

Л. В. РЯБОВА, О. П. МЕЛЕХОВА, В. В. ПОПОВ

**СУТОЧНЫЕ РИТМЫ ИНТЕНСИВНОСТИ
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭНТОДЕРМЕ
ЗАРОДЫШЕЙ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 10 XII 1973)

В литературе накопилось много данных о различного рода физиологических, биохимических и других суточных ритмах в живом организме. Почти все они получены на взрослых животных, и лишь немногие работы посвящены изучению становления ритмов в онтогенезе (1-3). Известно, что свободные радикалы (с.р.) представляют собой высокоактивные промежуточные продукты в ступенчатых процессах биологического окисления, и колебания их концентрации в тканях животных могут служить показателем колебаний общей активности окислительного метаболизма, так как установлена корреляция между уровнем окислительного метаболизма в тканях и содержанием в них с.р. (4, 5). Методом э.п.р. выявлены суточные колебания с.р. в печени и селезенке взрослых мышей (6), также методом привитой сополимеризации установлено наличие суточных колебаний интенсивности с.р. реакций в тканях личинки травяной лягушки периода претаморфоза (7).

В данном исследовании мы ставили целью изучение становления суточного ритма с.р. процессов в течение шести первых суток развития у зародышей *Rana temporaria* методом привитой сополимеризации.

Опыт ставили в феврале при постоянной температуре 17° в условиях естественной смены дня и ночи на зародышах, полученных от типифицированных травяных лягушек. Фиксацию материала производили через каждые 3 часа в течение первых 6 суток развития, начиная с момента оплодотворения. Концентрацию и распределение с.р. в зародышах травяной лягушки оценивали с помощью метода привитой сополимеризации (8) акриламида, меченного по C¹⁴. Относительное количество меченых сополимеров в объекте определяли в течение первых суток развития радиометрически (сцинтилляционный счетчик системы АВАС), а в течение 2-6 суток — методом гисторадиоавтографии. Для введения меченого акриламида зародышей перед фиксацией на 3 часа помещали в 0,03% водный раствор акриламида (в выбранной концентрации акриламид не токсичен) с активностью 3 мкС/мл. Таким образом, при каждой фиксации получали суммарное количество меченых сополимеров за 3 часа. Для выявления следов β-частиц была использована светочувствительная эмульсия типа «М» — экспозиция длилась 60 дней. Подсчет следов β-частиц (треков) производили на сакитальных и поперечных срезах, окрашенных гематоксилином по Эрлиху, при увеличении 900×, с помощью окуляр-микрометрической сетки на площади 100 м² в центральной части желточной энтодермы во время гастрюляции и нейруляции и в районе вентральной стенки средней кишки на последующих этапах развития. Всего изучено 200 зародышей. Результаты статистически обработаны по методу Стрелкова (9) и приведены в табл. 1. Достоверность различий определяли при P=0,05.

Результаты и обсуждение. Изменения концентрации с.р. постоянны у зародышей травяной лягушки периода раннего развития носят ярко выраженный колебательный характер, причем колебания интенсивности с.р. реакций ритмичны (рис. 1). Следует указать на зависимость

полученной кривой от метода регистрации: каждая точка представляет собой суммарное количество с.р., возникающих за 3 часа инкубации зародыша в растворе меченого мономера, так что данным методом при непрерывной регистрации количества с.р. нельзя выявить колебания с периодом меньше, чем 6 час. Имея свои закономерности, кривая изменения интенсивности с.р. процессов, однако, строго не повторяется от суток к суткам. Особенно выделяются первые сутки развития, соответствующие дроблению зародыша. По предварительным данным, полученным методом гисторадиоавтографии, было установлено, что суточные коле-

Таблица 1
Концентрация и распределение с.р. в зародышах травяной лягушки

| Целый зародыш, имп/мин | Энтодерма зародыша, треки на 100 μ^2 | | | | | | | время фиксации, час. |
|------------------------|--|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|----------------------|
| | 1-е сутки | 2-е сутки | 3-е сутки | 4-е сутки | 5-е сутки | 6-е сутки | 7-е сутки | |
| 1300 ± 73,87 | 0,8 ± 0,03 | 10,05 ± 0,67 | 48,0 ± 2,69 | 0,7 ± 0,05 | 4,4 ± 0,17 | 17,2 ± 0,46 | 2 | |
| 1278 ± 79,49 | 2,7 ± 0,39 | 23,6 ± 1,30 | 32,4 ± 0,75 | 1,9 ± 0,30 | 32,3 ± 0,97 | — | 5 | |
| 2700 ± 76,96 | 1,0 ± 0,11 | 35,0 ± 1,46 | 10,3 ± 0,79 | 0,6 ± 0,02 | 24,0 ± 0,46 | — | 8 | |
| 1737 ± 113,47 | 5,5 ± 0,38 | — | — | 2,5 ± 0,03 | 41,3 ± 0,98 | — | 11 | |
| 3284 ± 170,22 | 11,8 ± 0,45 | 52,2 ± 1,54 | 24,4 ± 0,78 | 9,7 ± 1,12 | 73,6 ± 2,56 | — | 14 | |
| 2868 ± 227,52 | 9,1 ± 0,37 | 34,5 ± 1,97 | 14,8 ± 0,64 | — | 47,4 ± 1,40 | — | 17 | |
| — | — | — | — | 10,8 ± 1,12 | — | — | 19 | |
| 1881 ± 227,52 | 24,0 ± 0,53 | 61,9 ± 1,15 | 15,3 ± 0,55 | 10,7 ± 0,80 | 76,1 ± 1,97 | — | 20 | |
| 1213 ± 125,0 | — | 19,7 ± 1,96 | 4,4 ± 2,6 | 12,3 ± 0,88 | 11,5 ± 0,97 | — | 23 | |

бания концентрации с.р. состояний во всех частях зародыша в период дробления синхронны. Поэтому для более полной оценки характера с.р. процессов в ходе дробления количество с.р. реакций регистрировали в целом зародыше радиометрически.

Итак, во время дробления зародыша кривая изменения уровня с.р. процессов имеет два достоверных максимума в 8 и 14 час. и достоверные минимумы в 2 и 23 часа. Период между 14 и 23 час. характеризуется постепенным спадом уровня интенсивности с.р. реакций с недостоверными различиями в промежуточных точках. Начиная со вторых суток развития и далее колебания количества с.р. состояний в энтодерме зародышей *Rana temporaria* являются более единообразными, причем кривая включения метки C^{14} имеет полифазный характер, обнаруживая достоверные максимумы в 5, 14, 20 час., а минимумы в 8, 17, 23 часа.

Однако суточный ритм включения метки C^{14} лабилен на протяжении всего исследования, что выражается в следующем: 1) не всегда выявляются точки экстремумов, являющиеся характерными для данного ритма; 2) неодинаков среднесуточный уровень колебаний интенсивности с.р. состояний в различные периоды развития зародышей: так, в частности, на фоне 4-х и 6-х суток 5-е сутки выделяются очень низким уровнем включения меченого сополимера; 3) относительная высота пиков интенсивности с.р. реакций также оказывается неодинаковой от суток к суткам; 4) при сравнении наших данных с данными о суточных ритмах с.р. процессов у личинок травяной лягушки периода претаморфоза (7) обнаруживается, что ритм с.р. реакций в обоих случаях носит полифазный характер, причем основные максимумы приходятся на вечерние часы, но положение точек экстремумов значительно различается.

Высокая лабильность свойственна и другим суточным ритмам амфибий. Так, кривая митотической активности в хрусталиковом эпителии взрослых *Rana temporaria* на протяжении 5 суток эксперимента при оптимальных условиях в природе варьирует в довольно широких пределах, и картина изменения митотической активности от суток к суткам строго

не повторяется, хотя и отмечаются точки постоянных экстремумов (¹⁰). Также варьирует от суток к суткам и дыхательная ритмика у лягушки (¹¹). Индивидуально изменчивым является ритм локомоторной активности *Rana temporaria* (¹²).

Таким образом, значительные различия в картине суточного изменения интенсивности с.р. реакций на протяжении нашего исследования можно отнести не столько за счет становления ритма, сколько за счет его высокой лабильности. Несмотря на вариации среднего уровня кривой

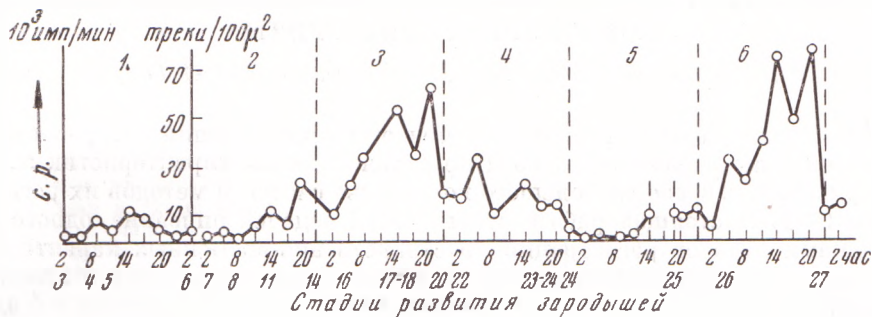


Рис. 1. Суточные ритмы с.р. процессов в энтодерме зародыша травяной лягушки. Стадии развития определены по таблицам Камбара и Марро. 1-6 — сутки

суточных колебаний количества с.р. и некоторые изменения положения ее экстремумов в течение первых шести суток развития травяной лягушки, обращает на себя внимание постоянство повышения уровня с.р. процессов в вечерне-ночные часы. Известно, что взрослые травяные лягушки — насекомоядные животные, ведущие ночной образ жизни (¹³, ¹⁴). Их свободноплавающие личинки питаются растительными остатками и активны по преимуществу в дневные часы. Поскольку функциональная активность организма энергетически обеспечивается процессами окислительного метаболизма, можно ожидать в часы общей активности организма большей активности биоокисления и более высокого уровня с.р. реакций. Наш опыт показывает, что интенсивность с.р. процессов у зародышей *Rana temporaria* с самого начала развития оказывается выше, в вечерне-ночные часы, чем в утренне-дневные. Возможно, что эту особенность ритма с.р. процессов можно рассматривать как адаптивно-обусловленную и наследуемую.

Итак, выявлен суточный ритм интенсивности с.р. реакций у зародышей *Rana temporaria* первых 6 суток развития. Ритм имеет полифазный характер с максимумами в 5, 14, 20 час. и минимумами в 8, 17, 23 часа. Основные максимумы приходятся на вечерне-ночные часы. По своим характерным особенностям ритм с.р. процессов у зародышей травяной лягушки сходен с таковым у личинок периода претаморфоза.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
23 XI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Красильникова, Кандидатская диссертация, М., 1963. ² Р. И. Богатова (Никанорова). Кандидатская диссертация, М., 1968. ³ А. А. Азарашвили, З. А. Соколова и др., Научн. докл. высш. школы, биол. науки, т. 1, 21 (1970). ⁴ В. Сомптер, J. Townsend, G. Rake, Nature, v. 174, 689 (1954). ⁵ Л. А. Блюменфельд, А. Э. Калмансон, Биофизика, т. 2, 552 (1957). ⁶ В. М. Коваленко, О. А. Чибрикин, Н. М. Эмануэль, Радиобиология, т. 10, 3, 355 (1970). ⁷ О. П. Мелехова, Г. П. Родина и др., Журн. общ. биол., т. 33, 2, 223 (1972). ⁸ Ю. П. Козлов, Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах, Изд. МГУ, 1970. ⁹ Р. Б. Стрелков, Метод вычисления стандартной ошибки и доверительных интервалов средних арифметических величин с помощью таблицы, Сухуми, 1966. ¹⁰ Е. В. Кузнецов, Ю. Д. Чугунов, В. Я. Бродский, Экология, т. 1, 16 (1972). ¹¹ С. Каузер, C. R. Soc. Biol., v. 144, 1697 (1950). ¹² Ю. Д. Чугунов, Зоол. журн., т. 45, 11, 1962 (1966). ¹³ Г. Залезский, Сборн. работ научн. студ. кружков МГУ, т. 2, 3 (1938). ¹⁴ П. В. Терентьев, Лягушка, М., 1950.