. 98—101. Авт.: Митев, А. М. Крышкова, А. М. Ангелов, И. Г. Пашев.
19. Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in der Niere und im Skelettmuskel von mit Schilddrüsen oder Propylthiouracil gefütterten Ratten. «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1967, vol. 348, N 3, p. 303—307. Auth.: N. Bargoni, M. A. Grillo, M. T. Rinaudo, T. Fossa.
20. Влияние тироксина на активность некоторых ферментов обмена углеводов и аминокислот в печени морских свинок. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, № 2, с. 165—169. Авт.: А. М. Ангелов, И. П. Митев, И. Г. Пашев, А. М. Крышкова.
21. Schapira F. L'activité éructose-i-prospho-aldolasique des tissus de mammifères. I-Répartition de l'activité F-I-P dans les tissus. «Bull. Soc. Chim. Biol.», 1961, vol. 43, p. 1357—1365.
22. Hatzfeld A., Schapira F. Présence de deux types d'aldolase dans le globule rouge de lapin. «C. r. Acad. sci.», 1969, D 268, N 18, p. 1799—1801.
23. Schapira F. et Nordman Y. Présence de 3 types d'aldolase dans le foie humain. «Clin. Chim. acta», 1969, N 26, p. 189—195.
24. Литвиненко Л. Т., Голубева Л. Н. О гетерогенности альдолазы. — «Укр. біохім. ж.», 1971, т. 43, № 5, с. 665—678.
25. Masters C. J., Herkovitz J. J., Wassarman P. N. Cité in Penhoët E. E. and coll. Isolation of fructose-1,6-diphosphate aldolases A, B and C. «Biochem.», 1969, N 8, p. 4391—4395.

УДК 591.1.05

Л. М. БАСАНЕЦ  
Отдел нейро-гуморальных  
регуляций в онтогенезе

### СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ ФОСФАТНЫХ ГРУПП ДНК В ДНП ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Многими исследованиями установлено, что с возрастом животных наблюдается снижение синтеза РНК *in vivo* [1] и *in vitro* [2—4], которое сопровождается изменениями состава и физико-химических свойств ДНП [4—6]. Представляло интерес изучить, наблюдаются ли при этом возрастные изменения в структуре ДНП, в частности, изменяется ли число свободных фосфатных групп ДНК в ДНП печени крыс разного возраста. Для этого мы определили количество свободных фосфатных групп методом спектрофотометрического титрования, используя краситель акридиновый оранжевый (АО).

ДНП выделяли из печени крыс четырех возрастных групп (1, 3, 12 и 24 мес.) по методу [7] с некоторыми модификациями. Полученный водный раствор ДНП переводили путем диализа в стандартный раствор с низкой ионной силой (фосфатный буфер  $3,5 \cdot 10^{-4}$  М, рН — 7,2). Состав ДНП печени крыс всех названных возрастов был исследован нами ранее [6]. Отношение белок/ДНК в препаратах составляло 1,6—1,7. ДНК выделяли

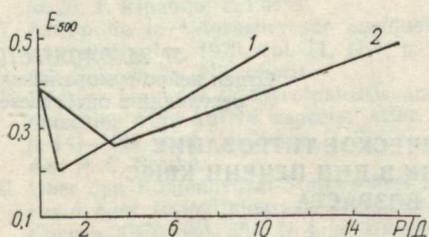


методом Мармура [8] с последующей обработкой РНК-азой и проназой.

Концентрацию ДНК и ДНП определяли спектрофотометрически, используя величину  $E_{(p)} = 6650$ . Концентрацию белка определяли по методу Лоури [9]. Титрование ДНК и ДНП АО производили согласно [10]: к серии растворов с увеличивающейся концентрацией ДНП или ДНК добавляли при размешивании краситель, причем, чтобы избежать агрегации, концентрация добавляемого красителя не превышала  $10^{-4}$  М. Измеряемые оптические характеристики изучали при концентрации красителя  $10^{-5} - 10^{-6}$  М. В работе использовали акридиновый оранжевый марки «краситель для микроскопии» после очистки его методом Цанкера [11]. Коэффициент молярной экстинкции красителя при  $E_{494} = 56\,000$  [12].

Оптическую плотность растворов при СФ-титровании измеряли на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 500 нм.

Для определения числа фосфатных групп в ДНП, доступных для связывания красителя, т. е. свободных от белка, были сняты зависимости оптической плотности АО от концентрации ДНП и ДНК в растворах [12—14]. Кривые такой зависимости для ДНП и ДНК, выделенных из печени крыс 24-месячного возраста,



Кривые СФ-титрования фосфатных групп с использованием акридинового оранжевого:  
1 — АО-ДНК; 2 — АО-ДНП.

ста, представлены на рисунке. Падение молярной экстинкции при 500 нм отвечает увеличению количества связанного красителя, большая часть которого образует агрегаты. Точка перелома (минимума) на кривой соответствует той концентрации ДНК, при которой практически весь краситель адсорбирован на полимере, и на каждую фосфатную группу приходится одна молекула красителя [12]. Дальнейшее добавление полимера приводит к перераспределению АО на нем, при этом  $E_{500}$ , отвечающее равномерному связыванию красителя, увеличивается.

Положение точек минимумов на кривых СФ-титрования ( $P/D$ ) мин используется для определения числа фосфатных групп в ДНП, доступных для связывания красителя. Здесь  $P$  — концентрация ДНК, выраженная в молях фосфора;  $D$  — молярная концентрация красителя.



В таблице приведены результаты спектрофотометрического титрования АО ДНП печени крыс четырех возрастных групп и соответствующих им ДНК. Титрование ДНК, выделенной из ядер печени крыс различного возраста, мы предприняли, предполагая возможные различия в свойствах разного возраста связывать АО. Как видно из таблицы, положение точек минимума ( $P/D$ )  $мин$  для ДНК всех возрастов практически не отличается.

Результаты СФ-титрования фосфатных групп ДНК и ДНП печени крыс разного возраста

Возраст, месяцы	Препараты	( $P/D$ ) $мин$	Количество свободных фосфатных групп по ( $P/D$ ) $мин$ , %	$P$	Количество свободных фосфатных групп по $dE_{500}/d(P/D)_{ДНП}$ % $dF_{500}/d(P/D)_{ДНК}$ %
1	ДНК ДНП	1,2 $2,4 \pm 0,01$	100 $50,2 \pm 2,4$	$P_{1-3} > 0,05$ $P_{1-12} < 0,05$	100 $45,8 \pm 3,5$
3	ДНК ДНП	1,1 $2,3 \pm 0,02$	100 $48,2 \pm 2,5$	$P_{1-24} < 0,05$ $P_{3-12} < 0,05$	100 $45,6 \pm 5,8$
12	ДНК ДНП	1,05 $2,6 \pm 0,01$	100 $39,7 \pm 1,4$	$P_{3-24} < 0,05$ $P_{12-24} > 0,05$	100 $38,0 \pm 4,3$
24	ДНК ДНП	1,2 $3,0 \pm 0,1$	100 $39,8 \pm 1,5$		100 $36,3 \pm 5,8$

Число же свободных фосфатных групп, определяемое в ДНП по положению ( $P/D$ )  $мин$ , изменяется с возрастом животных, достоверно уменьшаясь к старости.

Наряду с используемым параметром ( $P/D$ )  $мин$  для расчета числа свободных фосфатных групп в некоторых исследованиях используется [10, 15] угол наклона лучей кривых СФ-титрования, т. е. значение производной  $dE_{500}/d(P/D)$  при  $P/D \rightarrow 0$ . Определяемое число свободных фосфатных групп в ДНП по наклону правых лучей кривых СФ-титрования дает более низкие результаты (см. таблицу), но тенденция уменьшения числа свободных групп с возрастом животных сохраняется. Таким образом, учитывая возможности используемого метода [16], расчет кривых СФ-титрования показывает уменьшение с возрастом животных числа свободных фосфатных групп для связывания красителя.

Известно [10, 15], что используемые параметры кривых СФ-титрования для расчета свободных фосфатных групп ( $P/D$ )  $мин$ ,  $E_{500}$ ,  $dE_{500}/d(P/D)$  зависят от количества белка в препаратах ДНП. Мы предполагаем, что препараты ДНП печени крыс разного возраста, имеющие примерно постоянное количество белка



во всех возрастах животных, отличаются по распределению белка на ДНК, что, возможно, влечет за собой структурные изменения ДНК в ДНП-комплексе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клименко А. И., Тупчиенко Г. С. К вопросу о транскрипции генома в постнатальном периоде онтогенеза белых крыс. — «Онтогенез», 1973, т. 4, № 1, с. 80—83.
2. Блок Л. Н., Белоконов Н. С., Анохина Г. А., Никитин В. Н. Синтез РНК и белка в ДНК-направляемой белоксинтезирующей бесклеточной системе в присутствии ДНП печени крыс разного возраста. — «Журн. эволюц. биохимии и физиологии», 1974, т. 10, № 5, с. 446—450.
3. Mainwaring W. Y. P. The effect of age on protein synthesis in mouse liver. — «Biochem. J.», 1969, vol. 110, p. 879—888.
4. Berdesheva G. D., Zhelabovskaya S. M. Composition, template properties and thermostability of liver chromatin from rats of various age at deproteinization by NaCl solutions. — «Exp. Gerontol.», 1972, vol. 7, p. 321—330.
5. Мартыненко А. А., Никитин В. Н., Сагалова Н. Б. Возрастные изменения в составе хроматина ядер клеток печени белых крыс. — «Журн. эволюц. биохимии и физиологии», 1972, т. VIII, с. 128—131.
6. Басанец Л. М. Ступінь солевої депротейнізації ДНП хроматину печінки щурів різного віку. — «Доп. АН УРСР», 1974, № 7, с. 646—647.
7. Marushige K., Bonner J. Template properties of liver chromatin. — «J. Mol. Biol.», 1966, vol. 15, p. 160—174.
8. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. «J. Mol. Biol.», 1961, vol. 208, p. 208—218.
9. Protein measurement with Folin phenol reagent. — «J. Biol. Chem.», 1951, vol. 193, p. 265—273. Auth.: Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.
10. Борисова О. Ф., Минят Э. Е. Комплексы дезоксирибонуклеопroteида с акридиновым оранжевым. — «Мол. биология», 1969, т. 3, вып. 5, с. 758—767.
11. Zanker V. Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate (reversenzmessungen in wässriger Lösung. — «Zeitschrift phys. chem.», 1953, vol. 200, zenzmessungen in wässriger Lösung. — «Zeitschrift phys. chem.», 1953, vol. 200, p. 225—258.
12. Stone A. L., Bradley D. F. Aggregation of Acridine orange Bound to Polyanions. The Stacking Tendency of deoxyribonucleic Acids. — «J. amer. chem. soc.», 1961, vol. 83, p. 3627—3634.
13. Bradley D. F., Felsenfeld A. K. Aggregation of an acridine dye on native and denatured deoxyribonucleates. — «Nature», 1959, vol. 184, p. 4703—4707.
14. Furano A. V., Bradley D. F., Childers L. G. The conformation of the ribonucleic acid in ribosomes Dye Stacking Studies. — «Biochemistry», 1966, vol. 5, p. 3044—3056.
15. Исследование структуры дезоксирибонуклеопroteида и его компонентов оптическими методами. — «Молекулярная биология», 1970, т. 4, с. 359—366. Авт.: В. И. Пермогоров, И. А. Сладкова, Р. Г. Дебабов, Б. А. Ребен-тиш.
16. Борисова О. Ф., Суровая А. Н. Применение флуоресцирующих красителей для изучения структуры нуклеиновых кислот. — «Молекулярная биология», 1973, т. 1, с. 141—196.



### ВЛИЯНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА СТАНОВЛЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

В постнатальном онтогенезе белых крыс происходят существенные изменения мембранного потенциала (МП) мышечного волокна скелетной мускулатуры [1]. Наиболее выраженные изменения мембранного потенциала происходят в период незрелости половой системы, установление оптимальных значений МП происходит с достижением половой зрелости.

Высокий анаболический эффект стероидных гормонов и тот факт, что их действие опосредовано мембранными механизмами [2], позволили поставить вопрос о том, в какой мере становление мембранного электрогенеза может быть стимулировано половыми гормонами. Мышца, хотя и не является тканью — мишенью для половых гормонов, обнаруживает по ряду параметров сравнительно высокую чувствительность к их действию [3].

В работе проверялось влияние тестостеронпропионата — синтетического полового гормона с выраженными андрогенными свойствами.

*Методика.* Опыты проведены на животных раннего возраста (1-, 2-, 3-недельного, 1-, 3-месячного). Тестостеронпропионат (ТП) вводился в дозе 2,5 мг на 100 г веса тела внутривбрюшинно в течение 7 дней, на 8-й день животные брались в опыт. Измерения мембранных потенциалов (МП) скелетных мышечных волокон проводились на иммобилизованном животном (нембутал, 30 мг на 1 кг веса тела) в условиях *in vivo* с использованием микроэлектродного метода измерения [4]. Нормой служили животные, соответствовавшие по возрасту опытной группе в момент начала и конца инъекций. Полученные данные обработаны статистически по Стьюденту.

*Результаты опытов.* Полученные результаты представлены в таблице.

Животные разного возраста неодинаково прореагировали на тестостеронпропионат (ТП). Значимые эффекты получены у животных, получавших гормон с 2-, 3- и 4-недельного возраста. Введение ТП вызывает заметное увеличение мембранного потенциала. Наблюдается ускорение процессов формирования мембраны и уже в 4-недельном возрасте МП приближается к уровню поляризации зрелого волокна. Реакция на гормон отсутствует у крайних возрастных групп: у животных 1-недельного и 3-месячного возраста.



**Влияние тестостеронпропионата на величину  
мембранного потенциала у животных  
разного возраста**

Возраст	Контроль МП, мв	Опыт МП, мв	P
2 недели	40,4±0,04	39,4±0,37	P>0,05
3 недели	57,8±4,3	66,9±0,4	P<0,05
4 недели	71,9±1,8	79,0±2,4	P<0,05
1 месяц	72,2±0,1	79,4±5,7	P<0,05
3 месяца	84,0±1,45	83,4±4,8	P>0,05

Действие ТП может быть прямым или опосредованным. Прямое его действие может быть связано с ионным обменом: ТП поддерживает положительный  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $H_2O$  баланс, вызывает накопление  $K^+$  в клетке, задержку  $Na^+$  и  $H_2O$  вне клетки [2]. Действие ТП на мембранную поляризацию может быть и опосредованным одним из таких механизмов — влиянием тестостерона на продукцию кортикоидов надпочечниками [5, 6], ускоряющий эффект которых показан нами ранее [7].

Отсутствие действия гормона у животных самого раннего возраста вероятнее всего связано с недостаточностью акцептора на тестостерон. Известно, что определение пути полового развития на уровне гипоталамуса проходит в первую неделю постнатальной жизни крысы [8], в то же время половые различия в метаболизме стероидных гормонов в печени завершаются у крыс только к 30-дневному возрасту [9]. Реакция на ТП не найдена нами и у животных 3-месячного возраста. По-видимому, это связано с тем, что к 3-месячному возрасту в норме мембранный потенциал достигает оптимальных значений, а также с тем, что у этих животных очень высок уровень базальной секреции тестостерона, хотя выбранная нами доза достаточно велика, так как у зрелых крыс введение 1 мг ТП на 100 г веса тела предотвращает подъем концентрации ЛГ и ФСГ, вызванные кастрацией [10]. Таким образом, механизмы мембранного электрогенеза скелетных мышечных волокон в раннем онтогенезе в значительной степени контролируются андрогенами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новикова А. И. О возрастных изменениях мембранного потенциала поперечно-полосатых мышечных волокон. — «Физиол. журн. СССР», 1962, т. 48, № 12, с. 1504—1506.
2. Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И. Стероиды и биологические мембраны. — Сб. «Биологические мембраны», М., «Медицина», 1973, с. 94—112.
3. Хофман Э. Биохимия стероидов. М., «Мир», 1972. 175 с.
4. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника. Киев, «Наукова думка», 1960. 127 с.



5. Бекиров М. К., Чехранова М. А. Влияние тестостеронпропионата на функциональную активность коры надпочечников у крыс. — «Проблемы эндокринологии», 1972, № 4, с. 97—103.
6. Юдаев Н. А., Протасова Т. Н. Молекулярные механизмы гормонального контроля у животных. — «Проблемы эндокринологии», 1973, № 5, с. 109—116.
7. Новікова А. І., Нікольченко Ю. В. Вплив підрокортизону на рівень поляризації м'язового волокна в ранньому онтогенезі — «Вісник Харк. ун-ту, Біологія», 1972, № 87, вип. 4, с. 31—33.
8. Бабичев В. Н., Озол Л. Ю., Адамская Е. И. Влияние кастрации самцов крыс в различные сроки постнатальной жизни на реактивность гипоталамических нейронов к половым гормонам. — «Проблемы эндокринологии», 1974, № 1, с. 63—69.
9. Левина С. Е. Очерки развития пола в раннем онтогенезе высших позвоночных. М., «Наука», 1973, 239 с.
10. Vervon Lay, Nancy W. The influence of testosterone-propionat on the serum LH ant FSH in arhyectomated rats. — «Endocrinology», 1971, № 89, p. 161—169.

УДК 591.1.15

В. Н. НИКИТИН, д-р биол. наук,  
Р. К. МАКОВОЗ, канд. биол. наук,  
М. В. ГУНЬКО, канд. биол. наук,  
М. С. ГОНЧАРЕНКО, канд. биол. наук,  
С. Ц. ЗИЛЬБЕРМАН, О. А. КОНОВАЛЕНКО  
Отдел нейро-гуморальных регуляций в онтогенезе  
научно-исследовательского института биологии

### АДАПТАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ИНСУЛЯРНОГО АППАРАТА БЕЛЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАГРУЗОК

Широкий спектр влияния инсулина на метаболизм и функции всего организма, а также вопрос о причинах выраженной склонности людей пожилого возраста к заболеваниям диабетом и ожирением [1—3] привели к необходимости всесторонне и глубоко изучить механизм старения инсулярного аппарата. Существующее представление об изменении его функции с возрастом преимущественно базируется на результатах анализа сдвигов в структуре поджелудочной железы [4, 5] и отдельных исследованиях возрастных изменений инсулиновой обеспеченности организма [6—8].

Чтобы объективно судить о возрастных изменениях функциональной активности инсулярного аппарата, необходимо изучить и проанализировать сдвиги в разных звеньях обмена инсулина и его регуляции. Обязательным условием этого является полный охват всех периодов онтогенетического развития, начиная с ранних этапов постнатального развития и заканчивая глубокой старостью.

В. Н. Никитин и И. П. Соленова-Филиппова изучали содержание в плазме крови двух основных форм инсулина (свободно-



го и связанного) с применением биологического метода тестирования.

Настоящее исследование является логическим продолжением этих работ и посвящено изучению содержания в крови фракции иммунореактивного инсулина. Учитывая, что глюкоза — важнейшая мишень действия инсулина, в то же время представляет собой основной метаболит-сигнал, регулирующий инкрецию этого гормона, мы одновременно исследовали уровень ее в крови. Пировиноградная и молочная кислоты изучались в качестве промежуточных продуктов обмена глюкозы. Применение функциональных нагрузок глюкозой и инсулином преследовало цель определить адаптационную способность инсулярного аппарата к экзогенной глюкозе и выяснить возрастные особенности чувствительности организма к инсулину.

*Материал и методы исследования.* Работа проведена на белых крысах линии Вистар четырех возрастных групп (1, 3, 12 и 24 месяцев), содержащихся на обычном лабораторном рационе питания.

Гормональная активность инсулярного аппарата оценивалась путем определения содержания в плазме крови иммунореактивного инсулина высокочувствительным радиоиндикационным методом [10]. Глюкоза, пировиноградная и молочная кислоты определялись в цельной крови широко применяемыми в лабораторной практике колориметрическими методами [11 — 13]. При нагрузках глюкозу вводили в/брюшинно в дозе 100 мг/100 г веса тела, а инсулин (протамин-цинк-инсулин) — в/мышечно в дозе 0,8 ед./100 г веса тела животного. Указанные показатели определяли в динамике через 10, 30, 60, 90 и 150 мин после однократных нагрузок.

*Результаты исследований и их обсуждение.* Результаты исследований (табл. 1) свидетельствуют о том, что уровень иммунореактивного инсулина в плазме крови в первую половину

Таблица 1  
Уровень иммунореактивного инсулина в плазме  
крови белых крыс разного возраста (мк·ед·/мл)

Статистические показатели	Возраст, месяцы			
	1	3	12	24
$M \pm m$	23,73 ± 2,48	27,74 ± 2,31	23,00 ± 1,66	21,46 ± 2,14
$n$	42	40	25	22
$p$	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

онтогенеза повышается, достигая максимального значения к периоду полового созревания. К старости концентрация инсулина в плазме крови снижается.



Такова же в общих чертах закономерность изменения содержания форм свободного и связанного инсулина в плазме крови, выявленная И. П. Соленовой-Филипповой [7]. Таким образом, эти данные можно расценивать как свидетельство ослабления функциональной активности инсулярного аппарата к старости. Такое представление согласуется с результатами исследований С. А. Моренковой с соавторами [14], показавших угасание синтеза инсулина с возрастом.

Таблица 2

Возрастные изменения показателей углеводного обмена в норме и под влиянием нагрузок глюкозой и инсулином в крови крыс разного возраста, мг %

Показатель	Возраст, месяцы	Норма	Нагрузка глюкозой					Нагрузка инсулином				
			Время воздействия, <i>мин</i>									
			10	30	60	90	150	10	30	60	90	150
Глюкоза	1	76,6	143,3	165,3	84,0	82,6	83,5	43,0	—	31,0	33,5	39,3
	3	73,5	115,0	135,0	115,0	95,0	78,0	44,6	36,0	32,0	39,0	55,0
	12	74,0	132,3	190,0	97,5	110,0	75,5	53,7	32,5	42,2	35,0	35,0
	24	90,0	177,5	179,0	127,0	120,0	110,0	34,0	20,0	25,0	32,0	40,0
Молочная кислота	1	13,6	15,2	12,1	13,5	11,1	11,1	17,0	16,7	14,0	16,8	10,0
	3	14,5	15,0	13,7	9,2	13,0	11,5	15,9	—	12,7	14,2	13,5
	12	16,4	34,1	32,1	24,0	10,0	11,0	25,0	30,0	46,0	31,0	19,0
	24	17,5	23,2	27,0	18,0	18,0	17,0	21,0	41,0	35,0	26,0	31,0
Пирувино-градная кислота	1	2,09	2,09	1,89	2,25	1,97	2,17	1,80	2,08	2,21	2,53	2,08
	3	1,91	2,28	2,04	2,04	1,91	1,92	1,80	—	1,84	1,95	2,02
	12	2,03	1,85	2,30	2,00	1,30	1,60	1,60	2,35	2,00	1,75	1,95
	24	1,90	2,02	2,25	1,90	1,12	1,05	1,38	1,70	—	2,25	2,00

В табл. 2 показано, что в норме уровень глюкозы в крови молодых половозрелых животных стабилен и несколько повышается к старости, достигая к 24 месяцам 90 мг/%. Аналогично меняется концентрация в крови молочной кислоты, в то время как в содержании пирувата возрастные различия не обнаружены.

При нагрузке глюкозой максимальное повышение ее уровня в крови животных всех возрастных групп наблюдается через 30 мин после введения. Нормализация содержания глюкозы в крови животных разного возраста происходит в различные сроки: наиболее быстро, уже к концу первого часа она возвращается к норме у молодых (1 мес.) крыс; у половозрелых животных (3 и 12 мес.) тот же эффект достигается через 150 мин;



у старых, 24-месячных крыс, даже через 2,5 часа концентрация глюкозы не возвращается к исходному уровню.

Однократное введение инсулина уже через 10 мин приводит к выраженному, более чем в 1,5 раза, снижению уровня глюкозы в крови животных всех возрастных групп. Наиболее отчетливо оно выражено у старых крыс (почти в 3 раза). Критической величины содержание глюкозы в крови достигает к 30-й минуте после введения инсулина, затем наблюдается тенденция к повышению ее уровня, но даже к концу наблюдения (150 мин) концентрация глюкозы в крови не нормализуется.

Содержание молочной кислоты при нагрузке глюкозой в молодом возрасте практически не меняется, а к старости возрастает, отражая общую направленность нарушений углеводного обмена. Такова же закономерность сдвигов и при введении инсулина.

Определение уровня пировиноградной кислоты в условиях нормы и при функциональных нагрузках глюкозой и инсулином значимых различий не выявило.

Следовательно, способность инсулярного управления углеводным обменом снижается на уровне утилизации молочной кислоты к старости.

Таким образом, на основании полученных данных можно констатировать большую лабильность и функциональную мощь инсулярного аппарата у молодых и половозрелых животных по сравнению со старыми. Согласно некоторым данным [14], это может быть следствием ослабления синтезирующей функции инсулярного аппарата. Кроме того, данный процесс объясняется также [15] накоплением в организме в процессе старения антагонистов и ингибиторов инсулина, блокирующих функциональную активность инсулярного аппарата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генес С. Г. Гипогликемин, Гипогликемический симптомокомплекс. М., «Медицина», 1970. 236 с.
2. Жуков Н. А. Возрастные функциональные и морфологические особенности поджелудочной железы и их клиническое значение. Автореф. дис. на соиск. учен. степени д-ра мед. наук. Томск, 1965. 42 с.
3. Дильман В. М., Остроумова М. Н. Нарушение гормональной регуляции углеводного обмена при возрастной патологии человека. — В кн.: Проблемы медицинской химии, М., Медгиз, 1973. 147 с.
4. Гацко Г. Г. Эндокринная система при старении. Минск, «Наука и техника», 1968. 148 с.
5. Лейси П. Применение гистохимических методов и электронной микроскопии для изучения островковой ткани поджелудочной железы. — В кн.: Диабет. М., «Медицина», 1964. 273 с.
6. Тодоров И. Н. О синергическом действии инсулина и соматотропного гормона гипофиза (СТГ) на обмен нуклеиновых кислот (НК) в связи с данными по концентрации инсулина в крови в разные возрастные периоды. — В кн.: Материалы конференции по вопросам возрастной морфологии, физиологии и биохимии. М., 1965. 463 с. (НИИ возраст. физиол. и физ. воспит. АПН РСФСР).



7. Соленова-Филиппова И. П. Возрастные изменения концентрации инсулина в крови и реактивности к нему тканей. Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук, Харьков, 1969. 23 с.
8. Богущ С. В. Возрастные особенности инсулиновой обеспеченности организма. Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук. Киев, 1972. 24 с.
9. Никитин В. Н. Гипофизарно-адреналовая и инсулярная функции в онтогенезе. — В кн.: Приспособительные возможности стареющего организма. Киев, 1968. 119 с.
10. Huvärinen A., Nikkilä E. Specific determination of blood glucose with o-toluidine, «Clin. Chim. Acta», 1962, N 7, p. 140—143.
11. Yalow R., Berson S. Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. Determinations by a new sensitive immunoassay technic, «Diabetes», 1960, 9, p. 254—260.
12. Barker S., Summerson W. 1941. — Цит. по кн.: Пушкина М. Н. Биохимические методы исследования. М., Медгиз, 1963, с. 107—108.
13. Friedeman J., Naugen I. 1943. — Цит. по кн.: Пушкина М. Н. Биохимические методы исследования, М., Медгиз, 1963, с. 105—107.
14. Моренкова С. А., Рабэн Н. А., Коникова А. С. Исследование биосинтеза инсулина у крыс при старении. — «Тезисы докл. IX Международного конгресса геронтологов». Киев, 1972, с. 121—124.
15. Фролькис В. В., Богацкая Л. Н., Богущ С. В., Шевчук В. Г. Регулирование инсулиновой обеспеченности организма людей и животных разного возраста. — «Проблемы эндокринологии», 1972, т. 18, № 2, с. 106—110.

УДК 576.3 : 581.17 : 576.31

Г. Ф. ЖЕГУНОВ

Отдел нейро-гуморальных регуляций в онтогенезе  
научно-исследовательского института биологии

## К ВОПРОСУ О ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИНСУЛЯРНОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЛЫХ КРЫС

В формировании приспособительных реакций организма немаловажное значение имеют сдвиги гормональной регуляции. Особый интерес к деятельности инсулярного аппарата объясняется большой областью влияния гормона поджелудочной железы на обмен и функции всех органов и тканей, а также на жизнедеятельность клетки.

Эндокринная ткань поджелудочной железы представлена островками Лангерганса. При помощи различных методов окрашивания препаратов поджелудочной железы в островках удалось установить три типа клеток альфа-, бета- и дельта-клетки [1]. Островковая ткань характеризуется примерно постоянным составом: 75—80% бета-клеток, 20—25% альфа-клеток. Образование инсулина связывают с функцией бета-клеток, образование глюкагона — с функцией альфа-клеток. Роль третьего типа клеток, входящих в структуру островков, пока неизвестна [2].

Ультрасруктуру клеток островков Лангерганса изучали ряд авторов [4—6]. По их данным, бета-клетки располагаются в центральной части островка. Они имеют овальную форму



с равномерной электронной плотностью цитоплазмы. Ядра крупные, с неравномерным распределением хроматина, располагаются в центре клетки. Обычно в пренуклеарной зоне располагается аппарат Гольджи, принимающий активное участие в синтезе гранул инсулина [6]. Бета-клетки богаты митохондриями небольших размеров, но с большим количеством крист. Эндоплазматический ретикулум представлен цепочками мембран, усыпанными рибосомами. Бета-гранулы, содержащие инсулин, представляют собой округлые электронноплотные тельца, окру-

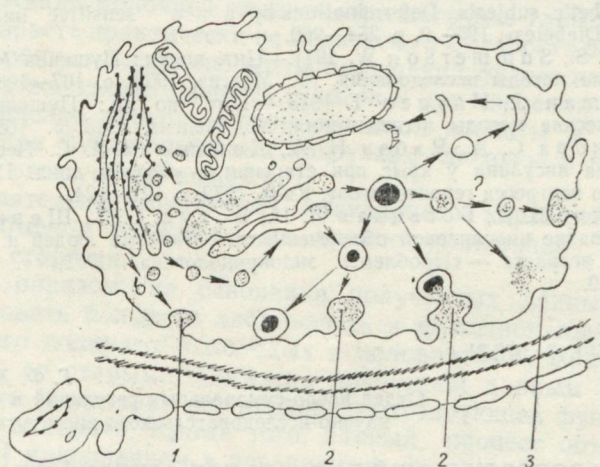


Рис. 1. Схема синтеза и секреции инсулина бета-клетками по Р. Альберт. Три возможных пути выхода синтезированного гормона из клетки.

женные одинарной мембраной. Количество гранул в клетке зависит от функционального состояния клетки.

Изучается также механизм синтеза и секреции инсулина [7—9]. В 1968 г. П. Лейси предположил в общем виде, что синтез инсулина нужно рассматривать как особый случай общего биосинтеза белков. По первоначальному представлению П. Лейси, «упаковывание» синтезированного продукта в особые гранулы было результатом везикулярного изменения эндоплазматической сети с последующей потерей рибосом. В более поздних работах он высказал предположение о возможном участии аппарата Гольджи в процессах «упаковки» синтезированного инсулина в гранулы.

В 1970 году Р. Альберт предоставил модифицированную схему (рис. 1) биосинтеза и секреции инсулина [10]. По его мнению, синтез инсулина происходит на шероховатой эндоплазматической сети. Далее отпочковавшиеся от нее микровезикулы поступают в аппарат Гольджи, где происходит «упаковывание» инсулина в гранулы, окруженные мембраной. Автор схемы го-



ворит о трех возможных путях выхода гормона из клеток: а) непосредственно с мембран эндоплазматической сети за пределы клетки путем эмицитоза; б) микровезикула поступает в аппарат Гольджи, после чего гранула, окруженная мембраной, выводится за пределы клетки; в) содержимое гранулы медленно «растворяется» в цитоплазме и в таком виде выводится из клетки.

К сожалению, работ, посвященных изучению морфологии бета-клеток в онтогенезе мало, в связи с этим в лаборатории

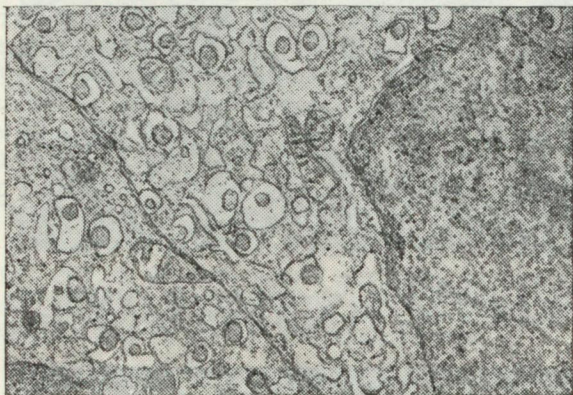


Рис. 2. Участок бета-клетки после нагрузки организма крысы глюкозой. Увеличение 15000. Уранилацетат.

электронной микроскопии НИИ биологии ведутся работы по изучению ультраструктур бета-клеток поджелудочной железы крыс разного возраста в связи с нагрузкой организма глюкозой и инсулином.

**Методика.** Опыты проводятся на 3- и 24-месячных крысах-самцах линии Вистар. Глюкоза (в расчете 100 мг на 100 г веса крысы) вводится в/брюшинно. Инсулин по 8 единиц на 100 г веса вводится в/мышечно. Спустя 30 мин, животных убивают. Кусочки ткани величиной 1—2 мм берутся из подселезочной части поджелудочной железы, фиксируются в 1% растворе  $\text{OsO}_4$  по Палладе в течение двух часов на холоду. Обезвоживаются в спиртах возрастающей концентрации и заливаются в метакрилаты. Срезы толщиной 400—600 Å режутся на ультрамикротоме УМТП-2М и контрастируются уранилацетатом или цитратом свинца по Рейнольдсу. Просматриваются под электронным микроскопом УЭМВ-100К.

**Результаты опытов и их обсуждение.** Получены фотографии, подтверждающие схему синтеза и секреции инсулина, предложенную Р. Альберт, в частности участие аппарата Гольджи



в сборке бета-гранул. Интересны изменения в ультраструктуре бета-клеток, произошедшие после нагрузки организма 3-месячной крысы глюкозой (рис. 2) и инсулином (рис. 3) по сравнению с нормальной клеткой (рис. 4).

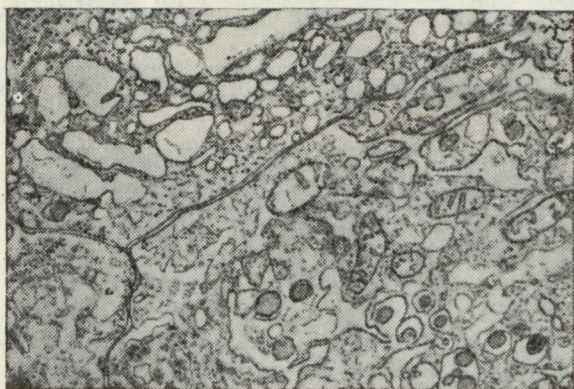


Рис. 3. Цитоплазма бета-клетки после нагрузки организма крысы инсулином. 15000. Уранилацетат.

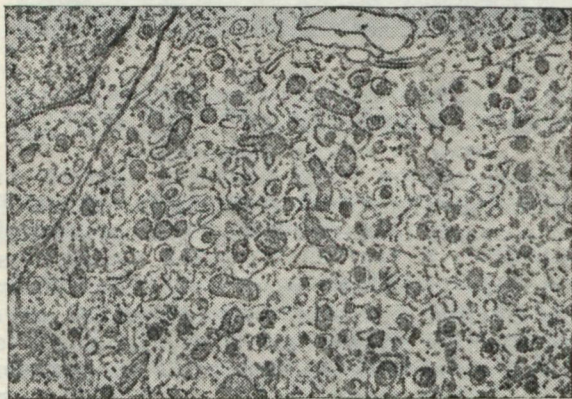


Рис. 4. Общая картина нормальной бета-клетки. 12000. Уранилацетат.

При нагрузке глюкозой, спустя 30 мин, бета-клетки содержат еще большое количество гранул секрета, ядра несколько увеличенных размеров. Аппарат Гольджи очень объемен. В клетке содержится большое количество эндоплазматического ретикулума, усаженного рибосомами. Митохондрии чуть больше средних размеров, разбухшие и с большим количеством крист. Все это свидетельствует о необычайно высокой синтетической



активности данных клеток. Электронномикроскопические фотографии, полученные при нагрузке инсулином, значительно отличаются от описанных выше. Количество гранул, окруженных оболочкой, значительно меньше. Встречаются даже дегенеративные гранулы (см. рис. 3). Аппарат Гольджи сильно фрагментирован и окружен большим количеством микровезикул. Значительное число микровезикул также распределено и по всей цитоплазме клеток. Эндоплазматического ретикулума меньше. Митохондрии разбухшие, матрикс их просветлен.

Такая картина свидетельствует о том, что клетка находится не в нормальном физиологическом состоянии, что синтезированный в клетке инсулин не выходит за пределы клеточных мембран. Видимо, избыточное содержание экзогенного инсулина в крови препятствует выходу этого гормона из бета-клетки. Можно предположить, что нарушается его нормальный синтез (эндоплазматическая сеть → аппарат Гольджи → гранула) на стадии «аппарат Гольджи», т. е. микровезикулы не поступают в комплекс Гольджи, но и выделиться за пределы клетки тоже не могут. Поэтому в бета-клетках по всей цитоплазме наблюдается такое большое количество микровезикул. Таким образом, выяснено, что спустя 30 мин после нагрузки организма половозрелых крыс глюкозой и инсулином, ультраструктуры бета-клеток специфически реагируют на эти воздействия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фингерланд А., Вортел В. Оптическая и электронно-микроскопическая дифференциальная диагностика эндокринных клеток поджелудочной железы. — «Архив патологии», 1972, т. 34, № 12, с. 44—51.
2. Огнева В., Петков П. Гистологическая и электронно-микроскопическая характеристика дельта-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. — «Архив анатомии, гистологии и эмбриологии», 1972, т. 2, с. 22—27.
3. Зуфаров К. А., Ташходжаев П. И., Шишова Е. К., Хамидов Д. Х. Атлас «Электронная микроскопия органов и тканей», 1971, М., «Медицина», с. 7—9.
4. Лейси П., Хартроф Т. Электронная микроскопия островков Лангерганса. — РЖБх, 1960, № 9, с. 13692.
5. Лейси П. Применение гистохимических методов и электронной микроскопии для изучения островковой ткани поджелудочной железы. — В кн.: Диабет, М., «Медицина», 1964, с. 273—291.
6. Murakami M., Tonutti T. Zur Ultrastruktur des Inselapparates beim Steroiddiabetes des Meerschweinchens. — «Endokrinologgie», 1972, vol. 59, N 1, p. 93—102.
7. Lacy P. E. New hypothesis of insulin secretion. «Nature», 1968, vol. 219, p. 1177—1179.
8. Burrl. H. Dynamic aspects of proinsulin release from perfused rat pancreas. — «Lancet», 1969, N 2, p. 130—135.
9. Steiner D. F. Proinsulin and insulin biosynthesis. — «Acta Diabet. Lat». 1969, N 6, Suppe 1, p. 39—43.
10. Albert R. Insulin biosynthesis and secretion — a still unsettled topic. — «The new England Journal of Medicine», 1970, vol. 282, N 4, p. 68—75.



### ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Предыдущими исследованиями установлено падение активности гексокиназы в печени крыс с возрастом, сильно выраженное в поздние периоды онтогенеза [1]. Эти результаты отражали возрастные изменения суммарной активности изозимов гексокиназы, характеризующихся низкой  $K_m$ , за счет снижения которой в основном уменьшалась интенсивность фосфорилирования глюкозы в печени старых животных. Как выяснилось, возрастные различия в активности гексокиназы зависят от количества поступающих в организм углеводов и при содержании животных на углеводной диете уменьшается степень снижения активности данного фермента к старости [1]. Полученные результаты указывали на то, что возрастные изменения активности данного фермента в известной мере обусловлены ее регуляцией и послужили основанием для дальнейшего исследования связи этих изменений с гормональной регуляцией гексокиназы.

В настоящей работе исследовалось влияние тиреоидэктомии и введения тироксина на гексокиназную активность в печени. Целесообразность этих исследований определяется данными о влиянии тиреоидных гормонов на некоторые ферменты гликолиза [3] и отсутствием сведений об их действии на активность гексокиназы в разные периоды онтогенеза.

Активность гексокиназы определялась так, как описано в [2], в печени крыс линии Вистар возраста 1, 3, 12 и 24 месяцев. Параллельно в печени тех же животных определялась концентрация белка по Лоури. Животные каждого возраста были разделены на несколько групп: 1 — контрольные животные; 2 — животные, которым трижды вводился тироксин (в мышечно в дозе 60 мг на 100 г веса) с интервалом 48 ч. Животных убивали декапитацией через 48 ч после последнего введения тироксина; 3 — животные с удаленной щитовидной железой, взятые для опытов через 21 день после тиреоидэктомии; 4 — животные, которым через 21 день после тиреоидэктомии вводили тироксин по той же схеме, что и животным 2-й группы. Для выяснения механизма действия тироксина животным 5-й группы одновременно с тироксином вводили актиномицин Д (4 мкг на 100 г веса). Первое введение антибиотика производилось за 2 ч до второго введения гормона. Последующее введение АД производилось на протяжении 4-х суток с интервалом 12 ч.



Результаты исследований (таблица) подтвердили возрастное снижение активности гексокиназы и показали, что тиреоидэктомия не влияет на ее уровень в печени молодых крыс. У крыс старшего возраста наблюдается четко выраженная тенденция к его снижению после операции (активность фермента была ниже нормы у всех годовалых крыс и у 6 из 9 двухгодовалых крыс). Введение тироксина после тиреоидэктомии нормализовало активность только у старых крыс.

Активность гексокиназы в печени крыс разного возраста после введения тироксина, тироксина и актиномицина Д, тиреоидэктомии и тиреоидэктомии с последующим введением тироксина  
(мкМ НАДР·Н<sub>2</sub>/г белка/мин)

Условия опыта	Возраст, месяцы			
	1	3	12	24
Норма (а)	17,2±0,99	15,9±1,47	10,7±1,14	8,1±0,22
Введение тироксина (б)	24,9±1,01	18,0±1,07	16,6±2,34	10,1±0,63
Введение тироксина и актиномицина Д (в)	15,5±0,60	12,3±0,76	8,5±0,77	8,4±1,23
Тиреоидэктомия г	17,0±1,49	14,7±1,36	8,7±0,94	6,1±1,40
Введение тироксина после тиреоидэктомии (д)	15,9±1,13	15,6±2,55	8,2±1,53	9,9±0,60

Примечание:  $P < 0,05$  при сравнении данных (а) и (б) по возрастным группам 1, 12 и 24 мес; (а) и (д) возраст 24 мес.; (б) и (в) по возрастным группам 1, 3, 12 и 24 мес.

Введение тироксина интактным животным приводило к значительному повышению активности исследуемого фермента в печени неполовозрелых крыс и в значительной степени выраженному у животных возраста 12—24 месяцев. У трехмесячных крыс наблюдалось слабое, статистически незначимое повышение активности гексокиназы. Эти особенности действия тироксина на данный фермент в разные периоды онтогенеза могут зависеть от многих причин, в частности, от возрастных различий в уровне



эндогенного гормона, реактивности тканей на его избыточное введение, интенсивности метаболизма и пр.

Введение актиномицина Д устраняет повышение активности гексокиназы, вызванное тироксином, что свидетельствует об усилении синтеза фермента при нагрузке организма тироксином.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали возможность участия тироксина в регуляции активности гексокиназы, в основе которой лежит механизм, связанный с усилением синтеза данного фермента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние углеводной диеты на активность гексокиназы в печени крыс разного возраста. — В сб.: Молекулярная биология старения, Киев, «Наукова думка», 1969, с. 93—100. Авт.: Н. А. Шабанова, В. В. Сушкова, Г. А. Творовская, Л. В. Бражник.
2. Возрастные и адаптивные изменения некоторых ферментов гликолиза. — В сб.: Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. Киев, «Наукова думка», 1974, с. 111—120. Авт.: Н. А. Шабанова, А. С. Попова, З. В. Шаливская, М. О. Шифман.
3. Enzyme response to thyreotoxicosis and hypothyroidism in human liver and muscle. — «Europ. J. Clin. invest». 1972, vol. 2, p. 141—149. Auth.: I. Nolte, D. Pette, B. Bacmaier, P. Kiefhaber, H. Shneider, P. Serib.

УДК 612.646 : 591.412

**В. Н. ЩЕГОЛЬКОВ**  
Кафедра физиологии  
человека и животных

#### ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА УТИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Сукцинатоксидазная система играет существенную роль в процессах окислительного фосфорилирования. Исследование механизмов регуляции этого звена представляет особенный интерес [1]. Известна взаимосвязь процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования [2—4]. В данной работе изучалось влияние на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга гексокиназы, глюкозы и АТФ. Субстрат окисления — янтарная кислота.

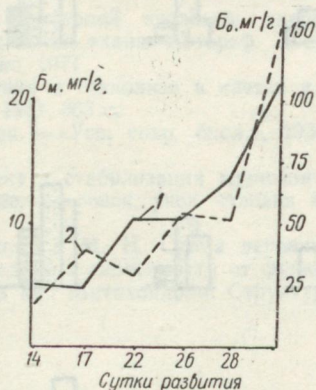
**Объект и метод исследования.** Исследовалась интенсивность процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга эмбрионов 14, 17, 22, 26-х суток развития односуточного утенка и 2-месячной утки. Митохондрии выделялись методом дифференциального центрифугирования с последующим определением белка в суспензии. Поглощение кислорода определялось в пяти инкубационных пробах методом полярографии. Во всех случаях в ходе опыта добавлялись АДФ (170 мкМ) и 2,4-динитрофенол (ДНД — 0,1 мМ). Во всех пробах содержалось, мМ:



58,3 Трис, 80 — KCl, 0,7 — ЭДТА, 1,6 — MgCl, 42 — сахарозы, 25 — янтарной кислоты. Пробы отличались разным набором компонентов «гексокиназной ловушки» — гексокиназы, глюкозы и АТФ.

**Результаты и их обсуждение.** К концу эмбриогенеза утки и в постнатальный период содержание белка в митохондриях мозга растет, достигая наибольшей величины у 2-месячной утки. Содержание общего белка мозга также растет к концу исследуемого периода. При этом наблюдается как бы переключение с механизма синтеза белка цитоплазматического на митохондриальный, и наоборот (рис. 1). Возрастающая дифференцировка мозга и начало функционирования его дифференцированных отделов требуют нарастания активной белковой массы, приходящейся на единицу веса органа, как в митохондриях, так и в цитоплазме клеток мозга.

Рис. 1. Содержание общего и митохондриального белка в ткани мозга:  
1 — белок митохондриальный (Б<sub>м</sub>); 2 — общий белок (Б<sub>о</sub>).



Энергетический обмен в митохондриях мозга интенсифицируется к концу эмбрионального развития. Напряженность процессов окислительного фосфорилирования наиболее высокая у митохондрий 26-х суток развития, односуточного утенка и взрослой утки (рис. 2, а). Об этом же свидетельствует и ответная реакция митохондрий на добавку АДФ. При наличии в среде инкубации АТФ, глюкозы и гексокиназы характер ответной реакции митохондрий резко изменяется на противоположный. Добавленная АДФ в этих условиях уже не стимулирует, а тормозит дыхание. Пользуясь классической схемой оценки сопряжения окисления с фосфорилированием в митохондриях, мы имеем дело с разобщенной системой [5]. Исключая из пробы 2 глюкозу и гексокиназу, выявляем, что эффект разобщения обусловлен наличием в пробе АТФ (рис. 2, в). При наличии в среде глюкозы и гексокиназы разобщение получено на 22-е сутки (рис. 2, г). С исключением гексокиназы из пробы 4 наблюдается восстановление эффекта сопряжения окисления с фосфорили-



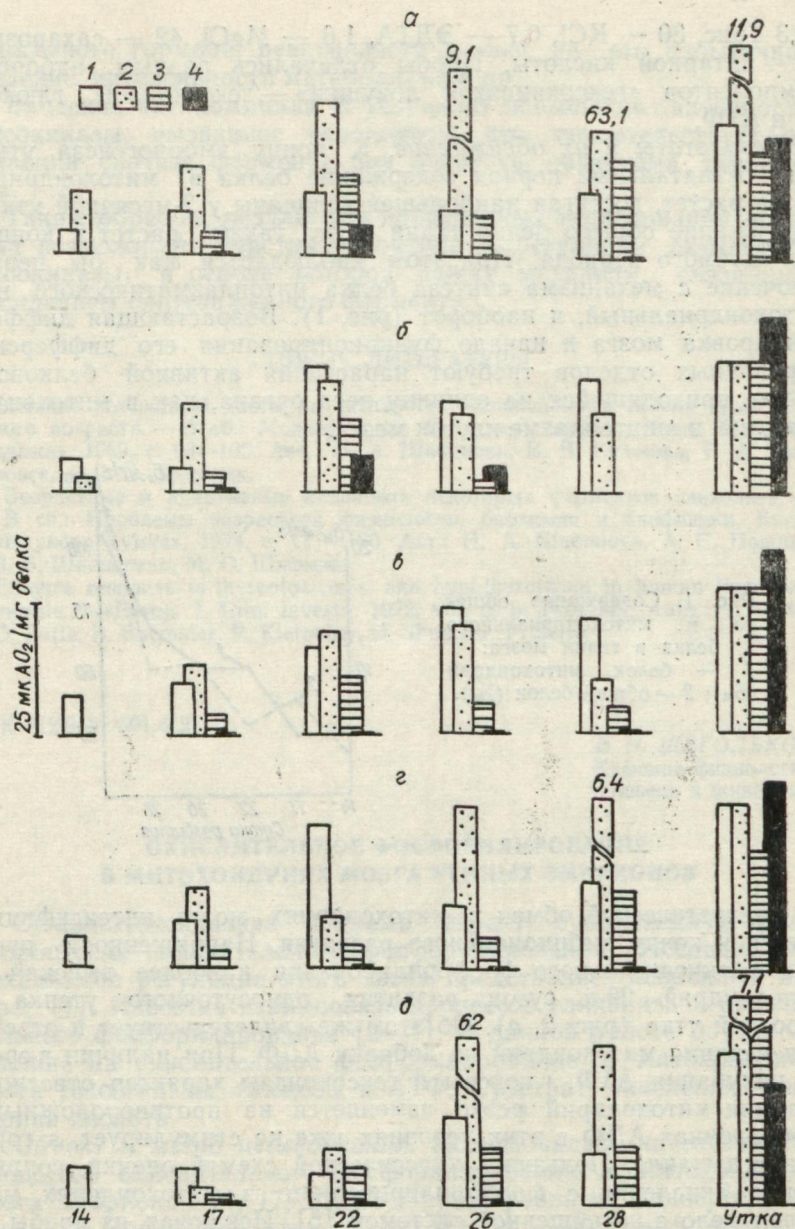


Рис. 2. Функциональное состояние митохондрий мозга утиных эмбрионов при разной нагрузке на дыхательную цепь: 1 — дыхание на сукцинате; 2 — +АДФ; 3 — истощение АДФ; 4 — +ДНФ; а — проба 1 — без добавок; б — проба 2 — АТФ (0,5 мг), глюкоза (9 мг); гексокиназа (0,03 мг); в — проба 3 — АТФ (0,5 мг); г — проба 4 — глюкоза (9 мг); гексокиназа (0,03 мг); д — проба 5 — глюкоза (9 мг). Объем ячейки 1 мл температура опыта 26°C.



рованием к концу эмбриогенеза и в постнатальный период. На 14, 17 сутки эмбриогенеза добавка АДФ тормозит дыхание митохондрий, что свидетельствует о влиянии глюкозы на окислительное фосфорилирование в этот период (рис. 2, д). Следует отметить специфический ответ митохондрий мозга эмбриональных тканей на добавление ДНФ. Почти во всех случаях он тормозит дыхание, и эффекта разобщения нет, чего не наблюдается у взрослой утки.

Следовательно, в течение эмбриогенеза (14, 17, 22 сутки) наиболее выражен эффект регулирующего воздействия глюкозы и гексокиназы на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга, который утрачивается к моменту вылупления и в постнатальный период.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондрашова М. Н. Регуляция янтарной кислотой энергетического обеспечения и функционального состояния ткани. Автореф. дис. на соиск. учен. степени д-ра биол. наук, Пушино, 1971.
2. Сейц И. Ф. Взаимодействие дыхания и гликолиза в клетке и сопряженное фосфорилирование. Л., Медгиз, 1961. 363 с.
3. Белицер В. А. Реакция Пастера. — «Усп. совр. биол.», 1938, т. VIII, с. 416—429.
4. Шапот В. С. Пастеровский эффект и стабилизация аденозинтрифосфорной кислоты в клетке. Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук, Л., 1947.
5. Николаева Л. В., Кондрашова М. Н. Схема первичной оценки функционального состояния митохондрий в зависимости от функциональной нагрузки на дыхательную цепь. — В кн.: Митохондрии. Структура и функции. М., «Наука», 1966, с. 83—85.

УДК 501.1.15 : 611.17

Л. А. ФРЕНКЕЛЬ, канд. биол. наук, Е. В. ПАРИНА д-р мед. наук,  
В. И. ШАНТЫРЬ, д-р мед. наук, В. В. КОРНИЕНКО, канд. биол. наук,  
Д. Л. ДУН, М. Г. ЯКОВЕНКО, А. И. ЛАНЬКО  
Кафедра биохимии,  
Харьковский НИИ медицинской радиологии

#### ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ЗВЕНЬЕВ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ

Способность к минерализации биологических систем, в частности костной ткани, представляет одну из сложнейших нерешенных проблем современной биологии. Важность исследования процессов минерализации и их нарушения предопределяется тем, что они обуславливают уникальные физиологические функции костной ткани — опорно-защитную и роль депо основных неорганических веществ в организме. Механизм мобилизации и транспорта из кости депонируемых ею катионов является узловым моментом в этой проблеме, приобретающим особую ак-



туальность в связи с установленными фактами деминерализации костной ткани в условиях воздействия космоса и ионизирующей радиации [1—5].

Согласно современной гипотезе [6, 7], в основе обызвествления кости лежит явление эпитахии (ориентированный рост кристаллов) апатита, ядра которой возникают в специфически ориентированных участках фибрилл коллагена. Помимо коллагена, ключевую позицию в этом процессе занимают кислые мукополисахариды, или гликозаминогликаны, обеспечивающие пространственную архитектуру макромолекул коллагена и в комплексе с ним служащие нуклеоторами центров эпитахии.

Учитывая, что этот вопрос изучен мало и что химическую реактивность костной ткани обуславливает ее возраст, целью работы явилось исследование возрастных особенностей биофизических свойств, содержания и метаболизма ведущих компонентов минеральной фазы (кальций, магний, фосфор, калий, натрий) и органического матрикса (коллаген, гликозаминогликаны, лимонная кислота) костной ткани.

*Материал и методы исследования.* Опыты проведены на 320 белых крысах-самцах линии Вистар 1-, 3-, 12- и 24-месячного возраста. Объектом исследования служили диафазы бедренных костей, извлеченные немедленно после декапитации животных. Кости тщательно очищались от сухожилий, мышц и перфузировались от костного мозга, после чего измельчались до определенной величины частиц, контролируемой специальными ситами. Содержание кальция и магния определялось комплексометрически с трилоном Б, калий и натрий — методом пламенной фотометрии, фосфор — по Фiske-Суббароу. Содержание коллагена — по оксипролину методом Ньюмана и Логана в модификации Зайдес А. А., Михайлова А. Н., Пушенко О. И.

Общее количество гликозаминогликанов (ГАГ) определялось по гексозамину методом Римингтона, фракционирование их велось с помощью колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с последующим проведением карбазоловой реакции на уронеовые кислоты по Швейцеру и Робертсону. Лимонная кислота определялась по Краусу в модификации Л. А. Френкель. Удельная стрела прогиба и максимальная нагрузка на разрушение кости исследовались на приборе для испытания кости на изгиб. Параметры кристаллической решетки минеральной фазы изучали на установке ДРОН-05 рентгеноструктурным анализом в монохроматизированном излучении меди при  $K\alpha = 1,5405 \text{ \AA}$ . Размер длины кристаллов по оси  $C$  определяли измерением интегральной полуширины рабочей линии 002. Обработка результатов проводилась методом гармонического анализа и расчетов на ЦЭВМ «Мир-2».

*Результаты и обсуждение.* Как следует из табл. 1, основная закономерность изменений химического состава костной ткани в процессе онтогенеза состоит в том, что с возрастом по мере



Таблица 1

Возрастная динамика содержания минеральных компонентов, величина кристаллитов апатита и максимальная прочность костной ткани крыс

Возраст крыс, месяцы	Кальций, %	Магний, %	Натрий, % мг	Калий % мг	Ca/P	Длина кристаллита по оси С, Å	Величина элементарной ячейки, Å	P max, кг/см <sup>2</sup>
1	22,35 ± 2,15	2,90 ± 0,28	807,1 ± 50,1	107,2 ± 18,3	2,35	124	6,85	1,15 · 10 <sup>3</sup>
3	30,28 ± 0,79	3,65 ± 0,21	667,5 ± 5,51	69,5 ± 9,95	2,61	128	6,85	2,27 · 10 <sup>2</sup>
12	33,95 ± 0,46	4,10 ± 0,10	446,5 ± 5,3	39,1 ± 1,5	2,88	139	6,86	3,15 · 10 <sup>2</sup>
24	38,03 ± 0,51	4,98 ± 0,20	328,3 ± 15,2	27,5 ± 4,0	2,96	144	6,86	3,49 · 10 <sup>2</sup>

минерализации происходит возрастание содержания кальция, магния и падение калия, натрия при одновременном снижении доли растворимого кальцийфосфата и лимонной кислоты, способствующей растворимости кальция и его переносу из кости в кровь. Полученные данные укладываются в представление о том, что при интенсивной минерализации, характерной для интенсивно растущего организма, кристаллы костного апатита отличаются меньшими размерами, а следовательно, большей активной ионнообменной поверхностью, чем у старых животных [8]. Учитывая, что ионы калия расположены в гидратном слое кристаллов, а ионы натрия, кроме гидратного слоя могут локализоваться на поверхности кристаллической решетки апатита, снижение с возрастом концентрации этих катионов можно объяснить укрупнением кристаллитов и уменьшением их общей поверхности. Экспериментально это подтверждается данными рентгенструктурного анализа, согласно которым у неполовозрелых крыс размеры кристаллитов апатита по оси С и элементарной ячейки минимальны (соответственно 124 и 6,85 Å), а у 24-месячных животных достигают наибольших значений (144 и 6,86 Å).

С другой стороны, укрупнение кристаллов апатита в зрелой и старой кости объясняет повышение концентрации кальция и магния у 12- и 24-месячных крыс. Согласно [9], минерализация кости начинается с образования кислой соли октокальцийфосфата, которая затем путем гидролиза переходит в оксиапатит. Поскольку отношение Са/Р в октокальцийфосфате более низкое (8/6), чем в оксиапатите (10/6), в костях молодых растущих животных доля апатита, обладающего лучшей растворимостью, по-видимому, несколько выше.

Результаты исследования содержания оксипролина (ОП), приведенные в табл. 2, свидетельствуют о наиболее высоком содержании коллагена в кости неполовозрелых крыс. К трем ме-



**Возрастная динамика содержания основных органических**

Возраст крыс, месяцы	Оксипролин в кости, мг %	Оксипролин в суточной моче $\gamma/1$ г	Лимонная кислота, мг %	Гексозамин, %
1	$21,70 \pm 0,038$	$1,052 \pm 0,062$	$5,52 \pm 0,23$	$0,183 \pm 0,01$
3	$1,477 \pm 0,026$	$0,876 \pm 0,058$	$5,03 \pm 0,084$	$0,138 \pm 0,09$
12	$1,613 \pm 0,023$	$0,206 \pm 0,018$	$4,66 \pm 0,06$	$0,108 \pm 0,05$
24	$1,420 \pm 0,030$	$0,670 \pm 0,023$	$3,50 \pm 0,07$	$0,81 \pm 0,08$

сяцам концентрация коллагена падает, а затем, после некоторого повышения у 12-месячных животных, достигает минимальных величин у двухгодичных крыс. В то же время суточная экскреция ОП с мочой в пересчете на 1 г веса животных закономерно снижается с возрастом, достигая наименьших значений у 12-месячных крыс, и несколько повышается к двум годам. Принимая во внимание то, что содержание ОП в моче является тестом, отражающим в основном катаболизм костного коллагена [10], и главным образом, растворимой его фракции [11], можно предполагать, что уменьшение его экскреции у 3- и 12-месячных крыс обусловлено снижением концентрации растворимого коллагена в кости. В то же время, в соответствии с этими данными [11], последующее возрастание ОП в суточной моче у 24-месячных животных может быть связано с развитием старческого остеопороза кости и усилением катаболизма нерастворимого коллагена.

Согласно данным табл. 2, содержание ГАГ (по гексозамину) с возрастом также прогрессивно снижается. Во фракционном профиле этих соединений количественно определены 8 основных фракций: кератан-сульфат (совместно с гликопротеидами), гиалурионовая кислота, хондроитин, кератан-сульфат, хондроитин-сульфат-4, хондроитин-сульфат-6 (хс-4 и хс-6), дерматан-сульфат и гепарин. Установлено, что снижение общего количества ГАГ в костной ткани в процессе онтогенеза обусловлено в основном уменьшением содержания гиалурионовой кислоты и суммарных хондроитин-сульфатов. Начиная с 3-месячного возраста в составе последних происходит перераспределение в сторону преобладания хондроитин-сульфата-6. Учитывая специфическую роль хондроитин-сульфатов в создании центров нуклеации кристаллов апатита, эти изменения можно расценивать как показатель интенсивности процесса минерализации и изменения его характера [9]. Характерным признаком старения костной тка-



Таблица

компонентов и механико-пластических свойств костной ткани крыс

Гиалуроно- вая кислота, мг %	Хондрои- тин-суль- фат-4, мг %	Хондрои- тин-суль- фат-6, мг %	Удельная стрела про- гиба, см/кг
19,6±0,1	28,2±2,3	24,4±0,8	3,10·10 <sup>-3</sup>
18,0±0,3	17,0±1,2	20,8±0,3	2,88·10 <sup>-3</sup>
12,4±0,6	7,4±2,3	10,2±2,8	1,69·10 <sup>-3</sup>
9,18±0,3	4,2±1,0	5,3±1,9	1,01·10 <sup>-3</sup>

ни одновременно может служить и падение концентрации гиалуроновой кислоты, обеспечивающей специфическую архитектуру коллагеновых фибрилл при создании новых центров эпитахсии кальцийфосфата [7].

Возрастные особенности метаболизма костной ткани определяют изменения в онтогенезе ее механико-пластических и прочностных функций. Это подтверждается наличием положительной корреляции между величиной удельной стрелы прогиба, характеризующей степень пластичности кости, с одной стороны, и концентрацией коллагена и гиалуроновой кислоты — с другой стороны. Максимальная же прочность на разрушение с возрастом повышается в результате возрастания содержания минеральных компонентов.

Обнаруженные возрастные различия в кристаллической структуре минеральной фазы костной ткани, а также в некоторых звеньях процессов, сопряженных с минерализацией, позволили установить изменения метаболизма, связанные с формированием структуры и функций кости, а также с нарушением их при старении. Определение структурно-функциональных особенностей костной ткани в разные периоды онтогенеза приобретает несомненную значимость для выяснения механизмов действия гравитационных факторов и ионизирующей радиации на костную систему.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков Е. Н., Красных И. Г. Изменение оптической плотности костной ткани у космонавтов А. Николаева и В. Севастьянова. — «Космич. биол. и мед.», 1970, № 6, с. 42—45.
2. Гроздов С. П. Пострадиационные изменения обмена кальция в тканях и их связь с состоянием биоэнергетики. — В кн.: Биоэнергетика при лучевых поражениях живого организма. Л., Изд-во АН СССР, 1973, с. 133—135.
3. Прохончуков А. А. Влияние радиоактивного фосфора на минеральный и белковый обмен в обызвествленных тканях. — «Радиобиология», 1963, т. 3, № 3, с. 345—350.



4. Френкель Л. А., Шантырь В. И. Материалы по изучению механических свойств и минерального состава костной ткани крыс различного возраста при остром лучевом поражении. — В кн.: Биохимич. исследования в травматологии и ортопедии. М., «Медицина», 1972, с. 138—142.
5. Babicky A., Kolar Y. Untersuchungen zum Stoffwechsel in der Epi- und Metaphyse nach localer Röntgenbestrahlung. — Strahlentherapie, 1966, 130, N 3, S. 349—356.
6. Balmain-Oligo N. Les relations entre les mucopolysaccharides acides et la calcification au niveau du cartilage de conjugation. — Lyon med., 1971, 226, N 13, p. 61—71.
7. Mac Gregor E., Bowness J. Interaction of proteoglycans and chondroitin sulfates with calcium or phosphate ions. — «Canad. J. Biochem.», 1971, 49, n. 4, p. 417—425.
8. Ньюман У. Н., Ньюман М. Минеральный обмен кости. М., Изд-во иностр. лит., 1961. 268 с.
9. Глимчер М. Молекулярная биология минерализованных тканей, в частности, костной ткани. — В кн.: Современные проблемы биофизики. М., Изд-во иностр. лит., 1961, № 2, с. 94—133.
10. Hahn T., Avioli L., Louis S. Effect of Chronic uremia on collagen Metabolism in skin and bone. — «Arch. intern. Med.», 1970, 126, n. 5, p. 882—886.
11. Langness U. Hydroxyprolinausscheidung und Kollagenstoffwechsel. — Dtsch. Med. Wochenschr., 1970, 95, № 5, s. 2530—2535.



В. Г. ШАХБАЗОВ, д-р биол. наук,

В. Б. АРАКЕЛЯН, Г. ЛЕБНИЦ,

К. РОШЛАУ

Кафедра генетики и цитологии,  
отдел генетики и биофизики гетерозиса

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Изменениям клеточных ядер под влиянием внешних повреждающих факторов посвящена обширная литература. Из ряда обзоров по этой проблеме видно, что роль изменений клеточного ядра в реакции клеток на внешние экстремальные воздействия изучена недостаточно [1, 2]. Мало изучена и ультрамикроструктура интерфазного ядра [3].

В последние годы на кафедре детально изучена реакция клеточного ядра на действие электрического тока и высокой экстремальной температуры [4, 5]. В этих работах показано, что электрокинетические свойства клеточных ядер изменяются в зависимости от возраста, физиологического состояния и под влиянием внешних повреждающих факторов. Установлены также глубокие изменения под влиянием низкой и сверхнизкой температур [6].

В данной статье изложены результаты исследования изменений знака дзета-потенциала клеточных ядер под влиянием низкой температуры и искрового электрического разряда, а также изменения морфологических особенностей клеточных ядер и структуризации хроматина под влиянием тех же повреждающих факторов.

Материалом служили клетки эпидермиса чешуй лукавиц *Allium* сера. Охлаждение клеток вели в криостате с регистрацией температурной кривой переохлаждения и замораживания. Действию искрового разряда ткань лука подвергали на установке ДМП-5.

Исследования по внутриклеточному микроэлектрофорезу проводили в плоской камере с платиновыми электродами в режиме 50 в/см и 1,5 мА по методике [4]. Морфологические изменения состояния ядер и хроматина исследовали при увеличении 15×40, при этом микроскопировали клетки без фиксации и окраски с целью более точно оценить повреждающие действия изучаемых факторов. Для систематизации учета повреждения ядер на каждом препарате учитывали процентное отношение



ядер трех типов: нормальных ядер с оптически однородным хроматином, ядер частично деформированных и содержащих структурированный хроматин и ядер пикнотических. Чтобы выяснить обратимость наблюдаемых изменений, учет состояния ядер проводили после воздействия и через 30 мин содержания эпидермиса в водопроводной воде.

При изучении влияния низкой температуры состояние клеточного ядра учитывали до и после температурного скачка, который происходит при кристаллизации воды в клетках ( $-6$ ,  $-7^{\circ}\text{C}$ ). Установлено, что в исходном состоянии около 30% клеточных ядер не смещаются в электрическом поле, а остальные имеют катодное смещение, т. е. положительный дзета-потенциал.

Изменения электрокинетических свойств клеточных ядер после действия низкой температуры показаны на рис. 1. Установлено, что охлаждение до  $-3,5^{\circ}$  вызывает обратимое повышение процента нейтральных ядер за счет снижения числа катодных.

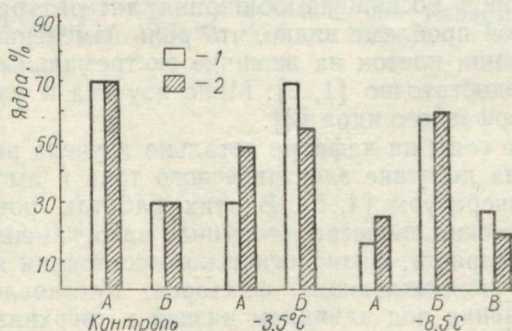


Рис. 1. Отношение катодных (А), неподвижных (Б) и анодных (В) ядер при двух режимах охлаждения: 1 — сразу после обработки, 2 — через 30 минут.

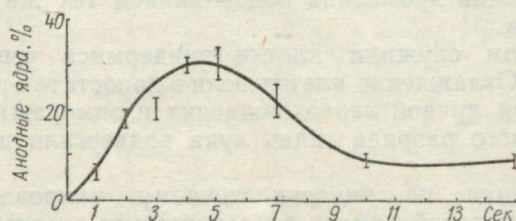


Рис. 2. Зависимость процента анодных ядер от времени обработки искровым разрядом.

Более глубокое охлаждение вызывает появление значительного числа анодных ядер, несущих отрицательный дзета-потенциал. Интересно отметить, что после температурного скачка у ядер



появляется свойство пульсировать под действием электрического тока [7].

Последствия действия на ядра искрового разряда показаны на рис. 2. Под действием разряда процент анодных ядер вначале возрастает, затем снижается, ядра также приобретают способность пульсировать под действием тока.

Изменения, происходящие в строении ядер и хроматина под действием низкой температуры и искрового разряда, показаны на рис. 3 и 4. После замораживания резко возрастает процент структурированных пикнотических ядер. Эти изменения необратимы, причем структурированные ядра со временем переходят в пикнотические. Действие искрового разряда также вызывает появление структурированных и пикнотических ядер, однако

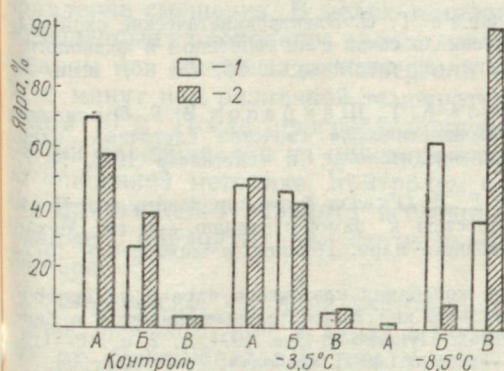


Рис. 3. Отношение нормальных (А), структурированных (Б) и пикнотических (В) ядер при двух режимах охлаждения: 1 — сразу после обработки; 2 — через 30 минут.

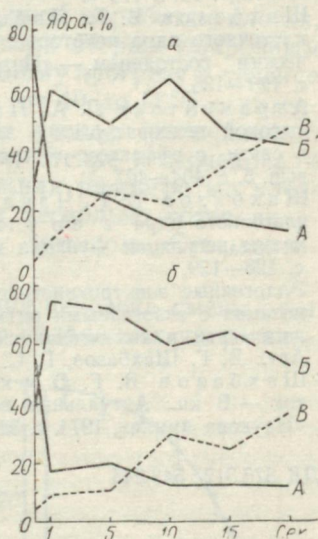


Рис. 4. Отношение нормальных (А), структурированных (Б) и пикнотических (В) ядер при разной экспозиции искрового разряда: а — сразу после обработки; б — через 30 минут.

в этом случае изменения оказываются частично обратимыми. Нужно отметить, что при температуре  $-8,5^{\circ}$  происходят структурные изменения цитоплазмы, которые не наблюдались при температуре  $-3,5^{\circ}$  и после обработки искровым разрядом: цитоплазма была шероховатой, появились глыбки и палочкоподобные структуры.

Проведенное исследование свидетельствует о существенной роли нарушений клеточного ядра при гибели клетки под действием таких различных повреждающих факторов как низкая температура и искровой электрический разряд. Параллельное исследование влияния этих факторов связано с гипотезой одного



из авторов о роли электрических нарушений ядерного аппарата при холодовой гибели клетки [8].

Полученные результаты подтверждают представление о том, что при замерзании клеток и при действии электрического разряда происходит электрическая деполяризация ядерной оболочки и хроматина, что выражается в изменениях дзета-потенциала и в структуризации ядра.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хесин Я. Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М., «Медицина», 1967. 423 с.
2. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., «Наука», 1972. 288 с.
3. Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М., «Наука», 1974. 175 с.
4. Шахбазов В. Г., Лобынцева Г. С. Электрокинетические свойства клеточного ядра некоторых растений в связи с их генотипом и физиологическим состоянием. — «Цитология и генетика», 1972, № 6, вып. 2, с. 129—136.
5. Атраментова Л. А., Попель А. Т., Шахбазов В. Г. О влиянии высокой температуры на электрокинетические свойства клеточных ядер в связи с эффектом гетерозиса. — «Цитология и генетика», 1973, № 7, вып. 5, с. 404—407.
6. Шахбазов В. Г., Чаплай Е. В. О связи функционального состояния клеточного ядра с его устойчивостью к замораживанию. — В сб.: Механизмы регуляции функции клеточного ядра. Тбилиси, «Мецниереба», 1972, с. 128—129.
7. Эндогенные электрокинетические колебания клеточного ядра и их синхронизация с экзогенными ритмами. — В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. Пушино-на-Оке. 1971, т. 2, с. 116—119. Авт.: В. Г. Шахбазов, Г. С. Лобынцева, А. Л. Набоков, Е. Ф. Копейка.
8. Шахбазов В. Г. О механизме низкотемпературного повреждения клеток. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев, «Наукова думка», 1974. с. 32—34.

УДК 576.312 : 543.545

Л. А. АТРАМЕНТОВА.

Г. И. ВОЛЧАНЕЦКАЯ, канд. биол. наук.

В. Г. ШАХБАЗОВ, д-р биол. наук

Кафедра генетики и цитологии

#### ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЯДЕР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

На растительных объектах было установлено, что электрокинетические свойства ядер зависят от физиологического состояния клеток и изменяются под действием высокой температуры [1—3]. Клетки животного происхождения не исследовались. Не известны нам также литературные сведения об изучении электрокинетических свойств клеток человека. Целью данной работы было изучение на клетках человека связи электрофоретической подвижности ядер с физиологическим состоянием клеток в норме и после воздействия высокой температуры.



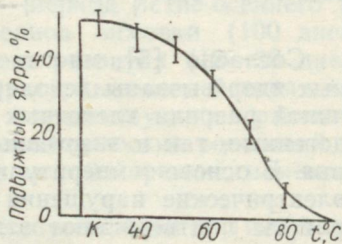
Использовали метод внутриклеточного микроэлектрофореза, применявшийся ранее для изучения клеток растений [1]: Объектом исследования служили клетки буккального эпителия человека. Эпителий состоит из трех слоев физиологически неравноценных клеток [4], поэтому клетки верхнего и нижнего слоев исследовали отдельно. С помощью шпателя соскабливали клетки со слизистой оболочки щеки. Это более старые клетки верхнего слоя. Затем прогирали щеку марлей и снова делали соскок более молодых клеток нижнего слоя. Налет распределяли тонким слоем на поверхности покровного стекла, добавляли в каплю водопроводной воды и помещали препарат клетками вниз в камеру для электрофореза.

При напряженности электрического поля 25 в/см в однослойных пластах клеток учитывали число подвижных ядер и направление смещения. В целях температурной обработки клетки, помещенные на покровное стекло, накрывали вторым покровным стеклом и в таком виде подвергали водному прогреву в течение пяти минут при различной температуре (от 40 до 90°C с интервалом 10°). После прогрева покровные стекла разъединяли, клетки распределяли на одном покровном стекле и исследовали по описанной методике. Контролем служили непрогретые клетки. Для каждого варианта исследовали несколько сотен ядер. Данные обрабатывали статистически методом Стьюдента-Фишера.

Установлено, что ядра клеток эпителия человека смещаются в электрическом поле к аноду и процент подвижных ядер зависит от функционального состояния клеток. В среднем в более старых клетках верхнего слоя эпителия смещается 51,7% ядер, в более молодых клетках нижнего слоя подвижных ядер больше — 73,8%, ( $P > 0,999$ ).

Для выяснения влияния возрастающей температуры на электрофоретическую подвижность ядер использовали клетки верхнего слоя эпителия. Установлено, что прогрев снижает электрофоретическую подвижность ядер (рисунок). Так, уже при температуре 40—50°C наблюдается небольшое (недостовверное) снижение подвижности ядер. Прогрев при 60° снижает подвижность ядер до 35,5% при 51,0% в контроле ( $P > 0,999$ ). После прогрева при 70° подвижность ядер составляет 24,0%, после 80° — 6,0%. Температура 90° вызывает полное прекращение смещения ядер.

В изменении электрофоретической подвижности клеточных ядер играет роль также изменение вязкости цитоплазмы, проис-



Влияние возрастающей температуры на электрофоретическую подвижность ядер.



ходящее при прогреве клеток. Количественно определить вклад этого фактора мы пока не смогли, однако наши наблюдения убеждают в несомненной роли изменения электрического состояния клеточного ядра. Об этом свидетельствуют наблюдаемые картины прекращения смещения клеточных ядер при наличии подвижных цитоплазматических структур.

Сравнительное исследование теплоустойчивости молодых и старых клеток проводили при температурах 65,75 и 80°C. Указанные воздействия существенно снижают подвижность ядер во всех вариантах опыта ( $P > 0,999$ ) (таблица), однако степень снижения зависит от возраста клеток. В целом теплоустойчивость молодых клеток на 6,2—10,2% выше по сравнению с более старыми, с большой степенью достоверности.

Изменение электрофоретической подвижности ядер под действием высокой температуры

Вариант опыта	Старые клетки			Молодые клетки			Р по возрастной теплоустойчивости
	количество ядер	подвижные $M \pm m$ , %	к контролю, %	количество ядер	подвижные $M \pm m$ , %	к контролю, %	
Контроль 60°	1424	$52,4 \pm 1,2$		987	$77,3 \pm 1,3$		
Конт- роль 75°	1825	$39,4 \pm 1,1$	75,2	1394	$60,2 \pm 1,3$	82,0	0,991
Конт- роль 80°	949	$50,5 \pm 1,6$		923	$70,2 \pm 1,5$		
Конт- роль 60°	497	$37,8 \pm 2,2$	74,5	695	$59,5 \pm 1,8$	84,7	0,982
Конт- роль 75°	949	$50,5 \pm 1,6$		923	$70,2 \pm 1,5$		
Конт- роль 80°	959	$4,1 \pm 0,6$	8,2	459	$10,1 \pm 1,3$	14,4	0,995

Согласно [5], многие онтогенетические изменения клеточных ядер вызваны деполяризацией ядрышка и хроматина. Причиной разряда клеточных ядер, по-видимому, являются как эндогенные, так и экзогенные факторы, повреждающие воздействия. В основе температурного повреждения клеток также лежат электрические нарушения в системе ядра. Результаты данной работы подтверждают эти предположения и доказывают их применимость и к клеткам человека. С увеличением возраста клеток происходит потеря ядрами электрического заряда в виде определенных ионов, что проявляется в снижении их электрофоретической подвижности. Высокая температура снижает подвижность ядер, что также может свидетельствовать об электрической деполяризации ядерных структур.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шахбазов В. Г., Лобынцева Г. С. Биоэлектрические свойства ядер и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом, физиологическим состоянием и действием высокой температуры. — «Биофизика», 1971, т. 16, вып. 3, с. 457—561.



2. Атраментова Л. А., Попель А. Т., Шахбазова В. Г. О влиянии высокой экстремальной температуры на электрокинетические свойства клеточных ядер в связи с эффектом гетерозиса — «Цитология и генетика», 1973, т. 7, вып. 5, с. 404—407.
3. Атраментова Л. А., Шахбазов В. Г. Электрокинетические особенности клеточных ядер в связи с физиологическим состоянием клеток растений. — «Биологические науки», 1974, т. 5, с. 139.
4. Захаров А. М. Частота хроматинположительных ядер в буккальном эпителии. — «Генетика», 1972, т. 8, № 2, с. 192—195.
5. Шахбазов В. Г. Связь длительности онтогенеза с эффектом гетерозиса и некоторые механизмы этой связи. — В кн.: Ведущие факторы онтогенеза, Киев, «Наукова думка», 1972, с. 266—281.

УДК 575.125 : 577.42+595.787

А. Т. ПОПЕЛЬ, Л. А. ВИННИК  
Кафедра генетики и цитологии

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ИНБРЕДНОЙ И ГИБРИДНОЙ ГРЕНЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА В ПЕРИОД ПРЕДИАПАУЗНОГО РАЗВИТИЯ

Несмотря на то, что теплоустойчивость тутового шелкопряда в период эмбрионального развития изучена подробно [2, 3, 5], данных о связи гетерозисного состояния зародыша с его теплоустойчивостью в процессе эмбрионального развития в литературе почти нет.

В период эмбриогенеза тутового шелкопряда Б. Л. Астауров различает 4 периода: 1 — преддиапаузный — с момента оплодотворения яйца до образования сегментированной зародышевой полоски и пигментированной зародышевой оболочки (продолжительность около трех суток); 2 — период летне-осеннего покоя (около шести месяцев); 3 — период зимовки (100 дней); 4 — постдиапаузный период весеннего развития (12—20 дней).

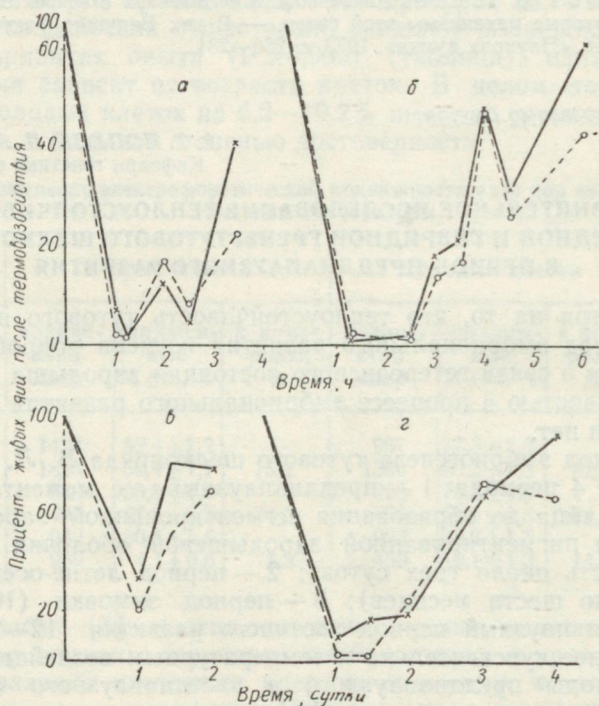
Наиболее чувствительна к температурным воздействиям гrena в периоды преддиапаузного и постдиапаузного развития, в течение которых смена морфофизиологических состояний совершается очень быстро, что влечет за собой резкие изменения в ее теплоустойчивости.

Поэтому мы исследовали теплоустойчивость инбредной и гибридной грены в короткий период преддиапаузного развития (от момента откладки яйца до вступления грены в период диапаузы).

Материалом для опытов служили инбредные линии тутового шелкопряда (14 поколение инбридинга) из кафедральной коллекции и межлинейные гибриды  $F_1$ . В каждом опыте одновременно спаривали самок инбредных линий с самцами тех же линий для получения чистолинейной грены, или с другой линией для получения гибридной грены. Через 4 часа самок распаривали и каждые 30 минут пересаживали в пластмассовые колечки на пергаментную бумагу для откладки яиц. Таким путем получали 3 порции яиц каждого генотипа ( $P_1$ ,  $P_2$  и  $F_1$  для реци-



прокных комбинаций). Каждую порцию грены делили на несколько частей в зависимости от количества вариантов. Инбредную и гибридную грену (одновременно) подвергали водному прогреву при температуре 43—52°C (методика термообработки подробно описана нами ранее [4]). Всего в опыте исследовали 17 различных возрастных категорий инбредной и гибридной грены (от 20 мин до 4 суток). Контролем служила порция гре-



Теплоустойчивость инбредной и гибридной грены тутового шелкопряда в период преддиапаузного развития:

а — 44°; б — 45°; в — 49°; г — 50° С; 1 — инбредные линии; 2 — межлинейные гибриды.

ны, не подвергавшаяся действию высокой температуры. Результаты опытов учитывали по проценту вышедших гусениц, который устанавливали по количеству оболочек, относимых к общему числу яиц. На рисунке приведены величины процентов живых зародышей в пересчете к соответствующему контролю.

В 1-й период преддиапаузного развития грены происходит созревание яйцеклетки. Яйца тутового шелкопряда в момент откладки находятся в стадии метафазы 1-го деления созревания. Около двух часов после откладки в яйце происходят процессы развития яйцеклетки, и гrena характеризуется минималь-



ной теплоустойчивостью. Как видно из рисунка, позиция *a*, через час после откладки при температуре 44°C лишь 1—6% яиц сохраняют жизнеспособность. К 2—3 часам теплоустойчивость грены резко возрастает. В 3—3,5 часа наблюдаются существенные различия в теплоустойчивости между инбредной и гибридной греней (до 20% в пользу гибридов при  $P > 0,999$ , рисунок, позиции *a*, *b*). По данным цитологических исследований [3], этот период соответствует моменту кариогамии. Некоторые различия в теплоустойчивости получены и в более ранние сроки, однако объяснить их пока трудно. Возможно, они обусловлены различной способностью кладок к андрогенетическому развитию.

Различия между инбредной и гибридной греней, возникающие в возрасте 3 часов, имеют место и в последующие сроки развивающейся грены. Так, значительно выше теплоустойчивость гибридных зародышей и в возрасте 4—6 часов (на 6—18% при  $P > 0,999$ , рисунок, позиция *b*). К суточному возрасту теплоустойчивость грены резко возрастает. Поэтому в этот и последующие периоды грену подвергали действию температуры 48—50°C. При температуре 49°C во всех исследованных возрастах (одни сутки, 34 часа и двое суток) гибриды по теплоустойчивости достоверно на 8—30% превышают теплоустойчивость инбредных линий (рисунок, позиция *в*). И, наконец, через трое суток существенных различий между инбредными и гибридными зародышами по признаку теплоустойчивости не отмечено (рисунок, позиция *г*), что, по-видимому, связано с различным временем вступления их в период эмбриональной диапаузы. Вновь существенные различия, достигающие 30% в пользу гибрида (при  $P > 0,999$ ), возникают в возрасте грены 4-х суток (рисунок, позиция *г*).

Таким образом, наименьшей теплоустойчивостью характеризуется гrena в период созревания яйцеклетки, который соответствует времени до 2—3 часов после откладки. К трем часам наблюдается возрастание теплоустойчивости, затем с некоторыми перепадами она устанавливается на одном уровне. Первые существенные различия между инбредной и гибридной греней появляются в возрасте 2,5—3 часов, что по времени соответствует моменту кариогамии. Преимущество гибридов в отношении теплоустойчивости в этот период связано с образованием гетерозиготы. Максимальное превышение по теплоустойчивости гетерозисных гибридов в сравнении с инбредными линиями имеет место в возрасте 3 ч 30 мин (на 22% при 44°), 6 ч (на 10% при 45°) и 2 суток (на 28% при 49°).

В целом повышенная теплоустойчивость гетерозисных гибридов возникает в момент кариогамии и сохраняется на всем протяжении преддиапаузного развития.

Нам известна лишь одна, подобная нашей, работа [1], в которой автор в опытах с морскими ежами получил, что уровень



теплоустойчивости яйцеклетки и зиготы одинаков и не зависит от их генотипических особенностей. Результаты, полученные в нашей работе, свидетельствуют об обратном.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андроников В. Б. Теплоустойчивость половых клеток и зигот морских ежей. — «Цитология», 1963, т. 5, вып. 2, с. 234—237.
2. Астауров Б. Л., Острякова-Варшавер В. П., Струнников В. А. Действие высоких температур в эмбриональном развитии тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.). — В сб.: Действие высоких и низких температур на развитие тутового шелкопряда. М., 1958, с. 39—80.
3. Острякова-Варшавер В. П. Цитология оплодотворения у тутового шелкопряда в связи с различиями в чувствительности последовательных фаз процесса к высокой температуре. — «Докл. АН СССР, сер. биол.», 1952, т. 83, № 6, с. 921—924.
4. Шахбазов В. Г., Попель А. Т. Теплоустойчивость гибридных семян и методика ее определения. — В сб.: Биологические основы повышения качества семян сельскохозяйственных растений. М., 1964, с. 29—33.
5. Эмме А. М. Подробное изучение возрастной изменчивости термоактивности развивающейся преддиапаузной грены. — «Докл. АН СССР, сер. биол.», 1952, т. 32, № 5, с. 825—828.

УДК 575.125 : 595.773

А. В. НЕКРАСОВА, С. П. БЕЛЕЦКАЯ  
Кафедра генетики и цитологии

#### ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ИМАГО ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ДРОЗОФИЛЫ

В связи с положительным влиянием гетерозиготности на длительность онтогенеза [1—5] особый интерес представляет проявление гетерозиса в возрастном аспекте.

В работе исследовали возрастные изменения плодовитости и устойчивости к действию высокой температуры у имаго инбредных линий и гибридов *Drosophila melanogaster*. Величину плодовитости определяли по количеству куколок и куколочных экзувиев на семью в течение всего репродуктивного периода. Теплоустойчивость исследовали у имаго шести возрастных групп. Температура опыта — 40°C, экспозиция — 20 минут. Теплоустойчивость определяли по проценту особей, выживших через 18 часов после прогрева.

Установлено, что продолжительность репродуктивного периода зависит от генотипа: самки инбредных линий откладывают фертильные яйца в течение 15—20 дней, хотя и остаются живыми на протяжении последующих отсадов, гибриды сохраняют высокую воспроизводительную способность до 40-дневного возраста. Снижение плодовитости с возрастом репродуцирующих особей наблюдали как у инбредных, так и у гибридных мух. Однако интенсивность откладки яиц у гибридов была гораздо выше на протяжении всего периода. В наиболее актив-



ный период кладки (4—6 суток) плодовитость гибридов  $F_1$  ( $M \times J-1$ ) и  $F_1$  ( $J-1 \times M$ ) была на 49% выше, чем у наиболее продуктивной линии. А в варианте  $F_1$  ( $A \times J-1$ ) — в 2—3 раза (таблица). У 18-дневных имаго инбредных линий плодовитость снизилась на 50—60% по сравнению с ранневозрастными группами. Уменьшение этого показателя у гибридов менее значительное: 7—20%.

Плодовитость инбредных и гибридных самок разного возраста

Вариант	$\bar{x} \pm m\bar{x}$	$F_1-P_1$		$F_1-P_2$	
		$D \pm mD$	$P$	$D \pm mD$	$P$
4—6 суток	M	136,0 $\pm$ 6,3	—	—	—
	J-1	91,0 $\pm$ 5,9	—	—	—
	A	64,0 $\pm$ 5,0	—	—	—
	$F_1(M \times J-1)$	203,0 $\pm$ 14,0	67,0 $\pm$ 15,4	0,999	112,0 $\pm$ 15,2
	$F_1(J-1 \times M)$	201,0 $\pm$ 8,8	110,0 $\pm$ 10,6	0,999	65,0 $\pm$ 10,8
	$F_1(A \times J-1)$	212,0 $\pm$ 7,0	116,0 $\pm$ 11,6	0,999	121,0 $\pm$ 9,8
	$F_1(J-1 \times A)$	215,0 $\pm$ 8,4	124,0 $\pm$ 10,3	0,999	119,0 $\pm$ 12,0
16—18 суток	M	102,0 $\pm$ 11,5	—	—	—
	J-1	46,0 $\pm$ 5,9	—	—	—
	A	33,0 $\pm$ 5,3	—	—	—
	$F_1(M \times J-1)$	145,0 $\pm$ 10,5	43,0 $\pm$ 15,6	0,99	99,0 $\pm$ 12,1
	$F_1(J-1 \times M)$	154,0 $\pm$ 9,0	108,0 $\pm$ 10,8	0,999	52,0 $\pm$ 14,7
	$F_1(A \times J-1)$	164,0 $\pm$ 8,1	128,0 $\pm$ 9,7	0,999	115,0 $\pm$ 10,0
	$F_1(J-1 \times A)$	199,0 $\pm$ 8,9	153,0 $\pm$ 10,7	0,999	166,0 $\pm$ 10,4

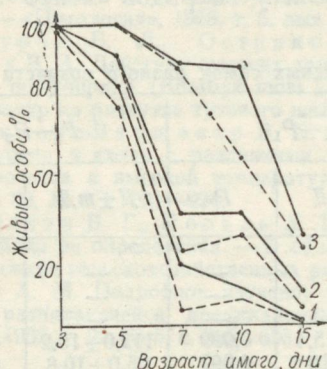
Таким образом, гибриды, обладая большей плодовитостью, сохраняют высокую воспроизводительную способность в течение более длительного периода. Эта закономерность характерна и для гибридов, не проявляющих гетерозис по продолжительности жизни.

При изучении теплоустойчивости у имаго разных возрастных групп установлено, что уменьшение устойчивости к действию высокой температуры с увеличением возраста происходит у всех опытных линий и гибридов дрозофилы. Однако утрата способности выдержать высокую температуру у гибридов происходит медленнее, чем у инбредных форм (рисунок). В группе 15-дневных имаго количество живых особей после температурной обработки уменьшилось по сравнению с 24-часовыми: у линий на 90—95%, у гибридов — на 50—60%.

Таким образом, физиологические особенности гибридных организмов отчетливо проявляются в процессе старения. Скрещивание часто представляет собой простейших способ повышения видового возраста у многих лабораторных животных. Но и в тех



случаях, когда общая продолжительность жизни не увеличивается, особенности генетического аппарата гетерозигот позволяют сохранить им высокую жизнеспособность, характерную для молодых особей, в течение длительного времени.



Возрастные изменения теплоустойчивости у имаго дрозофилы:

1 — линия «Алжирская»;  
2 — линия «Ленинградская»;  
3 —  $F_1$  (Алжирская  $\times$  Ленинградская); — ♀; ... ♂.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pearl R., Parker S. L., Gonzalez B. M. Experimental studies on the duration of life. — «Amer. Naturalist», 1923, N 57. p. 153—192.
2. Clarke J. M. Maynard-Smith J. Hybrid vigor and longevity. — «Genetics», 1955, N 53, p. 172—175.
3. Bonnier G. Experiments on hybrids superiority in *Drosophila melanogaster*. — «Genetics», 1961, N 46, p. 85—91.
4. Шахбазов В. Г. О влиянии инбредной депрессии и гетерозиса на длительность онтогенеза. — В сб.: Молекулярные и функциональные основы онтогенеза. М., 1970, с. 150—157.
5. Шахбазов В. Г. Связь длительности онтогенеза с эффектом гетерозиса и некоторые механизмы этой связи. — В сб.: Ведущие факторы онтогенеза. Киев, 1972, с. 266—281.

УДК 575.18:595.773.4

З. Т. НИКОЛЬЧЕНКО,  
Л. И. ЗАЙЦЕВА,

Р. А. ЦЕРЕЩЕНКО

Кафедра генетики и цитологии

#### ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG.

Дрозофила принадлежит к числу организмов с четким гетерохромосомным механизмом детерминации пола, обеспечивающим благодаря гетерогаметности одного из полов (в данном случае — мужского) расщепление по полу 1 : 1. Однако послед-



нее может нарушаться. Чтобы выяснить причины, вызывающие отклонение от упомянутого числового отношения, необходимо изучить влияние различных факторов на соотношение полов. Вопрос об изменении соотношения полов под влиянием разнообразных факторов широко освещен в литературе, но многое еще остается неясным. В частности, это касается амплитуды отклонений, направления сдвигов (в сторону мужского или женского пола), а также эндогенных механизмов, осуществляющих изменения соотношения полов в результате внешних воздействий. По данным одних авторов регуляция соотношения полов зависит от женского пола [1, 2]. Другие авторы полагают, что регуляторный механизм может действовать не только в организме самки, но и в организме самца [3, 4].

В настоящей работе изучалось влияние на соотношение полов у *D. melanogaster* Mg. таких факторов как голодание, плотность населения и высокая температура. В литературе имеются некоторые сведения о влиянии этих факторов на соотношение полов у разных видов животных. При этом большинство авторов отмечает преобладание самцов в подобного рода критических условиях [1, 2, 5—11], ряд других констатируют преобладание самок [12, 13] и, наконец, сообщается об отсутствии влияния перечисленных выше факторов на соотношение полов [14, 15].

Объектом исследований служили мухи линии Курган ленинградского происхождения. Во избежание влияния тесного инбридинга мухи брались из массовой культуры этой линии. Воздействие экстремальными факторами производилось на разных стадиях онтогенеза.

Голодание мухи испытывали на стадиях имаго и личинки. В экспериментах с имаго виргинных мух вскоре после выхода помещали в пробирки без питательной среды, но снабжаемые водой через специальные фитильки. По истечении определенного срока голода (одни сутки, двое или трое суток) мух скрещивали по схеме: контроль  $\times$  контроль ( $K \times K$ ), опыт  $\times$  контроль ( $O \times K$ ), контроль  $\times$  опыт ( $K \times O$ ) и опыт  $\times$  опыт ( $O \times O$ ). Для голода на личиночной стадии потомство одной пары мух выращивали на значительно меньшем количестве среды (0,5 от контроля). При этом личинки оказывались в условиях повышенной плотности. Так как голодание является не единственным неблагоприятным следствием перенаселенности, мы учитывали влияние фактора повышенной плотности в целом. Количество самцов и самок подсчитывалось непосредственно у вышедших имаго (контроль и опыт) и в потомстве этих особей по упомянутой выше схеме скрещиваний.

Термообработке мухи подвергались на стадиях личинки, куколки и имаго. Личинки и куколки прогревались однократно при температуре 37°C, экспозиции 6 ч (личинки — на 2-й — 3-й день личиночной стадии, куколки — на 2-й день после окукли-



вания). Имаго вскоре после выхода также подвергались однократному прогреву (использовались только виргинные мухи), но температура и экспозиция были разные: 40°C, 20 мин, 37°C, 4 ч и 37°C, 6 ч. Соотношение полов учитывалось непосредственно у вышедших имаго, личинки которых прогревались, и в их потомстве, а также в потомстве мух, прогретых на стадиях куколки и имаго. Схема скрещиваний оставалась прежней.

Во всех вариантах потомство одной пары родителей выращивалось в отдельных пробирках. Через 2—3-е суток оплодотворенную самку отсаживали на свежую среду. В каждом варианте исследовалось по 7—10 семей. Результаты суммированы, статистически обработаны и представлены в табл. 1, 2, 3.

Таблица 1

Влияние повышенной плотности личинок на соотношение полов у *Drosophila melanogaster* Mg.

Вариант	Повторность	Общее число мух	Соотношение полов, %		Отличие от контроля (+♀, —♂)	P
			самки	самцы		
У вышедших имаго						
Контроль	1	2204	49,9±1,06	50,1±1,06		
Опыт	1	1439	59,7±1,29	40,3±1,29	+9,8±1,67	>0,999
Контроль	2	2275	49,8±1,04	50,2±1,04		
Опыт	2	1633	61,8±1,20	38,2±1,20	+12,0±1,59	>0,999
В потомстве						
K×K	—	1754	49,9±1,20	50,1±1,20		
O×K	—	1411	43,1±1,32	56,9±1,32	—6,8±1,78	>0,999
K×O	—	1602	40,5±1,23	59,5±1,23	—9,4±1,71	>0,999
O×O	—	1570	37,8±1,23	62,2±1,23	—12,1±1,71	>0,999

+♀—отличие от контроля в сторону преобладания самок,  
 —♂—отличие от контроля в сторону преобладания самцов.  
 То же относится и к табл. 2 и 3.

Из табл. 1 видно, что при выращивании личинок в условиях повышенной плотности соотношение полов у вышедших имаго сдвинуто в сторону самок на 9,8—12% ( $P > 0,999$ ). Во всех экспериментах учитывалась плодовитость (по имаго). В данном опыте плодовитость оказалась значительно пониженной по сравнению с контролем. Последнее позволяет предположить, что изменение в соотношении полов произошло за счет элиминации самцов на преимагинальных стадиях, как следствие неблагоприятных условий перенаселенности. В потомстве этих особей преобладали самцы, при этом резкого снижения плодовитости, по сравнению с контролем, не наблюдалось. Наибольший сдвиг отмечен в варианте O×O (12%,  $P > 0,999$ ).



У мух, голодавших на стадии имаго (табл. 2), соотношение полов также сдвинуто в сторону самцов и в большинстве случаев статистически значимо. Наибольший сдвиг — в варианте О×О 3-суточного голодания (10%,  $P > 0,999$ ).

Таблица 2

Влияние голодания имаго на соотношение полов в потомстве у *Drosophila melanogaster* Mg.

Длительность голода	Вариант	Повторность	Общее число мух	Соотношение полов, %		Отличие от контроля (+♀, —♂)	P
				Самки	Самцы		
1 сутки	K×K	—	1142	49,7±1,48	50,3±1,48	—	—
То же	O×K	—	1116	41,5±1,48	58,5±1,48	-8,2±2,09	>0,999
"	K×O	—	828	45,3±1,73	54,7±1,73	-4,4±2,28	0,948
"	O×O	—	882	44,9±1,67	55,1±1,67	-4,8±2,23	0,970
2 суток	K×K	—	1319	49,6±1,38	50,4±1,38	—	—
То же	O×K	—	1451	46,0±1,31	54,0±1,31	-3,6±1,90	0,942
"	K×O	—	1421	42,6±1,31	57,4±1,31	-7,0±1,90	>0,999
"	O×O	—	1267	44,0±1,39	56,0±1,39	-5,6±1,96	0,995
3 суток	K×K	1	1194	49,9±1,45	50,1±1,45	—	—
То же	O×K	1	613	47,0±2,01	53,0±2,01	-2,9±2,48	<0,95
"	K×O	1	1065	47,8±1,53	52,2±1,53	-2,1±2,11	<0,95
"	O×O	1	1142	44,5±1,47	55,5±1,47	-5,4±2,06	0,991
3 суток	K×K	2	1430	49,9±1,32	50,1±1,32	—	—
То же	O×K	2	1304	44,7±1,23	55,3±1,23	-5,2±1,81	0,996
"	K×O	2	1290	45,7±1,39	54,3±1,39	-4,2±1,92	0,970
"	O×O	2	1154	39,8±1,44	60,2±1,44	-10,1±1,96	>0,999

В основном аналогичные результаты получены при действии высокой температуры (табл. 3). У мух, пропревавшихся на стадии личинки, соотношение полов у вышедших имаго изменено в пользу самок на 5% ( $P = 0,996$ ). Так как преобладание самок сочетается с резким падением плодовитости, его можно объяснить элиминацией самцов на преимагинальных стадиях под влиянием высокой сублетальной температуры. В потомстве этих особей соотношение полов не изменено (данные в таблицу не включены).

В потомстве мух, прогретых на стадии куколки, статистически значимый сдвиг в сторону самцов обнаружен только в варианте K×O (на 8,3%,  $P > 0,999$ ). В остальных вариантах — тенденция сдвига и тоже в сторону самцов.

При прогреве мух на стадии имаго в потомстве также преобладают самцы. Хотя сдвиги и небольшие, но статистически значимы.

Преобладание самцов во всех вариантах не сопровождалось значительным снижением плодовитости и поэтому объяснить его элиминацией самок на преимагинальных стадиях не представляется возможным. Феномен преобладания самцов в потомстве родителей, находившихся в неблагоприятных и крайних



Таблица 3

Влияние высокой сублетальной температуры на соотношение полов у *D. melanogaster* Mg.

Температура, °C	Экспозиция, ч	Стадия развития во время прогрева	Вариант	Общее число мух	Соотношение полов, %		Отличие от контроля (+♀, —♂)	Р
					Самки	Самцы		
					У вышедших имаго			
37	6	Личинки	Контроль	2759	49,9±1,0	50,1±1,0	+5,0±1,67	0,996
37	6	То же	Опыт	1309	54,9±1,37	45,1±1,37		
					В потомстве			
37	6	Куколки	K×K	2019	50,3±1,11	49,7±1,11		
37	6	То же	O×K	1780	47,8±1,18	52,2±1,18	-2,5±1,62	<0,95
37	6	"	K×O	1167	42,0±1,45	58,0±1,45	-8,3±1,82	>0,999
37	6	"	O×O	1231	47,5±1,40	52,5±1,40	-2,8±1,80	<9,95
40	0,3	Имаго	K×K	1580	49,8±1,26	50,2±1,26		
40	0,3	То же	O×K	549	48,3±2,10	51,7±2,10	-1,5±2,40	<0,95
40	0,3	"	K×O	890	44,5±1,66	55,5±1,66	-5,3±2,08	0,989
40	0,3	"	O×O	1101	44,0±1,50	56,0±1,50	-5,8±2,0	0,996
37	4	"	K×K	1732	49,9±1,20	50,1±1,20		
37	4	"	O×K	2370	45,6±1,02	54,4±1,02	-4,3±1,57	0,994
37	4	"	K×O	2337	46,7±1,03	53,3±1,03	-3,2±1,59	0,959
37	4	"	O×O	1686	46,0±1,21	54,0±1,21	-3,9±1,70	0,979
37	6	"	K×K	1657	50,4±1,23	49,6±1,23		
37	6	"	O×K	1757	45,9±1,17	54,1±1,17	-4,5±1,70	0,991
37	6	"	K×O	1813	47,8±1,20	52,2±1,20	-2,6±1,71	<0,95
37	6	"	O×O	1579	46,3±1,25	53,7±1,25	-4,1±1,75	0,980

для выживания условиях, пока не объясним. Можно лишь предположить, что такие экстремальные факторы, как голодание, повышенная плотность населения и высокая сублетальная температура оказывают определенное воздействие на процесс гаметогенеза, в результате чего вероятность оплодотворения яйцеклеток сперматозоидами, несущими X- и Y-хромосому, становится неравной. Так как сдвиги в сторону самцов обнаружены в реципрокных скрещиваниях (K×O и O×K), есть основание полагать, что использованные экстремальные факторы влияют не только на сперматогенез, но и на оогенез. Вследствие этого возникают различия между X- и Y-сперматозоидами в оплодотворяющей активности, при этом преимущество получают Y-сперматозоиды (варианты K×O), и между яйцеклетками в средстве к сперматозоидам разного типа, что проявляется в предпочтительном восприятии яйцеклеткой того же Y-сперматозоида (варианты O×K). При воздействии фактора на обоих родителей, очевидно, эффект усиливается, так как в скрещиваниях O×O в большинстве случаев преобладание самцов наибольшее.

Полученные данные свидетельствуют о возможном существ-



вовании эндогенного механизма, регулирующего соотношение полов под влиянием внешних воздействий в организмах мужского и женского полов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Светлов П. Г. Влияние внешних условий на определение пола у *Drosophila melanogaster*. — «Цитология», 1962, т. 4, № 4, с. 391—402.
2. Metzler Sigrid. Über die Beeinflußbarkeit des Geschlechtsverhältnisses von *Cyclops viridis* Jurine durch Außenfaktoren. — «Zool. Jahrb.», 1957, Abt. 1, 67, N 1, S. 81—110.
3. Геодакян В. А., Кособутский В. И. Регуляция соотношения полов механизмом обратной связи. — «Докл. АН СССР», 1967, т. 173, № 4, с. 938—941.
4. Кубанцев Б. С. Генно-хромосомные основы определения пола и его гормональное переопределение. — «Учен. зап. Волгогр. пед. ин-та», 1970, вып. 31, с. 57—85.
5. Владимирская Е. М. Пути регуляции пола у животных. Киев, «Урожай», 1966. 87 с.
6. Кубанцев Б. С., Дьяконова В. Н., Рыбакова Т. И. Плотность популяций и динамика полового состава у млекопитающих. — «Экология», 1970, № 3, с. 49—57.
7. Макеева А. П., Никольский Г. В. Половая структура нерестовой популяции рыб, ее приспособительное значение и способы регуляции. — В сб.: Теор. основы рыбоводства. М., «Наука», 1965, с. 53—72.
8. Наумов С. П., Гибет Л. А., Шаталова С. П. Динамика полового состава при изменениях численности млекопитающих. — «Журн. общ. биол.», 1969, т. 30, № 6, с. 673—680.
9. Bakker K. An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Dr. melanogaster*. — «Arch. neerl. Zool.», 1961, v. 14, N 2, p. 200—281.
10. D'Ancona Umberto. Distribution of sexes and enviromental Influence in the european eel. — «Arch. anat. microsc. et morphol. exptl.», 1959, 48 bis, Fasc. suppl., p. 61—70.
11. Olson Donald E. Sex ratios of young-of-year walleyes in Minnesota rearing ponds and lakes. — «Progress. Fish-Culturist», 1968, v. 30, N 4, p. 196—202.
12. Kinne Otto. Zur Biologie und Physiologie von *Gammarus duebeni* Lelly; VII: Über die Temperaturabhängigkeit der Geschlechtsbestimmung. — «Biol. Zbl.», 1953, v. 72, N 5/6, S. 260—270.
13. Kinne Otto. Über den Einfluss der Temperatur auf die Geschlechtsbestimmung bei *Gammarus salinus* Spooner (Amphipoda). — «Zool. Anz.», 1953, v. 151, N 11—12, S. 277—278.
14. Englert Du Wayne C., Bell A. E. Sex ratio in *Tribolium castneum* Herbst as influenced by larval starvation. — «Oikos», 1962, v. 13, N 1, p. 118—124.
15. Streams F. A., Pimentel D. Studies on the sex ratio of the harlequin bug, *Murgantia histrionica* (Hemiptera: Pentatomidae). — «Ann. Entomol. Soc. America», 1963, v. 56, N 5, p. 712—716.