

УДК 576.343+593.95

ЭМБРИОЛОГИЯ

Г. А. БУЗНИКОВ, Б. Н. МАНУХИН, В. И. ПОДМАРЕВ

ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА АКТИВАЦИЮ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В ЯЙЦЕКЛЕТКАХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ ПОСЛЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 4 I 1971)

Активация биосинтеза белков (¹⁻⁴) при оплодотворении яйцеклеток морских ежей наступает не сразу. Так, у яйцеклеток *Lytechinus pictus* интервал времени между оплодотворением и усилением биосинтеза белков (лаг-период) составляет $7,8 \pm 1,2$ мин. (³). Другая известная биохимическая реакция на оплодотворение — изменение уровня серотонина, низкомолекулярного физиологически активного вещества, несущего разнообразные регуляторные функции на всех этапах индивидуального развития (^{5, 6}). К числу последних относится возможное участие этого вещества в регуляции биосинтеза белков у ранних эмбрионов морских ежей (^{6, 7}). В настоящей работе была исследована возможная связь между сроками активации биосинтеза белков после оплодотворения (т. е. величиной лаг-периода) и уровнем эндогенного серотонина.

Яйцеклетки морских ежей *Strongylocentrotus dröbachiensis* (Баренцево море) и *S. intermedius* (Японское море) инкубировали в профильтрованной морской воде или в растворах серотонина на морской воде. Температура инкубации была оптимальной для данного вида ($5,5-7,5^\circ$ для *S. dröbachiensis* и $21-22^\circ$ для *S. intermedius*) и стабильной в течение каждого опыта. При определении длины лаг-периода яйцеклетки, взятые от одной самки, многократно промывали морской водой и экспонировали 30—40 мин. с C^{14} -гидролизатом белка хлореллы ($5-7,5$ мкС/мл). Затем меченые предшественники отмывали; часть яйцеклеток переносили в воду, а часть — в раствор серотонина ($50-100$ мкг/мл), где экспонировали 20—30 мин. Перед оплодотворением серотонин отмывали, но сразу после оплодотворения вносили снова. По 2 мл суспензии оплодотворенных яйцеклеток разносили в пенициллиновые флаконы для последующей инкубации; материал в каждом флаконе фиксировали равными объемами 10% ТХУ, содержащей казамин. Первую фиксацию проводили через 5 мин. после оплодотворения, а последующие фиксации — с пятиминутными интервалами в течение 60 мин. (опыты на *S. dröbachiensis*). Продолжительность соответствующих опытов на *S. intermedius* 30 мин. при 3-минутных интервалах между фиксациями.

Для определения серотонина яйцеклетки гомогенизировали с 0,5 N хлорной кислотой (1 мл густой суспензии яйцеклеток + 6 мл кислоты). Гомогенаты хранили в течение 5—20 дней в холодильнике. Всего было взято 4 серии проб: две на *S. dröbachiensis* и две на *S. intermedius*; в каждой серии использовали икру от одной самки. Первую пробу в серии брали до оплодотворения, а последующие — с 10-минутными (*S. dröbachiensis*) или 3—5-минутными (*S. intermedius*) интервалами, соответственно в течение 60—70 или 30 мин. Перед проведением анализов пробы центрифугировали и центрифугат после нейтрализации очищали на колонках с ионообменной смолой Дауэкс-50; техника очистки описана в другой работе (⁸). Серотонин определяли по Снайдеру и др. (⁹) (флуорометрия продукта конденсации с нингидрином).

В первой группе опытов были прослежены временные соотношения между изменениями уровня серотонина и интенсивностью биосинтеза белков после оплодотворения. Результаты этих опытов представлены на рис. 1

и 2. Можно видеть, что концентрация серотонина в неоплодотворенных яйцеклетках довольно высока, составляя у *S. dröbachiensis* и *S. intermedius* соответственно 6,5 $\mu\text{г}$ на 10^5 яиц (32,5 $\mu\text{г}$ на 1 г сырого веса) и 0,35 $\mu\text{г}$ на 10^5 яиц (7 $\mu\text{г}$ на 1 г сырого веса). У *S. dröbachiensis* в серии анализов, представленной на рис. 1, содержание серотонина в течение первых 10 мин.

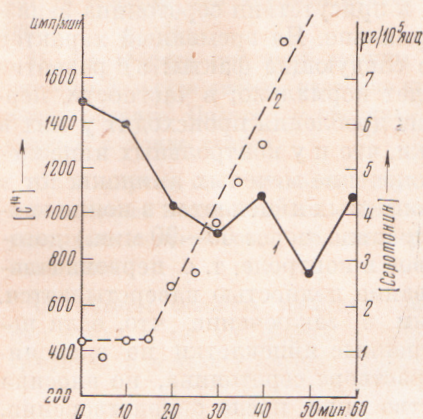


Рис. 1

после оплодотворения практически не изменялось, после чего начинало снижаться. Интенсивность включения меченых аминокислот оставалось на уровне, характерном для неоплодотворенных яйцеклеток, в течение первых 15 мин. после оплодотворения, а затем резко возрастала. Таким образом, вызванные оплодотворением изменения концентрации серотонина и изменения интенсивности биосинтеза белков становились заметными на 20 минуте после оплодотворения, т. е. совпадали во времени. В другой серии анализов на *S. dröbachiensis* спад концентрации серотонина начинался через 20 мин. после оплодотворения; соответственно больше был и лаг-период.

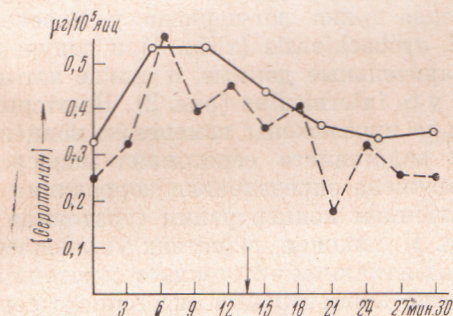


Рис. 2

Рис. 1. Изменения концентрации серотонина (1) и включения меченых аминокислот (гидролизата C^{14} -белка хлореллы) в ТХУ-нерастворимую фракцию яйцеклеток (2) у морского ежа *S. dröbachiensis* в первые 60 мин. после оплодотворения

Рис. 2. Изменения концентрации серотонина в двух партиях яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* в первые 30 мин. после оплодотворения. Стрелкой отмечено окончание лаг-периода

Рис. 3. Влияние серотонина (100 $\mu\text{г}/\text{мл}$) на включение меченых аминокислот (гидролизата C^{14} -белка хлореллы) в ТХУ-нерастворимую фракцию яйцеклеток *S. dröbachiensis* после оплодотворения. 1 — контроль (морская вода), 3000 яйцеклеток в каждой пробе; 2 — серотонин, 1800 яйцеклеток в каждой пробе

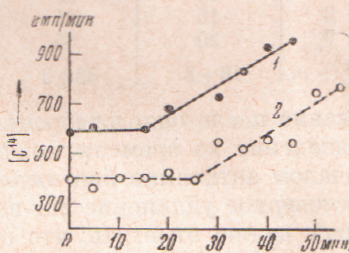


Рис. 3

Несколько иная картина наблюдается в опытах на тепловодном *S. intermedius* (рис. 2). Здесь концентрация серотонина в первые 3—5 мин. после оплодотворения несколько повышается. Однако затем она снова снижается, что приблизительно совпадает во времени с окончанием лаг-периода. Необходимо подчеркнуть, что здесь можно говорить только о приблизительном совпадении, поскольку в опытах на *S. intermedius*, в отличие от опытов на *S. dröbachiensis*, определение длины лаг-периода и взятие проб для анализа на серотонин проводили на разных партиях яйцеклеток.

Во второй группе опытов было проверено влияние экзогенного серотонина на длительность лаг-периода (т. е. на сроки активации биосинтеза белков после оплодотворения). Эту группу опытов проводили только на

S. dröbachiensis; результаты ее приведены в табл. 1. Средняя длительность лаг-периода при данных условиях инкубации яйцеклеток равна 18 мин.; экзогенный серотонин увеличивает ее до 33 мин. (примерно на 80%). Это удлинение лаг-периода статистически достоверно ($P < 0,01$). Результат одного из опытов второй группы представлен на рис. 3. Можно видеть, что здесь мы имеем дело именно с временным эффектом — обусловленная оплодотворением активация белкового синтеза в присутствии серотонина запаздывает, но, раз начавшись, протекает нормально. На временный характер наблюдаемой задержки указывают также следующие факты: а) развитие подоштных яйцеклеток в дальнейшем идет нормально; в частности, первое деление дробления происходит у них в

Таблица 1
Влияние серотонина (50—100 мкг/мл)
на продолжительность
лаг-периода у яйцеклеток
S. dröbachiensis

№№ п. п.	Лаг-период (в мин.)	
	норма	серотонин
1	15	30
2	20	30
3	10	35
4	25	40
5	15	45
6	15	30
7	25	35
8	15	25
9	20	35
$M \pm m$	18 ± 2	33 ± 2

те же сроки, что и у контрольных яйцеклеток; б) включение меченых аминокислот в белки подоштных яйцеклеток в конце концов (как правило, через 60—90 мин.) догоняет таковое в контроле, т. е. первоначальное отставание полностью наверстывается.

Отметим в заключение, что, если неоплодотворенные яйцеклетки не экспонировали в растворе серотонина, но вносили это вещество лишь после оплодотворения, лаг-период достоверно не возрастал.

Суммируя полученные результаты, можно сказать следующее. Во-первых, установлена длина лаг-периода у морского ежа *S. dröbachiensis* (табл. 1) и получены предварительные данные о длине лаг-периода у *S. intermedius* (рис. 2). Во-вторых, детально прослежены изменения концентрации эндогенного серотонина непосредственно после оплодотворения и обнаружена определенная корреляция — совпадение во времени между уменьшением концентрации серотонина и началом активации биосинтеза белков. И, наконец, в-третьих установлено достоверное удлинение лаг-периода под влиянием экзогенного серотонина. Здесь важно отметить, что эффективные концентрации экзогенного серотонина (50—100 мкг/мл) имеют тот же порядок, что и концентрация эндогенного серотонина до завершения лаг-периода (у *S. dröbachiensis* 32,5 мкг на 1 г сырого веса).

В свете приведенных данных можно предположить, что серотонин играет определенную роль в регуляции биосинтеза белков у оплодотворенных яйцеклеток морских ежей. Эта предполагаемая роль в данном случае, т. е. в первые минуты после оплодотворения, сводится к тому, что серотонин может быть одним из эндогенных факторов, задерживающих связанную с оплодотворением активацию биосинтеза белков. Физиологическое значение этой функции серотонина пока неясно — его можно было бы установить в ходе опытов с применением фармакологических препаратов, специфически влияющих на уровень эндогенного серотонина.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
31 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. R. Gross, J. Exp. Zool., 157, 1, 21 (1964). ² T. Hultin, Develop. Biol., 10, 2, 305 (1964). ³ D. Epel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 4, 899 (1967). ⁴ F. R. MacKintosh, E. Bell. Science, 164, 3882, 961 (1969). ⁵ Г. А. Бузников, И. В. Чудакова, ДАН, 152, № 4, 1014 (1963). ⁶ Г. А. Бузников, Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития, «Наука», 1967. ⁷ Г. А. Бузников, Н. Д. Звездина, Р. Г. Макеева, ДАН, 166, № 5, 1252 (1966). ⁸ Б. Н. Манухин, З. Е. Пустовойтова, Лаб. дело, № 2, 102 (1969). ⁹ S. H. Snyder, J. Axelrod, M. Z. Weig, Biochem. Pharmacol., 14, 7, 831 (1965).