

Ю. А. РОМАНОВ, Т. В. САВЧЕНКО, В. П. ЗАРЕНКОВА

## ДЕЙСТВИЕ ТИРОКСИНА НА КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ И МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ТЕТРАHYМЕНА PYRIFORMIS

Воздействие тироксином увеличивает митотическую активность в стационарных культурах *T. pyriformis*, степень повышения ее зависит от примененной концентрации гормона. Под влиянием тироксина уменьшается  $t_G$  и  $t_S$  и не изменяется продолжительность генерационного времени. В контрольной и находящейся в условиях действия тироксина культурах обнаружены ритмичные изменения митотического индекса с периодами 1,5—2,5 и 7,0—8,5 часов. Фазы этих ритмов в контроле и опыте не совпадают во времени суток.

Из литературы известно стимулирующее действие тироксина на митотическую активность и синтез ДНК в клетках многоклеточных животных и растений *in vitro* и *in vivo* [1—13, 16, 20, 26, 33, 36]. В настоящей работе исследовалось влияние тироксина на деление и параметры митотического цикла одноклеточных *Tetrahymena pyriformis*.

*Материал и методика.* В опытах использовалась культура *Tetrahymena pyriformis* (штамм GL-амикронуклеарный), не подвергшаяся синхронизации и содержавшаяся на дрожжевой воде при комнатной температуре. Опыты проводились в 4 сериях. 1—определение митотического индекса (МИ) в культурах разного возраста (1, 2, 3, 4, 5 и 8 дней). 2—определение в 5-дневной культуре МИ в зависимости от дозы L-тироксина (натриевая соль). Испытывались конечные концентрации гормона 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 мкг/мл. Время инкубации с тироксином—15 мин. 3—изучение влияния тироксина (0,01 мкг/мл) на МИ в культурах разного возраста (2, 5 и 8 дней), время действия гормона—15 мин. 4—определение параметров митотического цикла в нормальной и подвергшейся действию тироксина культурах (возраст культур—8 дней). С этой целью в культуры вводился тимидин-Н<sup>3</sup> (уд. акт. 3,4 С/мМ) в конечной концентрации 2,0 мккюри/мл. После 15-минутной инкубации с тимидином-Н<sup>3</sup> культуры отмывались в чистой среде двукратным центрифугированием и переводились на свежую среду, откуда брались пробы каждые 30 мин в течение 10 час. Тироксин вводился в культуру в конечной концентрации 0,01 мкг/мл за 16 час. до взятия первой пробы. В каждой точке опыта на препаратах определялись МИ, радиоактивный индекс (РИ)—индекс меченых интерфазных клеток, процент меченых делящихся клеток и интенсивность мечения ядер.

Препараты приготавливались по обычной методике изготовления тотальных препаратов простейших (сулемовый фиксатор Ниссенбаума, окраска гематоксилином Майера, обезвоживание и заключение в бальзам). Авторадиографические препараты готовились тем же способом без помещения в бальзам и покрывались фотоэмульсией типа «М» (НИИхимфото). Экспозиция автографов—3 суток. Делящиеся клетки определялись по изменениям конфигурации ядра и перешнуровке клеточного тела. Мечеными считались клетки с числом зерен восстановленного серебра над ядром более восьми. Для вычисления МИ и РИ (в промилле) в каждом препарате (пять на точку опыта) просматривались 2 000 клеток, интенсивность мечения определялась путем подсчета зерен серебра над 50 маркированными интерфазными ядрами.

*Результаты и обсуждение.* Высокие величины МИ в одно- и двухдневной культуре *T. rugifolmis* свидетельствуют о логарифмической фазе ее роста в это время. Резкое снижение МИ на 3-й день опыта указывает на переход культуры в стационарное состояние (табл. 1).

Таблица 1

МИ культур в зависимости от их возраста, ‰

Возраст культур, дни					
1	2	3	4	5	8
85,8	72,5	45,6	35,2	33,0	25,2
	$P_1=0,001$	$P_{1,2}=0,001$	$P_{1-3}=0,001$	$P_{1-3}=0,001$	$P_{1-3}=0,001$ $P_{4,5}=0,001$

Примечание. Цифры у Р показывают точку опыта с которой сравнивают результаты.

Таблица 2

Изменение МИ культуры в зависимости от дозы тироксина, ‰

Контроль	Концентрация тироксина, мкг/мл			
	0,001	0,01	0,1	1,0
33,0	35,9 (+9%)	45,4 (+38%) $P=0,001$	54,2 (+64%) $P=0,0001$	33,9 (+3%)

Примечание. В скобках указана величина изменения МИ, в ‰ по сравнению с контролем.

Из табл. 2 видно, что стимуляция клеточного деления тироксином в 5-дневной культуре зависит от концентрации гормонов в инкубационной среде. Эффективными были дозы тироксина 0,1 и 0,01 мкг/мл. Первая дозировка гормона вызывала наиболее сильное увеличение МИ, но одновременно приводила к морфологическим изменениям в клетках (увеличение размеров, изменение формы и пр). Поэтому далее использовалась доза гормона 0,01 мкг/мл, не оказывающего такого действия на клетки. Следует подчеркнуть сравнительно быстрое наступление стимуляции деления клеток *T. rugifolmis* (15 мин) под влиянием тироксина.

Действие тироксина на деление *T. rugifolmis* находится в зависимости от возраста культуры (табл. 3). В культуре, находящейся в логарифмической фазе роста, под влиянием гормона митотическая активность снижается, тогда как в стационарных культурах—повышается. При этом, чем больше возраст стационарной культуры, тем выраженнее стимулирующее действие тироксина.

Таблица 3  
 МИ (‰) культур разного возраста при действии тироксина, 0.01 мкг/мл

Возраст культуры, дни					
2		5		8	
контроль	тироксин	контроль	тироксин	контроль	тироксин
72,4	50,6 (−30‰) P=0,0001	33,0	45,4 (+38‰) P=0,001	23,2	47,3 (+104‰) P=0,0001

Примечание. См. примечание к табл. 2.

В литературе имеются данные как о стимуляции [15, 21, 29, 32], так и угнетении [37, 38, 40] клеточного деления у простейших гормоном щитовидной железы. Полученные нами результаты свидетельствуют о неодинаковом действии тироксина на культуру *T. rugiformis* в течение ее роста, что, возможно, связано с изменением чувствительности клеток к гормону и с отличиями их кинетики в разных фазах роста культуры. Быстрое наступление стимуляции деления клеток под влиянием тироксина позволяет думать о действии гормона на G<sub>2</sub>-фазу митотического цикла *T. rugiformis* либо путем сокращения продолжительности пребывания клеток в ней, либо вследствие перевода в деление клеток, задерживающихся в этой фазе. Первое предположение проверяли в опытах по изучению параметров митотического цикла *T. rugiformis* в условиях действия тироксина.

Графическое определение параметров митотического цикла по кривой меченых митозов (рис. 1а) показало, что в контроле—T=390, t<sub>G<sub>1</sub></sub>=154, t<sub>s</sub>=141, t<sub>G<sub>2</sub></sub> миним. =75 мин, а в опытной культуре—T=390, t<sub>G<sub>1</sub></sub>=217, t<sub>s</sub>=108, t<sub>G<sub>2</sub></sub> миним. =45 мин. Время митоза в обеих культурах считали равным 20 мин, поскольку именно такая продолжительность свойственна делению макронуклеуса [22, 34]. По литературным данным, для асинхронных культур *T. rugiformis* T=180—380 мин, t<sub>G<sub>1</sub></sub>=10—120 мин, t<sub>s</sub>=45—90 мин, t<sub>G<sub>2</sub></sub>=67—150 мин [17—19, 22, 25, 27, 30, 31, 34]. Результаты наших опытов свидетельствуют о том, что тироксин приводит к сокращению в клетках *T. rugiformis* t<sub>G<sub>1</sub></sub> и t<sub>s</sub> и к увеличению t<sub>G<sub>1</sub></sub> при неизменном T. Продолжительность генерационного периода культур была также определена по изменениям РИ и интенсивности мечения клеток в ходе опыта (рис. 1б и в). Отчетливое увеличение РИ и разведение метки в контрольной и опытной культурах наблюдалось после 405 мин от начала эксперимента, что близко к значениям T, полученным по кривой меченых митозов. Таким образом, увеличение МИ в культуре *T. rugiformis* при кратковременном воздействии тироксином может быть объяснено сокращением t<sub>G<sub>1</sub></sub>. Следует отметить, что в опытной культуре показатели митотической активности были более высокими по сравнению с контролем.

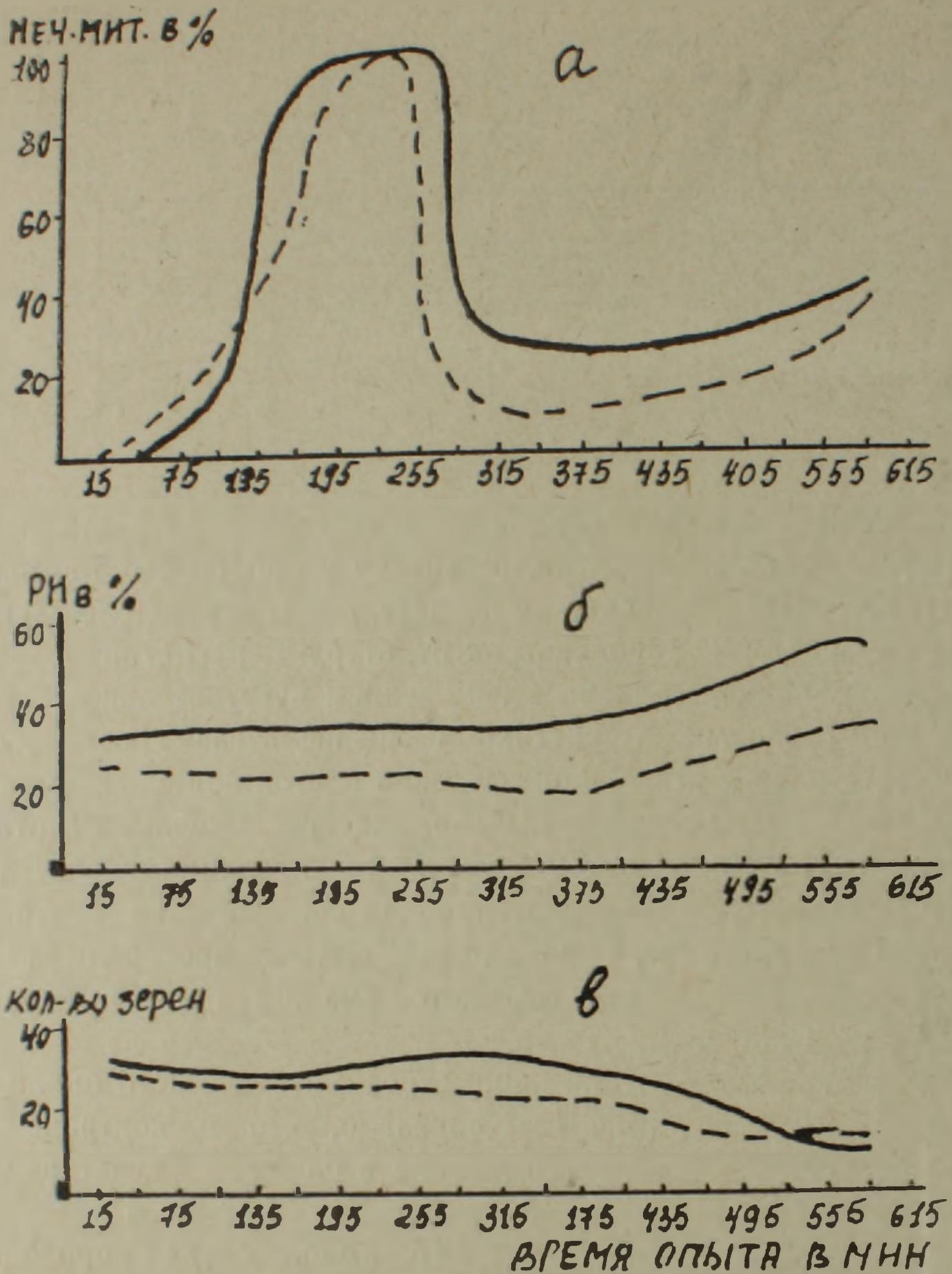


Рис. 1. а—кривые меченых митозов, б—изменения РИ, в—изменения интенсивности мечения интерфазных клеток в контрольной (сплошная линия) и опытной (штриховая линия) культурах *T. pyriformis*.

Средний МИ за 9,5 час. эксперимента составил 50 и 38% соответственно ( $p=0,003$ ). Больше количество делящихся клеток *T. pyriformis* в условиях пролонгированного действия тироксина может быть связано с уменьшением  $t_s$ . Но так как при этом не меняется  $T$ , то возможно предположение об увеличении митотической активности вследствие стимуляции тироксином вступления в митотический цикл клеток, находящихся в фазах покоя и не участвующих в обычных условиях пролиферации.

Из рис. 2 видно, что МИ в контрольной и опытной культурах в течение эксперимента не оставался постоянным (4 серия). Обнаружены достоверные ритмические изменения МИ с периодом 1,5—2,0 час. в кон-

троле и 2,0—2,5 час. в опытной культуре. Эти ритмические колебания МИ во времени не совпадали в контроле и опыте, и максимальные значения МИ в обеих культурах, как правило, приходились на разные часы суток. Поскольку указанные колебания МИ имеют сравнительно короткий период, то при наличии небольшой продолжительности G<sub>2</sub>-фазы у

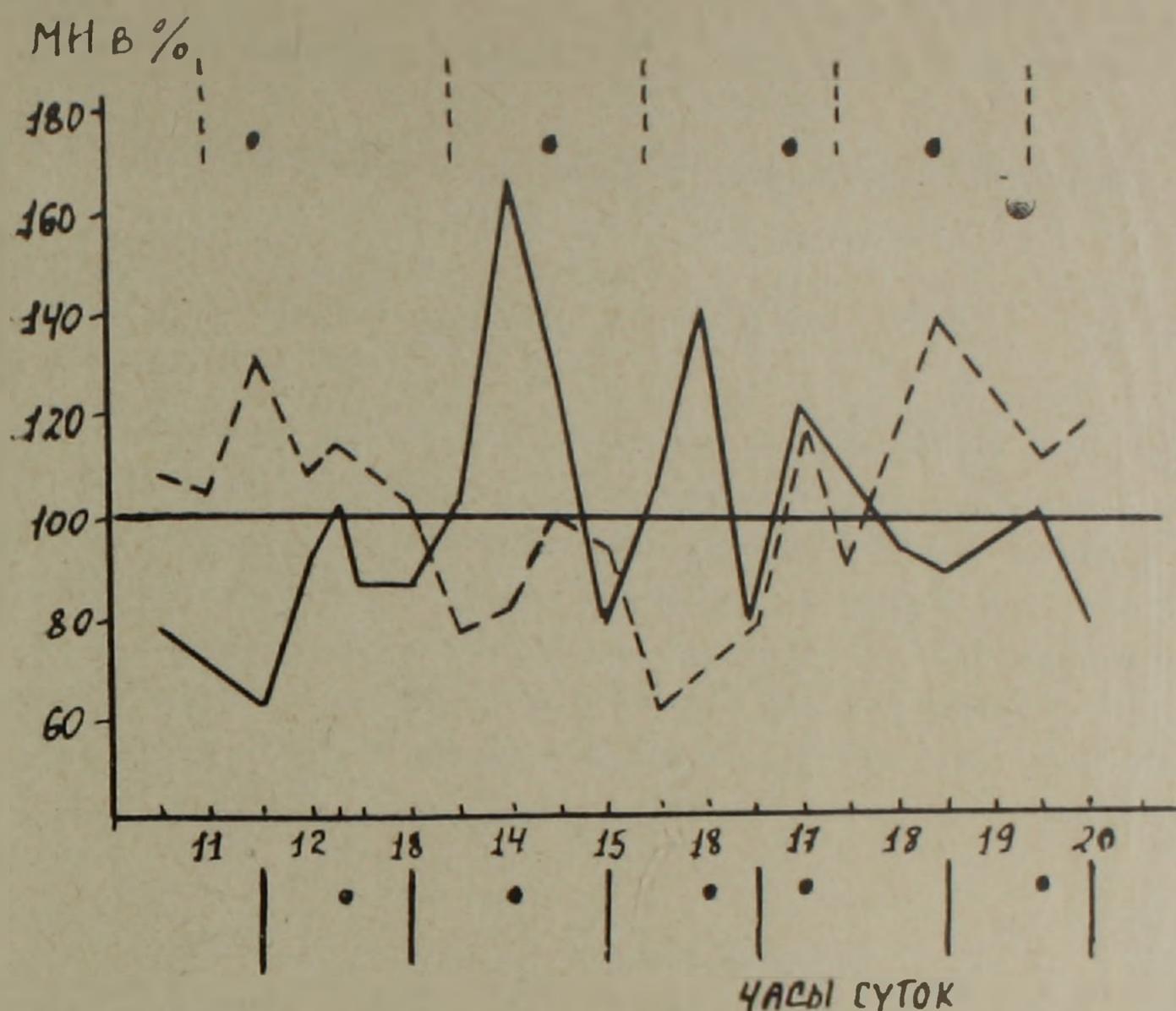


Рис. 2. Изменения МИ в % к средней величине в контрольной (сплошная линия) и опытной (штриховая линия) культурах *T. rugiformis* на протяжении эксперимента. Линии внизу иверху рисунка показывают продолжительность периодов изменения МИ соответственно в контрольной и опытной культурах. Темные кружки соответствуют времени суток, когда МИ в каждом периоде достигает максимальной величины.

*T. rugiformis* их можно объяснить либо существованием аналогичных изменений числа ДНК-синтезирующих клеток, либо периодичностью синхронизации вступления клеток в деление. Анализируя кривые на рис. 2, можно видеть, что помимо изменений МИ с коротким периодом, существуют более растянутые колебания числа делящихся клеток. Так, самые высокие значения МИ в контрольной культуре отмечены в 14 час., а наиболее низкие — в 11 час. 30 мин и в 20 час. В опытной культуре временная динамика МИ другая, поскольку максимальные величины его были в 11 час. 30 мин и в 18 час. 30 мин, а минимальные — в 15 час. 30 мин. Таким образом, помимо короткопериодических в контрольной и опытной культурах *T. rugiformis* наблюдаются изменения МИ с периодом, равным примерно 7,0—8,5 час., но фазы этого ритма в контроле и при воздействии тироксином не совпадают во времени суток. Для различных простейших в литературе, кроме того, описаны суточные ритмы клеточного деления [14, 23, 28, 35, 39]. Приведенные данные свидетель-

ствуют о том, что клетки простейших в процессе размножения способны к воспроизведению временных кодов различной частоты.

II Московский медицинский институт,  
кафедра биологии и генетики

Поступило 28.II 1974 г.

Յու. Ա. Ռոմանով, Տ. Վ. Սավչենկո, Վ. Պ. Ջարենկովա

Թիրոքսինի ներֆորտոթրոնիկ բջջաձև բաժանման եվ  
TETRAHYMENA PYRIFORMIS ՄԻԹՈՏԻԿ ՑԻԿԼԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Թիրոքսինի ազդեցությամբ ավելանում է միթոտիկ ակտիվությունը *T. pyriformis* ստացիոնար կուլտուրաների մեջ և բարձրացման աստիճանը կախված է օգտագործված հորմոնի խտությունից: Թիրոքսինի ազդեցությամբ փոքրանում են  $\lambda_2$  և  $\lambda_S$ -ը, իսկ գեներացիոն ժամանակի տևողությունը չի փոփոխվում: Ստուգիչ և թիրոքսինի ազդեցության տակ գտնվող կուլտուրաների մեջ հայտնաբերվել է միթոտիկ ինդեքսի ռիթմիկ փոփոխություն՝ 1,5—2,5 և 7—8,5 ժամ պարբերությամբ: Այդ ռիթմիկ փուլերը ստուգիչում և փորձում չեն համընկնում օրվա ժամերով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алов И. А. Очерки физиологии митотического деления клеток, М., 1964.
2. Лагучев С. С. Бюлл. exper. биол. и мед., 2, 93, 1971.
3. Маркелова И. В., Горюнова Г. Ф. Бюлл. exper. биол. и мед., 8, 93, 1971.
4. Рахматуллина И. К. Исследование внутрицикловых механизмов суточного ритма репродукции клеток и действия тироксина на G<sub>2</sub>-фазу митотического цикла. Канд. дисс., М., 1971.
5. Романов Ю. А. Некоторые вопросы суточной периодичности клеточного деления и действия гормонов на размножение клеток. Докт. дисс. М., 1969.
6. Романов Ю. А. и др. В кн. Регенерация и клеточное деление, М., 320, 1968.
7. Романов Ю. А. и др. Бюлл. exper. биол. и мед., 5, 91, 1969.
8. Романов Ю. А., Касавина Б. С. Там же, 9, 81, 1970.
9. Романов Ю. А., Рыбаков В. П. Там же, 11, 93, 1971.
10. Романов Ю. А. и др. В кн. Биология репродукции клеток, М., 7, 1972.
11. Рыбаков В. П. и др. Биология репродукции клеток, 114, 1972.
12. Эпова И. Е. В кн. Вопр. зоол. физиол. чел. и жив. 61, Хабаровск, 1966.
13. Эпова И. Е. Сб. Вопр. биол., вып. 2, 170, Тула, 1969.
14. Barnett A. Science, 164, 3886, 1417, 1969.
15. Budington R. A., Harvey H. F. Biol. Bull. Marine Biol. Labor., 28, 5:304, 1915.
16. Buknt H. J., Tobias C. A. Exp. Cell. Res., 60, 3, 445, 1970.
17. Cameron J. L. Nature (Engl.), 209, 5023, 630, 1966.
18. Cameron J. L., Gulle E. E. Jr. J. Cell. Biol., 24, 3, 845, 1965.
19. Cameron J. L., Stone G. E. Exp. Cell. Res., 36, 3, 510, 1964.
20. Carriere R. M. Anat. Rec., 156, 4, 423, 1966.
21. Cort G. T. Amer. J. Physiol., 65, 295, 1923.
22. Donald B. B. J. Cell. Biol., 13, 2, 193, 1963.

23. *Edmunds L. N. Jr.* Science, 145, 3629, 266, 1964.
24. *Idem.* J. Cell, a. Compar. Physiol., 66, 2, part 1, 231, 147, 1965.
25. *Hjelm R. R., Zeuthen E.* Exp. Cell. Res., 48, 1, 1967.
26. *Lee K. L. et. al.* Arch. Biochem. a. Biophys., 125, 3, 751, 1968.
27. *Mackeujie T. B. et. al.* J. Cell. Biol., 31, 3, 633, 1966.
28. *Mitchell J. L. A.* Planta, 100, 3, 244, 1971.
29. *Nowikoff M.* Arch. f. Protistenkunde, 11, 2—3, 309, 1908.
30. *Padilla G. M., Cameron J. L.* J. Cell. Physiol., 63, 3, 303, 1964.
31. *Rudick M. J., Cameron J. L.* J. Cell. Biol., 47, 2, part 2, 176, 1970.
32. *Shumway W. J.* Exp. Zool., 17, 2, 297, 1914.
33. *Siegel E., Tobias C. A.* Nature, 212, 5068, 1318, 1966.
34. *Sullivan W. D. Rice. M. F. M. Travos.* Amer. Microscop. Soc., 84, 1, 48, 1965.
35. *Sween B. M., Hasftngs J. W.* J. Protozool., 5, 217, 1958.
36. *Tasco C. et. al.* Rev. roum. endocrinol, 8, 4, 293, 1971.
37. *Torrey H. B.* Endocrinol., 12, 1, 65, 1928.
38. *Torrey H. B. et. an.* J. Gen. Physiol., 7, 1, 449, 1925.
39. *Volm M. Z.* Vergl. Physiol., 48, 2, 157, 1964.
40. *Woodruff L. L., Swingle W. W.* Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 20, 7, 386, 1923.