

Г. Г. БАТИКЯН, Е. Г. СИМОНЯН, Д. С. БАЛАСАНЯН

ДЕЙСТВИЕ АКТИНОМИЦИНА D НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ КОРЕШКОВ ЛУКА

Изучение кинетики ингибирования митозов, происходящих в клетках корешков лука под влиянием актиномицина, показало, что при малых дозах воздействия указанный антибиотик полностью не подавляет деление клеток, вместе с тем индуцирует хромосомные аномалии и метафазы, напоминающие к-метафазы. Оптимальные концентрации его оказывают заметное воздействие на клетки и вызывают значительный спад митотического индекса. Дозы 100 γ /мл, 250 γ /мл и 500 γ /мл являются летальными (через 24 и 48 час. митозы сводятся к нулю) и процессы, протекающие в клетке,—необратимыми, потому что в эти часы наступает массовая гибель клеток.

Действие актиномицина D исследовалось в разных областях биологии [9, 12, 23, 26, 33, 34].

Заслуживает внимания своеобразный ход развития исследований по актиномицинам, первый представитель которых был описан еще в 1940 г. Ваксманом [34]. Несколько лет спустя Вининг и Ваксман [33] опубликовали работы, посвященные новой разновидности актиномицинов—актиномицину D, структуру которого установили Булок и Джонсон [7].

По определению Брокмана, актиномицины—это хромопротенды (или хромопептиды), отличающиеся друг от друга пептидной частью своей молекулы.

Механизм действия актиномицинов был предметом исследования многих авторов [1, 2, 4, 6, 11, 12, 15, 16, 35].

Шоткин с соавторами исследовали действие актиномицина на фибробласты *in vitro*. Антибиотик вызывал исчезновение ядрышек и снижал количество рибонуклеиновой кислоты. Кейч [17] в опытах с культурами фибробластов показал, что антибиотик не влияет на включение ни меченого лейцина в белки, ни меченого тимидина в дезоксирибонуклеиновую кислоту, но полностью тормозит включение уридина в рибонуклеиновую кислоту. Тамаоки считает, что актиномицин подавляет биосинтез рибонуклеиновой кислоты всех типов, но биосинтез РНК, переносимой информацией, он подавляет слабее, чем биосинтез РНК других типов. Меритс своими опытами на печени крысы подтвердил эти результаты. Бал с сотрудниками [8] установили, что этот антибиотик оказывает аналогичное действие на рибонуклеиновые кислоты клетки конуса нарастания лука и задерживает митозы.

В 1953 году Равина [29] опубликовал сообщение о противоопухолевом действии актиномицина, а в 1955 и 1956 гг. Фарбер и Фарбер с соавторами [13, 14] опубликовали результат исследований противоопухолевого действия актиномицина.

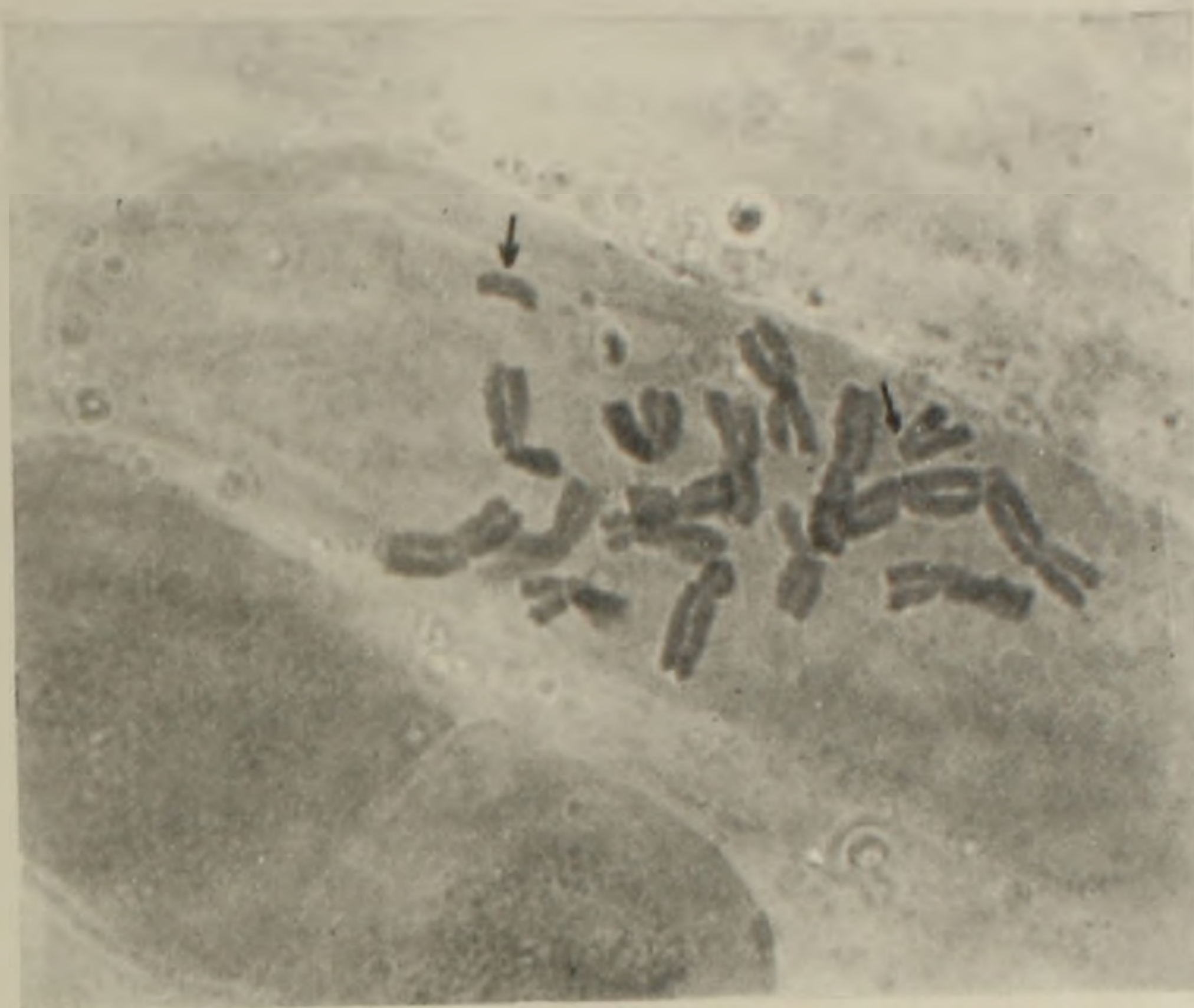


Рис. 1. Кариотип лука на стадии к-метафазы с делецией метацентрической хромосомы.

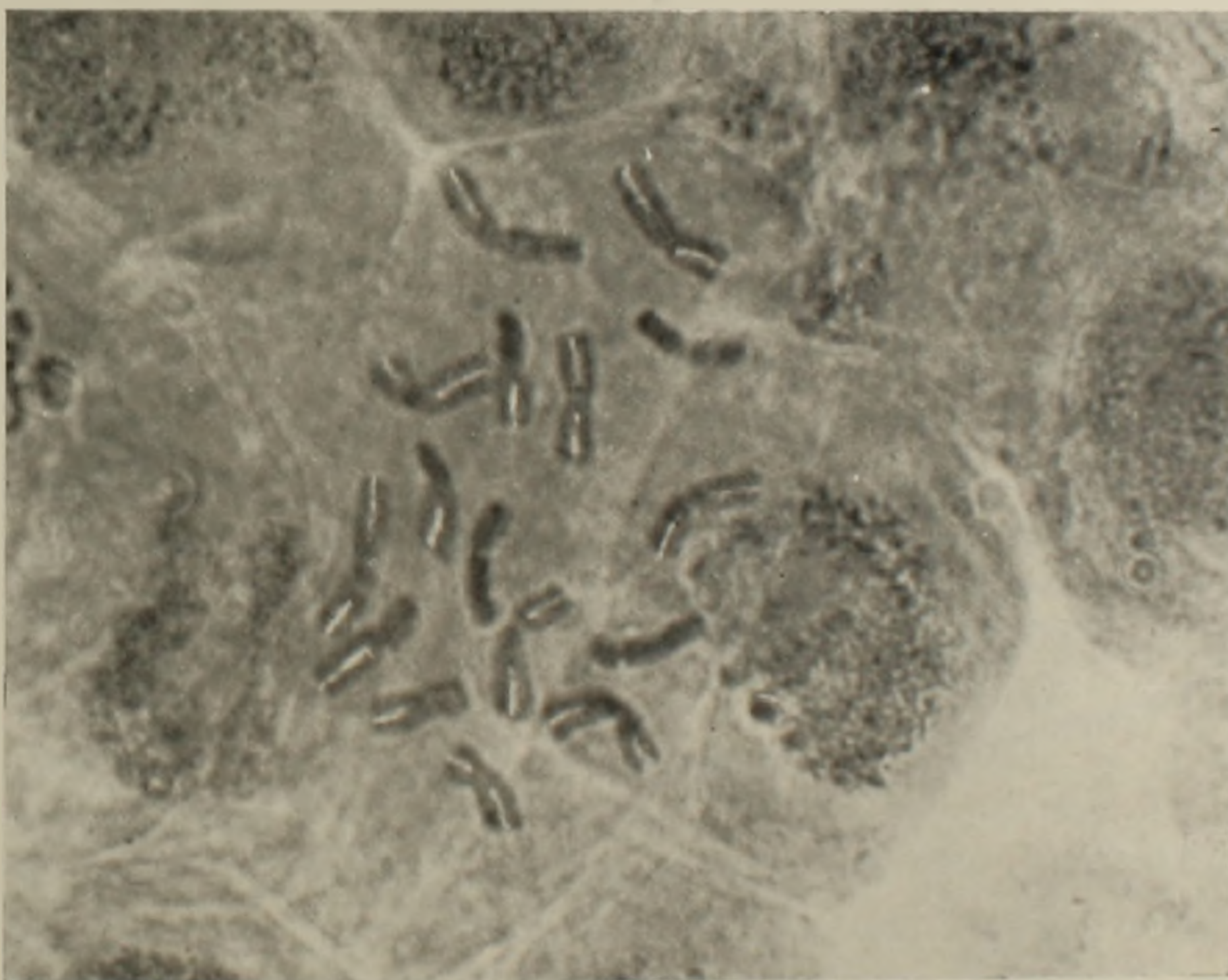


Рис. 2. Метафаза лука, напоминающая картину к-митозов.

В последние годы расширяется применение актиномицина для установления механизма действия ауксинов и других биологически активных в отношении растительной клетки веществ.

Уэйлер Дж. и Беннет Л. [35] отмечают, что основной причиной антибиотического действия актиномицинов является подавление синтеза РНК. Несмотря на различия в выводах отдельных работ, все авторы сходятся на том, что нарушения в фонде свободных оснований, нуклеотидов и нуклеозидов, вызываемые актиномицинами, не являются причиной их антибиотического действия.

Настоящее исследование посвящено изучению кинетики ингибирования митозов, происходящих в клетках корешков лука под влиянием указанного антибиотика.

Материал и методика. Семена *Allium* сера проращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной водопроводной водой. Корешки длиной 8—10 мм переносились в соответствующие растворы актиномицина и инкубировались при непрерывном нахождении антибиотика в среде. Фиксировали их с различными интервалами при продолжительности экспозиций от одного часа до 48 час. Таким образом, антибиотик находился в среде с корешками в течение различного для каждой группы времени.

Актиномицин использовался в концентрациях 250 γ /250 мл, 250 γ /500 мл, 250 γ /5000 мл, 250 γ /10000 мл, 250 γ /10000000 мл, 1 γ /мл, 50 γ /мл, 100 γ /мл, 250 γ /мл, 500 γ /мл вместе с контролем.

Первые пять концентраций были отнесены к минимальным дозам, вторые две—к оптимальным и последние три концентрации—к максимальным или летальным. Для изучения митотического индекса были приготовлены ацето-карминовые временные препараты.

Результаты и обсуждение. Корешки, обработанные концентрациями актиномицина меньшими дозами, чем 1 γ /мл, не показывают каких-либо видимых митотических задержек. Наиболее разбавленной дозой является 250 γ /10000000 мл. При воздействии этой концентрацией токсичность актиномицина проявляется очень слабо или совсем незаметно (МИ в этом варианте колеблется в пределах около 4%, т. е. находится приблизительно на уровне контроля).

Одинаковый эффект наблюдается при концентрациях 250 γ /10000 мл и 250 γ /5000 мл. Несколько понижается митотическая активность клеток при дозах 250 γ /500 мл и 250 γ /250 мл. Сравнивая количество клеток, делящихся при этих концентрациях, можно заметить, что понижение МИ наблюдается за счет уменьшения клеток, вступающих в митоз, а уровень метафаз остается почти неизменным по сравнению с другими концентрациями (250 γ /5000 мл, 250 γ /10000 мл, 250 γ /10000000 мл). С увеличением экспозиции уменьшается МИ клеток. Наибольший эффект отмечается при дозе 250 γ /250 мл. Таким образом, можно сделать предположение о том, что уменьшение митотического индекса связано с нарушением синтеза тех макромолекул, без которых ни одна клетка не может приступить к делению. Этим и объясняется то обстоятельство, что уменьшается прежде всего количество профаз. Следует также отметить, что воздействие этих доз не вызывает в клетках особых структурных из-

менений; изменения обратимы, и после снятия действия актиномицина клетки вновь возвращаются в нормальное состояние, продолжая делиться. Но при этом указанные концентрации актиномицина вызывают хромосомные аномалии (рис. 1). При дозе $250 \gamma/10000$ мл имело место накопление метафаз типа индуцированных колхицином (рис. 2). Так, если в контроле процент профаз на 10000 клеток примерно составляет 1,55, а метафаз более 0,8, то в опытном варианте несколько уменьшается процент профаз, а метафазы находятся примерно на уровне профаз (рис. 3). Это свидетельствует о том, что актиномицин указанной дозы действу-

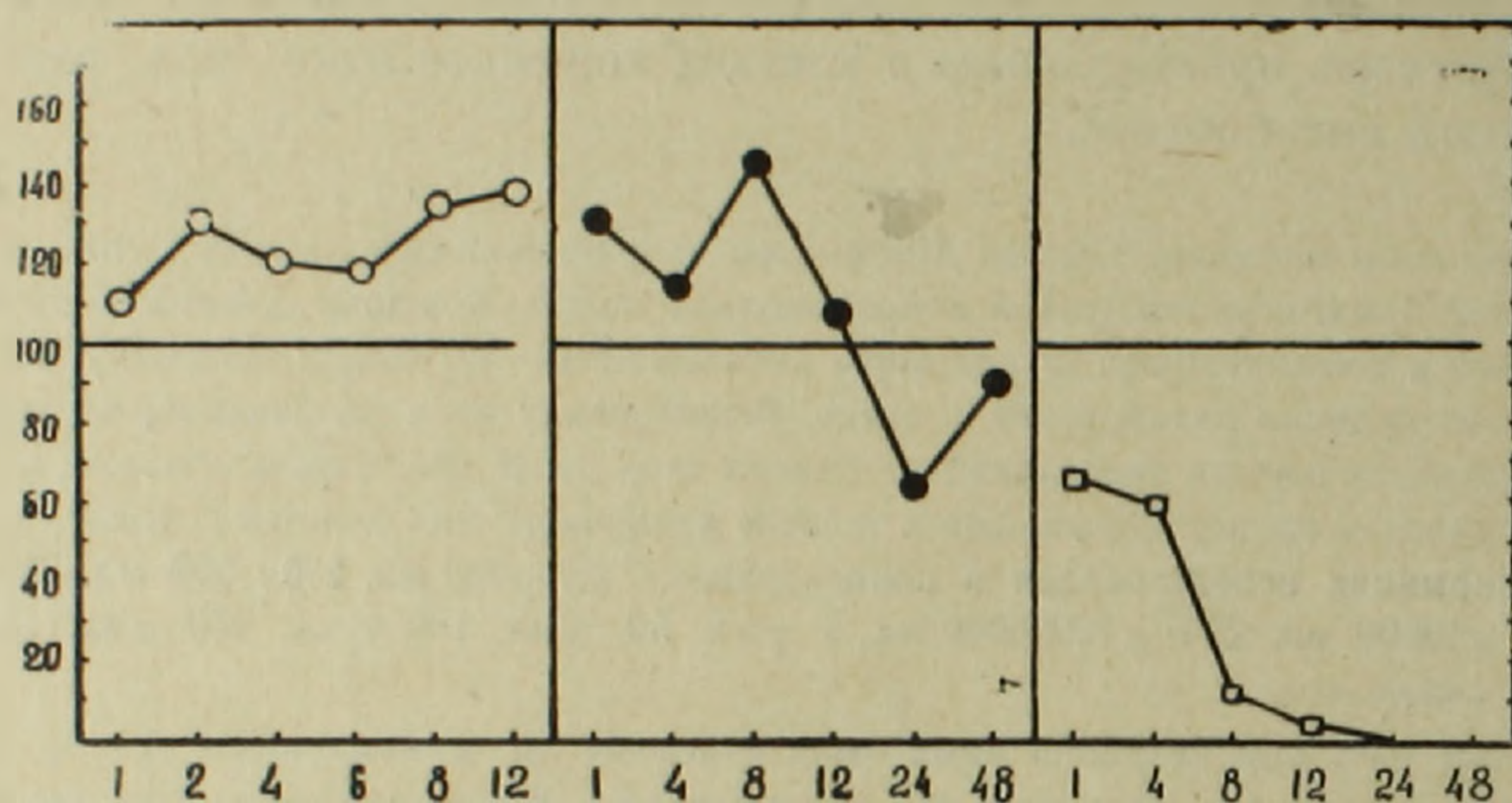


Рис. 3. Отношение числа метафаз опытных вариантов к контролю: по оси ординат—процент метафаз при действии актиномицина (за 100% принимается процент метафаз в контроле), по оси абсцисс—время после снятия действия актиномицина, ○—○ актиномицин в концентрации $250 \gamma/10000$ мл, ●—● в концентрации $1 \gamma/ml$, □—□ в концентрации $500 \gamma/ml$.

ет на митотический аппарат, в первую очередь на ахроматиновое веретено, разрушая его и вызывая тем самым дезориентацию хромосом в метафазе митотического деления. Данные указывают на неполное подавление деления клеток при малых дозах актиномицина. Хотя вступление их в митоз и задерживается на некоторое время, клетки завершают деление. Смоленская [6] считает, что такая картина происходит вследствие функционирования долгоживущих РНК, обеспечивающих частичный белковый синтез, необходимый для вступления клеток в митоз и его завершения. Подобные предположения делали ранее и другие исследователи.

Концентрация $1 \gamma/ml$ по сравнению с предыдущими (минимальными) оказывает заметное воздействие на клетки, уже через 1—4 часа заметен постепенный спад митотического индекса, и к 24 час. митоз по сравнению с контролем блокируется почти вдвое (через 24 и 48 час. МИ составлял $2,26 \pm 0,46\%$ и $2,05 \pm 0,44\%$) (табл. 2, рис. 4). Эта доза вызывала образование мостов и к-митозов. Часть митозов останавливалась в ранней профазе, что приводило к возникновению полиплоидных ядер (рис. 5).

Таблица 1

Частота встречаемости фаз митоза в клетках корешков лука при воздействии минимальными концентрациями актиномина D

Вариант опыта	Продолжительность обработки, час.	Количество клеток	Средняя на 1000 клеток					МИ, %
			И	П	М	А	Т	
250 γ/10000000 мл	1	10000	959,5	15,1	59,8	8,6	6,9	4,05±0,61
	2		958,5	15,3	11,3	8,5	6,4	4,15±0,61
	4		961,8	13,2	10,3	9,5	5,2	3,82±0,60
	6		961,2	14,3	10,5	8,4	5,6	3,88±0,60
	8		961,7	13,6	11,2	7,7	5,8	3,83±0,60
	12		961,6	13,5	10,8	7,9	6,2	3,84±0,60
250 γ/10000 мл	1	10000	959,9	14,8	9,4	7,8	7,1	3,91±0,61
	2		962,1	14,2	10,8	6,7	6,2	3,79±0,59
	4		963,5	13,1	10,2	6,9	6,3	3,65±0,58
	6		964,4	14,1	10,1	6,4	5,0	3,56±0,58
	8		965,5	13,3	11,4	5,8	4,0	3,45±0,57
	12		969,3	11,2	11,7	4,2	3,6	3,07±0,53
250 γ/5000 мл	1	10000	962,0	14,1	10,2	6,8	6,9	3,80±0,60
	2		963,9	13,4	9,8	8,4	4,5	3,61±0,58
	4		964,6	14,0	11,1	7,3	5,0	3,54±0,58
	6		965,4	12,8	10,9	7,7	3,7	3,46±0,57
	8		966,1	13,0	11,2	6,4	3,3	3,39±0,56
	12		971,4	9,6	12,2	3,6	3,2	2,96±0,52
250 γ/500 мл	1	10000	964,1	12,9	10,2	9,8	3,1	3,59±0,58
	2		964,9	13,8	9,9	8,2	3,7	3,51±0,58
	4		965,2	13,2	11,0	7,4	3,0	3,48±0,57
	6		966,6	13,1	9,1	8,5	2,7	3,34±0,56
	8		967,7	11,5	10,4	6,5	3,9	3,23±0,55
	12		974,8	9,1	10,2	3,7	2,2	2,52±0,45
250 γ/250 мл	1	10000	965,5	11,7	9,8	9,6	3,4	3,45±0,57
	2		966,2	12,0	9,1	10,4	2,3	3,38±0,56
	4		967,2	12,6	11,9	5,5	2,8	3,28±0,54
	6		968,8	12,3	10,1	6,1	2,9	3,12±0,54
	8		970,0	8,8	10,8	7,5	2,9	3,00±0,53
	12		976,3	6,8	8,9	5,3	2,7	2,37±0,47
Контроль (вода)	1	10000	959,0	16,1	9,5	8,2	8,2	4,10±0,61
	2		957,6	15,8	9,9	9,5	7,1	4,24±0,53
	4		960,9	14,9	9,1	7,6	7,5	3,91±0,61
	6		965,1	14,7	10,4	8,2	7,4	4,06±0,61
	8		958,6	15,5	9,2	8,6	8,1	4,14±0,61
	12		958,9	14,5	10,1	9,2	7,3	4,11±0,61

При концентрации 50 γ/мл был отмечен значительный спад митотического индекса, который в течение 24 час. спустился ниже 1 (рис. 6). Уровень метафаз примерно одинаков с уровнем профаз, но по сравнению с предыдущими концентрациями митотическая активность клеток соответственно понизилась, и к 24 и 48 час. МИ составлял $0,82 \pm 0,28$ и $0,76 \pm 0,26\%$. При дозе 100 γ/мл через 48 час. митоз был полностью блокирован (табл. 2, рис. 7). Дозы 250 и 500 γ/мл являются летальными (через 24 и 48 час. митозы сводятся к нулю (рис. 8, 9, 10), а процессы, протекающие в клетке—необратимыми, и при переносе в воду восстановления МИ не наблюдается. К этому времени актиномин вызывает гибель

Таблица 2

Частота встречаемости фаз митоза в клетках корешков лука при воздействии оптимальными и максимальными концентрациями актиномицина D

Вариант опыта	Продолжительность обработки, час.	Количество клеток	Средняя на 1000 клеток					МИ, %
			И	П	М	А	Т	
1 γ/мл	1	10000	967,0	11,1	11,1	7,5	3,3	3,30±0,56
	4		968,3	11,7	9,9	7,8	2,3	3,17±0,54
	8		970,4	8,8	12,4	6,8	1,6	2,96±0,53
	12		976,5	6,7	9,1	6,2	1,3	2,35±0,47
	24		977,4	6,5	7,4	6,4	2,3	2,26±0,46
	48		979,5	6,0	7,8	5,0	1,7	2,05±0,44
50 γ/мл	1	10000	969,6	12,5	9,3	5,3	3,3	3,04±0,53
	4		975,5	10,8	7,1	3,9	2,7	2,45±0,48
	8		986,8	3,6	5,2	3,5	0,9	1,32±0,35
	12		985,7	5,3	4,9	3,0	1,1	1,43±0,35
	24		991,8	3,0	3,2	1,7	0,3	0,82±0,28
	48		992,4	2,7	2,9	1,7	0,3	0,76±0,26
100 γ/мл	1	10000	972,0	10,4	10,1	5,9	1,6	2,80±0,53
	4		979,3	9,0	6,5	4,4	0,8	2,07±0,44
	8		986,7	5,7	5,5	1,4	0,8	1,33±0,35
	12		988,1	4,7	4,9	1,9	0,4	1,19±0,32
	24		998,4	0,6	1,0	—	—	0,16±0,12
	48		999,9	—	0,1	—	—	0,01±0,03
250 γ/мл	1	10000	973,8	8,5	9,5	6,9	1,4	2,62±0,50
	4		982,2	6,9	8,2	2,2	0,5	1,78±0,40
	8		995,0	1,8	2,2	1,0	—	0,50±0,22
	12		997,0	1,2	1,6	0,2	—	0,30±0,17
	24		1000	—	—	—	—	—
	48		1000	—	—	—	—	—
500 γ/мл	1	10000	981,6	5,8	6,9	4,4	1,3	1,84±0,41
	4		984,9	5,2	7,9	1,3	0,6	1,51±0,38
	8		997,6	1,1	1,3	—	—	0,24±0,15
	12		998,8	0,4	0,8	—	—	0,12±0,10
	24		1000	—	—	—	—	—
	48		1000	—	—	—	—	—
Контроль (вода)	1	10000	957,8	16,2	10,2	8,2	7,6	4,22±0,63
	4		961,6	14,4	9,9	8,3	5,8	3,84±0,60
	8		961,5	13,2	9,8	8,1	7,4	3,85±0,60
	12		962,2	12,3	9,4	8,4	7,7	3,78±0,59
	24		959,6	14,3	9,3	8,7	8,1	4,04±0,61
	48		961,4	13,8	9,4	8,8	6,6	3,86±0,60

клеток, в связи с этим и исчезновение митозов (рис. 11). При малых дозах и экспозициях погибают не все клетки, среди массы погибших клеток видны отдельные малоизмененные клетки.

Неодинаковая реакция клеток на действие актиномицина может быть связана с дифференциальной чувствительностью различных фаз клеточного цикла к антибиотик.

В последнее время исследователи единодушно признают, что неизменным следствием действия на митотический цикл ряда ингибиторов является задержка в S-периоде [24, 28].

Елифанова [2] считает, что критические периоды (периоды повы-

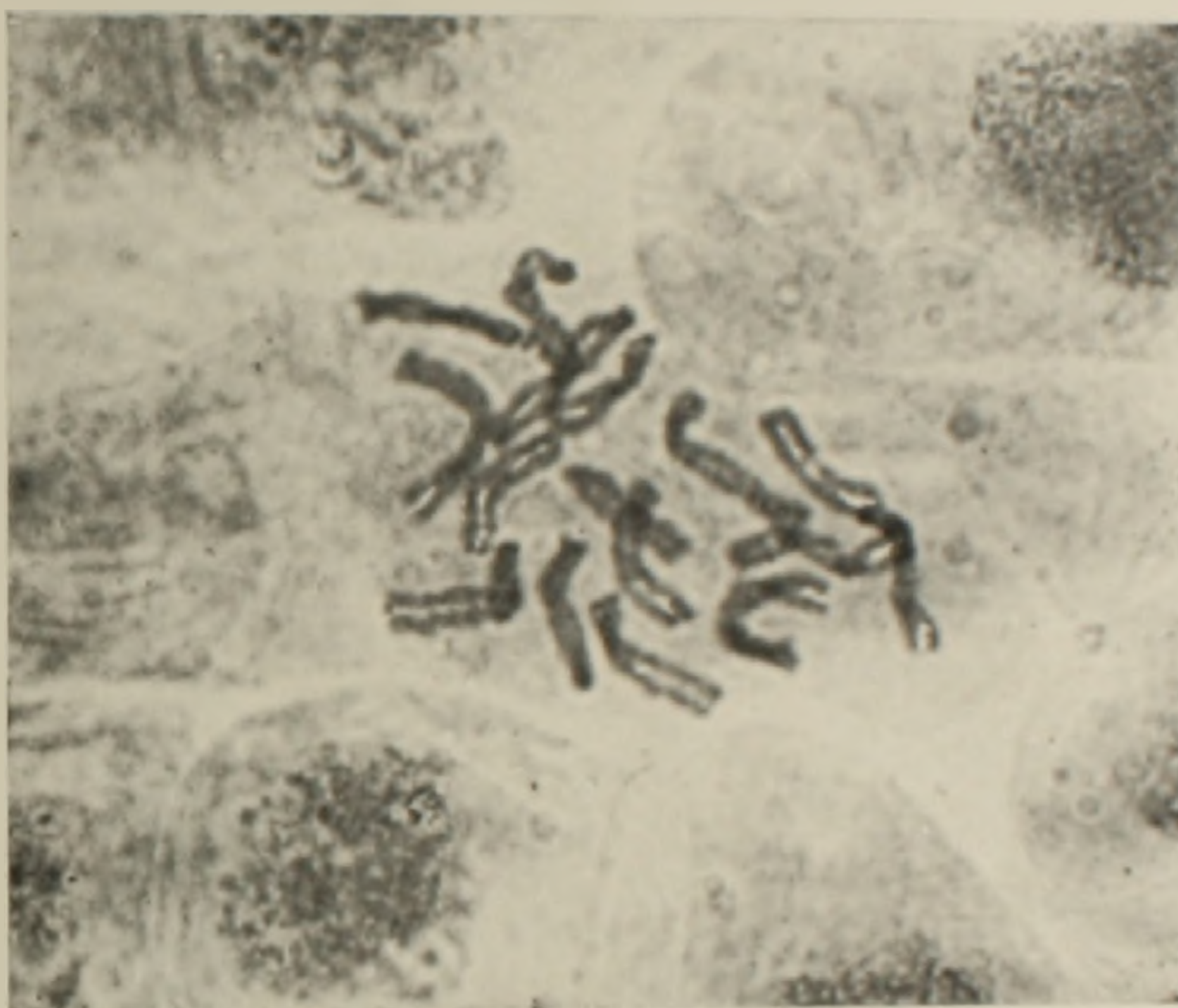


Рис. 5. Митоз, остановившийся в профазе с образованием полиплоидного ядра.

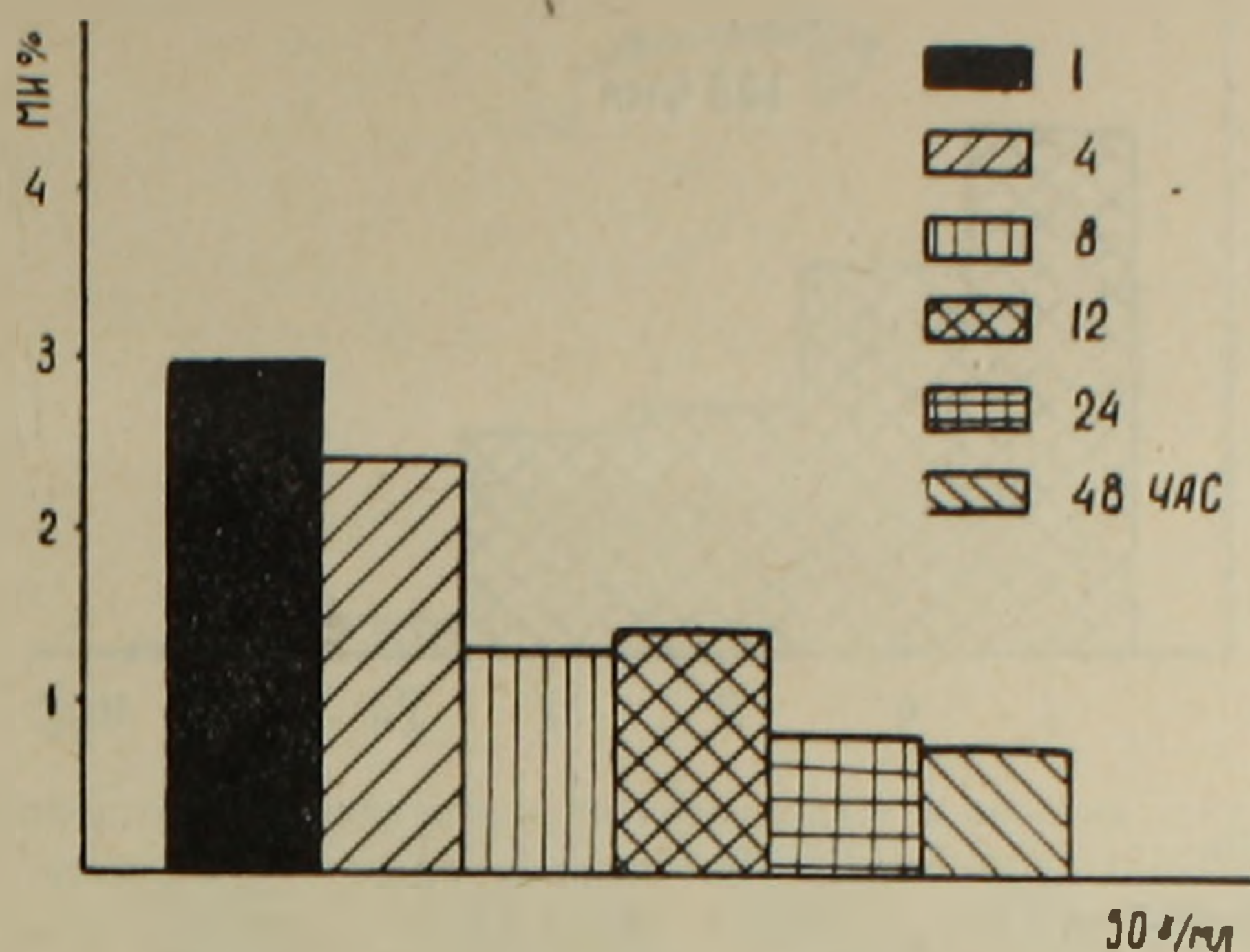


Рис. 4. Действие актиномицина в концентрации 1 μ /мл на митотический индекс в зависимости от экспозиции: на оси ординат—процент делящихся клеток, на оси абсцисс—время после снятия действия актиномицина.

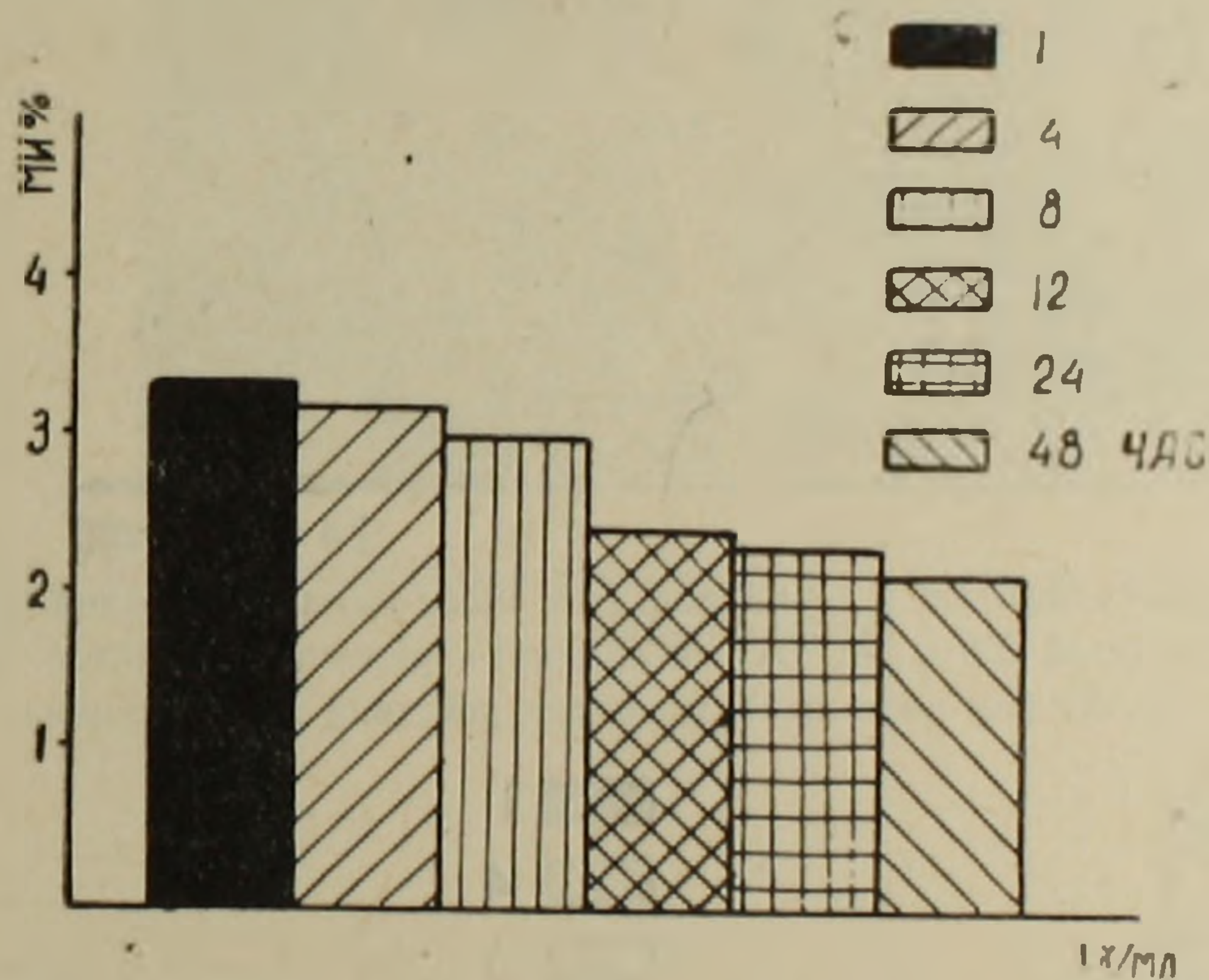


Рис. 6. Действие актиномицина в концентрации 50 μ /мл на индекс делящихся клеток в зависимости от экспозиции: на оси ординат—процент делящихся клеток, на оси абсцисс—время после снятия действия актиномицина.

шенной чувствительности клеток к тем или иным воздействиям, в том числе к ингибиторам синтеза специфических макромолекул), действительно существуют в митотическом цикле, однако к экспериментальному выявлению их следует подходить с большой осторожностью, тщательно оценивая латентный период и специфичность действия применяемых для анализа ингибиторов.

Убедительно показано [3], что наряду со специфическим действием ингибиторов на отдельные звенья биосинтеза макромолекул, характерным для малых доз, существует и неспецифический (по-видимому, наркотический) эффект больших доз.

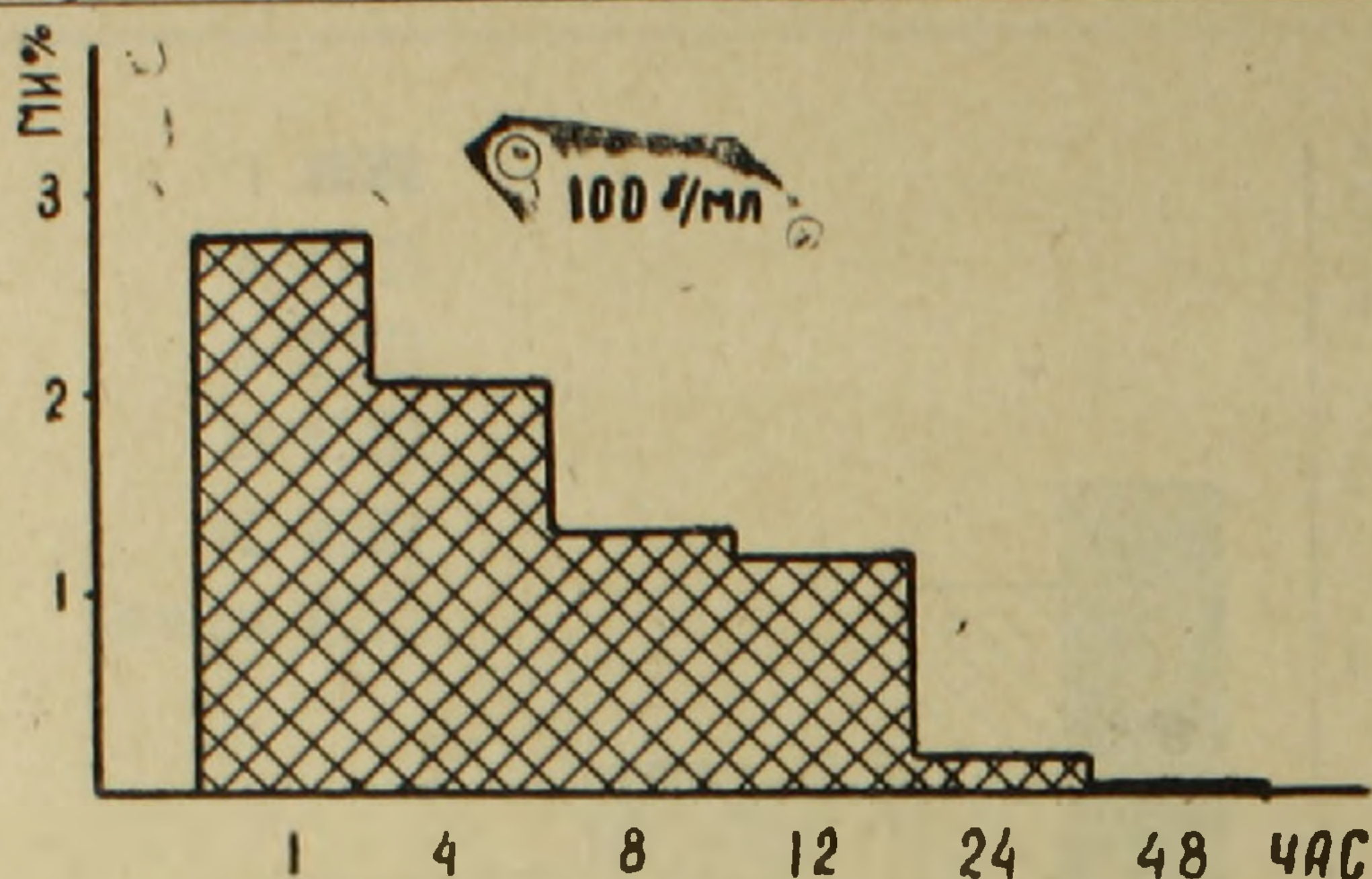


Рис. 7. Частота митозов в зависимости от экспозиции при воздействии актиномицина дозой 100 μ /мл: на оси ординат—процент делящихся клеток, на оси абсцисс—время после снятия действия актиномицина.

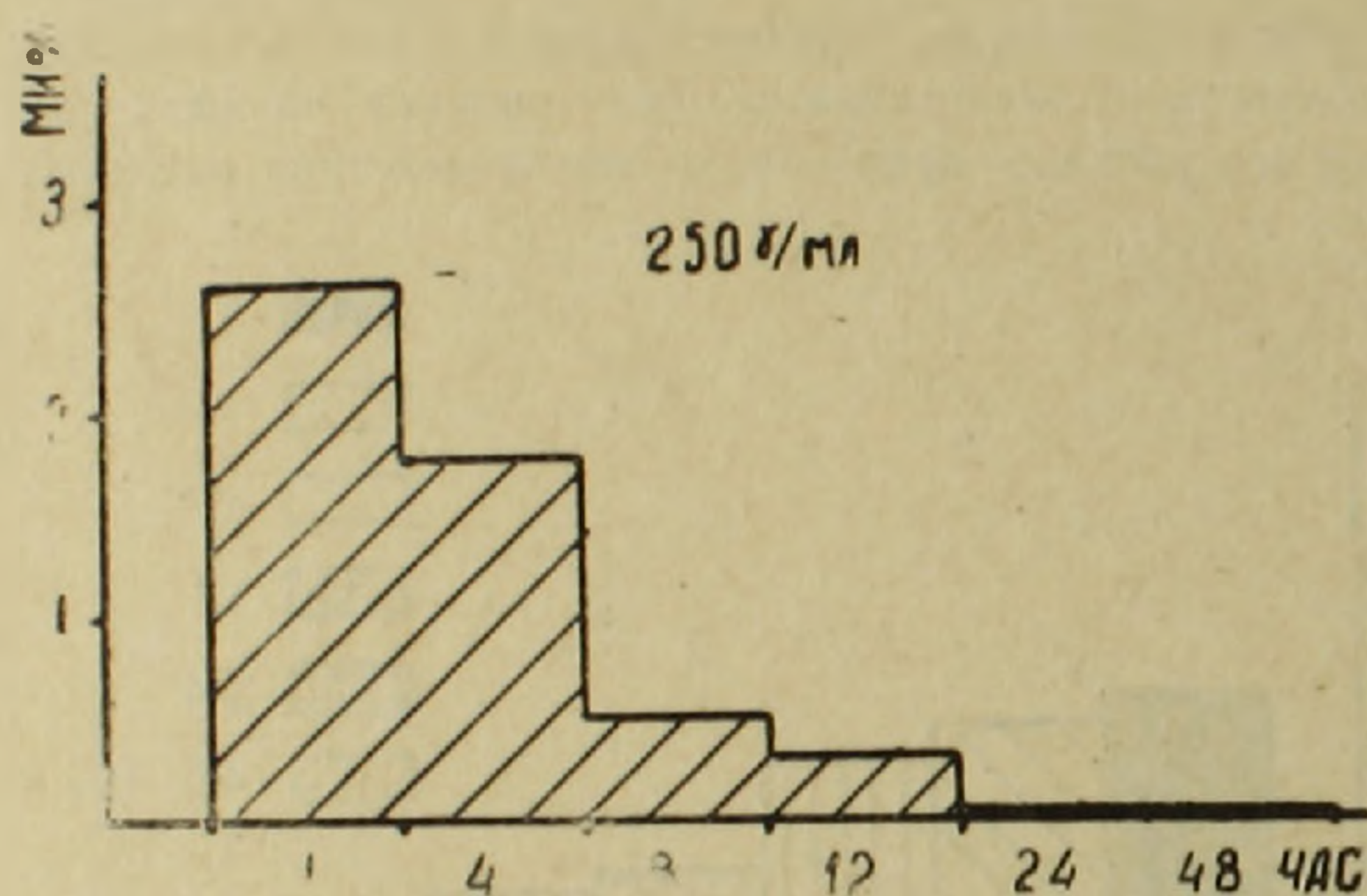


Рис. 8. Частота митозов в зависимости от экспозиции при воздействии актиномицина дозой 250 μ /мл: на оси ординат—процент делящихся клеток, на оси абсцисс—время после снятия действия актиномицина.

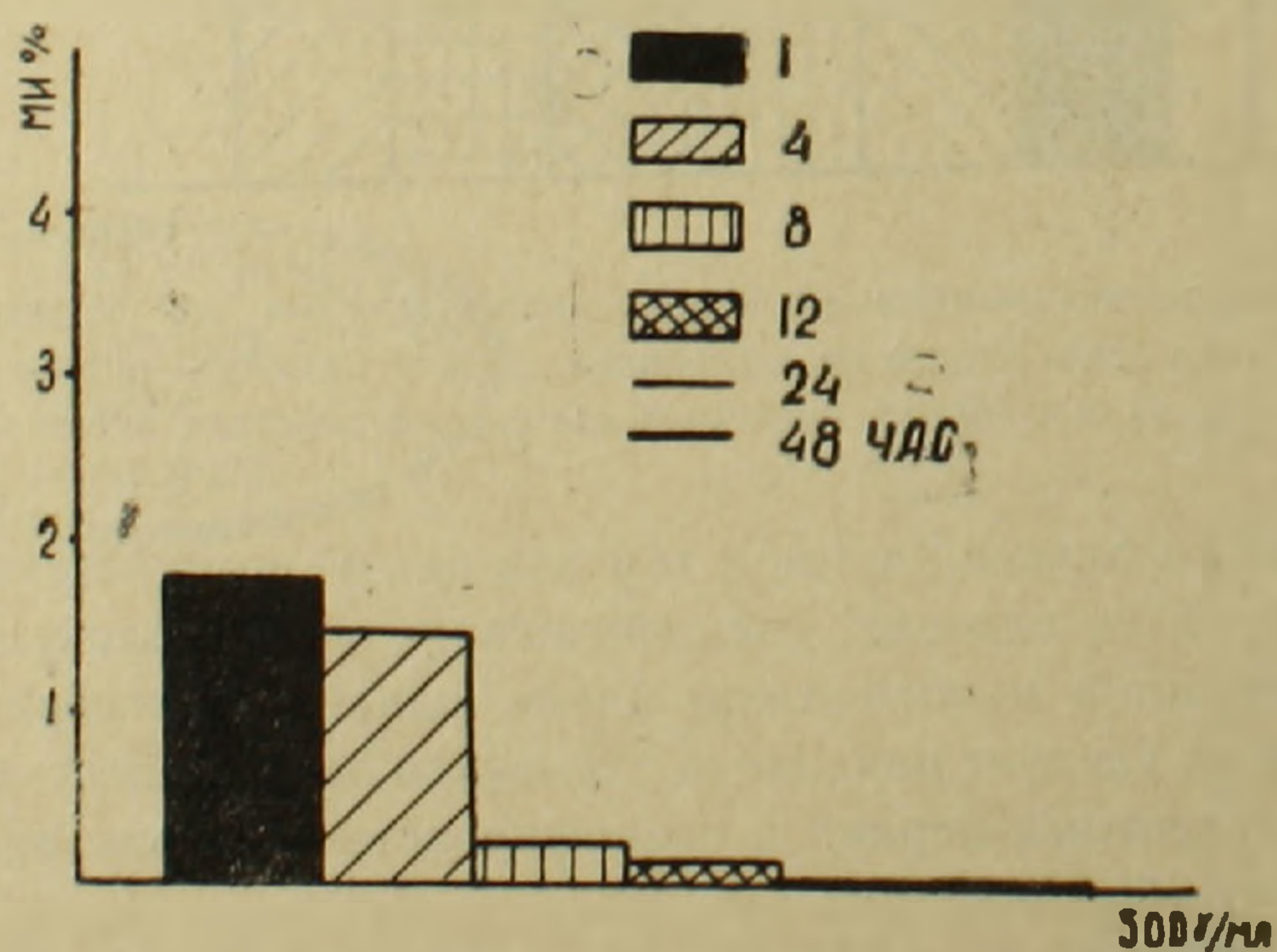


Рис. 9. Действие актиномицина в концентрации 500 μ /мл на индекс делящихся клеток: на оси ординат—процент делящихся клеток, на оси абсцисс—продолжительность экспозиции.

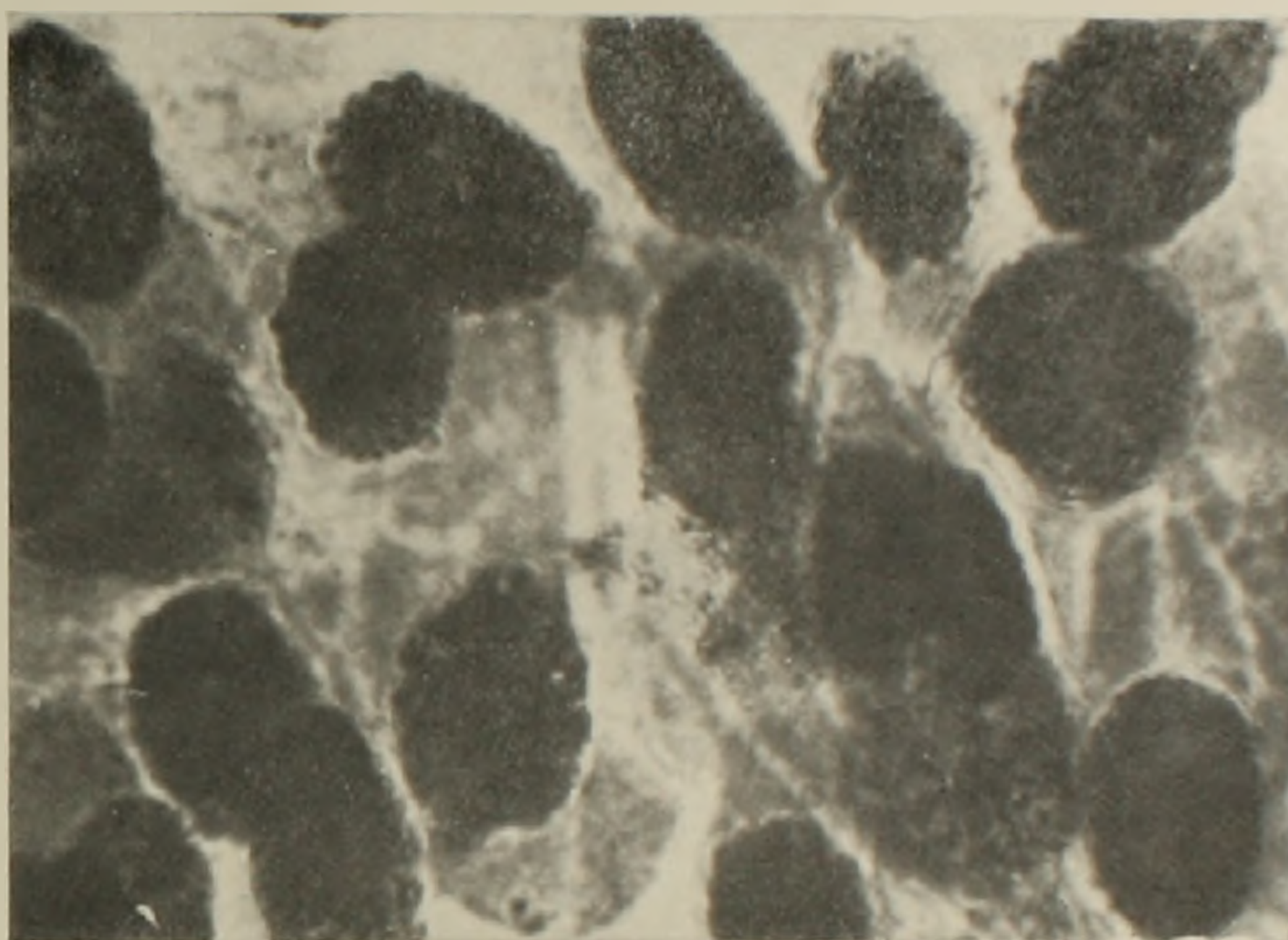


Рис. 11. Масса погибших клеток через 48 час. после снятия воздействия актиномицина.

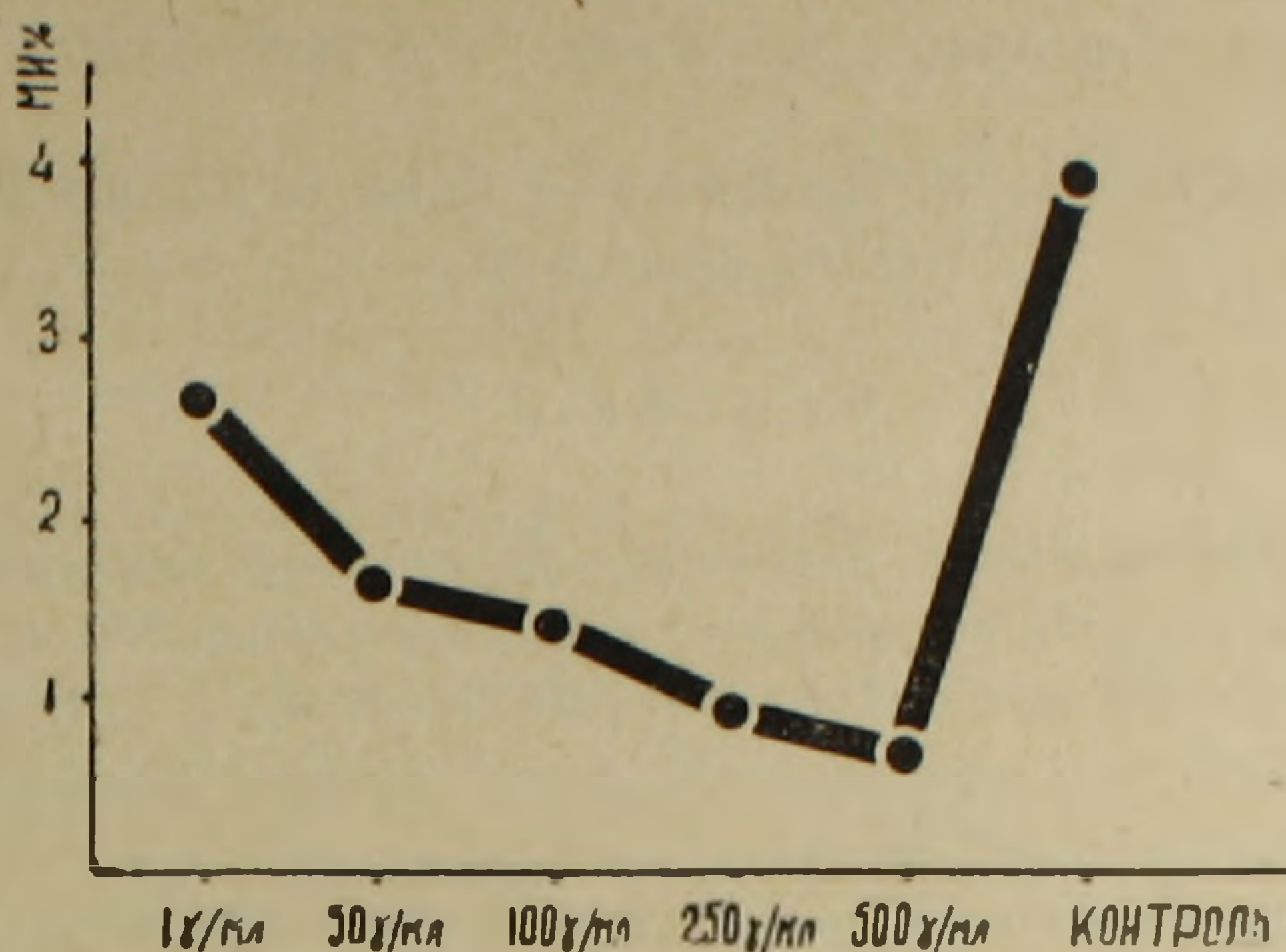


Рис. 10. Действие актиномицина на митотический индекс: на оси ординат—МИ в процентах к общему количеству подсчитанных клеток, на оси абсцисс—концентрация актиномицина.

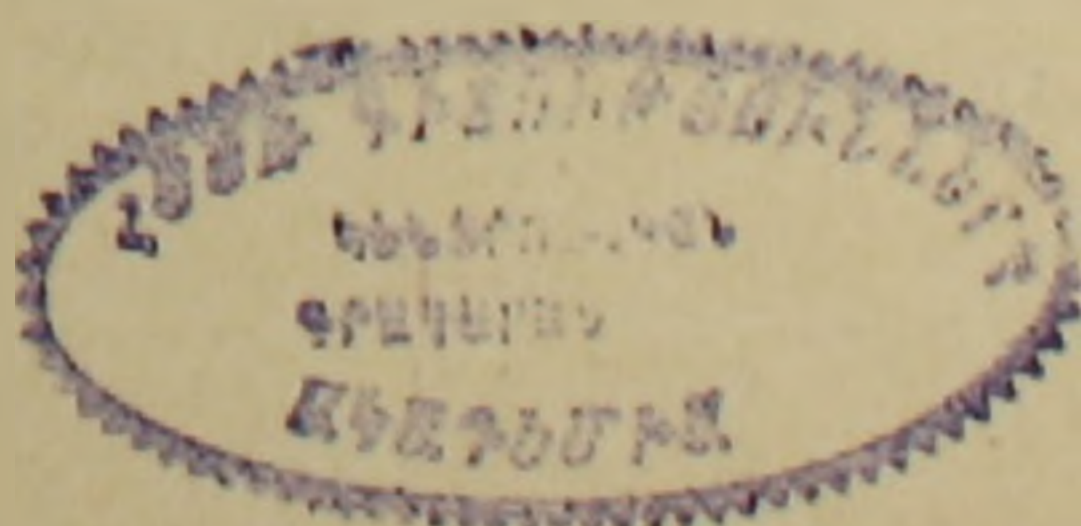
Сопоставляя данные, приведенные в табл. 2, можно отметить, что при малых экспозициях в дозе 1 γ /мл клетки успевают перейти к делению, иначе говоря, они переходят критические периоды или состояния повышенной чувствительности к воздействиям, после чего утрачивают чувствительность [5, 30, 31, 32]. В случае длительного воздействия ингибитора больше клеток охватывается в критическом периоде. За 1—4 час. до деления клетки, видимо, уже становятся нечувствительными к воздействию; через 8—48 час. в дозе 50 и 100 γ /мл количество клеток, вступающих в деление, меньше, а при концентрациях 250 и 500 γ /мл через 24 и 48 час. клетки просто погибают, поэтому никакого обратимого явления не наблюдается. И если учесть, что период клеточного цикла у лука длится примерно 23 час. [22], то можно с уверенностью сказать, что фазы G_1 , S и G_2 являются менее уязвимыми.

В настоящее время это явление не вызывает сомнений, и многими исследователями на различном биологическом материале установлено, что вступлению клеток в митоз предшествует ряд последовательных событий, превращающих ее из интерфазной в клетку, способную делиться. Можно полностью согласиться с предположением Лайта [18], что у клеток печени имеется стадия настоящего покоя, из которой клетки по мере необходимости переходят в митотический цикл. Эту стадию Лайт [18—20] и Квастлер [25] обозначают как G_0 -период или фазу G_0 .

И как предполагает Епифанова [2], критические процессы, которые предшествуют вступлению клеток в S период, в действительности разыгрываются при переходе клеток из периода G_0 в период G_1 . Это предположение заслуживает внимания.

реванский государственный университет,
кафедра генетики и цитологии

Поступило 10.VII 1973 г.



Զ. Գ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ, Ե. Գ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Դ. Ս. ԲԱԼԱՍԱՆՅԱՆ

ԱԿՏԻՆՈՄԻՑԻՆ D-Ի ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՆԻ ԱՐՄԱՏԱԾԱՅՐԵՐԻ
ԲՋԻՋԱԽՆ ՑԻԿԼԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Սոխի արմատածայրերում մերիստեմային բջիջների միթոտիկ ակտիվության վրա ակտինոմիցինի տարբեր խտությունների (250 γ /250 մլ, 250 γ /500 մլ, 250 γ /5000 մլ, 250 γ /10000 մլ, 250 γ /10000000 մլ, 1 γ /մլ, 50/մլ, 100 γ /մլ, 250 γ /մլ և 500 γ /մլ) ազդեցությունը բացահայտելու նպատակով կատարվել է միթոզի բջջաբանական անալիզը:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ ակտինոմիցինի թունավոր ազդեցությունը ցածր խտությունների դեպքում ավելի թույլ է: 250 γ /10000 մլ տարբերակում միթոտիկ ինդեքսը հավասարվում է համարյա ստուգիչին: Միթոտիկ ակտիվության նվազում նկատվել է նաև 250 γ /500 մլ և 250 γ /250 մլ խտությունների դեպքում: Պետք է նշել, որ նշված ակտիվության նվազումը տեղի է ունենում ի հաշիվ պրոֆազաների թվի պակասեցման:

Ակտինոմիցինի փորձարկված խտությունների ազդեցության տակ նկատվել է նաև քրոմոսոմային շեղումներ և մետաֆազաներ, որոնք հիշեցնում են C մետաֆազան: Ակտինոմիցինի օպտիմալ խտությունները զգալի ազդեցություն են թողել բջիջների բաժանման վրա և ֆիքսացիայից 1—4 ժամ հետո նկատվել է միթոտիկ ինդեքսի զգալի իջեցում: 24 ժամ հետո 1 γ /մլ տարբերակում միթոզը կասեցվում է ստուգիչի համեմատությամբ երկու անգամ, 50 γ /մլ 24 ժամ տարբերակում միթոտիկ ինդեքսը իջնում է 1-ից ցածր և հավասարվում է $0,82 \pm 0,28\%$: Միթոզի լրիվ կասեցում դիտվել է 100 γ /մլ 4,8 ժամ տարբերակում, իսկ 250 γ /մլ և 500 γ /մլ խտությունները թողել են լետալ ազդեցություն: Ֆիքսացիայից 24—48 ժամ հետո միթոզը հավասարվում է 0-ի և բջիջներում նկատվում է անվերադարձ պրոցեսներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Губенко И. С., Беляева Е. С. Цитология, 12, 5, 627—636, 1970.
2. Елифанова О. И. Цитология, 9, 9, 1967.
3. Иванов В. Б. Журн. общей биологии, 27, 3, 299—312, 1966.
4. Кожыбский Т., Ковшик-Гиндифор З., Курьлович В. В кн. Антибиотики, 1, 784—814, 1969.
5. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963.
6. Смоленская И. И. Тр. Тбилисского Госуниверситета, 139, 109—114, 1971.
7. Bullock E. and Johnson A. J. Chemical Soc., 3280, 1957.
8. Bal A. K. Z. Pflanzenphysiol., 63, 3, 1970.
9. Bal A. K. and Gross P. R. Science, 139, 584—586, 1963.
10. De Man J. C. and Noordyun. J. Cell Biol., 33, 489—496, 1967.
11. Elkind M., Kano E. J. Cell Biol., 42, 2, 366—377, 1969.
12. Epifanova O., Smolenskaya J., Sevastyanova M., Kurdyumova A. Exptl. Cell Res. 58, 2—3, 401—410, 1969.
13. Farber S. Am. J. Pathol., 31, 582, 1955.

14. *Farber S., Maddock Gh. and Swaffield S.* Proc. Am. Ass. Cancer, Res., 2, 104, 1956.
15. *Goessans G., Bassleer R.* Arch. biol., 81, 2, 165—102, 1970.
16. *Jacob J. and Sirlin J. J.* Ultrastruct. Res., 11, 315, 1964.
17. *Katz E. and Pugh L.* Appl. Microbiol., 9, 263, 1961.
18. *Lajtha L. G. J.* Cell compar. physiol., 62, 2, 143, 1963.
19. *Lajtha L. G.* Medecine, 43, 5. 625, 1964.
20. *Lajtha L. G. J.* Cell compar. physiol., 67, 3, suppl. 1, 133, 1966.
21. *Melvin Joan B.* Exptl. Cell Res., 45, 3, 559, 1967.
22. *Matagne R.* Caryologia, 21, 3, 209, 1968.
23. *Nagl Walter.* Z. Pflanzenphysiol., 63, 4, 316, 1970.
24. *Pfliffer S. E. and Tolmach L. J.* Cancer Res., 27, 1, 124, 1967.
25. *Quastler H.* In. Cell proliferation, 18, 1963.
26. *Ronssaux Jean.* C. r. Acad. Sci., D272, 26, 3271, 1971.
27. *Rickinson A.* Cell and Tissue Kinet., 3, 4, 335, 1970.
28. *Robbins E. and Borun T. W.* Proc. Nat. Acad. Sci., 57, 2, 409, 1967.
29. *Ravina A.* Presse Med., 61, 1270, 1953.
30. *Swann M. M.* Quart. j. microscop. sci., 94, 4, 369, 1953.
31. *Swann M. M.* Exper. Cell Res., 7, 2, 505, 1954.
32. *Swann M. M.* Proc. Roy Soc., A, 24, 1, 5—7, 1955.
33. *Vining L. and Waksman S.* Sciense, 120, 389, 1954.
34. *Waksman S. A. and Woodruff H. B.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 45, 609, 1940.
35. *Wheeler G. P., Bennett L. L.* Blochem. Pharmacol, 11, 353, 1962.