

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

СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 21 V 1974)

Многие биохимические реакции в животных и растительных организмах протекают при участии валентноненасыщенных осколков молекул — свободных радикалов (с.р.). Роль радикалов как высокоактивных промежуточных продуктов особенно велика в ступенчатых процессах биологического окисления. Была установлена прямая корреляция между уровнем окислительного метаболизма в различных тканях и содержанием в них с.р. (1, 2). Кроме того, имеются данные о периодическом характере ферментативных окислительно-восстановительных процессов (3-5), а также методом э.п.р. установлено наличие суточных колебаний интенсивности с.р. процессов в печени мышей (6, 7) и в различных тканях личинок *Rana temporaria* периода премегаморфоза (8).

Представлялось интересным выявить характер суточных колебаний интенсивности с.р. реакций в различных областях зародыша *Rana temporaria*, начиная с ранних стадий развития.

Объектом исследования служили зародыши травяной лягушки, полученные с помощью гипофизарных инъекций в феврале и содержавшиеся при постоянной температуре 17° в условиях обычной смены дня и ночи.

Фиксацию материала производили в течение 5 суток, начиная с момента гаструляции, через каждые 3 часа.

Для регистрации количества с.р. применяли метод привитой сополимеризации (9) в сочетании с методом гистоавторадиографии, что позволяло выявить региональные различия распределения с.р. в зародыше. В качестве мономера использовали акриламид, меченный по ¹⁴C. Для введения меченого мономера зародышей перед фиксацией в течение 3 час.

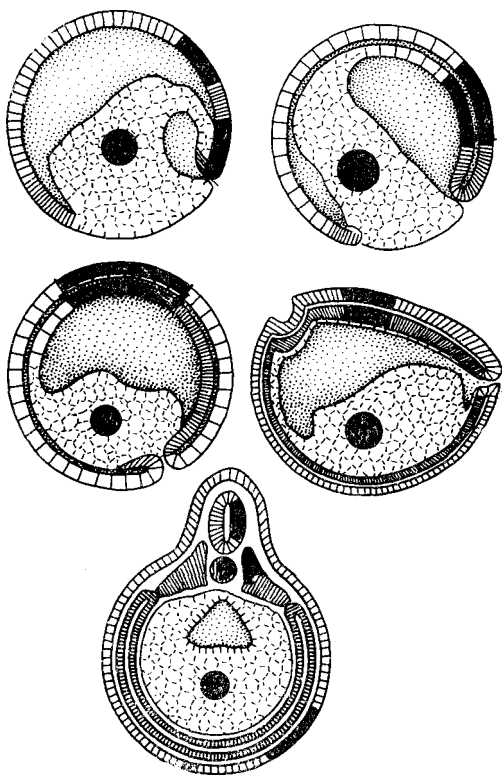


Рис. 1. Области подсчета треков на разных стадиях развития зародыша (обозначены затемненными участками)

инкубировали в водном растворе акриламида с активностью 3 мкС/мл. В такой концентрации акриламид нетоксичен и быстро проникает в ткани зародыща. После обычной гистологической обработки серийные срезы толщиной в 7 мкм были покрыты светочувствительной эмульсией типа «М» и после экспозиции в течение 60 дней проявлены и окрашены гематоксилином по Эрлиху. Подсчет следов β -частиц (треков) на препаратах проводили на площади 400 мкм².

Для исследования характера колебания с.р. были выбраны следующие закладки зародыша: презумптивные хордомезодерма и нервная пластинка, центральная часть энтодермы в период гастрюляции, хорда, нервная трубка, сомиты, туловищная эктодерма, центральные отделы

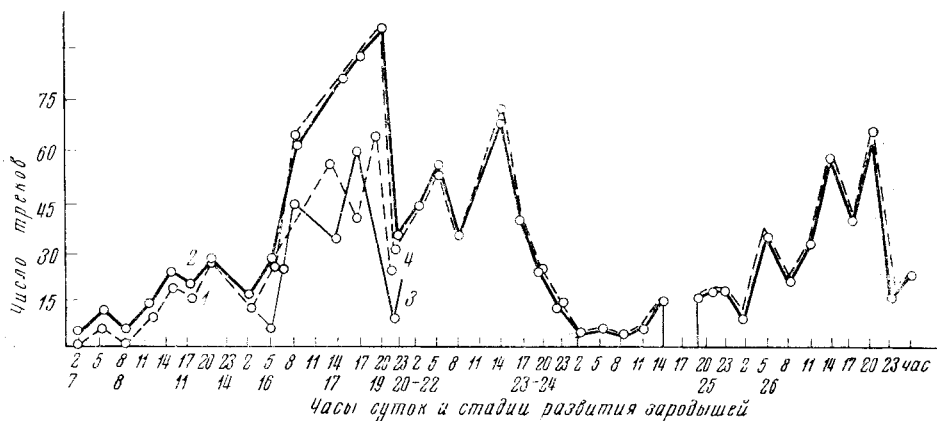


Рис. 2. Число треков на разных стадиях развития зародышей, определенных по таблицам Камбара и Марро. 1 — изменение интенсивности с.р. процессов в хордомезодерме, 2 — в развивающейся нервной системе, 3 — в туловищной эктодерме, 4 — в энтодерме

вентральной стенки кишки в период нейруляции и на последующих этапах развития. Последние определялись по таблицам Камбара и Марро. На рис. 1 обозначены участки подсчета треков в перечисленных выше закладках. Результаты подсчетов статистически обработаны по методу Стрелкова⁽¹⁰⁾. Достоверность различий определяли при $P=0,05$. Всего исследовано 250 зародышей.

Полученные кривые включения меченого мономера в различных областях зародыша показывают наличие достоверных суточных колебаний уровня с.р. на протяжении всего исследования. На рис. 2 представлены данные по включению метки в хордомезодерму (на более поздних стадиях в сомиты) и нервную пластинку (нервную трубку) и частично (3-и сутки развития) в экто- и энтодерму. Этих данных достаточно для того, чтобы дать представление о характере колебаний с.р. процессов во всех изученных закладках, поскольку, как правило, обнаруживается высокая степень синхронности колебаний с.р. в различных морфологических образованиях зародыша.

Так как нас интересовал суточный характер колебаний с.р. в зародыше, следует отметить, что при данной температуре (17°) и при выбранной точке отсчета (ранняя гастрюла приходится на 2 часа ночи и соответствует вторым суткам развития зародыша) колебания уровня с.р. обнаруживают максимумы в 5, 14, 20 час. и минимумы в 2, 8, 17, 23 часа. Таким образом, выявленный суточный ритм с.р. процессов во всех частях зародыша носит полифазный характер. Важно отметить, что такую характеристику ритм имеет уже в процессе гастрюляции (2-е сутки развития).

Во время нейруляции (3-и сутки развития) ритм с.р. процессов су-

щественно изменяется, особенно резко нарушаясь в закладках, участвующих в индукционном процессе. Так, в хордомезодерме и контактирующей с ней нервной пластинке ритм утрачивает полифазный характер, приобретая монофазный с максимумом в 20 час., причем различия в интенсивности с.р. реакций в 14, 17 и 20 час. являются недостоверными. В энтодерме при этом отсутствует минимум в 8 час., но сохраняются характерные для данного ритма максимумы в 14 и 20 час. В эктодерме ритм включения меченого мономера носит в основном инверсный характер по отношению к ритму с.р. процессов в энтодерме. Таким образом, ритм, существенно нарушаясь в целом, остается строго координированным в пределах индукционной системы хордомезодерма — нервная пластинка, где изменения в уровне с.р. идут строго параллельно.

Непосредственно после нейруляции (4-е сутки) ритм колебаний уровня с.р. во всех закладках становится синхронным, обнаруживая характерные максимумы в 5 и 14 час. В последующие сутки характер ритма существенно не меняется, добавляется лишь максимум в 20 час.

Оценивая интенсивность с.р. реакций в различных закладках, важно отметить следующее: на протяжении 15 час., начиная от стадии ранней гастрюлы (2 часа ночи, вторые сутки), уровень с.р. достоверно выше в хордомезодерме по сравнению с презумптивной нервной пластинкой; высоким уровнем с.р. выделяется энтодерма, начиная со стадии средней гастрюлы. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что уровень с.р. процессов в период нейруляции (3-е сутки развития) значительно выше в хордомезодерме и контактирующей с ней нервной пластинке, чем в экто- и энтодерме. При этом различия в интенсивности включения метки в хордомезодерму и нервную пластинку в данный период недостоверны. На более поздних стадиях развития появляются региональные различия в уровне с.р. в пределах того или иного развивающегося органа.

В настоящей работе оценка интенсивности с.р. процессов производилась по усредненным показателям в довольно обширных областях исследуемых закладок. При такой оценке разность в амплитудах колебаний уровня с.р. в различных областях зародыша, как правило, незначительна, но к концу 6-х суток существенно повышается интенсивность с.р. реакций в энтодерме.

Таким образом, процесс развития, с одной стороны, детерминирован, с другой — лабилен. Выявить его составляющие очень трудно. В нашей работе показано наличие суточных колебаний интенсивности с.р. процессов в различных группах клеток зародышей *Rana temporaria*. С одной стороны, существование подъемов и спадов в уровне с.р. должно быть связано с прохождением зародышем тех или иных стадий развития. С другой стороны, поскольку у личинок *Rana temporaria* установлено наличие суточного ритма с.р. процессов, зафиксированные максимумы и минимумы в уровне с.р. могут быть связаны непосредственно с процессом становления суточного ритма с.р., носящего циркадный характер. С этой точки зрения интересной представляется определенная повторяемость времени существования подъемов и спадов в уровне с.р. от суток к суткам.

При сравнении полученных нами данных по суточной ритмике с.р. процессов в различных закладках зародышей *Rana temporaria* и данных по суточным колебаниям уровня с.р. в различных тканях личинок того же вида периода претаморфоза⁽⁸⁾ обнаруживается следующее. Общий вид суточного ритма с.р. как в том, так и в другом случае сходен; у зародышей, как и у личинок травяной лягушки, отмечается в течение суток 3 основных максимума и 4—5 минимумов, хотя по фазе эти ритмы смещены относительно друг друга. В утренне-дневные часы в не связанных функционально тканях личинок *Rana temporaria* наблюдается десинхронизация колебаний с.р., тогда как в вечерне-ночные часы, наоборот, отмечается высокая степень корреляции колебаний во всех тка-

нях. У зародышей же колебания с.р., как правило, синхронны во всех группах клеток. Исключение представляет период нейруляции (3-и сутки развития), когда синхронно изменяется уровень с.р. только в пределах индукционной системы хордомезодермы — нервная пластинка.

Итак, при оценке синхронности колебаний в различных участках зародыша важно, по всей вероятности, учитывать не только связи между отдельными закладками (функциональные, индукционные), но и возраст, стадию развития зародышей. Оценивая амплитуду колебаний уровня с.р. в различных морфогенетических образованиях зародышей мы ограничимся лишь критерием самой общей связи с.р. процессов с физиологическим состоянием клеток. Так, наличие градиента в уровне с.р. между индуктором (хордомезодермой) и реагирующей тканью (презумптивной нервной пластинкой) в начале их индукционного взаимодействия может быть связано с особым физиологическим состоянием клеток хордомезодермы, необходимым для индуцирующего воздействия. На стадии поздней гастрюлы интенсивность с.р. процессов в хордомезодерме и контактирующей с ней презумптивной нервной пластинке одинакова. До конца исследования клетки индуктора и реагирующей ткани по своему физиологическому состоянию, оцениваемому по уровню с.р., остаются в динамическом равновесии, главной характеристикой которого является приблизительно одинаковое суммарное количество с.р., возникших в клетках за 3 часа инкубации зародыша в растворе меченого мономера, т. е. неравновесное физиологическое состояние клеток индуктора и детектора в индукционной системе имеет место только в начале индукционного процесса. Последнее нам представляется важным, поскольку говорит о временном характере процесса индукции.

Исключительно высокий уровень с.р. в хордомезодерме и контактирующей с ней нервной пластинке в период нейруляции (3-и сутки развития), по сравнению с уровнем с.р. в энтодерме, говорит о наличии различного рода метаболических градиентов в дорсовентральном направлении зародыша на этой стадии (11). Значительный подъем интенсивности с.р. реакций в энтодерме в период 6-х суток развития, что соответствует 26-й стадии развития по таблицам Камбара и Марро, может быть связан с процессом окисления липидов в энтодерме, клетки которой заполнены желтком. По литературным данным (12), процесс окисления липидов в онтогенезе амфибий начинается ко времени вылупления зародыша, т. е. к 26-й стадии для *Rana temporaria*.

Таким образом, во всех исследованных закладках зародышей *Rana temporaria* выявлены достоверные колебания уровня с.р. процессов. Как правило, во всех областях зародыша колебания с.р. синхронны. Исключение представляет период нейруляции, когда синхронность сохраняется только в пределах индукционно связанных образований.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
8 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ *B. Commoner, J. Townsend, G. E. Pake, Nature, v. 174, 689 (1954).* ² *Л. А. Блюменфельд, А. Е. Калмансон, Биофизика, т. 2, 552 (1957).* ³ *B. Chance, V. Schoener, S. J. Elsaesser, Biol. Chem., v. 240, 3170 (1965).* ⁴ *J. Iataseky, K. Jokota, R. Nakajima, Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 21, 582 (1965).* ⁵ *К. Руче, В. Чанс, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 55, 888 (1966).* ⁶ *О. А. Коваленко, Т. В. Анфалова, В. М. Чибрикин, Биофизика, т. 16, 837 (1971).* ⁷ *О. А. Коваленко, В. М. Чибрикин, Н. М. Эмануэль, Радиобиология, т. 10, 355 (1970).* ⁸ *О. П. Мелехова, Г. П. Родина и др. Журн. общ. биол., т. 33, 223 (1972).* ⁹ *Ю. П. Козлов, Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах, М., 1970.* ¹⁰ *Р. Б. Стрелков, Метод вычисления стандартной ошибки и доверительных интервалов средних арифметических величин с помощью таблицы. Сухуми, 1966.* ¹¹ *Л. Саксен, С. Тойвонен, Первичная эмбриональная индукция, М., 1963.* ¹² *Ч. Бодмер, Современная эмбриология, М., 1971.*