

В. Н. ЖОЛКЕВИЧ, А. А. ГУРВИЧ, Т. А. БОРИСОВА,
Т. Н. ЛИВАНОВА, Л. С. ШЛЯХТИНА

ОБ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ РАЗРЯДКЕ, ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ ДЕЛЕНИЮ КЛЕТОК *TORULA UTILIS*

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 28 VI 1972)

Исходными предпосылками к данной работе были следующие. Во-первых, в опытах с синхронизированной культурой дрожжей *Torula utilis* обнаружена предшествующая делению клеток вспышка излучения (¹⁻³). При разборе возможной природы указанного явления было высказано предположение (³), согласно которому вспышка излучения рассматривается как проявление кратковременной разрядки собственного интерфейса высокого энергетического потенциала; такая разрядка связана, видимо, с частичным нарушением неравновесной структурной упорядоченности протоплазмы, причем подобное нарушение представляет собой необходимое составное звено той глубокой перестройки внутриклеточной структуры, которая предшествует делению.

Во-вторых, у синхронизированной культуры изолированной ткани женьшеня (*Panax ginseng* С. А. Мей) непосредственно перед митозом обнаружена вспышка теплопродукции, причем количество выделяемой теплоты Q превышает количество энергии E , освобождаемой в процессе одновременного дыхания, т. е. внутриклеточный энергетический баланс становится отрицательным (⁴). Отрицательный энергетический баланс (когда $Q > E$) означает, что дыхание уже не компенсирует энергетические потери клетки (суммарно выражаемые теплоотдачей), и поэтому уровень энергетического обмена снижается (⁵). В свете этих данных предположение о предшествующей делению энергетической разрядке представляется весьма правдоподобным.

Для того чтобы получить еще более веские аргументы в пользу упомянутого предположения, мы решили составить энергетический баланс по данным теплоотдачи и дыхательного газообмена (т. е. определить соотношение величин Q и E) у дрожжей *Torula utilis*, у которых непосредственно перед делением и была обнаружена вспышка излучения. Останавливая свой выбор именно на этом объекте, мы учитывали, что синхронизация делений у дрожжей может достигать 40–70%, тогда как в опытах с синхронизированной культурой изолированной ткани *Panax ginseng* максимальная величина митотического индекса составляла в среднем всего 3–4%. Следовательно, если делению действительно предшествует некомпенсированная окислением вспышка теплопродукции, то у дрожжей она должна быть выражена особенно отчетливо.

Определения тепловыделения, газообмена и почкования велись на параллельных пробах. Дыхательный газообмен измеряли манометрически (по Варбургу), теплоотдачу — в микрокалориметре Кальве производства французской фирмы «Setaram», при 27°. Колбу с материалом, предназначенным для подсчета почек, помещали в ультратермостат при 27°. Подсчитывая коэффициент делений, учитывали почки, по величине приблизительно равные $1/20$ части материнской клетки.

Так как при работе с суспензией необходимо перемешивание, в калориметрическую камеру (в качестве которой служила стеклянная пробирка

длиной 68 см и наружным диаметром 3,3 см) была вмонтирована мепалка, приводившаяся в движение электрическим моторчиком МН-250. Содержимое колбы с материалом для подсчета числа клеток перемешивали каждые 5 мин.

Дрожжи культивировали на среде Ридера. Так же, как в работе (2), с целью синхронизации делений из питательной среды временно исключались азотистые соли и сахара, что приводило к задержке почкований. После же добавления в «голодную» среду этих компонентов возникала волна делений.

Работа велась следующим образом. Четырехдневную культуру, выросшую на полной питательной среде, отфильтровывали на воронке Бюхнера с помощью водоструйного насоса. Полученную плотную массу вместе с фильтром переносили в условия влажной камеры в чашку Петри, откуда брали навески на торсионных весах для последующего определения теплоотдачи, газообмена и числа делений. Навески помещали непосредственно в сосудики Варбурга, калориметрическую камеру, а для подсчета числа почек — в эрленмейеровскую колбу, где их сразу же суспендировали в определенном объеме «голодной» среды (отношение веса сырой дрожжевой массы в миллиграммах к объему среды в миллилитрах составляло 6:1), после чего начинали измерения теплоотдачи и газообмена. В сосудиках Варбурга количество «голодной» среды составляло 1,8 мл, в калориметрической камере и в колбе для подсчета почек — по 6 мл. Применявшиеся нами сосудики имели по две боковых реторты: у сосудиков, предназначенных для определения потребления O_2 , в одну из реторт наливали 0,8 мл 80% КОН (столь концентрированная щелочь была необходима в связи с тем, что менее крепкие растворы не обеспечивали полного поглощения CO_2); у сосудиков, предназначенных для определения дыхательного коэффициента, в аналогичную реторту наливали такое же количество воды. В другую реторту наливали 1,2 мл раствора, содержащего отсутствовавшие в «голодной» среде азотистые соли и сахарозу («сытая» среда). В калориметрической камере «сытой» средой заполняли определенным образом закрепленную пипетку, соединенную посредством каучуковой трубки с резиновой грушей; груша находилась вне калориметра и погружалась в водяную баню при 27°.

В «голодной» среде дрожжи выдерживали 1,5 часа, на протяжении которых проводили необходимые измерения. По истечении этого срока добавляли «сытую» среду, всегда соблюдая соотношение объемов «голодной» и «сытой» сред, равное 3:2 (в сосудиках Варбурга по 1,2 мл, в калориметрической камере и в колбе для подсчета почек — по 4 мл). После смешивания обеих сред восстанавливалось полное количество питательных компонентов среды Ридера. В сосудиках добавление «сытой» среды осуществлялось путем переворачивания боковой реторты, в калориметрической камере — нажимом на грушу.

После добавления «сытой» среды отсчет показаний манометров делали каждые 15 мин. Материал для подсчета числа почек фиксировали каждые 10 мин. на протяжении первого часа, каждые 15 мин. на протяжении второго часа и каждые 30 мин. на протяжении третьего часа. Для фиксации применяли 10% серную кислоту, которую в пробирке смешивали с равным (0,5 мл) объемом суспензии клеток. Показания микрокалориметра записывались на самописце, поэтому теплоотдачу можно было рассчитать в любой момент.

Всего проведено свыше 20 опытов, и все они дали примерно однозначный ответ. Через 20—30 мин. после добавления «сытой» среды возникала волна делений. Максимум почкований отмечался обычно через 50—60 мин., а приблизительно через 1,5 часа прирост абсолютного количества клеток составлял 50—60%. Если в конце периода голодания и в начальный (латентный) период пребывания на полной питательной среде насчитывалось в среднем 17 почек на 1000 клеток, то через 50—60 мин. их количество

возрастало до 70—110. Принимая во внимание, что время существования подсчитываемых маленьких почек составляет приблизительно 3 мин., и учитывая количество делящихся клеток, можно полагать, что коэффициент делений в наших опытах достигал 50—70%.

Рассмотрим теперь, как изменялись газообмен и теплоотдача после добавления «сытой» среды, когда проходили подготовка к делению, а затем и само деление. Данные одного из типичных опытов представлены на рис. 1.

Почти сразу же после добавления «сытой» среды начиналась бурная вспышка тепловыделения, достигавшая своего максимума примерно через 5 мин., после чего теплоотдача быстро уменьшалась (рис. 1). Из хода кривых отчетливо видно, что эта вспышка безусловно опережает волну делений. Максимум почкований приходится уже на момент, когда теплоотдача непрерывно и значительно снижается. Когда волна делений затухает, теплоотдача становится относительно постоянной. Из всего этого можно сделать вывод, что вспышка теплопродукции обусловлена переходом клеток к делению, но она связана не с самим актом деления, а с подготовкой к нему. Попутно заметим, что связь между ростом и теплопродукцией (измерявшейся в микрокалориметре Гальве) наблюдалась и у дрожжевой культуры *Saccharomyces* (6), но авторы не сопоставляли кинетику делений и теплоотдачи.

На «голодной» среде дрожжи дышали довольно интенсивно, причем дыхательный коэффициент был близок к единице. После добавления «сытой» среды дыхательный коэффициент сначала медленно, а затем быстро возрастал (что свидетельствовало о частичном переходе с кислородного дыхания на брожение), достигал максимума примерно через 1,5 часа, а затем снова начинал уменьшаться. Потребление кислорода после добавления «сытой» среды вначале довольно сильно возрастало, однако спустя 40—60 мин., когда выделение CO_2 резко увеличивалось, оно так же сильно снижалось. Когда же продукция CO_2 ослабевала, потребление кислорода снова повышалось.

При сопоставлении кинетических кривых тепловыделения и газообмена нетрудно заметить, что хотя во время вспышки теплопродукции потребление кислорода и начинает возрастать, однако оно достигает своего максимума лишь тогда, когда теплоотдача уже спадает. При этом потребление кислорода возрастает по сравнению с таковым на «голодной» среде не более, чем в 2,5 раза, теплоотдача же возрастает в 5—15 раз. Поэтому если составить энергетический баланс, выразив Q в процентах от E , то полученная величина в максимуме достигнет 1800%. Следовательно, энергетический баланс становится резко отрицательным, что согласуется с данными, ранее полученными при работе с культурой ткани *Panax ginseng* (4). Однако, как мы и ожидали, у дрожжей, благодаря значительно большей синхронизации делений, предшествующие делению изменения выражены гораздо сильнее (у *Panax ginseng* величина Q не превышала 140% от E).

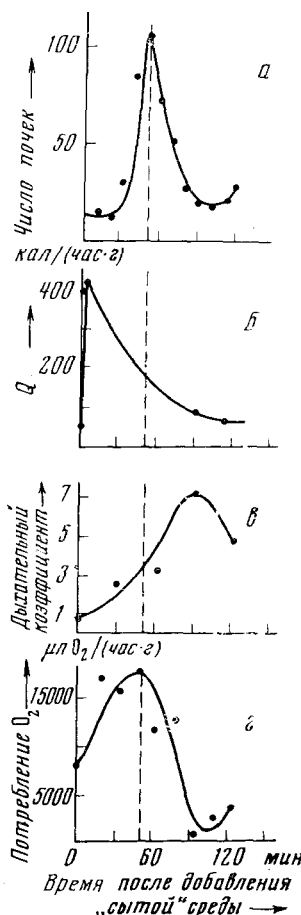


Рис. 1. Почкование, теплоотдача и газообмен у синхронизированной культуры *Torula utilis*. а — кривая почкования (число маленьких почек по 1000 клеток), б — теплоотдача, в — дыхательный коэффициент, г — потребление кислорода

Полученные данные, таким образом, подтверждают справедливость предположения об энергетической разрядке, непосредственно предшествующей делению клеток.

Естественно возникает вопрос об источниках, генерирующих столь большие количества теплоты. Исчерпывающе ответить на этот вопрос не легко: выделяемая живыми клетками теплота имеет сложное происхождение, поскольку в биологических объектах существует несколько весьма различных источников теплообразования⁽⁵⁾. Однако мы можем попытаться хотя бы ориентировочно назвать именно тот (или те) источник, который в данном случае следует прежде всего принимать во внимание. Основными источниками теплопродукции живых клеток являются: 1) окислительные процессы (часть освободившейся при них энергии, не аккумулированная в клетке, неизбежно превращается в теплоту); 2) процессы гидратации; 3) процессы рекомбинации свободных радикалов; 4) ферментативные гидролизы; 5) процессы распада сложных неравновесных структурных компонентов протоплазмы. Первый из названных источников сразу же отпадает, так как в виде теплоты теряется в несколько раз большее количество энергии, чем ее может освободиться в ходе одновременно идущего окисления. Разумеется, какой-то вклад в премитотическую вспышку теплопродукции окислительные реакции вносят (ибо в момент разрядки окисление и фосфорилирование, по-видимому, разобщаются), но этот вклад имеет все же подчиненное значение. Сразу отпадает также и второй источник. Остаются три последние из названных источников. Выяснением их роли мы и занимаемся в настоящее время.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР

Поступило
21 VI 1972

Институт нормальной и патологической физиологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Конев, Т. И. Лыскова, Г. Д. Нисенбаум, *Биофизика*, **11**, 361 (1966). ² А. А. Гурвич, В. Ф. Еремеев, Ю. А. Карабчиевский, *ДАН*, **178**, № 6, 1432 (1968). ³ А. А. Гурвич, *Проблема митогенетического излучения как аспект молекулярной биологии*, Л., 1968. ⁴ В. Н. Жолкевич, Р. Г. Бутенко, Н. Ф. Писецкая *Физиол. раст.*, **18**, 767 (1971). ⁵ В. Н. Жолкевич, *Энергетика дыхания высших растений в условиях водного дефицита*, «Наука», 1968. ⁶ I. Lamprecht, C. Meggers, *First European Biophysics Congress*, 14—17 September, 1971, Baden near Vienna, Austria, 1971, p. 335.