

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ  
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ  
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
Ж У Р Н А Л  
АРМЕНИИ

Журнал издается на армянском и русском языках

Այստանի քոնսլանական անձես

«Այստանի կենսաբանական հանգրուանը» հրատարակում է Հայաստանի ՍՍՀ Կրթութեան ներքին գործերի նախարարութեան և Գիտութեան բուսաբանութեան կենտրոնական ինստիտուտի, Գործադրական կենտրոնի, կենսաբանական ինստիտուտի, ճանաչողական զննարկատեղիի և բնագիտական կիրառական կենսաբանութեան այլ բնագիտական վերաբերյալ:

Բաժանորդագրին է ծա. 40 կ. Բաժանորդագրութեան ընդունվում է Մոսկուայից արտարժանացուցիչով:

«Биологический журнал Армении» публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, биофизике, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии.

Подписная цена за год 3 руб. 40 коп. Подписку на журнал можно производить по всем отделениям Союзпечати.

Խմբագրական կազմակազմ՝ է. Դ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Ե. Ազիտյան, Յոս. Բ. Ալեքսանյան, Հ. Գ. Բակլազյան, Ս. Ա. Գալստյան, Ժ. Ի. Հակոբյան, Ե. Ս. Հարությունյան (պատասխանատու քարտուղար), Մ. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Կազարյան, Պ. Ա. Ղանդրյան, Կ. Գ. Ղարաբաղյան, Ս. Մ. Մովսիսյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ):

Խմբագրական խորհուրդ՝ է. Դ. Աֆրիկյան (նախագահ), Ե. Ե. Ակրամովսկի, Վ. Ե. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ալեքսյան, Է. Ս. Կարրինյան, Ա. Ս. Կարյան, Ա. Հ. Թախտաջյան, Գ. Ա. Խորշոդյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Է. Լ. Հովսեփյան, Է. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Սաֆևոյան, Մ. Կ. Չալախյան, Կ. Ս. Փոկոսյան:

Редакционная коллегия: Э. К. Африкян (главный редактор), Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Акопян, Ю. Т. Алексанян, Е. С. Арутюнян (ответственный секретарь), Р. М. Арутюнян, О. Г. Баклаваджян, П. А. Гандилян, М. А. Давтян, В. О. Кизарян, К. Г. Карагезян, С. О. Мовсисян (заместитель главного редактора).

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. Н. Акрамовский, Э. Ц. Габриелян, А. А. Галоян, Л. С. Гамбарян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осянյан, К. С. Погосян, А. Л. Тахтаджян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

Պատասխանատու խմբագիր Ավագյան Ս. Մ.

Արտատպիչ Ք. Ա.

Технический редактор Авакян Ц. М.

Տպագրվում է թիվով 808,89 ր. Մուտքագրվում է թիվով 27,12,89 ր. ՎՓ 64303.

Բուրդա թիվ 1 Երևանից, 70X1050. Կտրված ցուցիչ, Մուտքագրվում է 10,75 ր. 5 ակտ

Մուտքագրվում է 15,75 ր. Մուտքագրվում է 13,56 ր. Թիվով 660, ՎՓ 470, Մուտքագրվում է 769 ր.

Դասիչի աստիճան: 375019, Երևան, թ. Մարշալա Բաղրամյան, 24 ր, կոմ. 11, տեղ. 56-01-97.

Իրատեսչական Գիտությունների Ազգային Գիտությունների Ազգային Գիտությունների

թ. Մարշալա Բաղրամյան, 24 ր.

Թիվագրատեսչական Գիտությունների Ազգային Գիտությունների

թ. Մարշալա Բաղրամյան, 24 ր.

Ք Ո Վ Ա Ն Գ Ա Կ Ո Ւ Ի Ք Յ Ո Ւ Ն

Կուրիլյուկ Ն. Վ., Մոլլանովա Ի. Վ., Կարավաևա Ե. Ն. Ն. Վ. Տիմոֆեև-Սեսազսկին և բրազիլացիները հայացքները մայրցամաքային ռադիոէկոլոգիայի սրբաբանների մշակման մեջ	296
Տյուրլուկանով Ա. Ն., Յլոզոբով Վ. Մ. Ուսմանը սկսնադարտի և մարդկությունից մասին—մուտքային վրա բնության կայունացման տեսություններ	801
Վերոնցով Ն. Ն. Մորֆոլոգիայի մեթոդոլոգիայի շուրջ	809
Լվանով Վ. Ի. Ժառանգական մոլեկուլներ. ուստոսպեկտիկ	818
Ուսիլի Ա. Վ., Բեկեզովսկայա Ն. Ն. Բեյզների կենդանի կամակարգի սպիտակուցների փոփոխականություններ և էնդոլիտիցիան	822
Կաբալովիճա Վ. Լ., Կաբոզովիճա Ի. Ի., Սիմոնյան Ն. Վ., Յայսի Կ. Կուրիլյուկանոսի միջավայրի բաղադրության ազդեցություններ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> խմորանկների սպունտան մուտանտների էջրի հաճախականության վրա	829
Պետին Վ. Գ. Բեյզների ռադիոազդեցության մոդիֆիկացիայի արդյունավետության գիծաբանական դետերմինացիան	835
Խումանովա Օ. Վ., Ուստովով Պ. Գ. <i>Fisavi-1</i> գենի տարրեր ալելային վիճակների ազդեցություններ մի շարք մորֆոլոգիական նշանների փոփոխականության և ժլորոպլաստների ուտրարկոստիցիաթային կազմակերպման վրա <i>Arabis (Crepis) hibernica</i> (L.) Heywood ձև	854
Գիլյանո Ն. Յա., Մալինսկայի Ս. Վ., Խաիր Մ. Ս. Բեյզների պոլիպլոիդիզացիայի ինդուցիան մեխանիզմների մասին	862
Գլազովսկայա Ա. Վ. Դեժ-ի նրկվելի ճեղքերի ուստարացիայի ռեկոմբինացիան ուղիների փոխհարաբերության մասին պրո. և էտիմոլոգիաների շեյքներում	859
Սարապուլցև Ք. Ի., Դեմսկիճ Ս. Ա. Կենոմի էվոլյուցիան և արգանիքմների դիֆերենցիացիան ըստ ռադիոնոկլիստեկոսիայի	866
Սելչենկո Վ. Ա. Վիսրի գենետիկական Տեսանքները Պոնտորիի ԱՆԿ-ում	875
Մոսսև Ի. Ք. Կետային և բրոմոստեյին մուտացիաների կազմավորման առանձնահատկությունները (ուստարիտներում)	878
Գիլի Զու. Ա. Յատոսիլիստիկ աուարացի պիզմենաային ուստակարգի մոլեկուլյար կազմակերպման մուտացիան փոփոխականություններ	890
Վոլյովայա Ն. Ա., Սիբեցովա Ս. Ա., Գեյլն Ա. Ս. Բրոմոստեյների կայունության և միտոչանգրիայ գենոմի ընդհանուր նկարագրությունը շաբարանկների մոտ	900
Վավրով Զու. Ի., Տարոնիճա Օ. Վ. Խմորանկները որպես մաղկ մուտագենների ուստմասիրության համար	903
Նարայանյան Ռ. Մ., Նիրիկյան Գ. Ս., Մարտիրոսյան Կ. Յու., Սիչուր Ն. Ն., Վազարյան Ա. Ն. Պատմական Հայաստանի տարածքից՝ Բայազետից՝ դաղիածները (Կամոյի շրջանի ժամանակակից բնակիչներ) աուարպոզենետիկական ուստմասիրությունները	909
Մուրկեյցան Է. Գ., Բեկյարյան Ն. Պ. Ֆրոնտոմաների աուտիվության մոլեկուլյար-գենետիկական աուպեկտները միկրոսոբանիզմների համակարգերի վրա	914
Տոնայան Ս. Ա., Սաղարեյան Ռ. Ա., Ավաղյան Ն. Մ., Ավաղյան Ս. Մ., Աուսեյլյան Վ. Ք., Ջաեփոլադյան Ն. Լ., Սիմոնյան Ն. Վ., Սաեփանյան Լ. Գ. Մանրէների գենետիկական կորստի մեխանիզմը էնդոպլասմիկ զաշտում	918
Ջաուրյան Ռ. Ա., Շոփեփյան Պ. Ա., Աուսեյլյան Ա. Գ. Դեժ-ի և Ռեժ-ի սպեցիֆիկ ռեկոմբինացիայի շարքի բեյզների պարամետրիկ թազանքի վրա	923
Նաև Շենյուր, Եվազարյան Է. Մ. Լճագորտերը ( <i>Ranidae: Rana ridibundus</i> ) կենսաաուտիվ Տեսազոտությունները Հայաստանում որպես ներդրում արևելյան տիպի աուարման աուստմասիրության մեջ	929

Ստեփանյան Ա. Ս., Մարգարյան Ա. Գ., Սույեյմանյան Մ. Ա., Առաքելյան Վ. Բ., Ռիչ- կով Գ. Ե., Հայրապետյան Ա. Ն. <i>Helix</i> նեյրոնի Բաղանթի կալիումական հազոր- դականության քանակական բնութագրումը ջրի տրանսմեմբրանային հոսքի անկա- յությունում	935
Իզիկյան Ն. Մ., Բակլավաբյան Օ. Գ. Գազաթի կեղևի էֆերեստների բաշխումը գետ- կային դաշտում	942
Գավրյան Ա. Մ., Վաղդանյան Ա. Օ., Հովսեփյան Լ. Մ., Կարապետյան Կ. Գ. Առնետ- ների սյարդի քրոմատինի ֆոսֆորիլիզների որակական և քանակական փոփոխու- թյունները	948
Աղաբաբյան Ա. Մ., Նավասարդյան Ե. Մ., Աղամյան Կ. Ս. Տոմատի միզոսեպակային հիբ- րիդների ֆենոտիպային փոփոխությունները՝ կախված ծնողական ձևերի ինքնա- ֆերտիլիտից մակարդակից	949
Ավետիսյան Ա. Ա., Մելիքյան Գ. Ս., Աղոլունյան Ս. Ա. Զհազեցած Թիագալային ֆրագ- մենտ պարունակող շաղկապների սինթեզը և ազդեցությունը բանջարեղենային կուլտուրաների աճի և զարգացման վրա	956

ՀՐԱՏՈՒՒ

Ավագյան Ռ. Մ. 1 Համամիթիբենական ուղիղկենսաբանական համալսումարը	960
----------------------------------------------------------------	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Кудиков Н. В., Молчанова И. В., Караваева Е. И., Н. В. Тимофеев-Ресовский и биогеоценологические идеи в разработке проблем континентальной радиоэкологии	795
Тюрюканов А. Н., Федоров В. М. Учение о «биосфере и человечестве» — теории стабилизации природы на планете	801
Воронцов Н. Н. К методологии морфологии	809
Иванов В. И. Наследственные молекулы: ретроспектива	818
Савич А. В., Берггольская Н. И. Эволюция и изменчивость белков энергетической системы клеток	822
Корогодина В. Л., Корогодин В. И., Симомян Н. В., Файси Ч. Влияние состав- а среды культивирования на частоту спонтанного мутирования дрожжей	829
Петин В. Г. Генетическая детерминация эффективности модификации радиочув- ствительности клеток	835
Усманова О. В., Усманов П. Л. Действие различных аллельных состояний гена <i>flacI-1</i> на изменчивость ряда морфофизиологических признаков и ультра- структурной организации хлоропластов <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	845
Гильяко Н. Я., Малиновский О. В., Хаир М. Б. О механизмах индуцированной полиплоидизации клеток	852
Глазунов А. В. О соотношении рекомбинационного и нерекомбинационного пу- тей репарации двунигетных разрывов ДНК у клеток про- и эукариот	859
Сирапульцев Б. И., Гераськин С. А. Эволюция генома и дифференциация орга- низмов по радиорезистентности	866
Шевченко В. А. Генетические последствия аварии на Чернобыльской АЭС	875
Моссэ И. Б. Особенности формирования точковых и хромосомных мутаций у зу- кариот	878
Гиллер Ю. Е. Мутационная изменчивость молекулярной организации пигментной системы фотосинтетического аппарата	890
Колтуева Н. А., Смирнова М. Е., Денин А. Б. Общий контроль стабильности хромосом и митохондриального генома у сахаромикетов	900
Павлов Ю. И., Тарунина О. В. Дрожжи как модель для изучения мутагенов	903
Арутюнян Р. М., Ширинян Г. С., Мартиросян К. Ю., Кочар Н. Р., Казарян А. А. Антропогенетическое исследование потомков выходцев с территории Исто- рической Армении, Ваязет (жители с. Норадуз района им. Камо)	909
Мугнецян Э. Г., Бегларян Н. П. Молекулярно-генетические аспекты активности фитогормонов на модельных системах микроорганизмов	914

<i>Тоноян С. А., Сагателян Р. А., Авакян Г. М., Авакян П. М., Аракелян В. Б., Джанколадян Н. Л., Симонян Н. В., Степанян Л. Г.</i> Механизм гибели микроорганизмов в электрическом поле	919
<i>Захарян Р. А., Овсепян В. А., Аракелян А. Г.</i> Специфическая рецепция молекул ДНК и двуспиральной РНК на плазматической мембране клеток печени	923
<i>Гинц Шнейдер, Есмазян Э. М.</i> Биоакустические исследования озерных лягушек ( <i>Ranidae: Rana ridibunda</i> ) в Армении как вклад в изучение распространения восточной формы	926
<i>Степанян А. С., Маркарян А. Г., Сулейманян М. А., Аракелян В. Б., Рычков Г. Е., Айрапетян С. Н.</i> Количественное описание калиевой проводимости нейрональной мембраны <i>Helix</i> при трансмембранном потоке воды	935
<i>Ипекчян Н. М., Бакаваджян О. Г.</i> Распределение эфферентов семенной коры и поясной извилины	942
<i>Давтян А. М., Варденисян А. О., Овсепян Л. М., Карагесян К. Г.</i> Качественные и количественные сдвиги фосфолипидов хроматина печени крысы	946
<i>Агаджанян А. М., Павасардян Е. М., Адамян К. С.</i> Фенотипическая изменчивость у межвидовых гибридов томата в зависимости от уровня самофертильности родительских форм	949
<i>Аветисян А. А., Меликян Г. С., Согомонян С. А.</i> Синтез и действие непредельных $\gamma$ -лактонов с гиазольными фрагментами на рост и развитие опонных культур	956

#### ХРОНИКА

<i>Авакян Ц. М.</i> I Всесоюзный радиобиологический съезд	960
-----------------------------------------------------------	-----

#### CONTENTS

<i>Kullikov N. V., Molchanova I. V., Karavayeva Ye. N. N. V. Timofeyev—Resovskii and Biogeocenological Ideas in the Elaboration of Problems of Continental Radioecology</i>	795
<i>Tyuryukanov A. N., Fyodorov V. M.</i> Teaching on "Biosphere and Humanity"—Theory of Nature Stabilization on the Planet	801
<i>Vorontsov N. N.</i> To the Methodology of Morphology	809
<i>Ivanov V. I.</i> Hereditary Molecules: Retrospective	818
<i>Savich A. V., Beregovskaya N. N.</i> Evolution and Variability of Proteins of the Cells Energetic System	822
<i>Korogodina V. L., Korogodina V. L., Simontan N. V., Fatsi Ch.</i> Influence of Cultivation Medium Composition on Spontaneous Mutation Frequency of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Yeasts	829
<i>Petlin V. G.</i> Genetic Determination of Efficiency of Cells Radiosensitivity Modification	835
<i>Usmanova O. V., Usmanov P. D.</i> Activity of Various Allelic States of Gene <i>Flavl</i> —I upon the Inconstancy of a Number of Morphophysiological Signs and the Ultrastructural Organization of Chloroplasts in <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	845
<i>Gilyano N. Ya., Malinowski O. V., Khair M. B.</i> On the Mechanisms of Induction of the Cells Polyploidization	852
<i>Glazunov A. V.</i> On the Correlation of Recombination and Non-Recombination of Reparation Ways of DNA Double Helix Gaps in the Cells of Pro- and Eucaryotes	859
<i>Sarapultsev B. I., Geraskin S. A.</i> Evolution of Genome and Differentiation of Organisms by Radioresistance	866
<i>Shevchenko V. A.</i> Genetic Consequences of Catastrophe in Chernobyl AES	875
<i>Mossa I. B.</i> Peculiarities of Formation of Point and Chromosomal Mutations in Eucaryotes	878
<i>Gitter Yu. Ye.</i> Mutation Variability of Molecular Organization of Photosynthetic Apparatus Pigment System	870

<i>Koltovaya N. A., Smirnova M. Ye., Dezin A. B.</i> Common Control of Chromosomes Stability and Mitochondrial Genome in Saccharomycetes . . . . .	900
<i>Pavlov Yu. I., Tarountina O. V.</i> Yeasts as a Model for the Study of Mutagenes . . . . .	903
<i>Arutyunyan R. M., Shirintan G. S., Martirosian K. Yu., Kochar N. R., Kazaryan A.A.</i> Anthropogenetic Investigation of Populations with Origin from the Territory of Historical Armenia. Bayazet (Modern Inhabitants of Kamo Region) . . . . .	909
<i>Mugnetstan E. G., Hegharian N. P.</i> Molecular-Genetic Aspects of Phytohormones Activity on the Systems of Microorganisms . . . . .	914
<i>Tonoyan S. A., Saghatelian R. A., Avakian H. M., Avakian Ts. M., Arakelian V. B., Janpoladian N. I., Smonian N. V., Stepantan L. G.</i> Mechanism of Death of Microorganisms on the Electric Field . . . . .	919
<i>Zakarian R. A., Hovsepian P. A., Arakelian A. G.</i> Specific Reception of Molecules of DNA and $\alpha$ sRNA on the Plasmatic Membrane of Liver Cells . . . . .	923
<i>Ilans Shneider, Yeghazarian E. M.</i> Bioacoustic Investigations of Lake Frogs ( <i>Rana ridibunda</i> ) in Armenia as a Contribution to the Study of Distribution of the Eastern Form . . . . .	926
<i>Stepanian A. S., Margarian A. G., Suleymanian M. A., Arakelian V. B., Richkov G. Ye., Hairapettian S. N.</i> Quantitative Description of Potassium Permeability in the <i>Helix</i> Neuronal Membrane in the Presence of Transmembrane Water Flux . . . . .	935
<i>Jpekhtian N. M., Baklavajian O. G.</i> Distribution of Efferents of Top Cortex in the Gyrus Cluguli . . . . .	942
<i>Davtian A. M., Vardevanian A. O., Hovsepian L. M., Karageuzlan K. G.</i> Qualitative and Quantitative Changes of Phospholipids of Rats Liver Chromatin . . . . .	946
<i>Aghojanian A. M., Navasardian E. M., Adamian K. S.</i> Phenotypic Changeability in Interspecific Hybrids of Tomato Depending on Level of Self-Fertility of Parental Forms . . . . .	949
<i>Avetisyan A. A., Melkian G. S., Soghomontan S. A.</i> Synthesis and Influence of the Unlimited $\gamma$ -Lactones with Thiazole Fragments on the Growth and Development of Vegetable Cultures . . . . .	956
<b>CHRONICS</b>	
<i>Avakian Ts. M.</i> The I All-Union Radiobiological Congress . . . . .	960

## Н. В. ТИМОФЕЕВ-РЕСОВСКИЙ И БИОГЕОЦЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ИДЕИ В РАЗРАБОТКЕ ПРОБЛЕМ КОНТИНЕНТАЛЬНОЙ РАДИОЭКОЛОГИИ

Н. В. КУЛИКОВ, Н. В. МОЛЧАНОВА, Е. Н. КАРАБАЕВА

Институт экологии растений и животных УрО АН СССР, г. Свердловск

Նաբարգրվում են ԽՍՀՄ ԳԱ Սերովի բաժանմունքի բույսերի և կենդանիների էկո-  
լոգիայի ինստիտուտում կատարված ադիոէկոլոգիական էկոագոցենոցիւնների  
զարգացման հիմնական աղյուցները: Նշվում է ն. Ս. Տիմոֆեև-Քեսովսկու ներ-  
դրումը ադիոէկոլոգիայի բնագիտական և մայրցամաքային ադիոէկոլոգիայի  
ինչորի մշակման մեջ:

Main results of development of radioecological studies in the Institute of  
Plants and Animals Ecology of Ural Branch of the AS of the USSR have  
been stated. The contribution of N. V. Timofeyev—Resovskii to the elabo-  
ration of problems of radiation biogeocenology and continental radioeco-  
logy is underlined.

Одним из признанных центров, где в 50-е годы под руководством  
Н. В. Тимофеева-Ресовского проводились первые в нашей стране радио-  
экологические исследования, является Институт экологии растений и  
животных УрО АН СССР. Пропагандируя идеи В. В. Докучаева, В. И.  
Вернадского, В. Н. Сукачева, а также учитывая опыт пековых наблю-  
дений за губительными действиями на окружающую среду отходов про-  
мышленных производств, Н. В. Тимофеев-Ресовский в эти годы ставит  
несьма серьезную проблему быстрого и полного изучения всех вопро-  
сов, связанных с возможностью воздействия бурно развивающейся  
этомной промышленности на биосферу. При этом он подчеркивает,  
что «любая достаточно широкая проблема о воздействии человека и  
его промышленной деятельности на окружающую природу должна в  
настоящее время ставиться на основе созданного В. И. Вернадским  
общего учения о биосфере» и биogeоценологических идей В. Н. Сука-  
чева [11].

В этой связи проблема взаимодействия живых организмов друг с  
другом и со средой обитания в условиях радиоактивного загрязнения в  
общих чертах сводится к изучению поведения радиоактивных веществ  
в различных компонентах биосферы и оценке действия понизирующих  
излучений на живые организмы. Такие исследования проводились в  
рамках сформулированной Н. В. Тимофеевым-Ресовским экперимен-  
тальной биogeоценологии, которую впоследствии он предложил назвать  
радиационной биogeоценологией. Радиоактивные изотопы рассма-  
тривались при этом в основном в качестве «меченых атомов» для изучения

судьбы химических элементов в биогеоценозах, а ионизирующие излучения — в качестве легко дозируемого фактора воздействия на организмы и их сообщества [12]. Основной экспериментальной базой служила биофизическая станция «Миассово», расположенная на территории Ильменского государственного заповедника им. В. И. Ленина в Челябинской области. Тогда на этой станции были проведены первые радиоэкологические исследования Г. Г. Поликарповым, создавшим затем школу морских радиоэкологов в Институте биологии южных морей АН УССР; А. А. Передельским, сформировавшим радиоэкологическую группу в Институте эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР. Здесь начинали свои первые работы сотрудники Коми научного центра УрО АН СССР, где сформировался известный радиоэкологический центр по изучению природных биогеоценозов, загрязненных естественными радионуклидами. В «Миассово» трудились научные сотрудники ЗИН АН СССР и других научных учреждений Ленинграда. Таким образом, работы, проводившиеся на Урале, стимулировали возникновение радиоэкологических центров в других регионах страны.

На первом этапе этих исследований И. В. Тимофеевым-Ресовским с сотрудниками были проведены многочисленные экспериментальные работы по изучению поведения ряда химических элементов в простых системах почва—раствор, почва—растение, вода—грунт, вода—гидробионты. В основу этих исследований был положен принцип аналитического редукционизма, состоящий в сознательном расчленении сложных природных систем на ряд более простых. Рассмотрение таких простых систем начиналось с выделения и изучения в них причинно-следственных связей. В простой системе их число невелико, они в ней резко проявляются и более доступны для изучения, что и позволило выявить основные факторы и механизмы, управляющие миграционной способностью радионуклидов. В результате были получены первые представления о скоростях и полноте поглощения разных радионуклидов в почвах и водных грунтах, прочности их фиксации в этих объектах, степени подвижности в первичных экологических звеньях и влияния некоторых физико-химических и экологических факторов на эту подвижность.

Существенное место отводилось изучению роли живых организмов в накоплении радионуклидов и их перераспределении по основным компонентам биогеоценозов. Для количественного сравнения накопительной способности организмов широко использовалось понятие коэффициента накопления — величины, равной отношению концентрации данного радионуклида в организме и его концентрации в среде при установлении равновесия. Было показано, что пределы накопления радионуклидов чрезвычайно широки как для разных видов организмов, так и для разных радионуклидов [13]. Практически по каждому изученному нуклиду двух десятков химических элементов были выделены виды живых организмов с особенно высокими и особенно низкими коэффициентами накопления. Виды, характеризующиеся наиболее высокими коэффициентами накопления, были названы специфическими накопителями, а для их вычленения был предложен объективный формаль-

ный критерий — отклонение коэффициента более чем на 4σ от среднего арифметического значения, установленного для соответствующего вариационного ряда. В плане поиска и выделения таких специфических накопителей особенно подчеркивалась роль организмов — пионеров образования коры цветствования и формирования почвенного покрова — бактерий, низших грибов, водорослей, лишайников. В последующем такие организмы — специфические накопители того или иного радионуклида — стали использоваться в качестве биоиндикаторов радиоактивного загрязнения окружающей среды. К числу наиболее удобных видов-индикаторов загрязнения почвенно-растительного покрова были отнесены представители мхов, лишайников, мхов сосны и других мховых пород, слой хорошо разложившейся лесной подстилки. Преимущество такой биоиндикации состоит в том, что она, основываясь на высокой концентрирующей способности живых организмов, позволяет в ряде случаев исключить трудоемкие работы по отбору, подготовке и анализу больших объемов воды, почв и других компонентов наземных и водных экосистем с низким содержанием в них радионуклидов. С учетом высокой накопительной способности водных растения и грунтов была также обоснована возможность использования слабопотоковых подтоков-отстойников для доочистки малорадиоактивных сбросных вод промышленных предприятий. Кроме того, в те годы были проведены многочисленные эксперименты по изучению сравнительной радиочувствительности более чем ста видов и сортов растений. На большом фактическом материале подтверждено стимулирующее действие относительно малых доз ионизирующей радиации на рост и развитие растений и дана первая попытка теоретического объяснения механизма этого явления. В специальных опытах с искусственными сообществами наземных растений, почвенных микроорганизмов и пресноводным перифитоном было показано, что при относительно малых дозах лучевого воздействия имеет место некоторая общая стимуляция этих сообществ без заметной их перестройки, а при высоких дозах облучения происходят глубокие нарушения видового состава сообществ и их структуры. Основные результаты исследований за этот период были опубликованы в серии первых выпусков трудов Института [9, 10].

Широкомасштабные испытания ядерного оружия в 60—70-х годах обусловили переход к собственно радиоэкологическим исследованиям, связанным с изучением процессов миграции и биологического действия нуклидов в реально существующих природных экосистемах суши и внутренних водоемах. Такие работы проводились в основном с долгоживущими радионуклидами, поступающими на земную поверхность в составе глобальных радиоактивных выпадений, а сами радионуклиды стали рассматриваться в качестве самостоятельного объекта исследований. В этих работах, помимо развития и расширения наметившихся представлений, были получены данные, характеризующие поведение радионуклидов в водоемах различной глубины, определены уровни содержания долгоживущих радионуклидов в основных компонентах пресноводных водоемов: воде, донных отложениях, рыбах, водной растительности. Установлена зависимость накопления радио-

нуклидов и организме разных видов рыб от их возраста, пола и сезона года. Количественно оценен переход радионуклидов из организма рыб в потомство с икрой, отмечена роль отмирающей водной растительности в накоплении радионуклидов [2, 3, 6].

В наземных экосистемах проведены работы по изучению миграции и распределения  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{137}\text{Cs}$  в почвенно-растительном покрове различных элементов тундрового и горно-лесного ландшафта на Северном и Южном Урале. В подобного рода исследованиях широко применялся системный подход, базирующийся на идее классиков современного естествознания о взаимосвязи между живыми и косными компонентами природной среды, а также между участками природной среды или, как их назвал Н. В. Тимофеев-Ресовский, элементарными биохорологическими единицами современной биосферы. При проведении радиоэкологических исследований с помощью системного метода выделяли определенные участки ландшафта, локализующиеся на сопряженных по стоку элементах рельефа. Изучение таких участков позволяет выявить зоны рассеяния и вторичной аккумуляции химических элементов (радионуклидов) в природной среде. Существенным компонентом природной среды является почвенно-растительный покров. Именно он служит первым экраном на пути поступления радиоактивных веществ из атмосферы на земную поверхность. При этом почвы, в которых совершаются процессы вторичного синтеза и деструкции огромного количества веществ биогенной природы, а также различного рода биогеохимические и биоэнергетические превращения, становятся основным депо радионуклидов. Эта гонкая, наиболее насыщенная жизнью оболочка биосферы является вместе с тем и наиболее чувствительной к повреждающим лучевым воздействиям в случае радиоактивного загрязнения. Все эти обстоятельства послужили причиной тому, что в рамках сформулированной в это время концепции континентальной радиоэкологии как радиоэкологии наземных биогеоценозов и внутренних водоемов значительное место отводилось радиоэкологическим исследованиям почвенно-растительного покрова [4].

Вместе с этим были продолжены радиобиологические исследования, в которых изучалась сравнительная радиочувствительность основных лесобразующих пород Урала на ранних этапах развития и впервые было показано, что относительно малые дозы радиации (в диапазоне доз, стимулирующих рост и развитие растений при предпосевном облучении семян) оказывают радиозащитное действие при последующем их облучении в сублетальных дозах [1].

В целом огромный эмпирический материал и опыт радиоэкологии позволил дать общую сравнительную картину миграции, распределения и биологического действия радионуклидов в объектах природной среды. Наряду с этим, на основании данных всех предшествовавших исследований был сформулирован фундаментальный вывод о том, что природную среду нельзя рассматривать в качестве пассивного разбавителя радиоактивных загрязнений. В силу своих структурно-функциональных особенностей и физико-химических свойств природные экосистемы способны перераспределять радиоактивные вещества по со-

ставляющим их компонентам, в результате чего концентрация радионуклидов и соответственно дозовые нагрузки облучения в отдельных звеньях этих систем могут достигать высоких значений. Как правило, вследствие концентрирующей функции живых организмов такими звеньями являются места максимального скопления органических остатков — верхние горизонты почв, донные отложения водосмов, места детрита и сапротелеобразования [5]. Эти особенности экосистем необходимо учитывать при нормировании и прогнозировании содержания радионуклидов в компонентах суши и водоемов.

На современном этапе континентальной радиоэкологии разрабатываются проблемы, связанные с задачами развития ядерных технологий и атомной энергетики. На этом этапе в радиоэкологические исследования все шире вовлекаются введенные нейтронами радионуклиды, а также естественные и трансураниевые нуклиды, сопутствующие ядерному топливному циклу. Кроме того, быстрый рост атомной энергетики влечет за собой значительное увеличение радиоактивных отходов, определенная часть которых, даже при нормальной работе предприятий ядерного топливного цикла, может проникать в окружающую природную среду. В настоящее время можно выделить следующие области атомной промышленности и технологии, развитие которых требует «вернадскологического» подхода: 1) добыча и переработка ядерного горючего; 2) атомная энергетика и реакторостроение; 3) ядерные взрывы; 4) захоронение радиоактивных отходов и рекреационные работы в санитарно-защитных зонах АЭС; 5) ядерные инциденты военного характера; 6) использование минеральных удобрений, технологических отходов и шахтных вод предприятий горнодобывающей промышленности в сельском хозяйстве.

Для решения ряда общих проблем радиоэкологии и в связи с задачами развития атомной энергетики в районе Белоярской АЭС была построена в 1980 г. и пущена в эксплуатацию Биофизическая станция Института экологии растений и животных УрО АН СССР. На базе этой станции проводятся систематические радиоэкологические исследования наземных, водных и околоводных экосистем в зоне Белоярской АЭС, идейную и теоретическую основу которых заложил Н. В. Тимофеев-Ресовский.

За истекшие годы было установлено, что с точки зрения возможных экологических и гигиенических последствий среди поступающих во внешнюю среду радионуклидов в районе Белоярской АЭС наибольший интерес представляют  $^3\text{H}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{137}\text{Cs}$ . Эти радионуклиды в основном в виде слаборадиоактивных вод сбрасываются в определенные участки природных экосистем и частично в Белоярское водохранилище, используемое в качестве водоема-охладителя. Следует отметить, что 20-летняя эксплуатация АЭС не привела к превышению допустимых уровней содержания радионуклидов в основных компонентах Белоярского водохранилища. Однако повышение температуры в зоне сброса подогретой воды привело к возрастанию накопления отдельных радионуклидов водными растениями, донными отложениями и грунтами примерно на порядок величины, а в рыбах — в 2—3 раза по сравнению с други-

ми участками водоема. Сброс дебалансных вод в природную болотно-речную экосистему привел к формированию зон концентрации  $^{137}\text{Cs}$ , в которых содержание этого нуклида превышает контрольные участки в десятки раз по воде и на два порядка величины по донным отложениям [5, 8]. В течение последнего десятилетия продолжен цикл работ по изучению сравнительной радиочувствительности лесобразующих пород Урала. При этом основное внимание уделяется модифицирующему действию на радиочувствительность сопутствующих факторов среды — влажности, длительности хранения, температуры, условий произрастания, предварительного облучения семян ионизирующей радиацией [7].

Изложенный материал показывает, что радиозкологические исследования, у истоков которых стоял Н. В. Тимофеев-Ресовский, способствуют как более глубокому познанию структурно-функциональной организации экологических систем, так и решению проблем по созданию рациональных взаимоотношений между развивающейся промышленностью и биологическими продуктивными силами Земли. Эти проблемы в основе своей являются биогеоэкологическими и стратегия их решения должна строиться на основе современных представлений о биосфере и биологических процессах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Действие ионизирующих излучений на гидробионты и наземные растения УНЦ АН СССР, вып. 74, 98, Свердловск, 1970.
2. Куликов Н. В., Куликова В. Г. Экология, 5, 45—50, 1977.
3. Куликов Н. В., Куликова В. Г., Бергголова Э. И. Экология, 1, 48—52, 1972.
4. Куликов Н. В., Молчанова И. В. Континентальная радиозкология, 184, М., 1975.
5. Куликов Н. В., Чеботкина М. Я. Радиозкология пресноводных биосистем, 127, Свердловск, 1988.
6. Любимова С. А. Автореф. канд. дисс., 16, Свердловск, 1971.
7. Модификация лучевых поражений семян растений, 62, Свердловск, 1983.
8. Молчанова И. В., Караашева Е. Н., Куликов Н. В. Экология, 5, 30—34, 1985.
9. Сб. работ лаборатории биофизики (Тр. Ин-та биологии УФАИ СССР), 9, 220, Свердловск, 1957.
10. Сб. работ лаборатории биофизики (Тр. Ин-та биологии УФАИ СССР), 13, 86, Свердловск, 1960.
11. Тимофеев-Ресовский Н. В. Радиоактивные загрязнения биосферы и меры борьбы с ними. (Тр. Ин-та биологии УФАИ СССР), 22, 7—16, Свердловск, 1962.
12. Тимофеев-Ресовский Н. В. Некоторые проблемы радиационной биогеоэкологии (Докл. для защиты ученой степени доктора биол. наук), 51, Свердловск, 1962.
13. Тимофеева-Ресовская Е. А. Распределение радионуклидов по основным компонентам пресноводных водоемов, 78, Свердловск, 1963.

Поступило 26.VI 1989 г.

## УЧЕНИЕ О «БИОСФЕРЕ И ЧЕЛОВЕЧЕСТВЕ»—ТЕОРИЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ПРИРОДЫ НА ПЛАНЕТЕ

А. И. ТЮРЮКАНОВ, В. М. ФЕДОРОВ

ВНИИ Природа, (Ин-т охраны природы и заповедного дела), Москва

Հիստորիական և ժամանակակից այլ դժուրալ խնդիրների պատճառներից մեկն է հանդիսանում գիտության մեջ մտածողության ֆիզիկա-տեխնոլոգիական տիպի գերիշխումը, որի հիման վրա մշակվում են բնական պաշարների արագացված սպառման արդյունաբերական տեխնոլոգիաները: Չլուրալ խնդիրների վերացման կարևորագույն նախապայման է հանդիսանում անցումը մտածողության կենտրոնաշին տիպին, ըստ որի կենտրոնի գործելու և զարգացման օրենքները պետք է հատարեն նասարակական արտադրության րովանդակության, ուղղվածության և անմպելքի կարգավորիչների վեր կենտրոնի կազմակերպվածության բարձր մակարդակի պահպանումը, մոլորակի կանաչ և հողաշին ծածկի հզորության աճը, բարձր խտության պահպանումը, կենդանի նյութի գործունեության ինտենսիվացումը և բազմազանությունը իրենցից ներկայացնում են «կենտրոնը և մարգագլխունը» համակարգի հետագա էվոլյուցիայի անհրաժեշտ նոտություններ:

One of the reasons of ecological and other global problems of the present is the domination of physico—technological mode of thinking in science, on the basis of which industrial technologies of accelerated consumption of natural resources are worked out. A more important ground for getting rid of global problems becomes the transition to biospheric mode of thinking, according to which the rules of functioning and development of biosphere must play the role of regulators of content, direction and rates of public production. The supporting of high level of biosphere organization, the increase of power of green and soil cover of the planet, the preservation of high density, diversity and the intensification of activity of living substance are necessary conditions for further evolution of the "biosphere and humanity" system.

К концу прошлого века научная мысль подошла к решающему рубежу своего развития—к пониманию того, что нужно не только знать природу, но и жить в согласии с нею. Иначе научная истина обращается против человечества и против природы и, следовательно, обесценивается. Понимание этой задачи науки В. В. Докучаев положил в основу общей концепции естествознания, принявшей в трудах В. И. Вернадского вид концепции биосферы—ноосферы. В. В. Докучаев настоятельно подчеркивал, что «сущность и высшая прелесть естествознания» заключается в изучении «вековечных, генетических и всегда закономерных взаимосвязей и взаимоотношений», какие существуют между живой и неживой природой, с одной стороны, и человечеством—его экономической, культурной и духовной жизнью—с другой.

Углубляя докучаевскую программу развития естествознания, В. И. Вернадский разработал в понятии ноосферы геологический ракурс понимания роли человечества в эволюции биосферы. Человечество, писал он, становится мощной геологической силой, способной преобразовать биосферу в целом, а научная мысль—планетным явлением. К этому выводу он пришел, осмысливая «взрыв» научного творчества в начале нашего века. И одновременно предостерег, что рост научного знания

особенно остро ставит задачу предотвращения использования науки «во зло человеку». К сожалению, научное сообщество не прислушалось к этому предупреждению ученого.

В. И. Вернадский сформулировал три основные научные установки, позволяющие предотвратить использование науки в антигуманных целях. Во-первых, следует исходить из положения о том, что не «природа вообще», а биосфера является «основной областью научного знания» и—одновременно—«областью максимального проявления человечества». В. И. Вернадскому принадлежит выдающееся эмпирическое обобщение о существовании трех реальностей—реальности Космоса, реальности микромира и биосферной реальности. Это обобщение приобретает особенно значительный смысл в связи с тем, что в век научно-технической революции человечество начинает активно вовлекать реальности Космоса и микромира в свою материально-производственную деятельность. Ввиду этого, весьма актуально высказывание В. И. Вернадского о том, что «логика естествознания глубоко и неразрывно связана с биосферой. Это положение является главным, исходным для понимания цели и сущности логики естествознания».

Во-вторых, согласно В. И. Вернадскому, следует исходить из положения о том, что не отдельно взятый человек, а человечество «как единое целое» является мощной геологической силой. «Создание биосферы из биосферы,—писал ученый,—это природное явление, более глубокое и мощное в своей основе, чем человеческая история. Оно требует проявления человечества как единого целого. Это его неизбежная предпосылка. Это новая стадия в истории планеты, которая не позволяет пользоваться для сравнения, без поправок, историческим ее прошлым. Ибо эта стадия создает по существу новое в истории Земли, а не только в истории человечества».

В-третьих, необходимо исходить из положения о том, что развитие научной мысли должно идти в направлении выявления организованности биосферы и Космоса с учетом древности всей человеческой культуры, всей истории освоения человечеством биосферы. Идеалы гуманизма неизбежно приобретают абстрактно-общий характер, если они отрываются от историзма взаимосвязи человечества с биосферой.

Проблема «наука—культура—этика» оказалась в центре идей русского космизма (В. Соловьев, Н. Федоров, П. Флоренский, К. Рерих, К. Циолковский и другие), возникшего и развившегося одновременно с докучавской школой в естествознании.

К сожалению, в нашем веке (как мы теперь вынуждены признать под давлением глобальных проблем современности) разработанная Докучаевым Вернадским стратегическая линия развития естествознания была отодвинута в сторону. Человечеству был навязан технологический путь развития и способ мышления, который всего за несколько десятилетий поставил человечество в антагонистические отношения с биосферой.

Технологический способ мышления антиисторичен и абстрактен. В его основе—однособытийная логика познания природы. Эта логика теряет из поля зрения биосферу как особое целостное природное обра-

зование, задающее и контролирующее способ поведения человечества. Тем самым утрачивается культура научного познания, а взаимодействие с биосферой превращается в насилие над ней.

Господство технологического способа мышления привело к подмене естественноисторических понятий «биосфера» и «человечество» политической, исторически эфемерной терминологией прагматиков, которые ввели в употребление термины «окружающая среда», «энвайроменталистика», «глобалистика» и другие. Сейчас поэтому необходимо подчеркнуть некорректность широко распространенного понятия «человек и биосфера» и правильность несложного, также единого, понятия «биосфера и человечество», введенного в научный обиход Н. В. Тимофеевым-Ресовским.

Технологический способ мышления культивирует представление о том, что человек способен навязать биосфере целесообразный (с его, антропоцентрической, точки зрения) для него способ существования. Это служит оправданием агрессивного технологического наступления на биосферу, которое в корне противоречит сущности и всей предшествующей истории взаимоотношения человечества с биосферой. Отсюда и возникает выражение «человек и биосфера», в котором «человек», (а не человечество) стоит на первом месте, а «биосфера»—на втором. На самом же деле первична биосфера—ее возраст достигает нескольких миллиардов лет, а человечество вторично—ему несколько тысяч лет. Человечество—всего лишь один из более трех миллионов биологических видов. Биосфера практически (геологически, как выражался В. И. Вернадский) вечна, а человек смертен. Разрушая биосферу, человечество ведет себя не как *Homo sapiens* («человек разумный») и в результате—ставит само себя перед вопросом—«быть или не быть?».

Рассматривая вопрос о причинах появления и обострения глобальных проблем современности, следует иметь в виду, что многие из них обусловлены противоречивым характером развития самой науки. На эту противоречивость В. И. Вернадский обратил особое внимание. Основное внутринаучное противоречие в развитии естествознания, он связал с борьбой двух линий («принципов») — линии Ньютона и линии Бюффона. Принцип Ньютона заключался, по его словам, в «поразительном упрощении в применении механических законов к явлениям природы, необычайном распространении области их применения», принцип же Бюффона состоял в использовании эволюционной идеи для «объяснения порядка природы и разнообразных сходств, какие наблюдаются между ее объектами». К середине XVIII в. принцип Ньютона стал доминировать в естествознании, стал определять «стиль мышления» в науке и задавал способ построения воззрений на природу в целом в виде механистической, а затем физической (в ее различных вариантах) картины мира. Борьба этих двух линий ярко проявилась в разделении естествознания на две группы наук—на группу наук о неживой природе и группу наук о живой природе.

Такое разделение имеет, казалось бы, под собой объективное основание—уже Ж.-Б. Ламарк указал на резкую, отчетливо фиксируемую на эмпирическом уровне «непереходимую» грань, разделяющую жи-

вую и мертвую природу. В. И. Вернадский выявил 16 признаков «материально-энергетического отличия живых естественных тел биосферы от ее косных естественных тел». Наиболее основательно в научном отношении это отличие было проработано по поводу второго закона термодинамики. Вместе с тем столь же эмпирически очевидно непрерывно идущее взаимодействие живого с неживым, обмен между ними веществом и энергией.

Заслуга В. В. Докучаева заключается в том, что он первым выявил, каким образом реально разрешается это противоречие между живым и неживым. Оно разрешается путем формирования особых (биокосных, по В. И. Вернадскому) природных тел (почвы, биогеоценозы, биосфера), способом существования которых является, согласно В. И. Вернадскому, биогеохимический круговорот вещества и энергии. В. В. Докучаев выдвинул определение почвы как особого естественноисторического тела, возникающего и развивающегося в процессе исторически длительного взаимодействия живого вещества с неживым. С этого определения началась наука о почве, которая стала первой наукой о биосфере. Ученые о биосфере и науки о ней (докучаевское почвоведение, докучаевское учение о зонах природы, биогеохимия В. И. Вернадского, биогеоценология В. Н. Сукачева, учение о ландшафтно-геохимических системах Б. Б. Польнова, радиационная биогеохимия и радиационная биогеоценология Н. В. Тимофеева-Ресовского и другие науки) представляют собой не что иное как правильно найденную теоретическую форму выражения диалектически противоречивого характера взаимоотношения живого вещества с неживым. Именно на этой теоретической основе естествознание, распавшееся на множество направлений и ответвлений, каждое из которых развивается на собственной концептуальной основе и в значительной мере независимо от других, может быть интегрировано в единое целое именно в концептуальном смысле. Иными словами, общее естествознание (не как механическая совокупность рядом положенных его составных частей, а как теоретически единое целое) возможно лишь как биосферное естествознание.

С появлением докучаевской естественно-исторической школы углубилось и приняло новые формы противостояние двух линий (Ньютона и Бюффона) в естествознании. Это противостояние В. И. Вернадский выразил (1916 г.) в важнейшем эмпирическом обобщении о сосуществовании «двух синтезов Космоса», или «двух научных картин мира», «двух научных мировоззрений» — физического (и механического) и натуралистического, которое мы теперь с полным основанием можем назвать биосферным. В первом, физическом, явления жизни практически полностью игнорируются или истолковываются в чисто физическом смысле. Во втором — биосферном, наоборот, явления жизни и человеческое рассматриваются как фактор организованности Космоса и признается, что этот фактор имеет столь же фундаментальное значение как универсальные физические законы и типы взаимодействия. Каждое из названных мировоззрений строится на собственных научных принципах и представляет собой особый тип мышления в науке. Это очень важно подчеркнуть, иначе невозможно понять те коллизии, которые претер-

целует наука перед лицом глобальных проблем современности. Сущность глобальных проблем заключается в судьбе биосферы и ее живого вещества. Между тем сами эти проблемы порождены мощным развитием индустриальных технологий, целиком построенных на принципах физической картины мира, т. е. картины, в которой игнорируется специфика явлений жизни и организованности биосферы. Более того, высокие темпы экономического развития, достигнутые в нашем столетии, стали возможны благодаря внедрению технологий, которые обеспечили ускоренное потребление природных ресурсов биосферы. Темп потребления ресурсов настолько высок, что даже если перейти к экологически чистым технологиям, то запаса ресурсов хватит всего на несколько десятилетий. А это означает, что нынешнее экономическое процветание есть верховство у будущего—у будущего биосферы и будущих поколений людей.

В физике существует множество законов, определяющих, при каких условиях может совершаться тот или иной физический процесс. Мы знаем, какие физические процессы природа «запрещает» или «разрешает». Но в физической картине мира, поскольку в ней абстрагируются от явлений жизни, не содержится запрета на действия, губящие живое вещество биосферы и в том числе человека. Этот запрет содержится в биосферной картине мира. Вот почему мы никогда не сможем избавиться от глобальных проблем, если не совершим решительный поворот от ныне господствующей физической картины мира к биосферной.

Экологические и другие глобальные проблемы отражают критический этап развития современной науки, обусловленный резким и прямым столкновением физического и биосферного типов научного мышления. Если в 20-х гг. В. И. Вернадский мог еще говорить о сосуществовании физической и натуралистической картины мира, отмечая при этом, что будущее науки принадлежит биосферному взгляду на природу, то теперь необходимо безусловный приоритет отдать биосферному мышлению. Нет сомнения, что физическая картина мира окажет крупные и ценнейшие услуги в решении технической стороны глобальных проблем, но она не может в принципе помочь в выборе и обосновании стратегии развития взаимоотношения человечества с биосферой, сущность которой заключается в сохранении и наращивании производительных сил биосферы.

К сожалению, инерция мышления еще слишком сильна. Все еще существует убеждение, что экологические проблемы можно решить, оставаясь в рамках физической картины мира. Это обстоятельство необходимо учитывать, выясняя подоплеку многих ожесточенных споров, ведущихся вокруг проблем экологии. В дискуссиях о применении пестицидов и ядохимикатов, переброске рек и строительстве гидро- и атомных электростанций, мелiorации и загрязнении рек и озер отчетливо проявляется альтернативность физического и биосферного типа мышления и отсутствие полного понимания того, что единственно научным подходом является только биосферный. Между тем мы все еще пытаемся совместить несовместимое по принципу «и волки сыты, и овцы целы». Технология, построенная на физических принципах, неизбежно губит

живое вещество. От этого невозможно избавиться. Поэтому попытки найти технологическое решение биосферных проблем представляют собой самообман.

Ограждая себя от вредных воздействий индустриальных технологий на биосферу, мы вынуждены принимать контрмеры. Этот «принцип контрмер» и лежит в основе подавляющего большинства экологических концепций и программ. Но это узкое понимание экологических проблем. В рамках отношений «мера — контрмера» никакая проблема никогда принципиально не решается, напротив, ее напряженность возрастает. Именно поэтому решение экологических проблем нужно искать на пути перехода к биосферной концепции стабилизации природы. В отличие от современной экологии, во всех ее многообразных разветвлениях строящейся как концепция охраны отдельных видов организмов и популяций (и прежде всего популяции человечества), учение о биосфере доказывает необходимость мыслить в масштабе всей геологической истории биосферы и заботиться о сохранении богатства живого вещества во всем его разнообразии. С потерей этого богатства мы теряем потенциал не только материального, но также нравственного и духовного развития.

Сейчас намечился целый ряд весьма перспективных направлений научных исследований, которые открывают возможность решать ресурсно-сырьевые проблемы путем активизации деятельности живого вещества в биосфере (перевод сельского хозяйства с монокультурной на биогеоценологическую основу, биоконверсия солнечной энергии, получение энергии из биомассы, повышение КПД фотосинтеза растений и т. д.). Сущностью всех этих направлений является интенсификация биогеохимического круговорота вещества и энергии в биосфере. Как подчеркивал Н. В. Тимофеев-Ресовский, нужно добиваться того, чтобы мы жили «на проценты» с этого круговорота, не затрагивая, а наоборот, увеличивая мощность зеленого и почвенного покрова биосферы, наращивая ее организованность — ее основной капитал. Сокращение зеленого и почвенного покрова планеты и генофонда живого вещества становится «ахиллесовой пятой» человечества. Поэтому разработка проблемы «биосфера и человечество» является, как неоднократно говорил Н. В. Тимофеев-Ресовский, первоочередной, не терпящей отлагательства научной проблемой, на решение которой должны быть брошены основные силы научного сообщества ученых.

Большой и необычайно острой проблемой становится быстрое изменение — в пределах жизни одного поколения людей — геологического облика планеты. Это приводит к нарушению экологических ниш жизнеобитания организмов и их популяций. Экологическая ниша зачастую понимается статично — лишь как место жизнеобитания. Тем самым упускается или приглушается историзм взаимоотношения организмов со средой, т. е. понимание того, что экологическая ниша является тем локусом биосферы, который должен быть завоеван популяцией. Разрушая геологическую среду, мы одновременно огромное множество популяций ставим в условия, когда они вынуждены вновь завоевывать для себя экологические ниши. В результате резко падает организованность био-

сферы и существенно снижается активность живого вещества и, соответственно, интенсивность биогеохимического кругооборота вещества и энергии в биосфере. Вот почему, имея в виду значительное изменение состояния геологической компоненты биосферы, целесообразно наряду с понятием охраны природы ввести более широкое понятие «стабилизация природы».

Биосферная концепция стабилизации природы указывает на необходимость ввести принцип структурной организованности биосферы в качестве основополагающего регулятора содержания, направления и темпа материально-производственной деятельности человечества. Размещение производительных сил на территории страны должно происходить с учетом естественно-исторической структуры биосферы (бассейнов, тектоники, географического распространения почв и биогеоценозов, региональности этносов и т. д.).

Согласно В. И. Вернадскому, не техногенез, а ноосферогенез—совместная эволюция (коэволюция) биосферы и человечества—составляет главную черту современной геологической стадии эволюции биосферы. Техногенез, несомненно, свидетельствует о том, что человек стал умным, но его ума пока хватило только на то, чтобы развиваться за счет безудержного потребления ресурсов биосферы. В этом проявилась односторонность развития человечества, и она оказалась бумерангом, ударившим по человечеству глобальными экологическими проблемами. Человек пока еще не постиг мудрость природы, сумевшей шаг за шагом накапливать организованность биосферы.

Наша страна занимает одну шестую часть всей суши планеты и поэтому все, что делается в нашей стране, невольно приобретает глобальный характер. Просчеты и задержка со своевременным решением экологических проблем, с одной стороны, скрадываются благодаря большим пространствам страны, а с другой—в критический момент приобретают особенно ожесточенный характер. Из этого следует, что в нашей стране особенно чувствуется потребность скорейшего перехода к биосферной концепции стабилизации природы, тем более, что она является родной дзюной концепции.

По существу Н. В. Тимофеев-Ресовский оказался единственным ученым, глубоко осознавшим и осуществившим преемственную связь концепции Докучаева-Вернадского с самыми острейшими проблемами современной науки. Выдвинутое В. И. Вернадским положение о естественной организованности реальностей Космоса, микромира и биосферы оказалось в центре научной деятельности Н. В. Тимофеева-Ресовского, изучавшего воздействие радиации на живое вещество биосферы, иными словами, исследовавшего эффекты прямого столкновения реальности биосферы с реальностями Космоса и микромира, ионизированного искусственными источниками радиоизлучения. Он стал основоположником радиационной биогеоценологии как одной из наук о биосфере.

В. И. Вернадский умер всего за несколько месяцев до атомной бомбежки Хиросимы и Нагасаки. Н. В. Тимофеев-Ресовский пережил это событие. Более того, как специалист он исследовал эффекты воздействия понизирующей радиации на живое вещество при испытаниях

ядерного оружия и утечке радиоактивных элементов в среду при авариях на атомных электростанциях.

Н. В. Тимофеев-Ресовский выделил особую геохимическую функцию живого вещества (расширив тем самым учение В. И. Вернадского о геохимических функциях живого вещества)—его способность адсорбировать и накапливать радионуклиды и содействовать их миграции, тем самым значительно определяя их судьбу на планете. Концепция биосферы, подчеркивал он, имеет в настоящее время всеобщее значение для оценки любых—глобальных, региональных и локальных—акций человечества. «Любая достаточно широкая проблема о воздействии человечества и его промышленной деятельности на окружающую среду,—писал он,—должна в настоящее время ставиться на основе созданного В. И. Вернадским учения о биосфере и разработанной В. И. Сукачевым биогеоценологии, дисциплины, изучающей взаимосвязи между компонентами (косными и живыми) биогеоценозов, как элементарных биохорологических участков современной биосферы, а также взаимодействия между разными биогеоценозами». Это дало ему право сказать, что «вся история естествознания, русского естествознания девятнадцатого и двадцатого века, дает возможность именно нам, советским ученым, эффективнее других, целостнее и рациональнее приступить к изучению научных основ большой проблемы—проблемы «биосфера и человечество». В 1968 г. он подчеркнул, что проблема «биосфера и человечество» должна решаться как комплексная проблема, решение которой является задачей всего естествознания, включая математику, и значение которой до сих пор большинством людей недостаточно осознано». Проблема «биосфера и человечество», пишет он, «...это действительно проблема номер один и проблема срочная. Нам нужно уже сейчас бросить все научные силы на решение этой проблемы». Он постоянно подчеркивал, что эту проблему необходимо осознать во всей ее остроте, глубине и широте.

Многие десятилетия научные исследования, проводившиеся под руководством Н. В. Тимофеева-Ресовского и помеченные грифом секретности, были недоступны для научной общественности. Мы от этого, как показал Чернобыль, только потеряли. К тому же, к сожалению, он слишком доверчиво относился к работникам атомной промышленности. Тем более сейчас, как никогда раньше, необходимо подхватить и развить богатство научных идей Н. В. Тимофеева-Ресовского и особенно его стержневую идею перехода естествознания на биосферную основу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Докучаев В. В. Избр. соч., 3, 331—332, М., 1949.
2. Верданский В. И. Философские мысли натуралиста. 282, М., 1988.
3. Вернадский В. И. Философские мысли натуралиста. 34—35, М., 1988.
4. Вернадский В. И. Избр. тр. по истории науки. 202, 205, М., 1981.
5. Вернадский В. И. Тр. биогеохимической лаборатории. 70—77, М., 1980.
6. Вернадский В. И. Живое вещество. 12—20, М., 1978.
7. Тимофеев-Ресовский Н. В. Тр. Ин-та биологии Уральского филиала АН СССР. 22, 10, Свердловск, 1969.

8. Тимофеев-Ресовский Н. В. Научн. тр. Обнинск отд. ГО СССР. Сб. первый, 1, 26, Обнинск, 1968.
9. Тимофеев-Ресовский Н. В. Научн. тр. Обнинск отд. ГО СССР. Сб. первый, 1, 16, Обнинск, 1968.
10. Тимофеев-Ресовский Н. В. Научн. тр. Обнинск отд. ГО СССР. Сб. первый, 1, 21, Обнинск, 1968.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армения, № 9-10 (42), 1989 г.

УДК 576.1+575.8

## К МЕТОДОЛОГИИ МОРФОЛОГИИ

Н. Н. ВОРОНЦОВ

Институт биологии развития им. П. К. Кольцова АН СССР, Москва

*Բազմաշաղկապ է, որ միտքի գրասեղան և ժամանակակից կենսաբանության մեթոդների շինթեզը նկարագրություն կրճեմանի ընդլայնել մորֆոլոգիական օրինաչափությունների կիրառումը կենդանականի տարրեր աստիճաններում, ինչպես նաև օգտագործել մոլեկուլյար կենսաբանության նվաճումները մորֆոլոգիական մոդելների ստեղծման համար:*

The significance and necessity of the quickest syntheses of "classic and modern biologies will allow to enlarge and apply margins of morphological regularities to different levels of living forms organization and also to use achievements of molecular biology for the application of the conceptual models of morphology to its objects.

Морфологический метод сравнения неотделим от систематики и эволюционной теории. Хотя со времен Аристотеля развитие морфологии и систематики шло неотрывно друг от друга, тем не менее границы морфологии понимаются по-разному не только зоологами и ботаниками, но и различно трактуются внутри сравнительной и эволюционной морфологии животных. Говоря о методологии морфологии, мы должны определить, как и для любой другой науки, объект исследования, предмет анализа, постановку задачи, круг методических приемов, уровень исследования, последовательность действий при решении задачи [3, 19, 28].

Как это ни странно, в определении границ морфологии не только не наблюдается единодушия, но и подчас не делается попыток определить границы, предмет анализа. В результате наблюдается крайнее несовпадение определений, даваемых самими авторитетными специалистами. Отмечу, что в БСЭ (1973) в статье «Морфология» [23] говорится о морфологии как части языковедения, а статьи «Морфологический анализ» и «Морфологический комплекс» целиком относятся к геоморфологии. В том же издании БСЭ содержание и объем обширной статьи «Морфология растений» [26] резко контрастирует с крошечной заметкой в 11 строчек «Морфология животных». О сравнительной морфологии в БСЭ (1976) говорится: «то же, что сравнительная анатомия животных», а в основательной статье «Сравнительная анатомия животных» [21] вновь ставится знак равенства между этой дисциплиной и

сравнительной морфологией животных. Если к этому добавить, что в ботанике нередко говорят о том, что анатомия изучает внутреннее, а морфология—наружное строение растений [32], то становится ясным, что понятия морфологии и анатомии остаются не очерченными в биологии. В биологии нередко синонимизируются морфология и анатомия. Это неоправданное сужение проблематики морфологии идет к ее застою.

Как известно, термин «морфология» был предложен в 1817 г. Гёте [12, 22], который разрабатывал проблемы общей морфологии как на растительных, так и на животных объектах. В связи с этим в морфологии не были заложены изначально те различия в трактовках объема и содержания морфологии животных и морфологии растений, которые возникли с дифференциацией наук. Морфология на уровне рубежа XIX и XX вв. понималась как учение о форме, противопоставляемое физиологии—учению о функциях организма. В момент возникновения морфологии, в период развития идеалистической морфологии, возникновения сравнительной морфологии, да и в последарвиновский период, когда сравнительная морфология приобрела эволюционное объяснение и возникла эволюционная морфология, морфологические исследования велись на уровне органов и их систем, т. е. на уровне анатомии или микроскопической анатомии.

На анатомическом уровне с помощью сравнительно-анатомического метода, приобретшего в последарвиновский период эволюционную направленность, были сформулированы важнейшие идеи и принципы сравнительной морфологии. К ним относятся учение о гомологии и аналогии, учение о корреляциях, принцип архетипа, идея общности плана строения, позднее появились понятия дивергенции, параллелизма и конвергенции; вершиной этого этапа развития была предложенная А. Н. Северцовым классификация принципов филогенетических изменений органов. Поскольку основные идейные концепции сравнительной и эволюционной морфологии были разработаны с помощью сравнительно-анатомических и эволюционных подходов, со временем произошло отождествление понятий морфология и анатомия.

Появление гистологии, цитологии привело к тому, что вслед за морфологией органов и их частей стала изучаться морфология тканей, морфология клетки. Гистологи и цитологи, как правило, были недостаточно знакомы с идейными достижениями сравнительной и эволюционной морфологии, полученными на анатомическом уровне. Использование идейных достижений морфологии гистологами и цитологами привело к таким несомненным успехам, как учение Заварзина о параллелизмах и преобразовании тканевых структур [18]. К сожалению, опыт А. А. Заварзина по применению принципов морфологии, разработанных на анатомическом уровне организации, к клеточному уровню оказался почти единичным.

Наиболее интенсивно развитие биологии после 1953 г. происходило в области ультраструктурной цитологии, молекулярной биологии и, в частности, молекулярной генетики. Здесь накоплен огромный материал, интересный для анализа с классической морфологической точки

зрения, с позиций сравнительной и эволюционной морфологии. К сожалению, представители «современной» биологии плохо знакомы с идеями и достижениями классической биологии, в том числе и морфологии. В результате представители этих новых областей биологии пытаются самостоятельно пройти тот же путь, который был пройден морфологией за почти двухвековой период истории. При этом при исследовании эволюции на молекулярном уровне нередко повторяются те же самые ошибки, через которые прошла морфология в течение своего длительного развития. К сожалению, морфологи подчас не отдают себе отчета в том, что анатомия и гистология есть лишь уровни исследования, что *морфологический метод может быть с успехом применен на всех уровнях существования биологических структур, в том числе и на молекулярном*. Если представителей «современной» биологии мы вправе упрекнуть в незнании классического наследия, то среди морфологов, среди эволюционистов нередки еще случаи сохранения полной неосведомленности об основных явлениях и принципах современной биологии. Скорейшее наведение мостов между классической и современной биологией оплодотворит как морфологию, которая получит новые сферы приложения, так и молекулярную биологию, которая сможет приложить концептуальные модели морфологии к своим объектам [8—10].

Приведем некоторые примеры возможного использования методологии для рассмотрения некоторых молекулярно-генетических и иных молекулярно-биологических явлений.

#### *Явления полимеризации и олигомеризации на молекулярном уровне*

В. А. Догель [14—16] обратил особое внимание на роль явлений полимеризации и олигомеризации в эволюции животных. Хотя В. А. Догель говорил об олигомеризации гомологичных органов, однако он допускал использование понятия полимеризации для эволюции клеточных органелл. Мне представляется весьма продуктивным использование этих понятий и при рассмотрении эволюции ДНК и иных биологических макромолекул.

А. С. Серебровский еще в предвоенные годы высказал мысль о том, что дупликация генов может дать материал для самостоятельной эволюции одного из дублированных генов, т. е. увидел в дубликации механизм возникновения новых генов. В 50-х гг. нашего века были расшифрованы аминокислотные последовательности в глобиновых цепях молекулы гемоглобина разных представителей позвоночных и в молекуле миоглобина. Бесспорное сходство между  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепями и несколько меньшее между глобиновыми цепями и молекулой гемоглобина позволило выдвинуть предположение о том, что гены, ответственные за кодирование этих белков, возникли в результате дубликации единственного праглобинового гена и последующей самостоятельной эволюции дублированных генов [37].

Эта идея Ингрэма положила начало тому руслу, в пределах которого затем сформировалось такое направление как молекулярная эволюция [35]. В 1970 г. Сусуму Оно опубликовал четко написанную книгу о

молекулярных механизмах макроэволюции, называющую им «Эволюция путем дупликации генов» (На русском языке она вышла под расплывчатым заголовком «Генетические механизмы прогрессивной эволюции») [24, 42]. Ни Ингрэм, ни Оно не ссылаются на конкретные указания Дарвина о роли поли- и олигомеризации, ни, тем более, на работы А. Милы-Эдвардса, К. С. Мережковского и В. А. Догеля—эта линия развития биологии прошла мимо них. Вместе с тем анализ эволюции количества ДНК с позиций поли- и олигомеризации весьма интересен.

Наименьшее количество ДНК среди хордовых (0,28—0,42 пг/2С) имеют асцидии надотряда *Enterogona*, в надотряде *Peurogona* количество ДНК вдвое больше (0,7 пг/2С). Геном ланцетника (1,2 пг/2С) в 2—4 раза больше генома асцидий. Размеры генома круглоротых в 2—4,5 раза больше генома ланцетника. Создается впечатление неуклонного роста размеров генома в ряду низших хордовых. На самом деле это не так.

В пределах акуловых размер генома варьирует от 5,5 до 18,6 пг/2С. Создается впечатление, что большой размер генома свойствен примитивным акулам из отрядов разнозубовых (*Heterodontiformes*, *Heterodontus francisci*—13,6 пг (2С), многожаберных (*Hexanchiformes*, *Hexanchus griseus*—10,7 пг (2С), а также своеобразной группе скатовидных скватиновых акул (*Squatiniiformes*, *Squatina*—18,6—19,6 пг (2С), тогда как у более продвинутых семейства серых акул (*Carcharhinidae*— размер генома уменьшается до 5,5—8,6 пг/2С. Также относительно низким количеством ДНК (7,0—7,8 пг/2С) характеризуются близкие к предыдущему семейству молотоголовые акулы (*Sphyrnidae*). У скатов количество ДНК изменяется от 5,6 до 15,2 пг/2С, однако однозначная трактовка этих данных затруднительна. Отметим, что наименьший размер генома среди хрящевых характерен для химер (*Hydrolagus coltiei*—3,0—3,2 пг/2С).

Среди 400 изученных видов костистых рыб около 80% видов имеют размер генома 1—3 пг/2С, средний размер генома костистых рыб 2,2 пг/2С [10], т. е. он в среднем в 2—3 раза меньше размеров генома хрящевых. По-видимому, можно говорить о том, что переход на уровень костистых рыб сопровождался олигомеризацией генома.

Размер генома ленинцестеуса и амин (2,2—28 пг/2С) не отличается от средних значений его для костистых рыб. Геном многоперов больше (9,8—11,7 пг/2С), несколько крупнее геном латимерии (13,2—14,4 пг/2С), однако разброс размера генома у осетровых рыб (от 3,6 до 10,2 пг/2С) заполняет брешь между настоящими костистыми рыбами, с одной стороны, и многоперовыми и кистеперыми—с другой.

Совершенно иначе обстоит дело с двоякодышащими. Можно сказать, что эволюция этой группы связана со взрывообразной полимеризацией количества ДНК, размеры генома возрастают в 100 раз по сравнению с костистыми рыбами: *Neoceratodus forsteri*—160,3 пг/2С, *Leptodosis paradoxo*—241,4—248,8 пг/2С, *Protopterus aethiopicus*—284,1 пг/2С [41, 10].

Размеры генома резко выделяют двоякодышащих среди всех остальных рыб. Полимеризация ДНК должна была произойти задолго до разделения стволов современных двоякодышащих, относящихся, по Бергу [2], к двум разным отрядам. Интересно, что различия в количестве ДНК между представителями отряда *Ceratodiformes* — *Neoceratodus* и другого отряда — *Lepidosireniformes* больше, чем отличия представителей монотипичных семейств последнего отряда — *Lepidosirenidae* и *Protopteridae* друг от друга.

Наиболее интересно сравнение геномов рыб и амфибий. Как известно, большинство отечественных исследователей, в том числе Северцов и Шмальгаузен [25, 33], видели в кистеперых предков наземных позвоночных [4, 5]. Холмгрен [36], в отличие от большинства наших исследователей, говорил о дифилетическом происхождении амфибий. Он считал двоякодышащих или близких к ним рыб предками хвостатых амфибий, тогда как кистеперые рыбы были предками стегоцефалов, бесхвостых амфибий и амниот. Идея Холмгрена были развиты Сёве-Сёдербергом [43, 44]. Однако уже через несколько лет Ярвик [38] не смог увидеть в двоякодышащих возможных предков наземных тетрапод и видоизменил дифилетическую гипотезу происхождения наземных позвоночных, предположив, что предками разных тетрапод были представители двух групп кистеперых — *Porolepiformes* и *Osteolepiformes*.

К сожалению, материал по размерам генома появился уже после кончины И. И. Шмальгаузена (первые данные о двоякодышащих и хвостатых амфибиях появились в 1964—1966 гг.), он еще не обсуждался в комплексе с анатомо-эмбриологическими данными. Все хвостатые амфибии при значительном разнообразии размеров генома характеризуются крайне высоким уровнем содержания ДНК на ядро. Средний размер генома 74 видов хвостатых амфибий — 70 нг/2С и варьирует от 33 нг/2С у углозубов до 160 (амфиума) и 180—270 нг/2С у нектурисов [10, 41].

Резко отличаются по размерам генома бесхвостые амфибии. Средний размер генома для 212 видов — 8,4 нг/2С, т. е. находится на уровне размеров генома хрящевых рыб. Благодаря характерной для бесхвостых амфибий авто- и аллополиплоидии размеры генома отдельных видов могуткратно увеличиваться. Тем не менее, отличия в размерах геномов хвостатых и бесхвостых амфибий разительны. Эти данные нуждаются в тщательном анализе специалистов по низким позвоночным, к каковым не относит себя автор. Отметим лишь некоторые бесспорные факты.

У истоков ствола (или стволов) наземных позвоночных стоит форма, претерпевшая умеренную (кистеперые) или резкую (двоякодышащие) полимеризацию количества ДНК. Все амфибии отличаются от амниот повышенным количеством ДНК. Переход от амфибийного уровня на рептилийный был связан, в частности, с денополиплоидизацией, т. е. с олигомеризацией количества ДНК. Полимеризация ДНК создали предпосылки для возникновения новых генов, возникновения новых биохимических процессов, новых белков.

Мы можем высказать две гипотезы относительно происхождения наземных позвоночных в свете сравнительно-генетических данных.

1. Мы должны вернуться к представлениям о том, что двоякодышащие или близкие к ним формы были предками наземных позвоночных. Хвостатые амфибии до наших дней сохранили высокое количество ДНК, свойственное двоякодышащим (и, предположительно, стегоцефалам). При эволюции от хвостатых к безногим и бесхвостым амфибиям произошла олигомеризация дублированных генов. Дальнейшая олигомеризация ДНК произошла при возникновении амниот. Эта цепь рассуждений позволяет сохранить представления о монофилетичности происхождения наземных позвоночных, но исключает кистеперых из числа предков тетрапод.

2. Резкие различия в размерах генома у разных подклассов амфибий говорят об их дифилетичности. Хвостатые амфибии происходят от двоякодышащих, а бесхвостые (и предки амниот) ведут свое происхождение от кистеперых. В этой второй линии происходила некоторая олигомеризация количества ДНК.

Хочу подчеркнуть, что данные о размерах генома не дают возможности «сохранить невншность и приобрести капитал», т. е. сохранить и представление о кистеперых как предках всех тетрапод, и держаться монофилетической концепции.

Подвергая на основе данных о количестве ДНК критике систему устоявшихся взглядов о происхождении наземных позвоночных, я хочу напомнить слова Северцова [25] о том, что «никакой филогенез и никакая классификация не могут быть построены на основании изучения структуры... только одного какого-нибудь признака». Сравнительно-генетические данные о количестве ДНК не могут сами по себе привести нас к построению новой системы, но они показывают несовершенство той системы взглядов, которая долгие годы казалась нам привычной.

### *Принципы общей филогенетики в анализе генетического материала*

Покажем на нескольких примерах правомочность использования закономерностей сравнительной морфологии и принципов общей филогенетики для анализа путей преобразования наследственных молекул в филогенезе.

1. Северцов [25] обратил внимание на большую изменчивость экзосоматических органов по сравнению с эндосоматическими. В десятках морфологических исследований показана большая изменчивость малофункционирующих частей организма по сравнению с интенсивно функционирующими. Так, например, у полевок (*Microtinae*), имеющих по 3 коренных зуба в верхней и нижней челюсти, наиболее изменчивыми оказываются последний верхний коренной ( $M^3$ ), и в особенности его задний отдел, и первый нижний коренной ( $M_1$ ), в особенности его передний параконидный отдел. Большая изменчивость этих частей зуба по сравнению с другими отделами связана с тем, что при движении зубных рядов именно эти участки коренных в первую очередь перестают функционировать. Функционирующие участки находятся под более

жестким контролем стабилизирующего отбора, нежели слабофункционирующие или временно не функционирующие.

На уровне геном нам известна значительно большая консервативность функционирующих генов по сравнению с «молчащими» или дублированными генами. То же прослеживается и на уровне ближайших генных продуктов—белков. Значительная межтаксонная изменчивость инсулина у млекопитающих захватывает разные участки в  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях инсулина, одна аминокислота нередко замещается другой. Однако нам неизвестны случаи замены цистеин-цистеиновых мостиков. Ясно, что такая замена полностью бы нарушила все конформационные свойства молекулы инсулина, и такая мутация была бы немедленно отбрана. По хорошо известному случаю мутантных гемоглобинов человека известно, что в разных позициях могут происходить замены одной моноаминомонокарбоновой аминокислоты на другую или же замена одной моноаминодикарбоновой кислоты на иную, но взаимозамены моноаминодикарбоновых кислот на моноаминокарбоновую ведут к летальному или полублетальному исходу из-за нарушения третичной структуры всей молекулы гемоглобина.

Открытие экзон-интронной структуры гена у эукариот показало, что функционирующие участки гена (экзоны) эволюционно консервативны, тогда как нефункционирующие интроны лабильны.

2. Северцовское представление об ароморфозе и идиоадаптации как основных направлениях изменений, вполне приложимо и к молекулярному уровню. Мы знаем многочисленные примеры постепенного накопления мутаций, ведущих к заменам одних аминокислот на другие в белках, сопоставимые с идиоадаптациями. Но вместе с тем мы знаем случаи коренной перестройки всей молекулярно-биологической организации, сопоставимые с ароморфозами самого высокого ранга. Некоторые из этих ароморфозов столь кардинальны, что трудно представить себе возможные пути преобразования одной структуры в другую. Известно, например, что царство прокариот характеризуется рибосомами типа 70 S (коэффициент седиментации—70 единиц Сведберга), тогда как царству эукариот свойственны рибосомы типа 80 S [11, 27]. Переходов между рибосомами про- и эукариот нет, они имеют совершенно различные планы строения. В царстве архебактерий ДНК-зависимая РНК-полимераза состоит из 9—11 субъединиц, а в царстве эубактерий—из 4 субъединиц и иницирующего фактора [11, 39, 40, 45]. Переходов между этими полимеразам в настоящее время не известно.

3. Разработанная Северцовым [25] классификация принципов филогенетических изменений органов, дополненная впоследствии другими исследователями, с успехом может быть применена и к более элементарным уровням организации живого.

С эволюционной точки зрения интересно, кодируется ли развитие хорды у личинок асцидий и у зародышей млекопитающих одними и теми же генами или нет? Несомненно, что в ряде случаев происходит *субституция генов*, причем, как и в случае субституции органов, возможно *два вида субституции*: 1) замещение одного гена эволюционно близ-

ким к нему геном, возникшим за счет дупликации; 2) замещение старого гена новым, негомологичным.

Принцип смены функций А. Дорна перекликается с эволюцией плейотропии. Можно предположить, что в филогенезе происходит смена функций и на геномном уровне. Мультифункциональность свойственна не только органам, но и биохимическим цепям, белковым молекулам. Рассмотрение эволюции этих молекул с позиций морфологических закономерностей эволюции может оказаться весьма продуктивным и для молекулярной биологии, и для эволюционного учения.

Нетрудно видеть, что развиваемые здесь представления о методологическом значении принципов общей и сравнительной морфологии применительно к более элементарным уровням изучения жизни во многом созвучны с идеями Беклемишева [1], который вместе с тем не всегда четко отделял морфологию от анатомии. Тем не менее, его основное заключение представляется весьма современным и познающим: «Наука о форме является более простой и более абстрактной по сравнению с другими биологическими дисциплинами, но именно в силу этого она уже достигла более высокой степени развития и потому может служить для них в известной мере образцом. В этом заключается особый методологический интерес изучения сравнительной анатомии» [1]. Поскольку анатомию Беклемишев, вслед за старыми авторами, определяют «как часть общего учения о форме организмов, или морфологии, занимающейся изучением строения взрослого животного, в противоположность эмбриологии, изучающей развитие животного» [1], то эти мысли могут быть отнесены и к методологическому значению принципов морфологии при изучении жизненных явлений и на более элементарных уровнях живого.

Универсальный характер морфологических закономерностей эволюции требует от специалистов в области теоретической морфологии общebiологического образования с достаточным знанием основ современной биологии, в том числе и молекулярной биологии. Когда морфологи осознают методологические принципы своей дисциплины в ее сегодняшнем, а не позавчерашнем объеме, когда мы осознаем границы приложимости морфологических закономерностей к разным уровням организации живого, нам вряд ли придется жаловаться на то, что морфология из царицы наук, каковой она была в начале XIX века, превратилась в бедную падчерницу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев В. Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т. 1. Палеоморфология, 3-е изд., 432. М., 1964.
2. Берг Л. С. Тр. Зоол. АН СССР, 2 изд., 20, 5—286, М., ГИ, 1955.
3. Блауберг И. В., Юдин Э. Г. Становление и сущность системного подхода, 280, М., 1973.
4. Воробьева Э. Н. Автореф. докт. дисс., 330. М., 1972.
5. Воробьева Е. И. Палеонтол. журн., 2, 110—116, 1974.
6. Воронцов Н. И. Эволюция пищеварительной системы грызунов. 240. Новосибирск, 1967.

7. (Воронцов Н. Н.), *Voronitskiy N. N.* Evolution of the Alimentary System in Myomorph Rodents. Smithsonian Inst. and National Science Foundation, Washington D. C., 346, New Delhi, 1979.
8. Воронцов Н. Н. Журн. Всесоюз. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, 25, 3, 295—315, 1980.
9. Воронцов Н. Н. В кн.: Эволюция материи и ее структурные уровни (тр. III Всесоюз. совещ. по философским вопросам современного естествознания), 295—302, М., 1983.
10. Воронцов Н. Н. Предисловие редактора к кн. Гинатулин А. А. Структура, организация и эволюция геномов позвоночных, 3—5, М., 1984.
11. Воронцов Н. Н. Зоол. журн., 66, 11, 1668—1684, 1987а; там же, 66, 12, 1765—1774.
12. Гете Н. В. Избр. соч. по естествознанию, 553, М., 1957.
13. Гинатулин А. А. Структура, организация и эволюция генома позвоночных, 294, М., 1984.
14. Догель В. А.) *Dogiel V. A.* Biologisches Zentralblatt, 49, 8, 451—469, 1929.
15. Догель В. А. Архив анат., гистол. и эмбриол., 15, 3, 101—114, 1936.
16. Догель В. А. Олигомеризация гомологичных органов как один из главных путей эволюции животных, 368, Л., 1954.
17. Дорн А. Происхождение позвоночных животных и принцип смены функций, 195, М., Л., 1937.
18. Забарзин А. А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани, 1, 291, М., 1915.
19. Зинзвеев А. А. Основы логической теории научных знаний, 286, М., 1967.
20. Иванов А. В. Происхождение многоклеточных животных, Филогенетический очерк, 287, Л., 1968.
21. Иванов А. В. БСЭ, 3-е изд., 24, 1, 354—355, 1976.
22. Канассе И. И. Очерки из истории сравнительной анатомии до Дарвина, Развитие проблемы морфологического типа в зоологии, 299, М.—Л., 1963.
23. Мельчук И. А. БСЭ, 3-е изд., 16, 604—605, 1974.
24. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции, 227, М., 1971.
25. Северцов А. Н. Морфологические закономерности эволюции, 1939/1949. В кн.: Северцов А. Н. Собр. соч., 5, М.—Л., 536.
26. Сребрянский Т. И. БСЭ, 3-е изд., 16, 605—607, 1974.
27. Спирин А. С., Гаурилова Л. П. Рибосома, 199, М., 1968.
28. Спирин А. Г., Юдин Э. Г., БСЭ, 3-е изд., 16, 164—166, 1974.
29. Татаринов Л. П. Морфологическая эволюция теридонтов и общие вопросы филогенетики, 259, М., 1976.
30. Тахтаджян А. Л. Вопросы эволюционной морфологии растений, 214, Л., 1954.
31. Тахтаджян А. Л. Основы эволюционной морфологии покрытосеменных, 235, М.—Л., 1964.
32. Транковский Д. А. БСЭ, 3-е изд., 1, 577—578, 1970.
33. Шмальгаузен И. И. Происхождение наземных позвоночных, 272, М., 1964.
34. Ayala F. J. Genetic differentiation during the speciation process. Evolutionary Biology (eds. Th. Dobzhansky, M. K. Hecht and W. C. Steere), 8, Plenum Press, New York, 1—78, 1975.
35. Ayala F. J. (ed.) Molecular Evolution, 1977 Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 277p.
36. Holmgren N. Acta Zoologica, 14, 1933.
37. Ingram V. Nature, 180, 326—328, 1957.
38. Jarvik E. Zool. Bidrag, Uppsala, 21, 237—675, 1942.
39. Kandler O. Naturwissenschaften, 68, 183—192, 1981.
40. Kandler O. Evolution of Prokaryotes, London, Academic Press, 335—361, 1981.
41. Manfredi—Romanini M. G. The DNA nuclear content and the evolution of Vertebrates. In: A. B. Chiarelli and E. Cignani (eds.) Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution, Academic Press, 39—82, 1971.
42. Ohno S. Evolution by Gene Duplication Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 163, 1970.

43. *Säve—Söderbergh G.* Arkiv Zool., 26 A. 1—20, 1—34.  
44. *Säve—Söderbergh G.* On the morphology of Triassic Stegocephalians from Spitsbergen, and the interpretation of the endocranium in the Labrynthodontia. Konigl. Svenska Vetenskapsakad Handl., Ser. 3, 16. 1, 1—181, 1936  
45. *Stachelbrand E.* Phylogeny and phylogenetic classification of Procarvates. Evolution of Procarvates, London, Academic Press, 1, 309—334, 1985.

Поступило 31.V 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989 г.

УДК 591.158.1

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЫ: РЕТРОСПЕКТИВА

В. И. ИВАНОВ

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

*Պնտարկվում է ժառանգական մոլեկուլների վերաբերյալ Ա. Ա. Կոլիև և Մ. Վ. Իմոբեյև-Քեսովսկի, Կ. Գ. Կոլցովի-Ն. Վ. Տիմոֆև-Քեսովսկու, Կ. Գ. Տիմմերի, Մ. Գեյբրյուկի-Է. Քրեյնգերի գաղափարի զարգացման շրջանագծային շղթան:*

The continuous chain of evolution of the idea about hereditary molecules is discussed: A. A. Collie and M. A. Menzblir—N. K. Kolisov—N. V. Timofeyev—Resovskii, K. G. Tsimmer, M. Delbryuk—E. Predinger...From the position of development of molecular genetics the importance of this branch of genetics evolution is quite significant.

Молекулярная генетика с ее базисным представлением о нуклеиновых кислотах как носителях генетической информации—плод развития естествознания второй половины XX века. Однако этому предшествовал более чем полувеконной период, в течение которого зародилась и оформилась сама идея о «наследственных молекулах», молекулярных (точнее макромолекулярных) размерах и природе элементарных единиц наследственности—генов. Иными словами, молекулярная генетика появилась отнюдь не вдруг. Вдруг же, как говаривал Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский, возникают только пузыри на болоте, а всякое стоящее дело имеет свои начало, корни и историю.

В данной статье читатель не найдет систематического изложения развития представлений о наследственных молекулах, а лишь очерк об одной из линий формирования этой плодотворной идеи.

Если попытаться мысленно вычленить основные парадигмы естествознания второй половины XIX века, то среди других надо будет назвать учение о корпускулярной природе вещества. Эта парадигма полностью охватила физику и химию и глубоко вторглась в биологию в виде клеточной теории М. Шлейдена—Т. Шванна—Р. Вирхова, гипотезы пангенезиса Ч. Дарвина, гипотезы наследственных факторов Г. Менделя (последняя, правда, до 1900 года мало кому была известна). Таким образом, естественнонаучное мировоззрение конца прошлого века

являло собой благодатную почву для поиска элементов биологической наследственности среди корпускулярных компонентов клеток.

Среди пионеров такого поиска был московский химик-органик А. А. Колли. Одним из направлений его исследований было определение молекулярных весов природных белков. По его вычислениям получалось, что молекулы белков имеют такую большую массу, что в отдельно взятой клетке может содержаться не астрономически большое, а вполне умеренное и даже небольшое число белковых молекул (или их агрегатов). Поскольку же через единственную клетку, даже такую маленькую, как многие сперматозонды высших организмов, передается полный комплект наследственного материала, содержащий сведения о тысячах и тысячах наследственных особенностей родительских и дочерних особей, то объем той части такого наследственного материала, которая отвечает за передачу потомкам единичных наследственных признаков, должен быть сопоставим с объемом отдельных белковых частиц. Предположение же о том, что именно белки представляют собой наследственный материал в то время ни у кого не вызывало сомнения, так как все другие вещества клеток казались неподходящими для этой роли ввиду своего слишком простого строения. В таком ключе и рассуждал А. А. Колли в докладе на съезде естественных ученых и врачей, который проходил в 1893 г. в Колонном зале генерального Дома Советов в Москве.

На этом же съезде выступал с докладом профессор сравнительной анатомии Московского университета М. А. Мензбир, рассказавший о сложном внутреннем устройстве клеток и хромосом и о гипотетической (тогда) роли последних как материальных носителей наследственности.

Оба доклада—А. А. Колли об ограниченной вместимости клеток для белковых молекул и М. А. Мензбира о сложном устройстве и исключительной генетической значимости хромосом—произвели большое впечатление на молодого ассистента М. А. Мензбира—Н. К. Кольцова, для которого тот съезд был первым в жизни крупным научным форумом. Впечатление было настолько сильным, что разработка представления о хромосомах как о гигантских наследственных молекулах белковой природы стало позже одним из основных предметов научных изысканий и размышлений Н. К. Кольцова и нашло отражение во многих его публикациях и лекциях начала 30-х годов [1—3 и др.].

Уже в статье «Биология», вышедшей в 6-м томе 1-го издания БСЭ в 1927 г., Н. К. Кольцов выдвинул гипотезу о том, что хромосомы клеток имеют в своей основе гигантские непрерывные фибриллярные молекулы белков, последовательные участки которых соответствуют линейно расположенным генам [1]. Поскольку при ненаправленном синтезе крупных полипептидов, построенных из 18 известных в то время природных аминокислот, должна образоваться случайная смесь из практически бесчисленного числа («сангилионов») изомеров, в действительности же имеет место идентичное воспроизведение тех же самых изомеров, то Н. К. Кольцов наделил наследственные молекулы свойством синтеза («кристаллизации», «ассимиляции») рядом с собой как с затравкой (матрицей) идентичных структур, свойством «размноже-

ния». Он выразил эту способность наследственных молекул к идентичному самовоспроизведению формулой "Omnis molecula ex molecula".

Последующее развитие генетики и цитологии не подтвердило тезиса Н. К. Кольцова о том, что наследственные молекулы представляют собой бечки. Но вот его концепция, что наследственные молекулы — линейные полимеры макромолекулярного размера, продольно дифференцированные на функционально различные последовательности и реплицирующиеся путем матричного синтеза, полностью вошла в современную молекулярную генетику.

Н. К. Кольцов публиковал свои работы о природе генетического материала не только на русском языке и не только в СССР. Однако, несмотря на его европейскую известность как экспериментального биолога, эти его идеи не оказали в то время непосредственного влияния на развитие учения о генах и хромосомах. Исключение составили работы ученика Н. К. Кольцова — Н. В. Тимофеева-Ресовского. Перескочив в 1925 г. по приглашению профессора О. Фогта из Москвы в Берлин, Н. В. Тимофеев-Ресовский организовал отдел генетики в Институте исследований мозга и развернул широкую программу исследований по филогенетике, генетике и эволюции популяций, мутационному процессу, радиационной генетике.

За несколько лет в опытах на дрозофиле Н. В. Тимофеев-Ресовский получил основополагающие данные о зависимости возникновения мутаций от дозы облучения, времени, качества радиации, состояния биообъекта, условий эксперимента и т. д. [7]. Довольно рано Н. В. Тимофеев-Ресовский заинтересовал своими работами физика-дозиметриста К. Г. Циммера и физика-теоретика, ученика Нильса Бора — М. Дельбрюка (впоследствии лауреата Нобелевской премии). Это придало работе по радиационной генетике биофизическую направленность и вскоре вылилось в написание (втроем) работы «О природе генных мутаций и о структуре гена», вышедшей в Геттингене в 1935 г. в ярко-зеленой обложке и известной как "Green pamphlet" или "Grünblätterwerk" [9].

В контексте данного очерка представляет особый интерес, что в результате теоретического анализа количественных закономерностей радиационного мутагенеза Н. В. Тимофеев-Ресовский, К. Г. Циммер и М. Дельбрюк предложили физическую модель гена и механизма генных мутаций, согласно которой ген рассматривается как некоторое дискретное множество атомов, (автономное в своих свойствах от других подобных множеств других генов), а генные мутации расцениваются как изменения положений атомов внутри генов или диссоциации химических связей за счет флуктуаций тепловой энергии или поглощения энергии из внешних источников.

Уже в 1936 г. Н. В. Тимофеев-Ресовский и М. Дельбрюк [8], определив частоты прямых и обратных мутаций в трех генах X-хромосомы дрозофилы (*w*, *m*, *i*) при определенных дозах облучения, оценили средний размер чувствительного объема, попадание в который вызывает мутацию, как величину порядка тысячи атомов, оговорив при этом, что эта величина только сопоставима, но не обязательно равна размеру ге-

на (чувствительный объем может оказаться как несколько больше, так и меньше размера гена).

Таким образом, только опираясь на идеи своего учителя Н. К. Кольцова, но используя совершенно иные подходы, Н. В. Тимофеев-Ресовский и его соавторы-физики М. Дельбрюк и К. Г. Циммер пришли к аналогичному выводу о макромолекулярном размере генов.

Н. В. Тимофеев-Ресовский, интенсивно работавший в области изучения мутационного процесса, развил дальше и мысли своего учителя об идентичном самовоспроизведении (авторепродукции, редупликации) генов. В связи с тем, что при авторепродукции генетического материала воспроизводится не только первоначальное строение генов, но и возникающие в них мутационные изменения (варианты), Н. В. Тимофеев-Ресовский развил представление о редупликации генетических структур как о конвариантном (включающем варианты) процессе [4], что имеет исключительное значение не только на уровне клеток, но и для эволюции биологических популяций.

Возможно, что гёттингенская «Зеленая тетрадь» Н. В. Тимофеева-Ресовского, К. Г. Циммера и М. Дельбрюка и не сыграла бы заметной роли в дальнейшем ходе истории с наследственными молекулами, если бы она не заинтересовала выдающегося австрийского физика, Нобелевского лауреата Э. Шредингера. Рассуждая вслед за данными авторами о размерах, структуре, высокой стабильности и редком мутировании генов, Э. Шредингер развил представление о хромосомах как об аperiодических кристаллах с фиксированными положениями атомов. Эти большие аperiодические кристаллы состоят из более мелких последовательностей, которые представляют собой наследственный код, построенный из небольшого числа знаков (подобно азбуке Морзе). Эти идеи были развиты Э. Шредингером в лекциях, которые он читал в 1943 г. в Дубинском университете, находясь там в эмиграции, а в 1944 г. издал в виде отдельной небольшой книги: "What is life? The physical aspect of the living cell" [6]. По утверждениям многих физиков и химиков, ставших «отцами» современной молекулярной генетики, эта книга сыграла решающую роль в становлении их интересов к физико-химическим основам жизни [5]. Хотя, оценивая значение этой книги ретроспективно, М. Ф. Перуц писал в 1987 г., что главная заслуга этой книги — популяризация более ранней работы Н. В. Тимофеева-Ресовского и соавторов — «Зеленой тетради» [5].

Таким образом, где в живом общении, а где (реже) через публикации протянулась непрерывная нить эволюции идей о наследственных молекулах: А. А. Кофли и М. А. Мензбир—Н. К. Кольцов—Н. В. Тимофеев-Ресовский, К. Г. Циммер, М. Дельбрюк—Э. Шредингер... И, наблюдая современное состояние и развитие молекулярной генетики, значение этой эволюции генетики следует признать весьма и весьма существенным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцов Н. К. БСЭ изд. 1-е, 6, 296—338, 1927.
2. Кольцов Н. К. Усп. экп. биол., сер. Б, 7, 1, 3—31, 1928.

3. Кольцов Н. К. Наука и жизнь, 5, 6, 4 (388)—14 (397), 1935.
4. Тимофеев-Ресовский Н. В. Цитология, 2, 1, 45—56, 1960.
5. Perutz M. F. Nature, 328, 6113, 535—559, 1987.
6. Schrödinger E. What is life? The physical aspect of the living cell. Cambridge Univ. Press, 1944. (Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики, М., 1947.
7. Timoféeff—Ressovsky N. W. Biol. Rev., 9, 4, 411—457, 1934.
8. Timoféeff—Ressovsky N. W., Delbrück M. Z. ind. Abst. Vererbl., 17, 322—334, 1936.
9. Timoféeff—Ressovsky N. W., Zimmer K. G., Delbrück M. Nachr. Ges. Wiss., Göttingen, 1, 13, 189—245, 1935.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10. (42). 1989

УДК 577.150.6

## ЭВОЛЮЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕЛКОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ

А. В. САВИЧ, И. И. БЕРЕГОВСКАЯ

Институт биофизики МЗ СССР, Москва

Исследования аминокислотных последовательностей белков энергетической системы клетки позволяют установить эволюционные связи между генами, кодирующими белки супероксиддисмутазы и белки комплекса НАДН-дегидрогеназы митохондрий. Показано, что белки супероксиддисмутазы и белки комплекса НАДН-дегидрогеназы митохондрий имеют более близкие эволюционные связи, чем белки супероксиддисмутазы и белки комплекса НАДН-дегидрогеназы цитохрома С. Это свидетельствует о том, что белки супероксиддисмутазы и белки комплекса НАДН-дегидрогеназы митохондрий имеют более близкие эволюционные связи, чем белки супероксиддисмутазы и белки комплекса НАДН-дегидрогеназы цитохрома С.

Homology between amino acid successions of proteins, taking part in energetic systems of bacteria and mitochondria, allows to attribute them to a single evolutionary tree, in which polypeptide chain increases in the result of genes duplication. Amino acid successions of superoxide dismutases and proteins of ND4 NADH—dehydrogenase complex of mitochondria and successions of C—type cytochromes and proteins ND6 NADH—dehydrogenase complex of mitochondria are compared. It is shown that ND4 is closer to mitochondrial Mn—SOD by its structure, whereas ND6—to C<sub>1</sub> cytochrome. Mitochondrial genome can be a target during radial influence and take part in biological intensification of defeat.

Большое место в научном наследии Н. В. Тимофеева-Ресовского занимают работы, использующие генетические и эволюционные подходы для изучения изменчивости в популяциях. В монографии, посвященной этому вопросу, говорится о связи между сопоставлением фенотипических признаков живых организмов и молекулярных фенотипов—аминокислотных последовательностей белков [3]. Гомология и эволюция животных означает глубокое внутреннее сходство признаков, имеющих

Сокращения: СОД—супероксиддисмутаза.

общее происхождение. В аминокислотных последовательностях гомологичными можно считать лишь те участки, в которых аминокислотные остатки совпадают. Соответственно, показателем гомологичности двух аминокислотных последовательностей можно считать отношение совпадающих аминокислотных остатков к общему числу сопоставляемых пар. В литературе используются различные способы оценки гомологичности, которые учитывают также совпадение аминокислотных остатков, близких по структуре. По этому признаку предлагались различные способы разбиения аминокислот на группы. В нашей работе [1] использовано следующее разбиение:

1. Gly (G), Ala (A), Pro (P), 2. Val (V), Leu (L), Ile (I), 3. Ser (S), Thr (T), 4. Cys (C), Met (M), 5. Lys (K), Arg (R), His (H), 6. Asp (D), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), 7. Phe (F), Tyr (Y), Trp (W).

В литературе [15] приводится несколько иное разбиение, в котором группы 1 и 3 объединены, а метионин отнесен не к группе 4, а к группе 2. Показателем гомологичности двух аминокислотных последовательностей нами [1] принималась величина:

$$C^{ак} = \frac{A + A_1}{K}, \quad (1)$$

где  $A$ —число совпадений аминокислотных остатков,  $A_1$ —число совпадений разных аминокислотных остатков, но принадлежащих к одной группе,  $K$ —число сравниваемых пар аминокислотных остатков, исключая позиции с пробелами (делециями).

Одним из механизмов эволюции генов является их соединение в более длинные цепочки. Нам предложена [11] схема эволюции генов, происходящих от общего предшественника, кодирующего  $N$ -аминокислотные остатки. В этой схеме, в « $k$ »-ом поколении, новые варианты генов образуются в результате присоединения генов « $k-1$ »-го поколения ко всем генам от 1 до « $k-1$ »-го поколения. В табл. 1 приведены расчи-

Таблица 1. Расчетные количества и предельные размеры генов по предложенной эволюционной схеме в первых 7 поколениях

$k$	$M_k$	$n_{\min}^k$	$n_{\max}^k$
1	1	$N$	$N$
2	1	$2N$	$2N$
3	2	$3N$	$4N$
4	7	$4N$	$8N$
5	56	$5N$	$16N$
6	2322*	$6N$	$32N$
7	28297332*	$7N$	$64N$

\* Для генов, кодирующих не более  $20N$  аминокислот.

танные по этой схеме количества возможных вариантов генов  $M_k$ , а также наибольшее и наименьшее число аминокислотных остатков  $n_{\max}^k = 2^{k-1} \cdot N$ ,  $n_{\min}^k = k \cdot N$  для первых 7 поколений.

Таблица демонстрирует стремительный рост числа вариантов генов. На этот костяк эволюции накладываются мутации, делеции и присоеди-

нение генных фрагментов, а также элиминация в процессе отбора. На этой основе были рассмотрены ферменты, участвующие в энергетических процессах в клетках. Были взяты белки, кодируемые на митохондриальном геноме человека, структура которого полностью расшифрована [6], и ряд белков бактериального происхождения [1].

Циклическая ДНК митохондриального генома не содержит неинформативных участков. На ней кодируются все транспортные и рибосомальные РНК и на 13 участках—информационные РНК, определяющие дыхательные белки. Из них 5 были идентифицированы сразу (по аминокислотным последовательностям) как субъединицы I, II, III цитохромоксидазы, цитохром В и АТФ-аза 6. Остальные 8 идентифицированы значительно позднее, иммунологическими методами [9, 10] как 7 субъединиц НАДН-дегидрогеназного комплекса и АТФ-аза 8. Аминокислотные последовательности этих 8 белков сравнивались между собой, полностью или отдельными частями, и с различными бактериальными белками, содержащими в качестве активных групп железо-серные кластеры или флавиновую группировку.

Высказывалось предположение, что железо-серные кластеры являются самой простой электрон-транспортной группой, первой появившейся в процессе эволюции. Отмечается, что в процессе эволюции железо-серных белков происходила дупликация генов [14]. При оценке гомологичности считалось, что если  $C^{ak} \geq 0,3$ , то пара белков имеет достаточно близкого общего предка. Вероятность случайных соединений для белков рассматриваемой группы, как правило, колебалась в пределах  $0,17 \pm 0,03$ . Высокие показатели гомологичности установлены между белками, кодируемыми на митохондриальном геноме АТФ-азой 8, НД4L, НД1, НД2, НД3, НД4, НД5 между собой и отдельными их частями, а также между (АТФазой 8 и бактериальными ферредоксинами 8Fe-8S, НД4L и бактериальными ферредоксинами 4Fe-4S, НД1 и НД3 и бактериальными флаводоксинами, НД2 и фумаратредуктазой В бактерии *E. coli* (белок, близкий по структуре к сукцинат-дегидрогеназе митохондрий), НД5 и субъединицей А фумарат-редуктазы, НД4 и НАДН-дегидрогеназой *E. coli*. В последних трех случаях гомологичность подтверждается сопоставлением нуклеотидных последовательностей, данные о которых имеются в работах [6, 12, 13, 25]. Расчеты показали, что вероятности случайных совпадений нуклеотидов для этих последовательностей лежат, как правило, в пределах  $0,27 \pm 0,02$ . Гомологичными считались последовательности, для которых  $C^{nk} > 0,35$ .

Исходя из того, что митохондрии в значительной мере автономны (они размножаются вне зависимости от деления ядра), можно предположить, что на митохондриальном геноме кодируются еще два вида белков СОД и цитохрома С-типа. Возможно, что некоторые белки, кодируемые на митохондриальном геноме, приобретают другой смысл, если их карбоксильный и аминный концы поменяются местами. Тогда их аминокислотные последовательности можно сравнивать с аминокислотными последовательностями других белков в противоположных направлениях. Рассмотрим такую возможность для супероксиддисмутаз и цитохромов С-типа.

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

1 FE CHR. VIN. M--HELPAALPYEK--NAL--EPVJ--SAETIEYHYG?--?HQTYVNTLQ  
 2 FE CH T A--YZIPALPYAB--BAL--ZPHI--?A2TICFHYCK--HMAAYVMTY--?GLV Z=E NPM O  
 3 FE PS OVA A--FELPPLPYAH--DAL--GPHI--SKETLEYHYCK--HNNTYVVNL--NMLVPC?--T-F B=O NPM M  
 4 FE E COLI S--FELPALPYAK--DAL--A-PHI--SAE?IEYHYCK  
 5 FE PH L A--FELPALPFA-M-NAL--EPHI--SOE?LZYHYCK--HHTYV?KLB-SI  
 6 FE DES D. G--FVLPDLPYAK--DAL--?PHI--SAHYDF?P?CK  
 7 FE PL B A--YTOPPLPFAK--DAL--EPY?M--AE?F  
 8 FE SP PL A--FELPSLPPDQ--DAL--ESSKMSANTLSYHCK--HMAAYVNL--NAAIIGT--BMAJ  
 9 MN RH S A--FVLPDLPYAN--DAL--AALGMMKEMTC--YHHDJ--HMKAYVDN--GMK IACT  
 10 MN TH AG PYPFKLPELGYP--YEAL--EPHIDARTME--HMKK--HMGAYVNL--NAALE--KYPVL--GCAZV  
 11 MN E COLI S--YTLPSLPYA--YDAL--EPHFQKIME--HHTK--HMTYVNN--NAAALE--SLPEFA-  
 12 MN B ST P--FELPALPYP--YDAL--EPKIDKEIMN--HHTK--HMTYVNTL--NAALEOH--PNL-O  
 13 MN MIT ЧЛ KHSLPDLPYD--YDAL--EPHIN--AQ:MQLM?SK  
 14 MN MIT ЧЛ KHSLPDLPYD--YDAL--EPHI--SAEIMQLM?SK  
 15 MN MIT AP KVTLPLDKWD--FGAL--[PY]--SQQINEIHYV  
 16 CU/ZN ЧЛ. ATKA--UCVLKCD--GCVGCTINGEOKESNCPVKKV--GCS--IJK--L TEGLHQFHVMQFQD  
 17 CU/ZN БК ATKA--UCVLKCD--GCVGCTIHFAK--GDT--VVV--TCS--IAC--L TEGDHGFHVMQFQD  
 18 CU/ZN ПМ ALKA--UCVLKCD--GCVHCVIHFEQOO--[GCVVVL--Q-F--IEC--L IKDHOHFHMEFOD  
 19 CU/ZN AP VQA--VAVLKCD--AQVSCVVVFQA--SESE--P-I--VSVYEJAONSPNAEROFHIKEFOD  
 20 CU/ZN PH L QDLTYKMTDQTC--MPV--CTI--ELSO--MYGVVVFIP--ELAD--LTPGMHGFHIHNGC-  
 21 NDH4 ЧЛ P--MLGLLIPSLHMF--MLTNERTFSPK--MNIHHTL--SQDQ?TFYLSYL--ATVLMMLC-  
 22 NDH4 MB P--BTLL[LP--IMML--AMLTLER]HSPOL--NIMHNTL--KCRQ?TII]HYMSYM--GT]IINIC-  
 23 NDH4 AMF P--MHSLPI]PILH--TMLTHERTHIPNIAHL--HEPTMCRQ?TILFHYLSYS--ATLLQ?L-  
 24 NDH4 AP3 ESKLJLLNLPMLW--LLMLLYERIKCSSEFVYVGSF--LKCHQSFVSYLYTYA--AS--FFSLF-  
 25 NDH BAKT P--RI--VRNISQVLH--ML--GTWFYQ--MLAIG--HM--RYLSIYVF--RA--IR--GE

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

11 MLPVEELITKLDGLPADKHT--VLRRNACGHANNSLFWKQKKTITLQ--GDLKA--AIERD  
 12 NMSLEELBNLEALPESIRTA--VRNNGCGHANNSLFWITLSPNCCCEPTGELAD--A]NKK  
 16 NTGCTSAOPHFNPLSKKHGCPK--DEERHVGD--LGNVADKNOVA]V--DJVD--PI]GL  
 17 NTAGCTSAOPHFNPLSKKHGCPK--DEERHVGD--LGNVADKNOVADNS--JED--SVISL  
 18 NTGCTTAQAHNPLSKKHGCPK--DEERHVGD--LGNVADENGVADNS--MKD--SVISL  
 19 ATGCTVQAGPHNFPHKHTGAPT--DEVRHVGD--HGNVMTDFNGVADNS--GF--KD--RLIKL  
 20 --S-CASIGOHYDFEHTNKHGFPWTDNNGCD--LPALFVSAKGLATNPV--LA--P--RL  
 21 --TL--LLT-I-NSWS--FTTVLVS--LEC--LLNIT--PPLALNAL--SALL--HWTAMPLLTQ  
 22 --ML--IIT--FNSWS--FLSHTI--FLEC--MLNIS--PPLALNAL--SALL--HWTAMPLPVWQ  
 23 D-TL--IIT--MSSXN--FLATMIT--IEC--MWNPS--PPLANNALNSII--HWTGMLPI]TE  
 24 --SLM--IMS--IW--SWS--VISNLLS--IEC--LLMLT--PRAAMNA--SSLI--FWMLTMAPFPM  
 25 --IM--MSGR--TLNOMLSQ--VTSFNS--LSVLS--GHDKYQV--NK--LPXGN--MOALINN  
 130 140 150 160 170 180  
 11 FQ--SVDNFK--A-EFEKAA--ASRFQ--SCH--ALLVLKCDKLA--VV--STANGDSEPHCEAIS  
 12 FQ--SFTAFK--DEFCKAA--ACRFQ--SCH--ALLVNNCELE--IT--STPNDEPIM--E--  
 16 SCEYSI]IO--RTMUYVEKPPDDLQRCGNEESTKTCGNACSRACCVIC]I--AK  
 17 SOKSII]IC--RTLYVMEKADDLQKCGNEESTKTCGNACSRACCVI]O]I--AG  
 18 SCNHSI]IC--RTMUYVEKODDLQKCGNEESTKTCGNACSRACCVI]O]I--AP  
 19 ]GPTBVVC--RSUVI]HACDDDLQKCD]E]E]S]I]K]T]C]N]A]G]P]R]A]C]C]V]I]G]I]T]N  
 20 TLI--ELK--HAINI]HACGDMH--SDMPKALGCGGARVACCV]O  
 21 LQD--SL]H]RS--H]REYNSN--ALCFL]S]T]L]G]H]A]I]M]I--VACT--FSWPTG--I]I]I--ATVVL  
 22 LORAN]I--H]TRS--H]REYNSN--ALCFL]S]T]L]G]H]A]I]M]I--H]T]A]C]H--F]S]W]P]T]G--I]M]S--A--I]V]L  
 23 LCR--S]LL]ARS--H]REYSYKALCCLASHTLGDSTLM]I]M--ACTL]A]M]P]T]O]N]K--S]I]V]L  
 24 LCR--N]J]M]ERS--G]L]REYSVN--ALCFL]G]S]S]L]G]H]A]I]M]I]T]Y]S--G]C]L]C--H]Y]T]M--T]L]L]C]A--L]V]I  
 25 MA--CT--AM--GHAQAQR--PV--FGCEPRPCEA--C--DCIAYIDPDH]I]T--L]T]P]E]V]V]J J-LGN]R]N]T]E]L  
 190 200 210 220 230  
 11 QA--SQ--P]I]L]C--LDV]E]H]A]Y]L]K]F]Q]N]R]R]P]D]Y]I]K]E]F]W--N]V]V]N]D]C]A]A]L--R]F--A--A]X  
 12 O-KY--P]I]L]C--LDV]E]H]A]Y]L]K]Y]G]N]R]R]E]Y]I]A]A]F]W--N]V]V]N]D]C]V--L--K]R]Y]E]A]K]A]X  
 21 AMH]S]S]S]Y]A]I]L]S]K]I]D]T--Q]R--L]C]I]S]S]T]M--I]M]C--W]L]S]L]I]F--P]Y]A--M]K]M]T]P]N]I 451-249  
 22 AMH]S]S]S]Y]A]I]L]S]K]L]D]T--Q]R--L]C]I]S]S]T]M--I]M]C--W]L]S]L]I]F--P]Y]A--M]K]M]T]P]N]I 451-249  
 23 G]M]H]S]S]S]Y]A]I]L]S]K]L]D]T--Q]R--L]C]I]S]S]T]M--I]I]C--W]L]S]L]I]F--P]Y]A]L]E]K]M]S--P]S]I]T 452-249  
 24 G]M]H]V]S]S]Y]A]I]L]A]K]I]D]T--R--L]C]V]L]S]M--L]V]G]C]V]L]S]I]S]W--V]F]S--Y]K--L--N]M]L 440-240  
 25 Q]Q--I]D]K]L]F]D]P]A]K]I]--G]A]A]F]V]M]L]D]A]E]I--Y--E]G]D]I--T]H]L]C]E]D]A]S]T]V]M]T]G]I]V]R]V 427-242

Рис. 1. Составление аминокислотных последовательностей супероксид-дисмутаз (FE, MN, CU/ZN), [8, 18, 19, 21, 22] с C-концевыми участками НАДН дегидрогеназ (ND) [6, 7, 11, 20, 25]. Ряды 1-10, 13-15 - только начальные N-концевые участки. Для C-концевых участков НАДН-дегидрогеназ (ряды 21-25) приведены номера сравниваемых остатков аминокислот. Сокращения: Chr. vin. - Chromatium vinosum, Ch. T. - Chlorobium thiosulphatophilum, Ps. ova - Pseudomonas ovalis, Ph. I. - Photobacterium leiognathi, Des. D. - Desulphovibrio desulphuric, Sp. PI - Spirulina platensis, Pl. B - Plectonoma borianum, Rh. S. - Rhodospirillum rubrum, Th. Ag. - Thermus agnatus, B. St. - Bacillus stearothermophilus, ЧЛ - цианобактерия, ЦП - цианобактерия, ДР - дрожжи, БК - бык, ПМ - плевела, МН - мышь, АМФ - амфибия, ДРЗ - дрожжи.

СОД нейтрализуют супероксидные радикалы  $O_2^-$ , образующиеся в системе электронного транспорта дыхательной цепи митохондрий и обладающие широким диапазоном токсичности [5]. Бактериальные СОД состоят из двух одинаковых субъединиц, содержащих около 200 аминокислотных остатков, между которыми расположен атом Mn либо Fe. В митохондриях эукариот имеется Mn-СОД, состоящая из 4 субъединиц. В цитоплазме клеток эукариот содержится Cu/Zn-СОД, состоящая из одной белковой цепочки с присоединенными к ней атомами Cu и Zn. Она кодируется в ядерном геноме—у человека в 21 хромосоме [17]. Аминокислотные последовательности Fe- и Mn-СОД близки между собой, но существенно отличаются от таковых для Cu/Zn-СОД [8, 19].

На рис. сопоставляются аминокислотные последовательности различных СОД [18, 19, 21, 22] и НАДН-дегидрогеназ (бактериальной и компоненты митохондриального НАДН-дегидрогеназного комплекса (НД4). Для сравнения берется участок НАДН-дегидрогеназ, расположенный на карбоксильном конце, и сопоставляется с последовательностями СОД в противоположном направлении—от карбоксильного конца к аминоному. На ЭВМ были рассчитаны показатели гомологичности. Их усредненные значения по группе одинаковых белков представлены в табл. 2. Для Fe-СОД и Mn-СОД в некоторых случаях известны

Таблица 2. Средние показатели гомологичности между аминокислотными последовательностями супероксиддисмутаза и НАДН-дегидрогеназ

Белок	Номера остатков	Число в группе	НД	Cu,Zn	Fe	Mn бакт.	Mn мит.
НД	150—250	5	0,37	0,27	0,30	0,33	0,35
Cu,Zn-СОД	1—150	5	0,27	0,69	0,26	0,28	0,37
Fe-СОД	1—55	8	0,30	0,26	0,71	0,60	0,57
Mn-СОД бакт.	1—200	2	0,33	0,29	—	0,75	—
Mn-СОД мит.	1—60	4	0,31	0,31	0,60	0,7	0,52
Mn-СОД мит.	1—10	3	0,35	0,37	0,57	0,52	0,9

лишь короткие участки аминокислотных последовательностей, начиная с аминоного конца, и в этих случаях сопоставление неполное. Как и следовало ожидать, наибольшая гомологичность наблюдается между белками внутри одной и той же группы. Она несколько ниже между группами Mn-СОД и Fe-СОД, самая низкая между Cu/Zn-СОД и другими супероксиддисмутазами. У НАДН-дегидрогеназ наибольшая степень гомологичности наблюдается с митохондриальной Mn-СОД, это подтверждает предположение о родстве этого участка этих белков митохондриальным Mn-СОД.

В дыхательной цепи митохондрий имеются два вида цитохромов С-типа: цитохром  $C_1$ , передающий электрон от комплекса II к комплексу III, и цитохром  $C_1$ , входящий в комплекс II. Цитохром С поступает в митохондрии из цитоплазмы. На митохондриальном геноме скорее всего может кодироваться цитохром  $C_1$ . На рис. 2 дано сопоставление аминокислотных последовательностей цитохромов С-типа, принадлежащих бактериям ( $C_2, C_3, C_5, C_{355}, C_{551}$ ), водорослям (F), митохондриям ( $C, C_1$ ), и белков НД 6—компонентов НАДН-дегидрогеназы, кодируе-



Таблица 3. Результаты расчетов на ЭВМ показателей гомологичности для рассматриваемых белков

Число белков в группе	5	1	1	7	3	1	2	1	6
Белок	НДБ	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	C	C <sub>2</sub>	Г	C <sub>55</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>5,1</sub>
НДБ	0.66	0.39	0.19	0.27	0.21	0.28	0.24	0.27	0.28
C <sub>1</sub>	0.39	X	0.24	0.31	0.25	0.34	0.29	0.32	0.34
C <sub>1</sub>	0.19	0.24	X	0.24	0.21	0.20	0.24	0.22	0.15
C	0.27	0.30	0.24	X	0.75	0.54	0.35	0.35	0.47
C <sub>2</sub>	0.21	0.25	0.21	0.54	X	0.38	0.32	0.27	0.41
Г	0.28	0.33	0.20	0.41	0.38	X	0.41	0.37	0.51
C <sub>55</sub>	0.24	0.29	0.24	0.35	0.32	0.41	X	0.53	0.39
C <sub>5</sub>	0.27	0.32	0.22	0.35	0.27	0.37	0.53	X	0.42
C <sub>5,1</sub>	0.28	0.34	0.15	0.47	0.41	0.51	0.39	0.42	X

сохранился лишь в двух из пяти белков НДБ (мышь и амфибия), и у тех же двух второй цистеиновый остаток замечен на метионин. В остальных трех случаях в первом положении цистеин заменен на циклические аминокислоты, а во втором положении — на лейцин. Такая деформация показывает, что белок, выполняющий функции цитохрома C<sub>1</sub>, мог синтезироваться на митохондриальном геноме на начальном этапе биологической эволюции, когда митохондрия была самостоятельным организмом, а потом, с потерей самостоятельности, нужда в собственном цитохроме C<sub>1</sub> отпала, и характерный для цитохромов набор аминокислотных остатков изменился в результате мутаций.

Митохондриальный геном обычно не рассматривается как мишень при воздействии ионизирующей радиации на клетку и организм. Нам рассмотрена возможность роли митохондриального генома как мишени при радиационном мутагенезе [2].

Основанием для этой концепции служат результаты популяционной генетики [4], которые можно перенести на популяции митохондрий в клетке. После облучения может возникнуть клетка с определенной мутацией в геноме одной из митохондрий. Процессом усугубления первичного повреждения можно считать борьбу за существование между потомками поврежденной (примитивной) митохондрии и потомками нормальных. Отбор может произойти в пользу первых и, следовательно, к познанию в клетке только дефектных митохондрий с пораженной энергетикой, что характерно для раковой клетки.

Поступило 26.VI 1989 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Береговская Н. Н., Савич А. В. Биополимеры и клетка. 4, 238, 1988.
2. Береговская Н. Н., Савич А. В. I Всесоюз. радиобiol. съезд. Тез. докл., 4, 812, 1989.
3. Тильфеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. М., 1977.
4. Тильфеев-Ресовский Н. В., Яблоков А. В., Глотова Н. В. Очерк учения о популяции. М., 1973.
5. Фридрих И. В. и др.: Свободные радикалы в биологии. М., 1, 273, 1979.

6. Anderson S., Bankler A. T., Barrell B. C., de Bruijn M. L. H., Coulson A. R., Drotin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier R. H., Smith A. J. H., Staden B., Young I. D. *Nature*, 299, 457, 1981.
7. Bibb M. J., Van Elten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. *Cell*, 26, 167, 1981.
8. Brock Ch. R., Walker J. E. *Biochemistry*, 19, 2873, 1980.
9. Chomin A., Cleer M. W. J., Ragan C. I., Riley M., Doolittle R. F. *Science*, 234, 614, 1986.
10. Chomin A., Ragen C. J., Matsunaga Yagi A., Hatefi Y., Doolittle R. F., Attardi G. *Nature*, 314, 592, 1985.
11. Cleary D. O., Wolstenbalme D. R. *J. of Molecular evol.*, 22, 252, 1985.
12. Cole S. T. *Eur. J. Biochem.*, 122, 479, 1982.
13. Cole S. S., Grundström T., Jaurin B., Robinson J. J., Weiner J. H. *Eur. J. Biochem.*, 126, 211, 1982.
14. Comrak R. *Chemica scripta*, 21, 87, 1983.
15. Dayhoff M. O., Barker W. C., Hunt L. T. In: "Methods in Enzymology", "AP", 524, New York, 1983.
16. Dikerson R. E., Timkovich R., Alanassy R. J. *J. Mol. Biol.*, 100, 473, 1976.
17. Feaster W., Kwok L., Epstein Ch. *Amer. J. Human Genet.*, 29, 563, 1977.
18. Hartis J. I., Auffret A. D., Northop P. D., Walker J. E. *Eur. J. Biochem.* 106, 297, 1980.
19. Jabach I. R., Farh D. J., Kerschesteiner D. A., Deutch H. V. *Biochemistry*, 19, 2310, 1980.
20. Roe B. A., Ma D.-P., Wilson R. K., Wong F.-H. *J. Biol. Chem.*, 260, 9759, 1985.
21. Steinman H. M. *J. Biochem.*, 253, 8708, 1978.
22. Steinman H. M., Hill R. L. *PNAS USA*, 70, 3725, 1973.
23. Voordouw G., Brenner S. *Eur. J. Biochem.*, 159, 347, 1986.
24. Wakabayashi S., Matsubara H., Kin Ch. H., Kawai K., King T. E. *Bioch. Biop.*, Res. Communication, 97, 1548, 1980.
25. Yong I. E., Roger B. L., Campbell H. D., Jaworsky A., Shau D. C. *Eur. J. Biochem.*, 116, 165, 1981.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10. (42). 1989 г.

УДК 575.224:582.282.23

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЧАСТОТУ СПОНТАННОГО МУТИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ

В. Л. КОРОГОДИНА, В. И. КОРОГОДИН, Н. В. СИМОНЯН\*, Ч. ФАЯСИ\*\*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна,  
\* Ереванский физический институт, ГКАЭ СССР, Ереван,  
\*\* Институт биофизики АН ВНР, г. Сегед

Քայլ է արված, որ տարբեր միջավայրերի *Saccharomyces cerevisiae* խմորանկերի ուներսիան դեպի պրոտոտրոֆություն սեղի է ունենում տարբեր արագություններով: Աննդամիջավայրում անհրաժեշտ մետաբոլիտի կոնցենտրացիայի փոքրացմանը զուգընթաց մեծանում է ուներսիայի հաճախականությունը ըստ տվյալ զենի: Այդ փոփոխությունը լոկուսային ուներսիայի համար ավելի է արտահայտված, քան՝ սուպրասոբային:

It was shown that in *Saccharomyces cerevisiae* yeasts reversions to prototrophy occur with different rates on different media. With a decrease

of the concentration of the necessary metabolite in the medium, the frequency of reversion of the corresponding gene increases. This dependence is more pronounced for locus revertants than for suppressors.

Гипотезу о том, что мутабельность—величина переменная и зависит от условий внешней среды, Лобашев сформулировал еще сорок лет назад [8]. Систематические исследования таких явлений начали появляться лет 15 назад в работах, посвященных дисбалансу пулов нуклеотидов [19, 27].

Эксперименты *in vitro* показали, что точность репликации зависит от баланса пулов нуклеотидов [25, 26].

Отклонение от равновесия концентрации одного из нуклеотидов вызывает изменение пулов других нуклеотидов путем влияния на ферменты путей биосинтеза [31, 32, 35].

Дисбаланс приводит к разнообразным эффектам, в том числе к повышению мутабельности генов [12—14, 16, 27, 38].

Исследования некоторых авторов показали генную специфичность феномена повышения мутабельности при дисбалансе [12, 13, 17].

Основные результаты были получены на бактериях при лимите тимину и тимидину [1, 13, 14, 16, 22]. На дрожжах-сахаромицетах исследования проводились по дисбалансу тимина в среде [11, 12, 17, 27].

Целью нашей работы было исследование зависимости спонтанной мутабельности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* от содержания аденина в среде культивирования.

**Материал и методика.** Опыты были поставлены на гаплоидных ауксотрофных по аденину дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* штамма P-192 (a de 2-192). Среды культивирования даны в работах [2, 3]. Среди реверсий к прототрофности мы наблюдали два типа мутаций: «клокочущие»—мутации в гене *ade 2*, и супрессорные, влияющие на биосинтез не только аденина, но и других метаболитов. Схема методики регистрации мутантов приведена на рис. 1. Клетки высевали с помощью инокулятора на ядерные

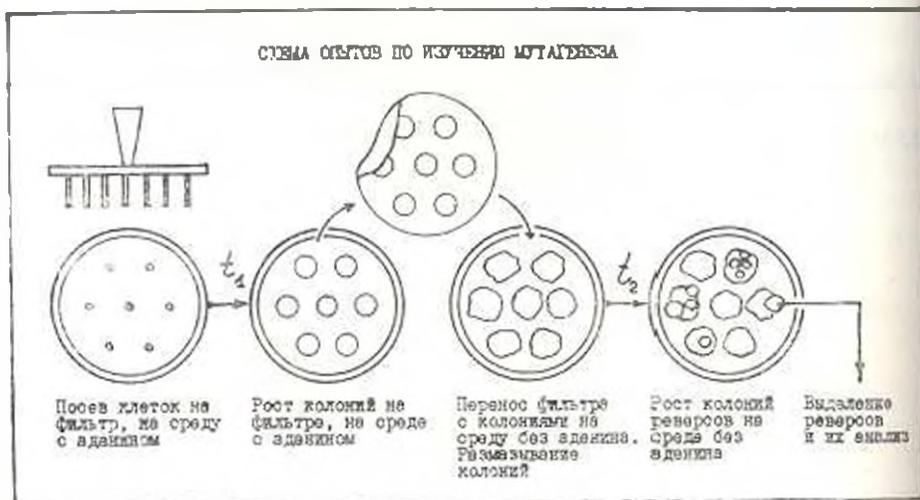


Рис. 1. Схема опытов по изучению мутагенеза.

фильтры, покрывающие агаризованную питательную среду. После инкубации в течение требуемого времени фильтры переносили в чашки Петри на селективную среду, содержащую аденина, а выросшие колонии растирали. Во время культивирования на

селективной среде (10—14 суток) на мазках появлялись колонии реверсов—либо группами («множественные реверсы соответствующие мутациям, произошедшим до переноса фильтров на селективную среду), либо поодиночке («единичные», соответствующие реверсам, возникающим во время остаточного роста колоний) [7]. Регистрируя множественные и единичные реверсы во времени и определяя их фенотип (окраску колоний и потребность в метаболитах) и генотип, можно подсчитать количество локусных и супрессорных реверсов, возникающих на исходной и селективной средах. Генетический анализ показал, что определяемый нашими методами фенотип реверсов хорошо соответствует их генотипу (на бедных средах колонии локусных реверсов белые, а супрессорных, как и исходного штамма, розовеет [6]. Это позволяет определять выход локусных и супрессорных реверсов и их соотношение при заданных условиях культивирования в любой период роста культуры. Определен прирост клеток исходного штамма в колониях, можно рассчитать частоту ревертирования в этом интервале времени. Количество реверсов каждой выделяемой группы в наших опытах составляло, по меньшей мере, несколько десятков, а ошибки опытов—не больше 10—20%.

**Результаты и обсуждение.** При культивировании клеток штамма P-192 (a ade2-192) на средах, содержащих 1, 10 и 100 мг/л аденина, получены кривые роста этих клеток (рис. 2). Первая точка для анализа

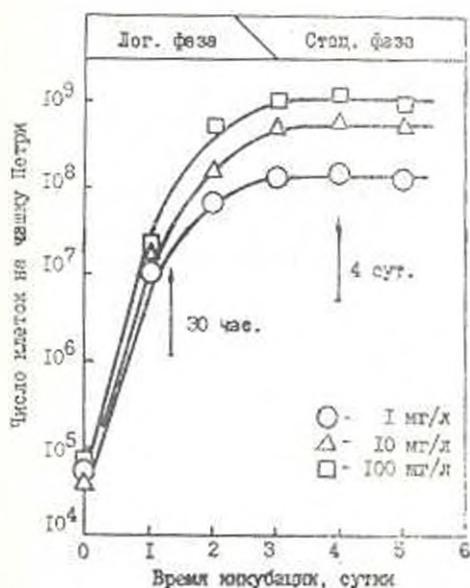


Рис. 2. Кривые роста дрожжей на средах с разным содержанием аденина

мутационности была взята в логарифмической фазе роста культур (30—40 ч), когда аденина в среде достаточно (колонии исходного штамма—белые). Следующая точка—ранняя стационарная фаза (4 сут), когда на средах с 1 и 10 мг/л аденина он истощился (колонии покраснели), а на среде с 100 мг/л аденина по-прежнему его достаточно (колонии—белые).

В экспериментах, поставленных по представленной схеме, регистрировали локусные и супрессорные мутации.

На рис. 3А приведены частоты возникновения супрессорных реверсов в логарифмической и стационарной фазах роста культур как на исходных средах, так и после перенесения на селективную среду без аде-

ния. Видно, что частоты мутирования в генах-супрессорах близки для всех условий культивирования.

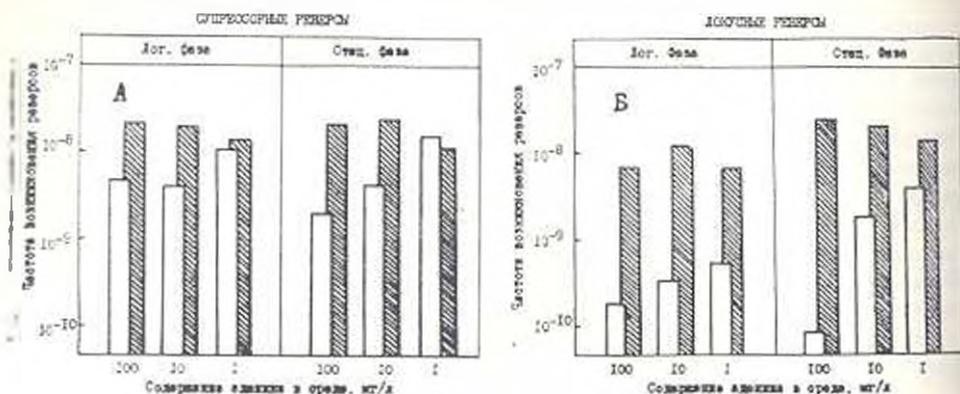


Рис. 3. Частота возникновения супрессорных (А) и локусных (Б) реверсов в логарифмической и стационарной фазах роста (светлые столбики) и при остаточном росте на селективной среде (темные столбики).

Иная картина наблюдается для локусных реверсов (рис. 3Б). В логарифмической фазе роста культур, когда аденина в среде достаточно, частоты на всех трех средах культивирования примерно совпадают. В стационарной фазе роста на среде с избытком аденина (100 мг/л) частота локусных реверсий остается прежней. На средах с 1 и 10 мг/л аденина истощается, а частота реверсий повышается на порядок и более. На селективной среде частота реверсий примерно одинакова и в период роста, и в стационарной фазе независимо от среды культивиро-

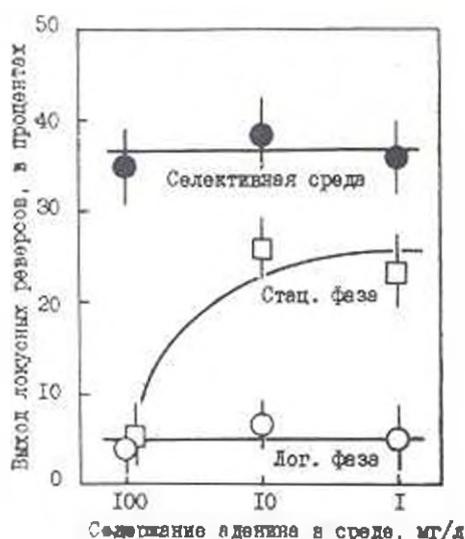


Рис. 4.

Рис. 4. Влияние содержания аденина в среде и условий культивирования на относительный выход локусных реверсов.

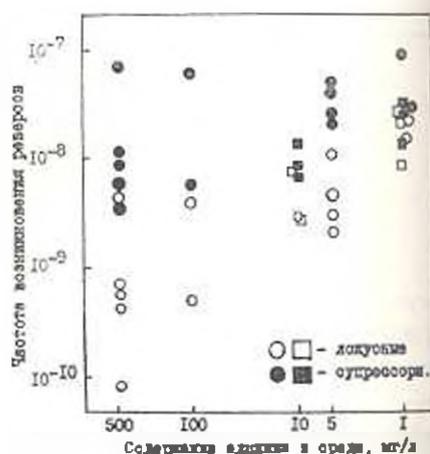


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость выхода локусных и супрессорных реверсов от содержания аденина в среде для дрожжей штамма ДК769-127 (круглые символы) и штамма 769-р192-15В-п4 (квадратные символы).

вания, и лишь немого превышает частоты при истощении аденина в средах с 1 и 10 мг/л его.

Эти же закономерности наблюдаются при рассмотрении соотношения локусных и супрессорных реверсов,  $L/L+S$ . На рис. 4 видно изменение этого соотношения в зависимости от содержания аденина в среде. В логарифмической фазе, когда аденина в среде достаточно,  $L/L+S$  составляет несколько процентов. При переходе в стационарную фазу на среде с 100 мг/л аденина это соотношение не изменяется, а на средах с 1 и 10 мг/л аденин исчерпывается, и величина  $L/L+S$  повышается до 25%. На селективной среде без аденина  $L/L+S$  равно 40—50% при всех условиях предварительного культивирования.

С этими данными согласуются результаты опытов и на других штаммах дрожжей—769-P192-15B-114 и ДК 769-172, ауксотрофных по аденину и лизину. На рис. 5 приведены частоты возникновения локусных и супрессорных реверсов, наблюдаемые в разных опытах на этих штаммах в зависимости от содержания аденина в среде культивирования во время стационарной фазы роста. Видно, что частота мутирования генов-супрессоров почти не изменяется, а для локусных реверсов на средах с высокими концентрациями аденина она существенно меньше, чем на средах с низким содержанием его.

Из представленных данных видно, что на мутирование аденинового гена и генов-супрессоров содержание аденина в среде влияет по-разному. Частота мутирования аденинового гена при резком лимите по аденину увеличивается в 100—200 раз, а мутирование генов-супрессоров незначительно зависит от его содержания в среде.

Аналогичные данные получили Чепурной и Михова-Ценова [10]. При лимитировании лейцина в среде они наблюдали увеличение частоты локусного ревергирования лейцинового гена и постоянство ревергирования лизинового гена.

В последнем случае явно нет никакого дисбаланса пулов нуклеотидов. Это говорит о том, что наши данные также не обязательно трактовать в терминах дисбаланса.

Известно, что регуляция генов аденинового пути биосинтеза осуществляется конечным продуктом [20, 36]. Это позволяет предположить, что ген *ade2* «работает» только при лимите по аденину.

Чтобы объяснить повышение мутабельности аденинового гена при лимите по аденину, мы предложили гипотезу о связи мутабельности гена с его функциональной активностью [4, 5]. Из литературы можно привести много примеров, свидетельствующих о связи между активностью гена и его концентрацией [9, 29, 39] и стабильностью [18, 23, 24, 33, 34], а также о повышенной индуцированной мутабельности активно работающих генов [15, 21, 30, 37].

Мы предполагаем, что активные гены, вследствие их измененной конформации, обладают более высокой мутабельностью. Тогда наши наблюдения объясняются тем, что при достаточной концентрации аденина в питательной среде ген *ade2* не работает, и его мутабельность невысокая. При исчерпании аденина в среде ген *ade2* начинает активно функционировать, и его мутабельность возрастает. Можно пред-

положить также, что супрессорные гены работают одинаково независимо от присутствия или отсутствия в среде аденина. Поэтому их мутабельность тоже не очень зависит от концентрации аденина. В случаях наличия такой зависимости это можно отнести к ошибкам включения оснований в ДНК, что может быть действительно следствием дисбаланса пулов нуклеотидов.

Генная специфичность дисбаланса может проявляться также из того, что недостаток или избыток какого-то нуклеотида может регулировать активность генов, причастных к его синтезу или использованию, и тем самым изменять мутабельность этих генов.

Авторы благодарят Н. О. Абетян, Н. Л. Джанполадян, К. А. Любимову и Нгуен Тхи Нго за помощь в проведении экспериментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вячеславов Л. Г. Автореф. канд. дисс. М., 22, 1973.
2. Девин А. Б. Генетика, 223, 992, 1975.
3. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сб. методик по генетике дрожжей-сахаромидетов. Л., 1984.
4. Илькина В. Л., Корогодин В. И., Файси Ч. Генетика, 23, 637, 1987.
5. Корогодин В. И., Абетян Н. О., Брунцковс Х., Джанполадян Н. Л., Корогодина В. Л., Михова-Ценова Н., Симонян Н. В., Файси Ч., Чепурной А. И. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-351, Дубна, 1988.
6. Корогодина В. Л., Колтавая Н. А., Любимов К. А., Корогодин В. И., Файси Ч. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-835, Дубна, 1988.
7. Корогодина В. Л., Корогодин В. И., Файси Ч. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-766, Дубна, 1988.
8. Лобашев М. Е. Вести Ленингр. ун-та, 8, 10, 1947.
9. Преображенская О. В., Карпов В. Л., Нагорская Т. В., Мирзабеков Ф. Д. Мол. биол., 18, 8, 1984.
10. Чепурной А. И., Михова-Ценова Н. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-333, Дубна, 1988.
11. Barclay V. J., Little J. G. Molec. gen. Genet., 160, 33-40, 1978.
12. Brendel M. In: Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. (Ed. F. J. de Serres), Plenum, New York, 425-434, 1985.
13. Bresler S. E., Mosevitsky A. I., Vyacheslavov L. Nature, 127, 704-706, 1970.
14. Grester S. E., Mosevitsky A. I., Vyacheslavov L. Mutation Res., 19, 261-263, 1973.
15. Truck R. E. Mutation Res., 11, 161-166, 1971.
16. Coughlin C. A., Adeltger R. A. Nature, 176, 531-532, 1956.
17. Eckardt E., Kunz B. A., Launis R. H. Current Genet., 7, 399-402, 1983.
18. Carl L., Ciabr H., Leri J., Vass R. Science 217, 618-620, 1982.
19. Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. (Ed. F. J. de Serres), Plenum Publ. Corp., New York, 1985.
20. Gross T. S., Woods R. A. Heredity, 18, 2, 275, 1972.
21. Herman R. K., Luerkin N. B. J. Bacteriol., 106, 513-550, 1971.
22. Leites A. J., Eisenstark A. Mutation Res., 5, 15-21, 1968.
23. Kim S. H., Ryu D. Biotechnol. Bioeng., 26, 497-502, 1984.
24. Kalsch E., Starlinger E. Z. Vererbungsh., 16, 297-303, 1965.
25. Kunkel T. A., Lash L. A. J. Biol. Chem., 235, 5941-5946, 1960.
26. Kunkel T. A., Silber J. R., Lash L. A. Mutation Res., 93, 411-419, 1982.
27. Kunz B. A. Environmental Mutagenesis, 4, 655-726, 1982.
28. Lammers M., Fallman H. Eur. J. Biochem., 140, 261-267, 1984.
29. Lancillotti F., Lopez A. C., Arias F., Atencio C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1560-1564, 1987.
30. Lipschutz R., Falk R., Aronad C. Israel J. Medical Sci., 3, 323-324, 1965.

31. Luzzo J. K., Brox L., Henderson J. F. *Cancer Res.*, 37, 736—743, 1977.
32. Maybaum K., Cohen M. B., Sudee W. J. *Biol. Chem.*, 256, 2126—2130, 1981.
33. Mellon I., Bohr V. A., Smith C. A., Hanawalt P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8878—8882, 1986.
34. Mellon I., Spivak G., Hanawalt P. C. *Cell*, 51, 241—249, 1987.
35. Ross D. D., Akman S. A., Schrecher A. W., Bachur N. R. *Cancer Res.*, 41, 4493—4498, 1981.
36. Satyanarayanan T., Kaplan J. G. *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 40—47, 1971.
37. Savic D. J., Kanazir D. T. *Molec. gen. Genet.*, 118, 45—50, 1972.
38. Weinberg G., Ullman B., Martin D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2447—2451, 1981.
39. Weisbrod S. *Nature*, 297, 289—295, 1982.

Получено 26.VI 1989 г.

Обзор ж. Армения, № 9—10.(42).1989 г.

УДК 575.11:582.282.23

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК

В. Г. ПЕТИИ

НИИ радиологии АМН СССР, г. Обнинск

Քերված ևն լրացուցիչ տվյալներ, որոնք ցուցադրում են խմորասնկային բջիջների ուղիղզգայնության գենետիկական ղեկավարման արդյունավետությունը: Յուրյց է տրված, որ մոդիֆիկացիայի արդյունավետությունը կախված է բջիջների հետադիմացիոն վերականգնման ունակությունից՝ հսկվող բջիջների գենոտիպով: Որպես ուղիղզգայնության էկզոգեն մոդիֆիկատորներ սպաղաքոված ևն տարրեր ուղիղզգայնությունը և ուղիղսնկաբիլիզատորներ, էներգիայի բարձր զմային հազորդամար ճառագայթումներ (էՊՀ), ինչպես և զազային կազմ՝ էառազայթման վայրկյանին: Ստացված արդյունքները համադրման հիման վրա խմորասնկերի համար՝ զրակալնության մեջ հրոտարակված տվյալներով, այլ օրյակտների համար, ևզրակալնություն է արվում ուղիղզգայնության մոդիֆիկացիայի արդյունավետության գենետիկական ղեկավարմանցիայի ընդհանուր կենսաբանական նշանակության մասին:

Some additional data are presented to demonstrate genetic determination of yeast cells radiosensitivity modification. It was shown that the effectiveness of this modification was dependent of cell ability to postradiation recovery controlling by cell genotype. The following exogenous factors we have used in this paper to modificate cell radiosensitivity: densely ionizing radiation, well-known radioprotector (cysteamin), hypoxic radiosensitizers (metronidazole and misonidazole), oxygen or argon during the irradiation. Comparing findings of this paper with those published in literatures it was concluded the general importance of cell genotype in the effectiveness of cell radiosensitivity modification.

Генетическому контролю модификации радиочувствительности посвящены многие работы [1—7]. Однако интерес к этим исследованиям не ослабевает ввиду фундаментальной и практической значимости получаемых результатов. Детерминация эффективности модификации ра-

Сокращения: ЛПЭ—линейная передача энергии; ОБЭ—относительная биологическая эффективность; ККУ—коэффициент кислородного усилителя.

диочувствительности находится в тесной связи с участием систем пострадиационного восстановления в механизме проявления ОБЭ, кислородного эффекта, механизма действия радиопротекторов и радиосенсибилизаторов. Принципиальное отличие этих механизмов от традиционно рассматриваемых в радиобиологии обуславливает важность и актуальность новой информации, подтверждающей эти механизмы. Перед нами стояли две задачи: на дрожжевых клетках получить дополнительные результаты, указывающие на роль генотипа клеток, контролирующего их способность восстанавливать радиационные повреждения, в детерминации эффективности модификации радиочувствительности некоторыми экзогенными факторами; путем сопоставления данных для дрожжевых клеток с результатами других авторов продемонстрировать универсальность полученных закономерностей для прокариотических и эукариотических клеток различного происхождения.

*Материал и методика.* Эксперименты проведены следующим образом на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* различного генотипа. В настоящее время картировано около 30 локусов этих дрожжей, влияющих на их радиочувствительность. Мутанты дрожжей, содержащие один из этих локусов, условно были подразделены на три категории, различающиеся фенотипически. Первая—17 штаммов, характеризующихся повышенной чувствительностью (по сравнению с клетками исходного родительского штамма лишь к УФ-излучению; вторая—восемь штаммов, чувствительных только к ионизирующему излучению; третья—пять штаммов с повышенной чувствительностью к обоим агентам. Поскольку перед данной работой стояла задача анализа закономерностей модификации чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения, мы использовали, наряду с различными штаммами дикого типа, все радиочувствительные штаммы в гаплоидном и диплоидном состоянии из второй группы и лишь некоторые из первой и третьей группы. Характеристики штаммов приведены в работе [5].

Перед облучением клеток в стационарной стадии роста диплоидные дрожжи выращивали в течение 3—5 сут., а гаплоидные—7—14 сут. на твердой питательной среде при 30°. Продолжительность преирирадиационного культивирования определяли по времени прекращения почкования клеток.

Облучение редкоионизирующим излучением ( $^{60}\text{Co}$ ) на установке «Гаммацелл-220» проводили при мощности дозы от 20 до 10 Гр/мин. В ходе выполнения данной работы мощность дозы уменьшилась в 2 раза за счет радиоактивного распада;  $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$  использовали в качестве стандартного излучения при изучении ОБЭ илучений с высокой ЛПЭ. Импульсный ускоритель электронов с максимальной энергией 25 МэВ использовали при исследовании эффективности модификации радиочувствительности кислородом и гипоксическими сенсбилизаторами. Дозиметрию ускорителя осуществляли непосредственно перед облучением и после его окончания ферросульфатным методом. Погрешность дозиметрии редкоионизирующих излучений составляла 1—10%.

В качестве плотноионизирующего излучения использовали  $\alpha$ -частицы  $^{239}\text{Pu}$ , имеющие средние ЛПЭ примерно 130 кэВ/микрон. Именно при этой ЛПЭ наблюдается максимальное значение ОБЭ для многих клеток эукариот. Детали  $\alpha$ -облучения и дозиметрии описаны ранее [8]. Общая неопределенность дозиметрии  $\alpha$ -источника, проводимая с использованием поверхностно-барьерного полупроводникового детектора, обладающего 100%-ной эффективностью регистрации, хорошим разрешением по энергии и исключительно малым фоном, составляла 10—13%.

В качестве радиопротектора в работе применяли цистеамин в концентрации (0,01 М), не оказывающей токсического действия на клетки, которые помещали в водный раствор радиопротектора за 30 мин до облучения. Детали этой методики описаны [9].

В качестве гипоксических сенсбилизаторов применяли часто используемые как в количественной радиобиологии, так и в экспериментальной и клинической онкологии

электрооакцепторные соединения метронидазол и мизонидазол. Оба препарата использовались при концентрации 0,01 М, которая, не являясь токсичной, проявляет максимальную степень сенсибилизации при почти предельной в обычных условиях растворимости. Электрооакцепторные соединения добавляли в аноксическую суспензию клеток непосредственно перед насыщением ее газом, так как для проявления сенсибилизирующего действия было необходимо, чтобы они присутствовали во время облучения. Для создания аноксии клетки насыщали свободным от кислорода (содержание  $O_2$  менее 0,003%) аргоном, а для создания оксигенированных условий—кислородом. Для этого непосредственно перед облучением растворенный в суспензии клеток воздух откачивали форвакуумным насосом до остаточного давления  $\sim 600$  Па и насыщали аргоном или кислородом. Затем цикл вакуумирование—насыщение газом повторяли трижды. Детали этой методики описаны ранее [10, 11].

Основным биологическим тестом, использованным в данной работе, является способность облученных клеток к бесконечному размножению, определяемая по образованию видимых невооруженным глазом макроколоний сразу после облучения или после 3-суточного пострадиационного восстановления в непитательной среде. При инкубировании облученных дрожжей на стандартной питательной среде при  $30^\circ$  для полного проявления эффекта, как правило, было достаточно 5—7 суток. Для построения кривых доза—выживаемость клетки облучали в нескольких дозах (обычно 3—7). Каждый опыт повторяли не менее трех раз. Другие детали работы описаны в работе [5, 7].

*Результаты и обсуждение* На рис. 1 приведены данные о связи средних инактивирующих доз  $D_0$  после  $\gamma$ - и  $\alpha$ -облучения для 37 штаммов дрожжевых клеток различного генотипа, кривые выживаемости которых опубликованы нами ранее [5, 8]. Облученные клетки высевали на питательную среду сразу после облучения (А) и после 3-суточного пострадиационного восстановления в непитательной среде (Б). Светлые значки обозначают данные для клеток, которые способны к пострадиационному восстановлению, а темные—для клеток, не обладающих такой способностью. Для удобства интерпретации на этот рисунок нанесены линии одинаковых значений ОБЭ, определяемых отношением  $D_0/\gamma/D_0\alpha$ . Эти данные показывают, что ОБЭ возрастает с увеличением  $D_0$ , а также наблюдается хорошая корреляция ( $r=0,88$ ) между ОБЭ, радиочувствительностью и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений; те штаммы, которые характеризуются наибольшей радиочувствительностью, т. е. наиболее «дефицитны» по способности к восстановлению, имели значения ОБЭ более низкие, чем резистентные штаммы, способные к восстановлению. Наиболее интересная новая информация, следующая из этих данных, заключается в том, что различия в ОБЭ между радиочувствительными и радиорезистентными штаммами становятся более значимыми после пострадиационного восстановления (рис. 1. Б) по сравнению с высевом клеток на питательную среду сразу после облучения (рис. 1. А).

Для большей наглядности последнего вывода результаты рис. 1 были трансформированы в зависимость отношения радиочувствительностей мутантного и дикого штаммов  $D_0$  (дикий)/ $D_0$  (мутант) сразу после  $\gamma$ - и  $\alpha$ -облучений (рис. 2, А) и после 3-суточного пострадиационного восстановления (рис. 2, Б). Это отношение непосредственно указывает, во сколько раз исходный родительский штамм устойчивее к дей-

ствие ионизирующего излучения по сравнению с мутантными. Темные значки на этом рисунке характеризуют гаплондные штаммы, светлые — дивалондные. Пунктирные линии показывают связь между указанными параметрами, если бы они изменялись в одинаковой степени после  $\gamma$ - и  $\alpha$ -облучений. Сплошная линия на рис. 2, А проведена через экспериментальные точки; эта же линия нанесена и на рис. 2, Б. Несколько интересных выводов следуют из такого представления дан-

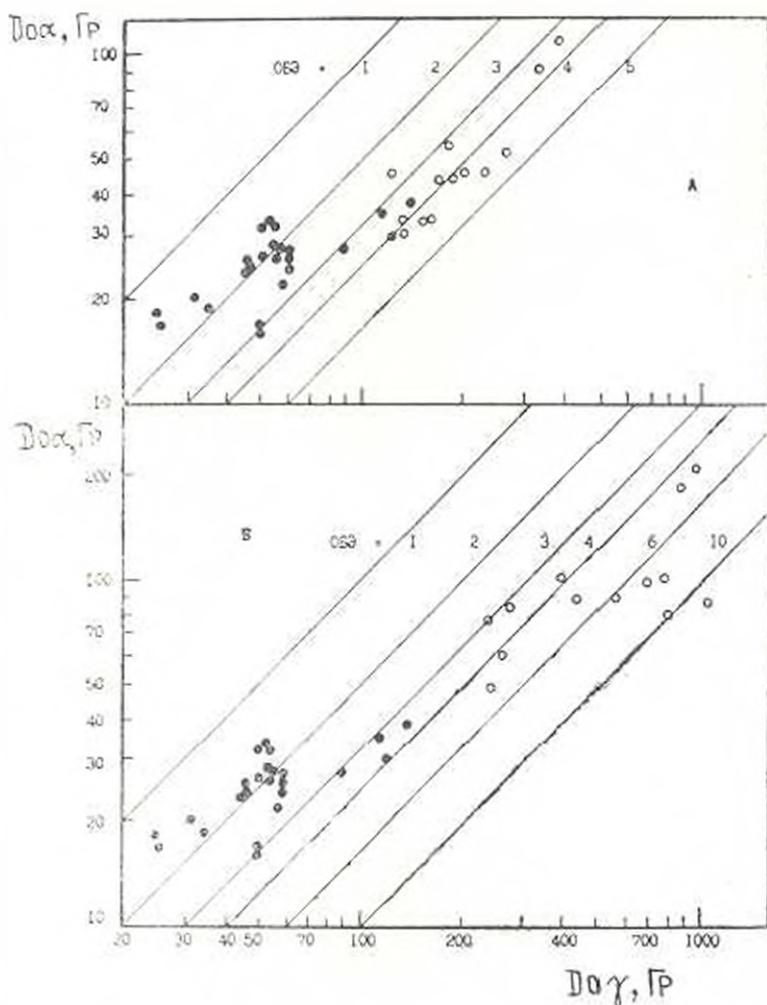


Рис. 1. Связь между  $D_0$  для дрожжевых клеток *S. cerevisiae* различного генотипа, облученных в стационарной стадии роста  $\gamma$ -излучением  $^{60}\text{Co}$  (ось абсцисс) и  $\alpha$ -частицами  $^{239}\text{Pu}$  (ось ординат), сразу после облучения (А) и после 3-суточного восстановления (Б).

ных. Во-первых различия в радиочувствительности клеток мутантного и дикого типа уменьшаются с увеличением ЛПЭ излучения—все экспериментальные точки расположены ниже пунктирной линии. Во-вторых, тенденция к уменьшению различий в радиочувствительности клеток дикого типа и мутантов еще более выражена после пострadiационного

восстановления—экспериментальные точки на рис. 2, Б расположены ниже сплошной линии, характеризующей связь между обсуждаемыми параметрами сразу после облучения. И, наконец, из данных, приведенных на рис. 2, следует важный вывод, что различие в радиочувствительности клеток мутантных и дикого типа в большей степени выражены и модифицируются (восстановлением и качеством излучения) для диплоидных, чем гаплоидных клеток.

Подобное представление данных мы использовали для дополнительной демонстрации генетической детерминации эффективности ра-

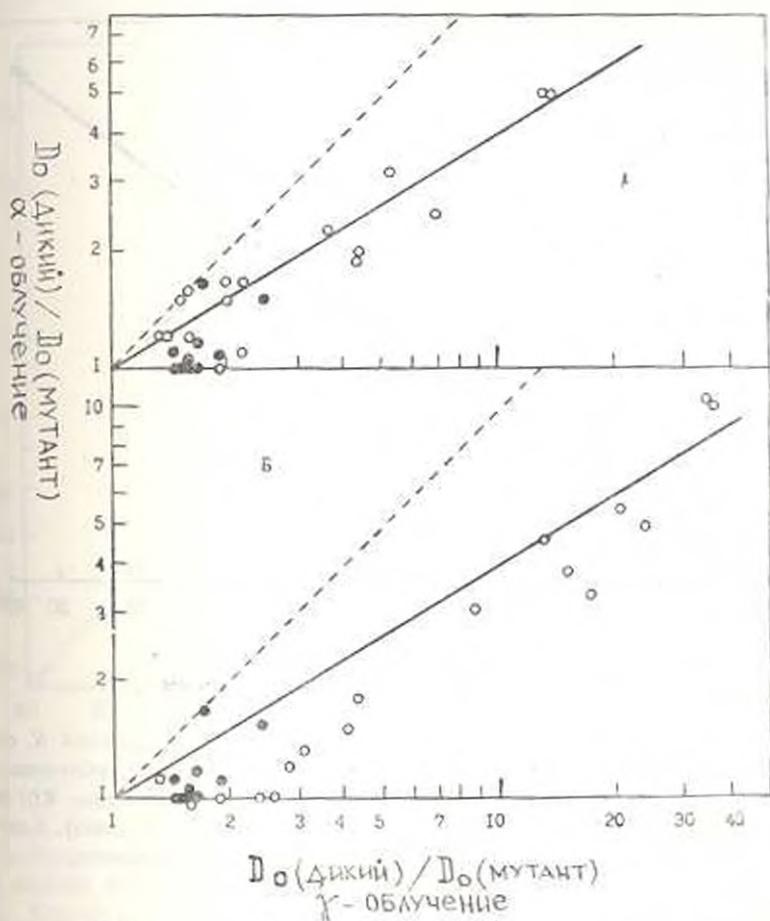


Рис. 2. Связь между отношением радиочувствительностей дрожжей *S. cerevisiae* для мутагенного и дикого штамма  $D_0$  (дикий)/ $D_0$  (мутант), облученных в стационарной стадии роста  $\gamma$ -излучением  $^{60}\text{Co}$  (ось абсцисс) и  $\alpha$ -частицами  $^{239}\text{Pu}$  (ось ординат), сразу после облучения (А) и после 3-суточного восстановления (Б).

диопротектора (рис. 3). Здесь, как и на предыдущем рисунке, светлые значки характеризуют данные для диплоидных клеток, темные—для гаплоидных. Пунктирная линия показывает гипотетическую связь между анализируемыми параметрами, если бы цистеамин действовал с одинаковой эффективностью на клетки различного генотипа. Исход-

ные экспериментальные данные, послужившие основой для построения рис. 3, опубликованы нами ранее для 29 штаммов дрожжей *S. cerevisiae* различного генотипа [5, 9]. В этих работах была продемонстрирована связь между способностью клеток к пострадиационному восстановлению и эффективностью действия радиопротекторов на дрожжи. Данные рис. 3 позволяют более наглядно сделать следующие заключения. Видно, что различия в радиочувствительности клеток дикого и мутантного типа возрастают при использовании радиопротектора. Происходит это благодаря ранее показанной дифференциальной эффектив-

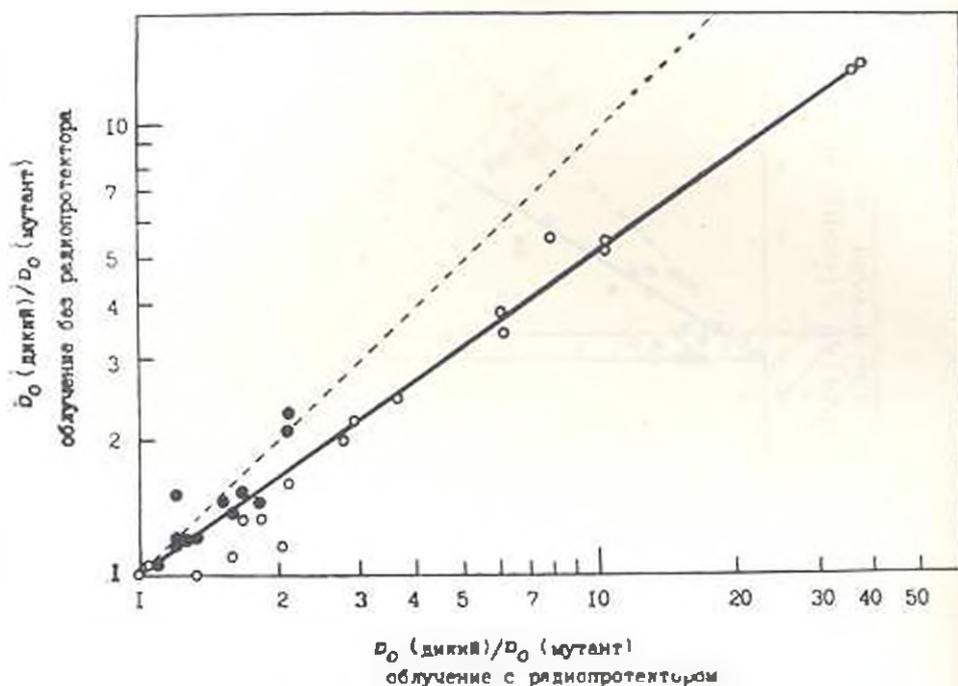


Рис. 3. Связь между отношением радиочувствительностей дрожжей *S. cerevisiae* мутантного и дикого типов  $D_0$  (дикий)/ $D_0$  (мутант), облученных в стационарной стадии роста  $\gamma$ -излучением  $^{60}\text{Co}$  и присутствии 0,01 М цистеаминна (ось абсцисс) и без радиопротектора (ось ординат). Клетки высевали на питательную среду сразу после облучения.

ности действия протектора на клетки дикого и мутантного типа. Из рис. 3 видно также, что анализируемый эффект в большей степени выражен для клеток с двойным набором хромосом, чем одинарным.

Используя ранее опубликованные нами [5, 10, 11] кривые выживаемости дрожжевых клеток различного генотипа (27 штаммов), облученных в различных условиях, мы построили связи между  $D_0$  для клеток, облученных в аноксии, и  $D_0$  для клеток, облученных в оксигенированных условиях (рис. 4) или в условиях аноксия + электроноакцепторные соединения (рис. 5). Для наглядности на эти рисунки нанесены линии одинаковых значений коэффициентов усиления кислородом (рис. 4) и гипоксическими сенсibilизаторами (рис. 5), определяемые

отношениями соответствующих  $D_0$ . На этих рисунках светлые значки относятся к штаммам, обладающим способностью к пострадиационному восстановлению в непитательной среде, темные—к штаммам, не обладающим такой способностью. Из рис. 4 ясно, что эффективность модифицирующего действия кислорода четко связана со способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений: дрожжевые штаммы, дефектные по способности восстанавливаться от радиационных повреждений, имели более низкие значения, чем их более резистентные родительские штаммы и те мутанты, которые сохранили способность к восстановлению в непитательной среде.

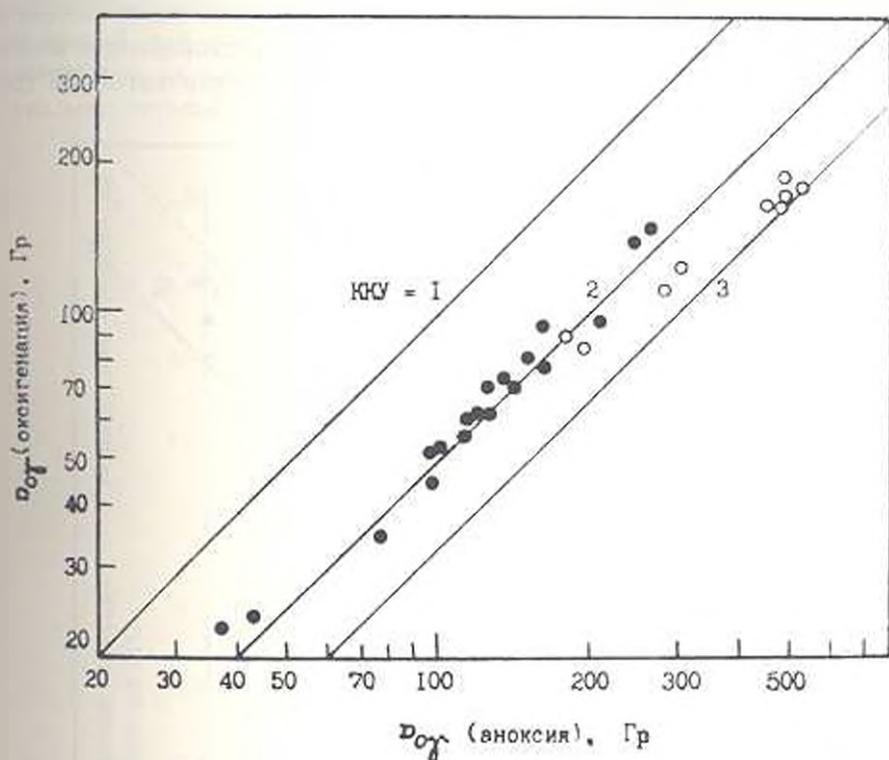


Рис. 4. Связь между  $D_0$  для дрожжевых клеток *S. cerevisiae* различного генотипа, облученных в стационарной стадии роста 25 МэВ электронами в аноксии (ось абсциссе) и в оксигенированных условиях (ось ординат). Клетки высевали на питательную среду сразу после облучения.

Из рис. 5 видно, что метронидазол (кружки) усиливал действие ионизирующего излучения только тех мутантов, которые были способны к восстановлению, и не усиливал эффективность действия радиации на штаммы, неспособные к пострадиационному восстановлению. Однако делать на этом основании вывод, что любые гипоксические сенсибилизаторы могут действовать только на радиочувствительность штаммов, способных к восстановлению, нельзя. Как видно из рис. 5, более эффективный гипоксический сенсибилизатор мизондазол (треугольники) повышал радиочувствительность всех изученных штаммов, однако эффективность модификации радиочувствительности коррелиро-

вала со способностью клеток к пострadiационному восстановлению: она для радиорезистентных штаммов была более высокой, чем для радиочувствительных.

Некоторые авторы связывают механизм действия гипоксических сенситизаторов с подавлением способности клеток к пострadiационному восстановлению. Приведенные на рис. 5 результаты принципиально не противоречат такому представлению. Однако данные рис. 6 показывают, что вряд ли такой механизм реализуется в действительности. Видно, что с увеличением молярной концентрации мизонидазола повышается радиочувствительность клеток (возрастает коэффициент усиления мизонидазолом), но параллельно уменьшается доля необратимо пораженных клеток, т. е. возрастает объем восстановления клеток при выдерживании их в пострadiационный период в неинтактной сре-

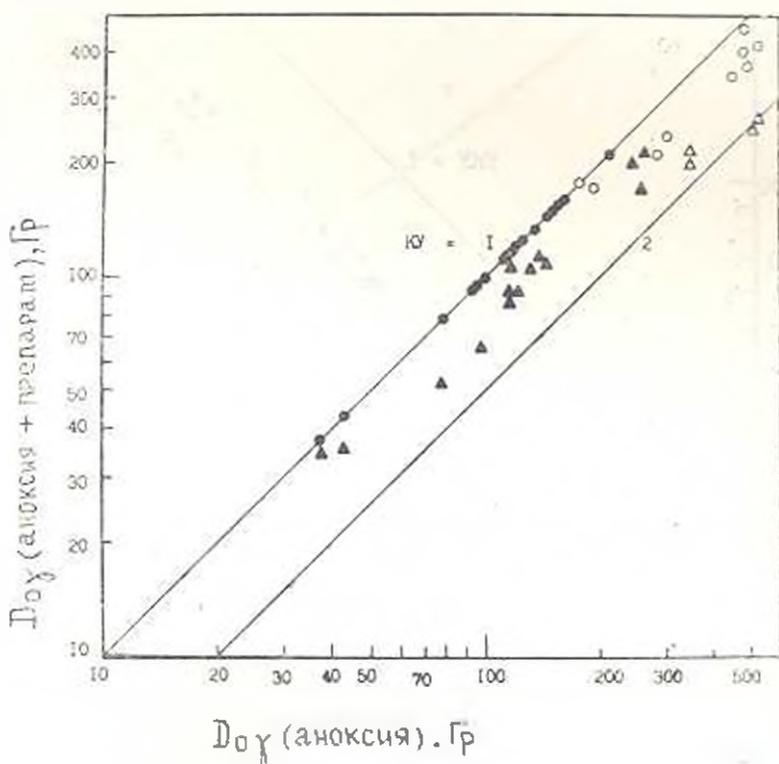


Рис. 5. Связь между  $D_0$  для дрожжевых клеток *S. cerevisiae* различного генотипа, облученных в стационарной стадии роста 25 МэВ электронами в аноксии (ось абсцисс) и в условиях аноксия+гипоксический сенситизатор (ось ординат). Клетки высевали на питательную среду сразу после облучения.

де. Следовательно, механизм сенситизации гипоксических клеток электроакцепторными соединениями вряд ли связан с ингибированием восстановления, а скорее обусловлен большей вероятностью проявления радиационных повреждений, приводящих к инактивации клеток.

Приведенные результаты являются дополнительным аргументом в пользу участия систем пострадиационного восстановления в модификации радиочувствительности плотнoионизирующими излучениями, радиопротекторами, кислородом и гипоксическими сенситизаторами.

Данные о корреляции ОБЭ плотнoионизирующих излучений с радиочувствительностью и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений известны и для ряда других клеток прокариот [6, 12, 13], в том числе и для культивируемых клеток человека [14, 15]. Совокупность этих данных показывает, что ОБЭ плотнoионизирующих частиц определяется не только повышенной вероятностью формирования радиационных повреждений при большой ЛПЭ излучений, как это традиционно предполагалось, но и повышенной вероятностью их проявления на биохимическом этапе реализации потенциально летальных повреждений. Участие процессов пострадиацион-

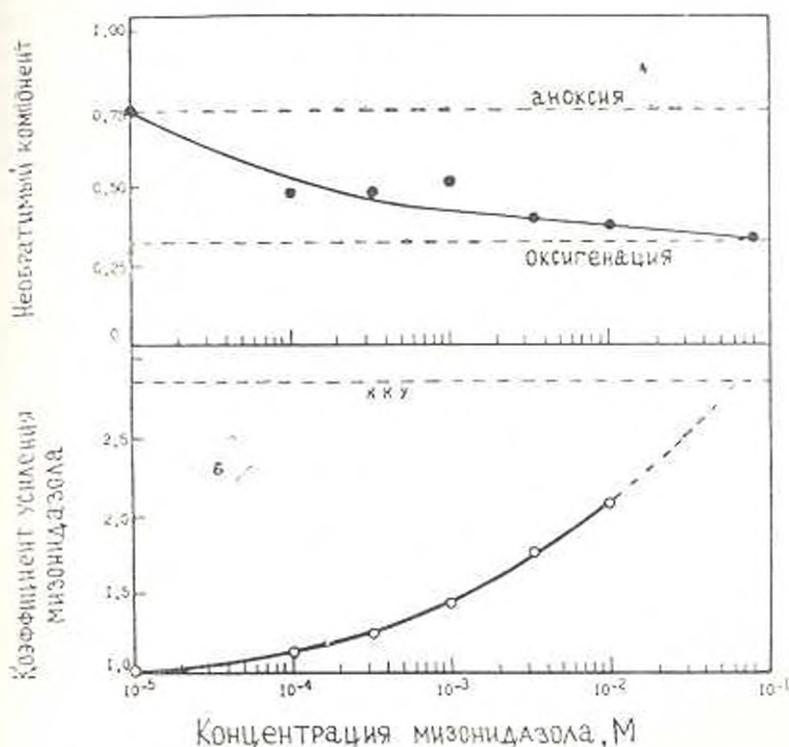


Рис. 6. Зависимость необратимого компонента лучевого поражения (А) и коэффициента усиления мизондазолом (Б) от его молярной концентрации. Диплоидные дрожжи *S. cerevisiae* дикого типа (штампы XS800) облучали 25 МэВ электронами в стационарной стадии роста.

ного восстановления, в частности, механизма восстановления двойных разрывов цепей ДНК [16], в проявлении ОБЭ плотнoионизирующих излучений сводится к тому, что при действии излучений с высокой ЛПЭ повышается вероятность формирования повреждений, от которых клетка не может восстанавливаться. Естественно, что проявляется это в

большей степени для радиорезистентных клеток, для радиочувствительных мутантов.

Данные об участии систем пострадиационного восстановления в механизме действия радиопротекторов известны к настоящему времени для клеток различного происхождения [2, 3, 5, 6, 12], в том числе и для культивируемых клеток человека [17, 18]. Эти данные показывают, что эффективность действия радиопротекторов определяется не только снижением вероятности формирования радиационных повреждений, как это традиционно предполагалось, но и уменьшением вероятности проявления (реализации) потенциально летальных повреждений из-за функционирования систем пострадиационного восстановления.

Дополнительные данные по генетической детерминации эффективности модификации радиочувствительности кислородом и гипоксическими сенсбилизаторами, приведенные в данной работе, в совокупности с опубликованными другими авторами результатами для клеток различного происхождения [3, 12, 19], в том числе и для культивируемых клеток человека [15, 17, 18], демонстрируют связь радиосенсибилизирующего действия кислорода и гипоксических сенсбилизаторов с радиочувствительностью клеток и их способностью к пострадиационному восстановлению. Это означает, что механизм радиосенсибилизирующего действия этих агентов связан не только с физико-химическим этапом формирования радиационных повреждений, но и с зависящей от генотипа способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений на биохимическом этапе их проявления.

Важно подчеркнуть, что отмеченная в работе дифференциальная модификация радиочувствительности резистентных штаммов дикого типа и радиочувствительных мутантов, дефектных по репарации, в большей степени была выражена для клеток в диплоидном, чем в гаплоидном состоянии. Эти данные показывают, что процессы ферментативного восстановления, участвующие в этих модификациях, более эффективно работают у диплоидных дрожжей по сравнению с гаплоидными, т. е. лишь при наличии в клетках гомологичных хромосом. Это может означать, что процесс восстановления осуществляется через рекомбинацию и поэтому нуждается в конъюгации хромосом-гомологов. Диплоид-специфическая форма восстановления [20], связанная с наличием в клетке двух наборов хромосом, может проявляться в ликвидации двойных разрывов ДНК. Известно, что лишь диплоидные клетки способны восстанавливаться от двойных разрывов ДНК [11, 21], а гаплоидные клетки и диплоидные, гомозиготные в отношении некоторых гап-локусов, не обладают такой способностью. Следовательно, восстановление двойных разрывов цепей ДНК, которое осуществляется по рекомбинационному механизму и для которого требуется диплоидное состояние, может явиться тем фактором, который принимает участие в механизме проявления ОБЭ плотноконизирующих излучений, действия радиопротекторов, кислорода и гипоксических сенсбилизаторов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мясник М. Н. Генетический контроль радиочувствительности бактерий. 152, М., 1974.
2. Носкин Л. А. Докт. дисс., 250, Гатчина, 1984.
3. Эдгар Л. Х., Корыстов Ю. Н. Кислород в радиобиологии. 177, М., 1984.
4. Мясник М. Н., Сворцов В. Г., Соколов В. А. Фотобиологические аспекты радиационного поражения клеток. 151, М., 1985.
5. Петух В. Г. Генетический контроль модификации радиочувствительности клеток. 204, М., 1987.
6. Красович Е. А. Проблемы ОБЭ и репарации ДНК. 217, М., 1989.
7. Петух В. Г., Комаров В. И. Количественное описание модификации радиочувствительности. 152, М., 1989.
8. Pettit V. G., Kubakova N. A. Mutation Res., 82, 2, 181—291, 1981.
9. Pettit V. G., Matrenina V. I., Mol. Gen. Genet., 183, 1, 152—157, 1981.
10. Pettit V. G., Ryabchenko V. I. Int. J. Radiat. Biol., 42, 5, 491—500, 1982.
11. Pettit V. G. Mutation Res., 108, 1, 121—131, 1983.
12. Alper T. Cellular Radiobiology. Cambridge University Press, 1979.
13. Alper T. Br. J. Cancer., 49, 6, 137—143, 1984.
14. Hewitson I. P. Int. J. Radiat. Biol., 34, 5, 461—469, 1978.
15. Tobias C. A., Blakely E. A., Chang R. Y., Lommel L., Roots R. Br. J. Cancer., 49, 6, 175—185, 1984.
16. Frankenberg—Schwager M., Frankenberg D., Harbich R. Br. J. Cancer., 49, 6, 169—173, 1984.
17. Эдgren М., Модиг Х., Ревез Л. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. М., 220—226, 1983.
18. Revesz L., Edgren M., Nishida T. In: Modification and Radiosensitivity in Cancer Treatment. Tokyo, Academic Press, 13—29, 1984.
19. Sapor O., Fielden E. M., Loverock P. S. Radiat. Res., 69, 2, 293—305, 1977.
20. Saeki T., Machida I., Nakai S. Mutation Res., 73, 2, 251—265, 1980.
21. Luchnik A. N., Glaser V. M., Shestakov S. V. Mol. Biol. [Repts., 3, 6, 437—442, 1977.

Поступило 31.V 1989 г.

Биолог ж. Армении, № 9—10, (42) 1989 г.

УДК 575.581.174

### ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ АЛЛЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ГЕНА *FLAVI-1* НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ РЯДА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

О. В. УСМАНОВА, П. Д. УСМАНОВ

Отдел общей генетики хлопчатника АН Тадж.ССР, г. Душанбе

*Ներկայացված է և տվյալները ստորին տիպի արարիզոպիսի 8 մուտանտային ձևերի մասին շարքը ցանկազան հատկանիշների փոփոխությունների վրա ազդելու և ուստի տիպի մուտացիաների ազդեցության վերաբերյալ: Քեննեդիական վերլուծու-*

Քլորոֆիլի քանակությունը է. որ բլթերի ֆենատիպը պայմանավորված է 3 ոչ ավելա-  
 լին զենների ազդեցությամբ: Ի զեւյ ցույց է տրված, որ իւս-1 զենն ունի 6 ալել-  
 ամորֆային միճակներ: Քվարկված 3 զեններից յուրաքանչյուրի նամար պարզված  
 է ըստֆիլային անբավարարության ժառանգման մոնոհիբրիդային բնույթը. Ապտ-  
 ցուցված է իւս-1 տիպի պատկանելությունը միացման 5-րդ չրմաստմային  
 խմբին: Այնուային մուտանտների համար գրանցված են զանազան շեղումներ  
 ետրմայից՝ ըստ վարդակի տերևների չափսերի, բույսերի բարձրության, կողմային  
 ճյուղերի բանակի, մի բույսի վրա առաջացած պտուղների և ջրղունների բանակի,  
 բարոպլաստների թվի և չափսերի. նրանց ուստրակտոցվածքային կազմակերպ-  
 ման, ինչպես և նրանցում նրկրային պիգմենտների պարունակության:

The data on allelic and nonallelic mutations activity upon the inconstan-  
 cy of a number of quantitative indications of eight Arabidopsis Chlorine  
 mutant forms are presented in the article. With the help of genetic analy-  
 sis it is established that the Chlorine phenotype is due to the action of  
 three nonallelic genes: Ch-3, Ch-5, flavi-1. It is shown that the gene  
 flavi-1 has six allelomorphic states. Each of the three enumerated genes  
 has monohybrid character of chlorophyll insufficiency inheritance. The  
 allelic mutants have various departures from the norm on the rosette lea-  
 ves size, on the plant height, on the stems number, the side limbs and  
 fruits, formed on one plant; on the number and size of chloroplasts and  
 their ultrastructural organization and on the contents of green pigments in  
 them.

Среди большого многообразия индуцируемых мутагенами наслед-  
 ственно-измененных форм у растений особый интерес представляют  
 аллельные мутации. Получение и экспериментальных исследованиях  
 аллельных мутаций является весомым аргументом, говорящим в поль-  
 зу того, что единицей изменения в данном конкретном случае является  
 ген (т. е. возникла истинно генная мутация).

Аллельные мутанты могут служить в качестве удобных моделей  
 для изучения тонкой структуры гена, действия различных субъединиц  
 одного и того же гена на характер изменчивости и степень выраженно-  
 сти фенотипического признака. Располагая большой коллекцией хлоро-  
 филльных мутантов арабидопсиса, мы поставили перед собой следую-  
 щие задачи: выделить аллельные мутации среди коллекции мутантных  
 форм арабидопсиса типа хлорина; установить генетическую природу  
 аллельных мутаций и исследовать их действие на структурную органи-  
 зацию фотосинтетического аппарата пластид и хлоропластов.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили индуцированные различ-  
 ными физическими и химическими веществами жизнеспособные хлорофилльные му-  
 танты типа хлорина—58/15, V-76, F<sub>2</sub>Ch1, 12.5. (17), 12.6. (15), 6.2. (11), 73, 768/5, кон-  
 тролем служили растения расы Энкхайм (En).

Опытные растения выращивали в почве на высекогорном стационаре Снежух. В  
 процессе роста и развития проводили фенологические наблюдения, регистрировали  
 изменчивость ряда количественных признаков (табл. 1).

В фазу бутонизации—цветения проплатили скрещивания по общепринятой методи-  
 ке, которая достаточно подробно описана [1]. Известно, что выявление серии мно-  
 жественных аллелей требует проведения большого объема работ по скрещиванию му-  
 тантов между собой. Для подсчета максимального возможного числа скрещиваний на  
 аллелизм используется общепринятая формула  $M = \frac{n^2 - n}{2}$ , где M—число скрещива-

Таблица 1. Влияние мутантного гена на изменчивость ряда количественных признаков у мутантных форм арабидонсиса

Шифр линии	Размер розетки, мм	Высота главного стебля, мм	Количество на растение			Вес 1000 семян, мг
			стеблей	боковых ветвей	стручков	
En	76	194,00±7,31	2,20±0,17	6,40±0,91	65,40±1,42	23
73	23	91,00±5,69	1,40±0,10	3,60±0,18	30,60±2,65	21
F <sub>2</sub> chl	51	166,80±3,83	1,80±0,49	5,00±0,28	45,00±2,09	18
62 (15)	45	154,20±4,42	7,60±0,23	18,20±0,91	108,8 ±3,62	15
53/15	40	173,40±3,95	7,20±0,31	22,60±1,00	218,40±6,45	15
12.6. (15)	42	107,80±4,34	5,60±0,46	17,60±0,87	63,20±3,77	16
V-76	35	172,00±11,82	4,80±0,38	19,50±1,84	178,0 ±24,74	17
12.5 (17)	39	130,80±5,41	5,40±0,23	29,90±1,91	74,60±5,26	17

ний: p—число взятых в скрещивание мутантных линий [2]. Эту работу целесообразно проводить поэтапно, исключая в генетический анализ одновременно не более четырех—пяти линий. В опытах было осуществлено более 200 скрещиваний.

Для установления аллельных взаимоотношений использовали тест на аллелизм, который основан на том, что при скрещивании двух мутантов, несущих изменения в разных генах, возникает гибрид первого поколения—дигетерозигота, имеющая фенотип дикого типа в силу доминирования нормальных аллелей каждого из генов. В таком случае принято считать, что исследуемые рецессивные мутации не аллельны. А если после скрещивания мутантов между собой в F<sub>2</sub> растения имеют мутантный фенотип, то значит мутации аллельны, так как обе аллели одного и того же гена находятся в гомологичных хромосомах.

Для определения характера наследования изучаемого признака желто-зеленый мутант арабидонсиса скрещивали с исходной расой. В качестве материнского растения, по правилу, брали мутант, у которого под бинокулярной лупой кастрировали тычинки в зароссыривших бутонках. Затем на рыльце созревшего пестика наносили пыльцу, взятую с растения дикого типа. Для определения группы сцепления мутанты арабидонсиса скрещивали с маркерными линиями *velociflor*, *gl'ap*, *lu'co*, выделенными Редд [3]. Содержание зеленых пигментов в листьях определяли в 100%-ном ацетоне по методу Ветштейна [4].

Цитологический и электронно-микроскопический анализ проводили на сформировавшихся средних участках второй и четвертой пары розеточных листьев. При цитологическом анализе массы и размера хлоропластов в клетках губчатого мезофилла аллельных мутантов, инфилтратом зрелой фазы делали в изотоническом растворе сахарами по общепринятой методике [5]. Препараты просматривали и просчитывали под световым микроскопом МБИ-3 и МББ-1А при увеличении \*300 (окуляр 20, бинокулярная линза 1,5\*). Диаметр хлоропластов измеряли, используя окуляр-микрометр МОВ-1\* при общем увеличении \*1350.

Для электронно-микроскопического исследования тонких срезов мелко нарезанные кусочки листьев фиксировали в течение 1,5 часа 2%-ным раствором глютаральдегида в фосфатном буфере при pH 7,4 и дофиксировали 1% OsO<sub>4</sub>. Материал обезжиривали спиртом возрастающей концентрации до абсолютного, после чего проводили через бензидиный ацетон. Образцы заливали эпоксидом 812. Срезы готовили на ультратоме фирмы LKB (Швеция); контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольду [6]. Препараты просматривали и фотографировали на электронном микроскопе Hitachi (Япония). Работу проводили в лаборатории цитогенетики Института общей генетики АН СССР им. Н. И. Вавилова (Москва).

**Результаты и обсуждение.** Здесь дается описание фенотипического проявления действия мутантного гена на морфологические признаки и особенности роста и развития мутантных растений; затем приводятся данные генетического анализа по выяснению аллельных взаимоотно-

шений и характера наследования признака хлорофилльной недостаточности; завершается эта часть характеристикой ультраструктурной организации хлоропластов в клетках фотосинтезирующих тканей зеленых мутантов арабидопсиса.

### *Фенотипическая характеристика мутантных растений*

58/15—Желто-зеленая окраска листьев (иногда стеблей и стручков), переходящая в светло-желтую, светло-зеленую; верхушки стручков усыхающие; созревание семян неравномерное. Размер розетки 2,5—5 см; высота растения 4—17 см. Развитие замедленное; плодовитость пониженная.

12.6.(15)—Желто-зеленая яркая окраска листьев, переходящая в светло-зеленую при повышении температуры. Размер розетки 2—7 см; высота растения 9—18 см. Развитие сильно замедленное, плодовитость пониженная. При низкой температуре появляется антоциан.

Г<sub>2</sub>—Желто-зеленая яркая окраска листьев растения, переходящая в светло-желтую, светло-зеленую. Размер розетки 3—5 см, высота растения 7—16 см. Развитие почти нормальное, плодовитость нормальная.

V-76—Желто-зеленая яркая окраска листьев, переходящая в светло-зеленую. Размер розетки 3—4 см; высота растения 12—17 см. Развитие замедленное, плодовитость пониженная [7].

12.5.(17)—Желто-зеленая яркая окраска листьев и растения, переходящая в светло-желтую, светло-зеленую. Размер розетки 3—5 см; высота растения—13—18 см. Развитие замедленное, плодовитость пониженная.

6.2.(14)—Желто-зеленая яркая окраска листьев, переходящая в светло-зеленую. Размер розетки 3—6 см; высота растения 8—15 см. Развитие сильнозамедленное, плодовитость низкая.

73 Б—Зеленовато-желтая окраска листьев, переходящая к концу вегетации в светло-зеленую. Размер розетки 1—3 см; высота растения 4—11 см. Развитие почти нормальное; плодовитость пониженная.

568/5—Зеленовато-желтая окраска листьев, переходящая в светло-зеленую. Растения тонкостебельные. Размер розетки 2—3 см, высота растения 10—24 см. Развитие нормальное; плодовитость почти нормальная.

Под световым микроскопом изучали действие мутантного гена на размер и число хлоропластов в клетках губчатого мезофилла листьев мутантных растений. Наряду с главным мутантным признаком (желто-зеленая окраска растений), они различаются по числу хлоропластов между собой и в сравнении с контролем (табл. 2). В табл. 3 показана мутационная изменчивость содержания хлорофиллов *a* и *b* в хлоропластах листьев мутантных растений. Наименьшее количество хлорофиллов наблюдается у мутанта 12.5.(17).

Анализируя в целом экспериментальные данные, представленные в табл. 1—3, мы приходим к заключению, что изученные нами мутант-

Таблица 2. Число и размеры хлоропластов в клетках губчатого мезофилла листьев мутантных форм арабидопсиса

Шифр линий	Параметры хлоропластов		Шифр линий	Параметры хлоропластов	
	число	размеры, мкм		число	размеры, мкм
Ep	28.68±1.03	5.01±0.07	12.6. (15)	21.70±0.56	4.38±0.06
73	21.62±1.13	1.21±0.06	12.5. (17)	21.30±0.58	4.57±0.05
V-76	22.76±0.72	4.53±0.05	6.2. (14)	20.82±0.59	4.49±0.07
58/15	21.96±0.54	4.41±0.03	Echl	20.16±0.54	4.65±0.06

ные формы арабидопсиса существенно различаются по целому ряду количественных признаков: по размерам розеточных листьев, высоте растений, количеству стеблей, боковых ветвей и плодов, сформировавшихся на одном растении; по числу и размерам хлоропластов в клетках фотосинтезирующих тканей и содержанию зеленых пигментов. При этом следует отметить, что как по числу и размерам хлоропластов, так и

Таблица 3. Мутационная изменчивость содержания хлорофиллов в листьях мутантных форм арабидопсиса

Шифр линий	Содержание хлорофилла, мкг/мг сырого веса			Шифр линий	Содержание хлорофилла, мкг/мг сырого веса		
	а	в	а/в		а	в	а/в
Ep	826±7	370±16	2.2	12.5. (17)	134±8	37±4	4.1
58/15	303±10	129±3	2.3	12.6. (15)	346±9	178±12	1.9
V-76	237±10	189±30	1.3	73	422±11	196±9	2.1

по содержанию хлорофиллов мутантные формы значительно уступают контролю.

#### *Аллельные взаимоотношения мутантных форм типа хлорина и характер их наследования*

При скрещивании желто-зеленых мутантов на аллелизм нами выделены три гена (73, 58/15, 568/5), независимо детерминирующие желто-зеленую окраску арабидопсиса (табл. 4), причем по одному гену (58/15) обнаружено шесть аллеломорфных состояний. Ранее мы уже подчеркивали, что получение аллельных мутаций гонорит в пользу истинно геной природы возникшего изменения. В подтверждение этого можно привести результаты скрещивания любого мутанта из членов ряда, составляющих серию множественных аллелей с растениями дикого типа. Так, например, при скрещивании 58/15×Ep фактическое расщепление составляло 53 нормальных и 23 мутантных растения, при ожидаемом 54.75:18.25, что свидетельствует о полном соответствии моногибридному характеру наследуемого признака (при  $\chi^2=0.07$  P (3:1)=0,982). Эти данные говорят в пользу того, что мы имеем дело с истинно геной мутацией. Нами проведены также скрещивания мутантов 73 и 568/5 с растениями дикого типа, которые выявили гочковую природу анализируемых мутаций, локализованных, однако, в других

локусах. Нам представлялось интересным ответить на вопрос: в какой хромосомной группе сцепления находится ген, образующий серию множественных аллелей. Для этого казалось достаточным провести скрещивание лишь одного мутанта—58/15 из серии множественных аллелей с тестовыми линиями арабидопсиса, хромосомные группы сцепления которых мечены различными сигнальными генами: ap—I группа сцепления; eg—II; gl—III; ve—IV и lu—V группа сцепления. Все маркерные гены свободно комбинировали с геном 58/15, в полном соответствии со схемой дигибридных скрещиваний (9:3:3:1). Лишь для гена lu фактическое расщепление 102:40:47:0 существенно отклонялось от ожидаемого 108:36:36:12, что свидетельствует о явном нарушении явления свободного комбинирования, характерного для дигибридного скрещивания. Из этого следует, что ген 58/15, а следовательно, и все другие гены, составляющие серию множественных аллелей, расположены в пятой хромосомной группе сцепления арабидопсиса.

Используемые в работе мутантные растения имеют цифровую символику, так как это принято при получении мутаций (т. е. номер семьи и варианта после обработки химическими и физическими мутагенами). Целесообразно перенести название мутагенов в фенотипическую символику, обозначая гены [8].

Результаты генетического анализа позволили нам для обозначения аллельных и неаллельных генов предложить сокращенную и развернутую генетическую символику, представленную в табл. 5.

Таблица 5. Обозначение генов мутантных форм арабидопсиса типа хлорина

Шифр аллели	Г е н	
	символ	название
73	ch 3	<i>chlorina 3</i>
58/15	flav1-1	<i>flavoviridis 1-1</i>
V:76	flav1-5	<i>flavoviridis 1-5</i>
F <sub>8</sub> chl	flav1-4	<i>flavoviridis 1-4</i>
12.5. (17)	flav1-3	<i>flavoviridis 1-3</i>
6.2. (14)	flav1-6	<i>flavoviridis circulifolia 1-6</i>
12.6. (15)	flav1-2	<i>flavoviridis 1-2</i>
568:5	ch 5	<i>chlorina 5</i>

Результаты проделанной нами работы убедительно показывают, что сходные фенотипические эффекты могут обуславливаться различными состояниями одного и того же гена (аллельные мутации). В нашем случае ген flav1-1 и различные его состояния являются хорошим подспорьем для исследования в целом «ген—признак» и изучения механизмов генетического контроля структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений.

Таблица 4. Выяснение аллельных взаимоотношений среди мутантов арабинопеписа класса хлорина

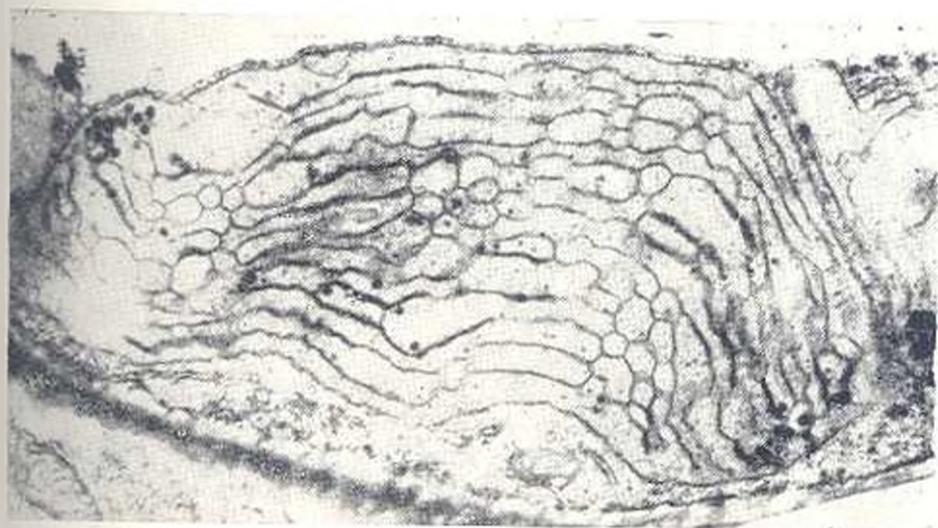
	7-76	58/15	12.5.(17)	73	12.6.(15)	$P_{chl}$	568/5	6.2.(14)
7-76		В	В	+	В	В	+	В
58/15	В		В	+	В	В	+	В
12.5.(17)	В	В		+	В	В	+	В
73	+	+	+		+	+	+	+
12.5.(17)	В	В	В	+		В	+	В
$P_{chl}$	В	В	В	+	В		+	В
568/5	+	+	+	+	+	+		+
6.2.(14)	В	В	В	+	В	В	+	

# ВКЛЕЙКА

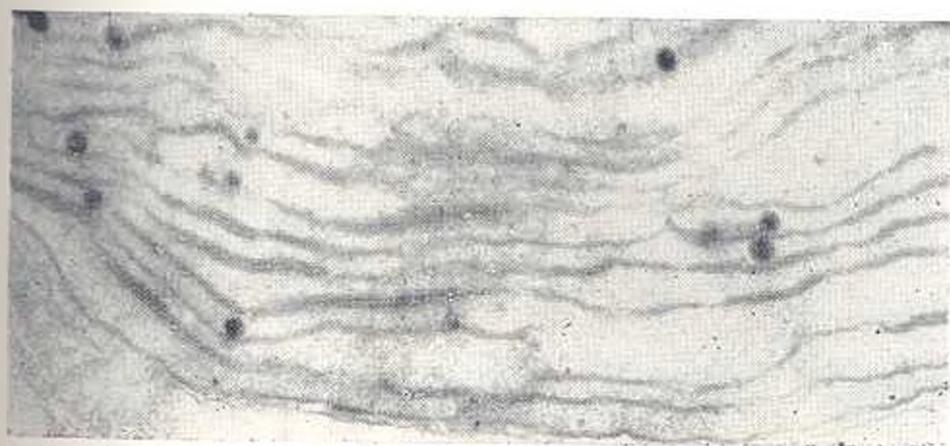
(к ст. Урмановой О. В., Урманова П. Д.)



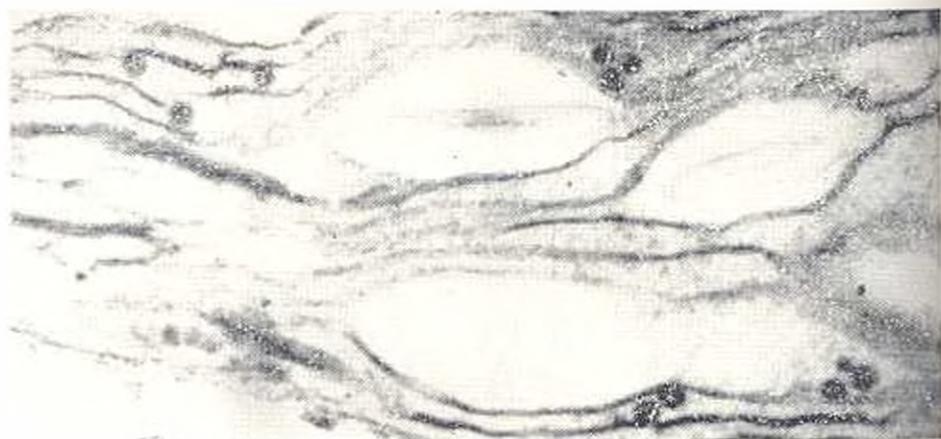
Исходная ра-а Еп (контроль)  $\times 58000$ .



Пласт 1-3  $\times 9830$



Пласт 1-3  $\times 58000$ .  
Ультраструктура хлоропластов мутантов (рис. 1)



Placi 1-4  $\times 60000$ .



Placi 1-5  $\times 60000$ .



Placi 1-6  $\times 58000$ .

*Цитологическое и электронно-микроскопическое изучение  
хлоропластов в клетках фотосинтезирующих тканей  
аллельных мутантов арабидопсиса*

Морфологический анализ хлоропластов в листьях исходной и мутантных форм показал, что они преимущественно имеют округлую, реже эллипсоидную форму: зеленая окраска—у контроля и желто-зеленая—у хлоропластов мутантных форм. Хлоропласты в норме характеризуются равномерной гранулированностью, что не отмечается у мутантов. Световая микроскопия хлоропластов дает нам самые общие сведения о структурной организации фотосинтетического аппарата. Более детальное изучение его ультраструктуры под влиянием мутантного гена *flav-1* возможно только с применением электронного микроскопа. Изучение ультраструктурной организации мембранной системы хлоропластов у арабидопсиса в норме показало, что они имеют строение, типичное для хлоропластов зеленых растений, что согласуется с литературными данными [9, 10]. Хлоропласты имеют форму вытянутой линзы (форма иногда зависит от среза), окруженной оболочкой, состоящей из двух мембран. Система фотосинтетических мембран представлена хорошо развитыми ламеллами с упорядоченно расположенными тилакоидами в гранах и межгранных ламелл. Стопки гран заключают от 6 до 16 плотно упакованных тилакоидов. Однако анализ ультраструктуры хлоропластов у аллельных мутантов показал заметные отклонения от нормы. Наиболее характерным для них типом нарушения является отсутствие нормальных высокоупорядоченных гран, отдельные тилакоиды простираются по всей строме хлоропласта. Мембраны мутантов *flav-1-3\**, *flav-1-6* характеризуются выплывающей тилакоидной стромы и незначительным количеством гран, в стопках которых от 2 до 5 тилакоидов. Особенно отличается по ультраструктуре хлоропластов мутант *flav-1-1*. Тилакоиды стромы имеют выпятое строение с небольшим количеством укороченных гран, в стопках которых по 2—3 тилакоида. Кроме того, отличаются наличием большого числа пластоглобул и отсутствием крахмальных зерен. В хлоропластах мутанта *flav-1-4* присутствуют крахмальные зерна и пластоглобулы; мембранная система у этого мутанта достаточно хорошо развита, однако в гранах от 3 до 5 тилакоидов. Хлоропласты мутанта *flav-1-5* имеют небольшое количество гран, но они достаточно хорошо развиты, хотя в сравнении с контролем у них значительно меньше тилакоидов в стопках гран. У мутанта *flav-1-2* хлоропласты имеют овально-округлую форму. Ближе расположенные ламеллы собраны в многочисленные граноподобные образования.

Таким образом, электронно-микроскопический анализ аллельных мутантов показал значительные изменения в ультраструктуре хлоропластов. Степень изменчивости ультраструктурной организации хлоропластов зависит от действия различных субъединиц одного и того же гена *flav-1*.

\* Здесь и далее, см. вклейки.

В настоящее время мы располагаем предварительными данными, полученными при помощи методов замедленной люминесценции и пикосекундной спектроскопии, которые свидетельствуют также о существенном влиянии аллельных мутаций на функциональную активность фотосинтетического аппарата арабидопсиса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Умашев П. Д., Мюллер А. Генетика, 6, 7, 50—60, 1970.
2. Выгалов Р. Б., Квитко К. В. В кн.: Фотосинтез и использование солнечной энергии. 257—260. Л., 1971.
3. Ridel G. P. Business: Arabidopsis Research (G. Robbeisen et Gerd Wasniod. Co., Gelsenkirchen, 207—210, 1965.
4. Weinstein Exp Cell Res, 12, 3, 427, 1957.
5. Боннер Дж. В кн.: Биохимия растений 10—12, М., 1968.
6. Reynolds E. S. J. Cell Biol., 17, 1, 208—212, 1963.
7. Kranz A. R. Arabid. Int. Serv., 15, 118—139, 1978.
8. Захаров И. А. Генетические карты высших растений, 156, Л., 1979.
9. Талева С. В., Павлова Н. П., Браждт А. Б. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 13—28, 1962.
10. Weinstein D von Chlorophyll-metal und der Submikroskopische formwechsel der Plastiden—Exp. Cell Res., 12, 424—06, 1957.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биол. ог. ж. Армении. № 9—10, (42), 1989

УДК [577.2+576]:539.1.04

## О МЕХАНИЗМАХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ КЛЕТОК

Н. Я. ГИЛЬЯНО, О. В. МАЛИНОВСКИЙ, М. Б. ХАИР\*

Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова АН СССР,  
\*Комиссия по атомной энергии САР, г. Дамаск

Ձույց են արվել առնետների լյարդի հեպատոցիտներում իոնացնող ճառագայթների տարրեր զոգանների ազդեցությանը մակածված պոլիպլոիդիզի երկու մեխանիզմները: Քույլ իոնացնող ճառագայթաճարման դեպքում պոլիպլոիդիզիունը հետևանք է միթոզների արգելակման, իսկ ուժեղ իոնացնող ճառագայթման դեպքում՝ բջիչների միացման: Անթադրվում է, որ ուժեղ իոնացնող ճառագայթաճարման դեպքում հարուցված պոլիպլոիդիզիան համար թիրախ է հանդիսանում բջիչին մեմբրանը: Ռա ապացույցն է տարրեր կենդանի նկարաներով հարուցված հեպատոցիտների միացումը, որն այդ դործանի ազդեցությունից նկատվել է նաև տարիքային փոփոխությունների հետ կապված:

In rats liver hepatocytes two mechanisms of polyploidization, induced by ionizing irradiation have been shown; polyploidization of cells takes place in the result of mitoses braking, whereas during the radiation by denselonizing irradiation—polyploidization is realized at the expense of cells confluence. It is supposed that in case of polyploidization induction by denselonizing irradiation the target is the cellular membrane. The evidence of this suggestion have been data, obtained on induction of hepatocytes confluence by neutrons with various energies, as well as agedependent changes in the effect of hepatocytes confluence, induced by neutrons.

Сокращения: ОБЭ — относительная биологическая эффективность.

Известно, что полиплоидия свойственна не только растительным, но и животным клеткам, особенно она характерна для видов с высоким спонтанным уровнем повреждений наследственных структур.

О причинах, индуцирующих полиплоидизацию, говорить сложно, поскольку она возникает и в процессе естественного старения, и в процессе регенерации органа, и после различных воздействий [1—4]. Существенным моментом в процессе полиплоидизации является образование двуядерных клеток. Показано, что в онтогенезе полиплоидизация протекает через стадию двуядерности, а то время как в процессе регенерации эта стадия отсутствует. Кроме того, для некоторых видов, имеющих полиплоидный ряд, двуядерные клетки не зарегистрированы. Чередование полных и ацитокинетических митозов—один из возможных механизмов полиплоидизации в процессе онтогенеза и, по-видимому, при регенерации и гормональной стимуляции. Вторым возможным механизмом образования двуядерных и полиплоидных клеток является abortивная пролиферация клеток, имеющих сшивки ДНК-ДНК, ДНК-РНК, ДНК-белок, РНК-РНК [2, 5]. Третьим возможным механизмом является слияние клеток. Трудно сказать, какие условия необходимы для осуществления полиплоидизации с помощью митоза, а какие способствуют слиянию. Определяющим фактором слияния, как и ацитокинетического митоза, может быть изменение свойств клеточной поверхности при некоторых условиях подготовки клетки к митозу. Доказательством того, что способность к слиянию больше выражена у делящихся клеток, служит частое появление поликарлионов в пролиферирующих тканях при регенерации и опухолевом росте. Выявлению механизмов полиплоидизации клеток могут способствовать эксперименты с использованием различных методических подходов.

В настоящей работе с помощью метода проточной цитометрии, автордиографии, используя в качестве инструмента исследования ионизирующее излучение с различной ЛПЭ, мы попытались определить пути полиплоидизации гепатоцитов крыс в процессе онтогенеза, регенерации, после действия ионизирующего излучения с различной ЛПЭ на пролиферирующие и покоящиеся клетки. Известно, что Н. В. Тимофеев-Ресовский всегда рассматривал биологическое действие ионизирующего излучения не как самоцель, а как инструмент для познания природы биологической мишени. Именно Николай Владимирович, вместе с Циммером задумали и осуществили эксперимент с индукцией мутаций при действии только что открытых нейтронов.

*Материал и методика.* Работа выполнена на самцах крыс разного возраста. Стимуляцию к пролиферации проводили с помощью частичной гепатэктомии. В каждой серии экспериментов использовались животные одного возраста. Облучали животных нейтронами деления со средней энергией 0,85 МэВ в биологическом канале реактора ВВР-М в на нейтронном генераторе—нейтронами с энергией 14 МэВ [6]. Облучение редкоионизирующим излучением проводили на двух установках: на рентгеновском аппарате РУМ-11 и на «Исследователе». Цитофлуориметрический анализ клеточной суспензии гепатоцитов проводили на проточном цитофлуориметре. Фиксированные в этаноле гепатоциты окрашивали флуоресцентным красителем «ДАPI» в концентрации 0,2 мкг/мл в течение 30 мин при 37°. Автордиографические исследования проводили с помощью <sup>3</sup>H-тимидина, который вводили интратрибуциально животным

за час до декапитации в концентрации 0,3 МнКи на г веса животного [6]. За полноту принимались измерения для отдельного животного. На каждую экспериментальную точку приходилось от 5 до 10 животных. При цитофлуориметрическом анализе распределения клеток по уровням пloidности для каждого животного было проанализировано не менее 60 тысяч клеток. Компьютерная обработка результатов анализа проводилась по программе, разработанной А. К. Валеевым, которая вычисляет общее число зарегистрированных клеток, количество клеток разной пloidности, положение мод для клеток каждого уровня пloidности и коэффициент вариации для каждой группы.

**Результаты и обсуждение.** Исследование полипloidизации гепатоцитов крыс, индуцированной рентгеновыми лучами в различных дозах и в различных периодах клеточного цикла (рис. 1), показало, что она носит дозозависимый характер и наибольшую радиочувствительность.

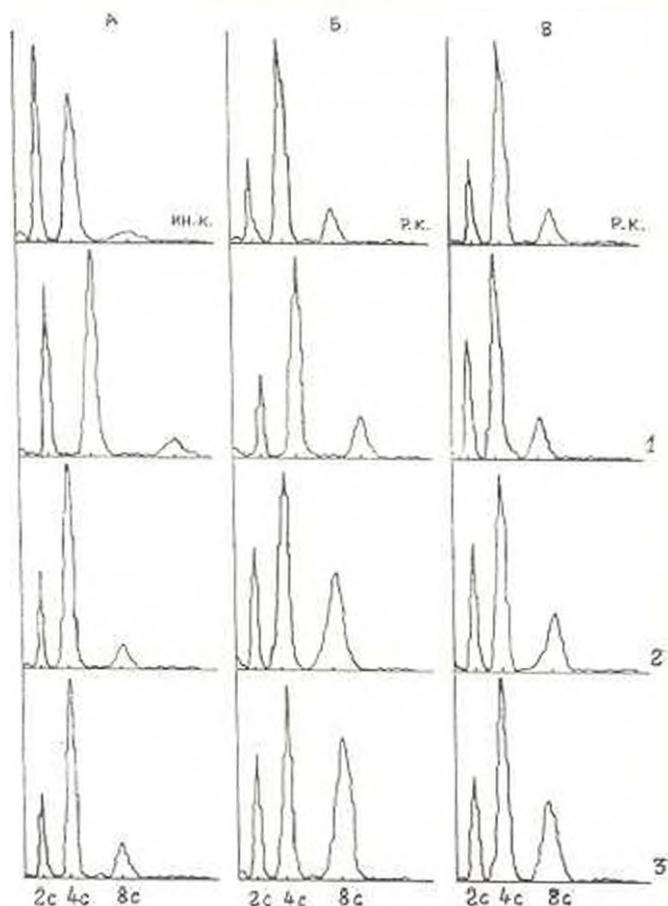


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК в гепатоцитах крыс, облученных рентгеновыми лучами в различных дозах и в различные периоды клеточного цикла. А, Б, В— $G_1$ ,  $G_2$ —периоды клеточного цикла соответственно. 1, 2, 3—облучение в дозах 2, 4, 7 Гр соответственно. По оси абсцисс—содержание ДНК на клетку (отн. ед.); по оси ординат—число клеток (отн. ед.).

по данной реакции проявляют клетки, находящиеся в ДНК-синтетическом периоде клеточного цикла. Облучение непроделирующихся гепатоцитов не приводит к увеличению уровня пloidности гепатоцитов даже при увеличении дозы облучения до 30 Гр.

При исследовании индукции полиплоидизации гепатоцитов нейтронами с энергией 14 Мэв неожиданным оказался эффект на непродлиферирующих гепатоцитах (рис. 2). Эффективность нейтронного облучения в индукции полиплоидизации непродлиферирующих гепатоцитов могла быть обусловлена, по крайней мере, тремя причинами.

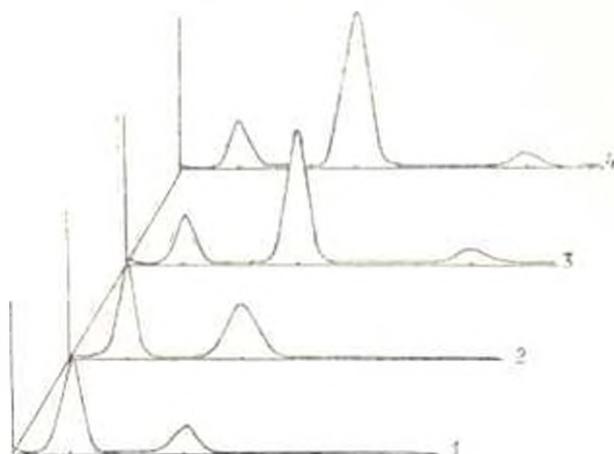


Рис. 2. Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК в гепатоцитах негепатэктомированных крыс, облученных нейтронами с энергией 14 Мэв (1—необлученный контроль, 2, 3, 4—облученные в дозе 0,25, 0,5; 1 Гр соответственно). По оси абсцисс—содержание ДНК на клетку (отн. ед.); по оси ординат—число клеток (отн. ед.).

1. Нейтроны индуцировали в покоящихся клетках синтез ДНК. Однако радиоавтографические исследования включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК непродлиферирующих гепатоцитов после облучения крыс нейтронами в дозе 1 Гр не зарегистрировали сколько-нибудь значимых изменений в гепатоцитах как облученных, так и необлученных крыс.

2. Изменение соотношения клеток разной пloidности после облучения нейтронами из-за преимущественной гибели диплоидных клеток. При тщательном микроскопическом исследовании не было зарегистрировано морфологических изменений клеток при этой дозе облучения.

3. Индуцированное нейтронами слияние клеток. Двойная окраска ядерным и цитоплазматическим красителями (ацетоорсеином и метиленовым зеленым) гепатоцитов облученных крыс позволили нам не только зарегистрировать увеличение числа двуядерных клеток после нейтронного облучения, но также проследить кинетику изменения доли двуядерных клеток в течение первых 4 ч после облучения. Доля двуядерных клеток по отношению к необлученному контролю достигает максимума в 2 часа, а к 4 часам доходит до контрольного уровня, что, по-видимому, объясняется последующим слиянием ядер, так как цитометрический контроль этих экспериментов не зарегистрировал уменьшения уровня пloidности.

Таким образом, нейтронное облучение вызывает качественно иную реакцию клеток, чем редкоионизирующее излучение, несмотря на формально одинаковый конечный эффект—повышение пloidности клеток.

Индукцированное слияние клеток вполне возможно за счет прохождения плотнейоизирующих протонов и более тяжелых ядер отдачи через мембраны контактирующих клеток. Длина пробега ядер отдачи намного превышает диаметр клетки, поэтому практически каждая заряженная частица пересекает границу клетки. Дозовая зависимость слияния не имеет порога и, по-видимому, описывается реакцией первого порядка. Это явление имеет аналогию со слиянием клеток при импульсном электрическом разряде продолжительностью мкс, вызывающем временную деформацию мембран соседних клеток при разности потенциалов 1В. Следовательно, исходя из этой аналогии, можно предположить, что слияние возможно и при редкоизирующем излучении, но только при очень больших дозах. Действительно, при дозах 720 и 1200 Гр мы наблюдали увеличение плоидности непролиферирующих гепатоцитов. На рис. 3 представлены кривые дозовой зависимости слияния гепатоцитов

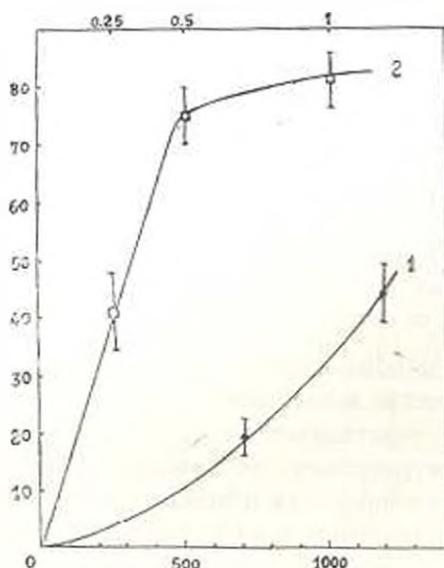


Рис. 3. Дозовая зависимость эффективности слияния клеток для гамма-лучей и нейтронов с энергией 14 Мэв (1 и 2 соответственно). По нижней оси абсцисс—доза гамма-лучей (Гр.); по верхней оси абсцисс—доза нейтронов (Гр.); по оси ординат—доли клеток с удвоенным содержанием ДНК (%).

для гамма-лучей и нейтронов, из которых видно, что ОБЭ нейтронов по слиянию гепатоцитов составляет  $5 \times 10^3$ . Следует отметить, что в подавляющем большинстве изучаемых биологических реакций мишенью является ДНК, и это априори накладывает определенные ограничения на размах биологической эффективности разных излучений. Обычно ОБЭ колеблется в пределах одного порядка величины. Теоретически при мишенях большей протяженности и большей величине критической энергии эффективность разных видов излучений может достичь огромных величин. Наша работа в какой-то степени иллюстрирует это положение. Для получения дополнительных аргументов, подтверждающих это положение, была исследована эффективность индукции поли-

плоидизации непролиферирующих гепатоцитов нейтронами деления со средней энергией 0,05 Мэв. Нейтроны деления оказались более эффективными в индукции слияния гепатоцитов (рис. 4), что подтверждает сделанное нами предположение о зависимости слияния клеток от локально выделенной энергии в чувствительном микрообъеме, исходя из того, что плотность ионизации обратно пропорциональна энергии частиц.

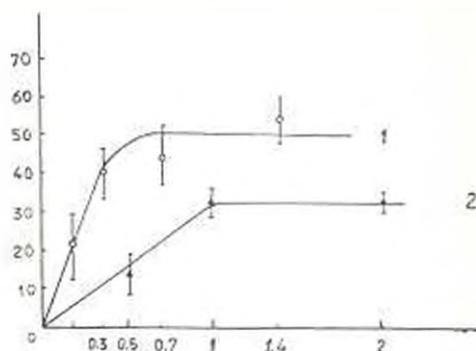


Рис. 4. Дозовая зависимость полиплоидизации непролиферирующих гепатоцитов 50-дневных крыс, облученных нейтронами деления с энергией 0,85 Мэв (1) и нейтронами с энергией 14 Мэв (2). По оси абсцисс—доза облучения (Гр); по оси ординат—доля клеток, удвоивших свою плоидность (%).

Предположение о ведущей роли повреждения мембраны в индукции полиплоидизации плотниоизирующим излучением подтверждается также результатами экспериментов, выполненных на животных разных возрастных групп. Известно, что клеточные мембраны существенно меняются с увеличением возраста животного. На крысах дозовой зависимости слияния непролиферирующих гепатоцитов крыс разного возраста (рис. 5) видно, что слияние гепатоцитов индуцируется небольшими дозами нейтронов и в районе 1—2 Гр эффект достигает плато. Наблюдается значительная разница (на порядок) в индукции слияния гепатоцитов половозрелых крыс 40- и 100-дневного возраста. Зависящее от возраста уменьшение слияния гепатоцитов может быть обусловлено изменением состояния мембраны и уменьшением числа клеток, способных к слиянию. Увеличение дозы облучения на порядок не приводило к увеличению доли слившихся клеток. Кроме того, отсутствие различий у крыс 100—120- и 6-месячного возраста в уровне полиплоидизации гепатоцитов говорит о том, что с возрастом число клеток, способных к слиянию, уменьшается, достигая порога к 3,5—4 месяцам.

При облучении плотниоизирующим излучением пролиферирующих клеток эффект полиплоидизации складывался из двух величин: полиплоидизации, индуцированной регенерационным процессом и полиплоидизации, возникающей в результате слияния клеток. Слияние клеток зависит от возраста облучаемого животного, пролиферативные способности гепатоцитов также сильно зависят от возраста. Таким образом, мы имеем две зависящие от возраста компоненты, из которых складывается эффект полиплоидизации при действии плотниоизирующего излучения. При сравнении кривых дозовой зависимости поли-

плоидизации гепатоцитов крыс разного возраста, облученных нейтронами и рентгеновыми лучами в ДНК-синтетическом периоде клеточного цикла (рис. 6), видно, что индуцированная рентгеновыми лучами полиплоидизация не зависит от возраста облучаемого животного, в то время как после нейтронного облучения эта зависимость наблюдается.

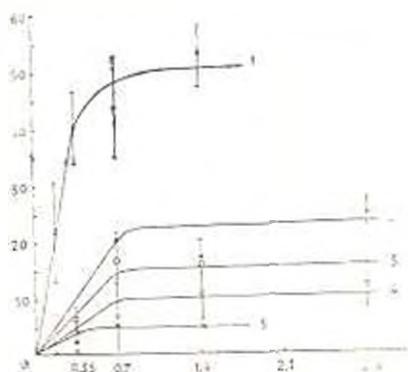


Рис. 5

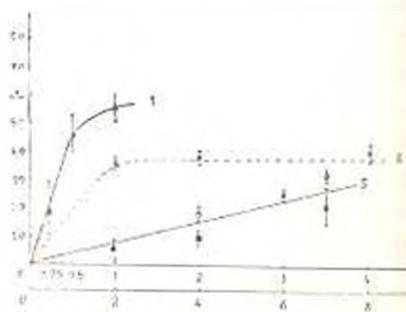


Рис. 6.

Рис. 5. Дозовая зависимость полиплоидизации непролиферирующих гепатоцитов в крысах разного возраста, облученных нейтронами деления с энергией 0,85 Мэв. 1. 40-дневные; 2. 60-дневные; 3. 70-дневные; 4. 90-дневные; 5. 100-дневные. По оси абсцисс—доза облучения (Гр); по оси ординат—доля клеток, удвоивших свою плоидность (%).

Рис. 6. Дозовая зависимость полиплоидизации гепатоцитов, индуцированной ионизирующим излучением с различной ЛПЭ, у крыс разного возраста в ДНК-синтетическом периоде клеточного цикла. 1 и 2—20- и 50-дневные крысы (соответственно), облученные нейтронами с энергией 14 Мэв. 3—60 (○) и 100 (■)-дневные крысы, облученные рентгеновыми лучами. По оси абсцисс—доза облучения (Гр); верхняя—для 14 Мэв нейтронов; нижняя—для рентгеновых лучей; по оси ординат—доля клеток, удвоивших свою плоидность (%).

Таким образом, обнаруженные нами два механизма полиплоидизации гепатоцитов, индуцированной ионизирующим излучением с различной ЛПЭ, позволили выделить две радиочувствительные мишени; кроме хорошо изученной мишени ДНК, имеется важная и недостаточно изученная мишень у мембраны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский В. Я., Урманцев И. В. Клеточная полиплоидия. Пролiferация и дифференцировка, М., 1981.
2. Nakanishi K., Fujita S. Cell Struc. and Func., 2, 3, 261—265, 1977.
3. Гильяно Н. Я., Малиновский О. В. Цитология и генетика, 18, 4, 256—259, 1984.
4. Гильяно Н. Я., Малиновский О. В. Радиобиология, 24, 1, 35—38, 1984.
5. Waring M. J. Nature, 219, 1320—1325, 1958.
6. Гильяно Н. Я., Малиновский О. В., Хаир М. Б., Балдычев А. С., Смолин В. А. Радиобиология, 28, 1, 67—73, 1988.

Поступило 26.VI 1989 г.

## О СООТНОШЕНИИ РЕКОМБИНАЦИОННОГО И НЕРЕКОМБИНАЦИОННОГО ПУТЕЙ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК У КЛЕТОК ПРО- И ЭУКАРИОТ

А. В. ГЛАЗУНОВ

ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Ներկայացված են ԳՆԲ-ի և ԳՆԲ-ի ճեղքերի սեպարացիայի ուղիների վերլուծության արդյունքները պրո- և էուկարիոտների բջիջներում: Հրացուցիչ էզրակացություն է արված այն մասին, որ խմորասեղերի և *E. coli* բջիջներ մաս պլազմիդային ԳՆԲ-ի երկթև էնդրերի ռեկոմբինացիոն սեպարացիան (իրականացվող համալոգիկ ռեկոմբինացիայի միջոցով) բավական արդյունավետ է և հանդիսանում է ավելի ճարավոր պրոցես բան ռեկոմբինացիոն սեպարացիան:

Results of analysis of reparation ways of DNA double helix gaps in the cells of pro- and eucaryotes have been stated. An additional conclusion is made, according to which in the yeasts and *E. coli* cells recombination reparation of double helix gaps of plasmid DNA (being realized by means of homological recombination) is rather effective and is a more probable process than recombination process.

На сегодняшний день накоплен обширный материал, касающийся репарации потенциально летальных повреждений клеток разных видов и генотипов. В ряде случаев удалось показать, что в основе восстановления клетки от летальных повреждений лежит репарация ДНР ДНК, наиболее тяжелых повреждений ДНК, индуцируемых в клетке ионизирующей радиацией [1—3]. Имеется много данных о корреляции радиорезистентности клеток про- и эукариот с их способностью репарировать ДНР ДНК. Считается, что ДНР ДНК репарируется в клетках в основном путем рекомбинации между гомологичными последовательностями ДНК, одна из которых несет ДНР. Были предложены схемы этого процесса [4, 5], которые и по сей день являются в значительной мере гипотетическими: неизвестны ни конкретный механизм, ни генетический контроль отдельных его этапов, ни ферменты, участвующие в репарации. С другой стороны, имеются данные, свидетельствующие что в ряде случаев, например, для клеток млекопитающих механизм репарации ДНР ДНК может не включать в себя гомологичную рекомбинацию [6]. Возможный механизм нерекомбинационной репарации ДНР ДНК был предложен в работе [7]. Этот механизм предполагает «везаконную» внутримолекулярную рекомбинацию по коротким повторам (до 10 п. н.), фланкирующим ДНР. В пользу существования такого механизма свидетельствуют данные о репарации ДНР плазмидной ДНК в клетках *E. coli* [8—10].

Вопрос о соотношении рекомбинационного и нерекомбинационного путей репарации ДНР ДНК представляется крайне важным для понимания механизмов лучевой инактивации клеток. Исследование меха-

Сокращения: ДНР—двунитевые разрывы; ДНБ—двунитевые бреши

лизов репарации ДНР ДНК потребовало разработки новых методических подходов.

Существенные возможности в этом отношении открылись благодаря разработке техники рекомбинантных плазмид. Ор-Вивер и др. [11], Ор-Вивер и Шостак [7] предложили для изучения процессов репарации ДНР, а также двунитовых брешей (ДНБ-делетированных участков плазмидной ДНК в районе ДНР) использовать генетическую трансформацию дрожжевых клеток с помощью плазмиды, линейаризованной эндонуклеазой рестрикции. Показано, что в результате такой трансформации в значительном числе случаев имеет место репарация плазмиды посредством рекомбинации с гомологичной хромосомной ДНК, при этом часто происходит восстановление утраченной части генетического материала плазмиды. Авторы [11] использовали интегративную плазмиду. Оказалось, что линейаризация такой плазмиды в участке, гомологичном хромосомной ДНК, приводит к резкому увеличению частоты трансформации клеток (на 2—3 порядка) по сравнению с соответствующей величиной для кольцевой молекулы. При этом если плаزمида исходно несла ДНБ, то в составе хромосомы она уже находилась в репарированном состоянии, т. е. восстанавливала утраченный участок генетического материала (ДНБ). Процесс интеграции линейаризованной плазмиды подавляется мутацией RAD52. По предположению авторов, ген RAD52 контролирует репаративный синтез, тем более, что этот ген не влияет на интеграцию кольцевой плазмиды. Если использовали автономно реплицирующийся вектор [7], то при селекции на «правильную» восстановленную ДНБ трансформация клеток линейаризованной плазмидой, несущей ДНБ (60 п. н.) в районе ДНР, примерно в 50% случаев приводит к интеграции плазмиды в хромосому (репарация ДНБ с кроссинговером), в другой половине случаев плазмиды с восстановленной ДНБ остается в клетке в автономном состоянии (репарация ДНБ без кроссинговера). Если же анализировать все клоны, возникшие в результате трансформации линейаризованной молекулой (без селекции на «правильную» репарацию ДНБ), то с большой вероятностью (70—80%) в репарированной плазмиде ДНБ не восстанавливается. Отмечены случаи неполного восстановления ДНБ, когда восстанавливается только часть утраченных в исходной плазмиде сайтов рестрикции. Однако более вероятным процессом в данном случае является религирирование плазмиды без рекомбинации с гомологичной хромосомой, при этом репарированная плазмиды остается в клетке в автономном состоянии. По мнению авторов, лигирирование может осуществляться либо непосредственно в месте разрыва, либо после дегградации ДНК до тех пор, пока гомология не окажется достаточной для лигирирования. И действительно, такой механизм был продемонстрирован при трансформации клеток *S. coli* линейаризованной pBR322 [8—10].

Здесь была обнаружена значительная доля трансформантов, несущих плазмиду с делетией в районе сайта линейаризации. Секвенирование репарированной плазмиды свидетельствовало в пользу механизма, предложенного Ор-Вивером и Шостаком. С другой стороны, трансформация дрожжевых клеток линейаризованной плазмиды в случае отсут-

ствия гомологии с хромосомной ДНК приводила к образованию инвертированных димеров [12]. Если же плазмиду котрансформировали с фрагментом ДНК, имеющим гомологию с плазмидой в районе ДНР, то в подавляющем большинстве случаев имела место «правильная» рециклизация плазмиды. В других работах также отмечена высокая эффективность лигирования линейаризованной плазмиды в дрожжевых клетках [13, 14]. Неясно, однако, в каком соотношении находится два рассматриваемых пути репарации ДНР плазмидной ДНК: рекомбинационная репарация (под «нерекомбинационной репарацией» мы здесь понимаем как простое воссоединение липких концов, так и «везакопную» рекомбинацию по коротким повторам в пределах одной молекулы, в противоположность репарации посредством рекомбинации с гомологичной хромосомой). Оценка этого соотношения крайне важна для выяснения преимущественных механизмов репарации ДНР ДНК в клетке. Данные Ор-Вивера и Шостака [7] позволяют лишь грубо оценить это соотношение: доля религированных молекул в экспериментах авторов цитируемой работы составляет около 50%. С другой стороны, данные работы [12] позволяют предполагать преимущественно рекомбинационный путь репарации ДНР плазмидной ДНК.

Ранее нами была описана система для изучения репарации ДНР плазмидной ДНК, позволяющая количественно оценивать соотношение рекомбинационного и нерекомбинационного путей репарации ДНР плазмидной ДНК [15, 16]. Оказалось, что даже при наличии липких концов у линейаризованной плазмиды она репарируется в клетках *S. cerevisiae* в основном путем рекомбинации с гомологичной хромосомой: доля плазмид, репарированных путем нерекомбинационной репарации, составляет около 10% в общем пуле репарированных молекул. Рекомбинационная репарация ДНР плазмидной ДНК находится под контролем генов RAD52, RAD54. Мутации *rad53* и *rad57* осуществляют неполный блок репарации ДНР ДНК.

Принципиально важным представляется тот факт, что в ряде случаев возможна неполная репарация ДНБ ДНК [7]. Это может свидетельствовать в пользу того, что рекомбинационный путь репарации может вызвать мутации. Как показывают наши данные, точность репарации ДНБ находится под контролем гена RAD57. В *Rad*<sup>+</sup>-клетках репарация ДНБ ДНК осуществляется с высокой точностью (практически во всех случаях в репарированной плазмиде полностью восстанавливается ДНБ. При этом ДНБ плазмидной ДНК размером до 2,5 т. п. н. репарируются в *Rad*<sup>+</sup>-клетках примерно с той же эффективностью, что и ДНР).

Представляет интерес сравнение закономерности репарации линейаризованной плазмиды в клетках дрожжей с закономерностями, установленными для бактерий и высших эукариот. Авторы работы [8] линейаризованной по *Sall* сайту плазмидой pBR322 трансформировали клетки *E. coli* разных генотипов. Линейаризованная плаزمида трансформировала клетки в 100—1000 раз менее эффективно, чем кольцевая молекула. Мутации *гесА*, *гесВ*, *гесГ* снижают эффективность трансформации линейаризованной плазмиды, не влияя на соответствующую вели-

чину для кольцевой молекулы. Плазмиды, восстановившие кольцевую форму, часто содержали делецию в районе сайта линейаризации. Обработка липких концов линейаризованной плазмиды фосфатазой или дострипание до «тупых» концов фрагментом Клеюва приводит к уменьшению частоты трансформации и увеличению при этом доли делетированных молекул. Авторы предположили, что линейная плазида восстанавливается в клетках не за счет лигирования липких концов, но за счет внутримолекулярной рекомбинации между короткими прямыми повторами в пределах последовательности плазмиды. Другим исследователем [9] был проведен анализ нуклеотидной последовательности плазмид, восстановивших кольцевую форму. Делеции затрагивают как одно плечо линейаризованной молекулы (односторонние делеции), так и оба плеча (двусторонние делеции). В обоих случаях рециклизация плазмиды осуществляется посредством рекомбинации по коротким (4—10 н. п.) прямым повторам, находящимся по разные стороны от сайта рестрикции. Авторами предложена модель образования делеций в плаزمиды, восстановивших кольцевую форму, предполагающая спаривание последовательностей, находящихся в обоих концах линейаризованной молекулы. Сходная модель на основании собственных данных была предложена Саагаником и др. [10]. Заметим, что образование делеций в результате линейаризации плазмиды наблюдали и при трансформации дрожжевых клеток [12, 17].

К нескольким иным выводам пришли Симингтон и др. [18], изучавшие трансформацию клеток *E. coli* линейаризованной димерной плазмидой pBR322, несущих два различных аллеля гена  $tet^R$ . Оказалось, что линейный димер трансформирует клетки дикого типа в 100—1000 раз менее эффективно, чем кольцевой, и приблизительно с той же эффективностью, что и кольцевой димер клетки с генотипом  $tesBC\ sbcA$ , в которых функционирует  $tesE$  система рекомбинации. Анализ трансформантов показал, что доля плазмид, имеющих рекомбинантный фенотип, приблизительно одинакова как для клеток дикого типа, так и для мутантов. При этом частота рекомбинации плазмидной ДНК (определяемая по выходу  $tet^R$ -трансформантов) в результате линейаризации плазмиды возрастает приблизительно на порядок. Симингтон и др. [18] полагают, что репарация (восстановление кольцевой формы) линейаризованной плазмиды в клетках *E. coli* дикого типа включает два механизма: внутримолекулярная рекомбинация, в результате которой образуются рекомбинантные кольцевые мономеры, и лигирование с образованием исходного кольцевого димера. Не исключено, правда, как отмечают авторы, что часть (если не все) трансформантов, содержащих исходный кольцевой димер, образовалась в результате трансформации клеток примесью кольцевых молекул, которая могла присутствовать в исходном препарате плазмиды. В случае же трансформации линейаризованной димерной плазмидой мутанта  $tesBC\ sbcA$ , по-видимому, восстановление кольцевой формы молекулы осуществляется посредством внутримолекулярной рекомбинации линейных димеров с образованием кольцевых мономеров.

Значительное, в 50—100 раз, увеличение выхода  $\text{tel}^R$ -трансформантов в результате линейаризации димерной плазмиды свидетельствует в пользу того, что ДНР, внесенный эндонуклеазой рестрикции, является рекомбиногенным, как и в случае дрожжевых клеток.

В другой работе [19] показано, что клетки *E. coli* дикого типа, а также  $\text{rogA-rogB-}$  и  $\text{recN}$  мутанты, обладающие повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации, в одинаковой степени способны к воссоединению «липких» и «тухлых» концов плазмидной ДНК. Однако если линейаризованную плазмиду подвергали обработке щелочной фосфатазой, в мутантных клетках плазида репарировалась менее эффективно, чем в клетках дикого типа.

Недавно было сообщено о способности клеток *E. coli*, имеющих  $\text{recE}$ -систему рекомбинации, репарировать ДНБ плазмидной ДНК [20]. Авторы сконструировали плазмиду, несущую два различных аллеля гена  $\text{neo}$  в противоположной ориентации. Один из аллелей содержал делецию размером около 300 п. Линейаризация плазмиды в аллеле гена  $\text{neo}$ , несущего ДНБ, приводит к тому, что среди трансформантов резко возрастает доля  $\text{Kan}^R$ -клонов (до 30% против 1% для кольцевой плазмиды), что означает восстановление ДНБ. Причем, как и в случае с дрожжевыми клетками [7], примерно в половине случаев восстановление ДНБ сопровождается кроссинговером по фланкирующим последовательностям плазмидной ДНК. Здесь возможны оценки соотношения рекомбинационной репарации ДНР плазмидной ДНК и репарации путем лигирования (рекомбинации по коротким повторам, фланкирующими ДНР, по механизму, предложенному Коули и др. [9]). Действительно, частота трансформации (при селекции по маркеру  $\text{Amp}^R$ ) клеток плазмидой  $\text{pK43}$ , линейаризованной по  $\text{EcoRY}$  сайту, находящемуся вне аллелей  $\text{neo}$ , составляет около 0,3% от соответствующей величины для кольцевой молекулы. При этом не исключено, что часть (если не все) трансформантов образовались за счет трансформации клеток примесью кольцевых молекул, имеющих в препарате линейаризованной плазмиды. Частота трансформации плазмидой, линейаризованной по  $\text{XhoI}$ -сайту (в участке ДНБ), при селекции по маркеру  $\text{Amp}^R$  составляет около 1,4% от соответствующей величины для кольцевой молекулы. При этом около 40%  $\text{Amp}^R$ -трансформантов имеют фенотип  $\text{Kan}^R$ , т.е. заведомо образовались за счет рекомбинационной репарации ДНБ. Если представить, что все  $\text{Amp}^R$ -клоны при трансформации линейаризованной по  $\text{EcoRY}$ -сайту плазмидой образовались за счет лигирования, то соотношение вероятностей рекомбинационной репарации и лигирования будет не менее чем 2:1 в пользу рекомбинационного пути репарации. Реально же это соотношение, по-видимому, еще больше смещено в сторону рекомбинационной репарации. Этот вывод важен для анализа путей репарации ДНР ДНК, индуцированных в клетках *E. coli* ионизирующей радиацией. Действительно, радиация индуцирует в клетках ДНР, которые не дают, естественно, липких концов, поэтому кроме рекомбинационного пути, репарация ДНР возможна лишь путем негомологичной рекомбинации по механизму, предложенному Коули и соотр. [9].

Способность репарировать ДНБ плазмидной ДНК была продемонстрирована и для фотосинтезирующих бактерий [21].

Системы, использующие трансформацию (трансфекцию) клеток линейаризованной плазмидой (вирусом), известны и для клеток млекопитающих (см. обзор [22]). Ротом и Вильсоном [23] была сконструирована линейная ДНК вируса SV40, содержащая на концах повторы размером 131 н. п. Этой молекулой трансформировали клетки обезьяны. Выживаемость вируса могла быть обеспечена в двух случаях: либо гомологичная рекомбинация по концевым повторам, либо простое воссоединение «конец в конец» (негомологичная рекомбинация). Анализ индивидуальных вирусных геномов показал, что события негомологичной рекомбинации (соединение «конец в конец») происходят примерно в 2—3 раза чаще гомологичной рекомбинации. Таким образом, здесь имеет место ситуация, отличная от таковой для дрожжей и бактерий, где репарация ДНР плазмидной ДНК путем гомологичной рекомбинации является предпочтительной. Напомним, что имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что репарация ДНР ДНК в клетках млекопитающих может осуществляться и без посредства гомологичной рекомбинации [6].

Коке и др. [24] использовали линейаризованную плазмиду для трансформации 4 линий клеток человека (две нормальные, третья—от больного пигментной кератодермой, а четвертая—от больного *Ataxia telangiectasia*—АТ-клетки). Плазмида pSV2gpt содержала ДНК pBR322, вируса SV40, и фрагмент генома *E. coli*, кодирующий ген специфической ксантин фосфорибозилтрансферазы (XPRT). Ген gpt с фланкирующим промотором SV40 и последовательностями процессинга может экспрессироваться в клетках млекопитающих. ДНР вводили *in vitro* в ген gpt эндонуклеазой рестрикции. Трансформанты отбирали по фенотипу XPRT<sup>+</sup>. Оказалось, что линейаризация плазмиды по уникальному сайту рестрикции в гене gpt не влияет на частоту трансформации для трех линий клеток и снижает соответствующую величину для АТ-клеток. Обработка липких концов нуклеазой S1 приводила к снижению частоты трансформации клеток лишь в случае, когда сайт рестрикции находился в пределах кодирующей рамки считывания.

В той же работе изучали рекомбинацию плазмидной ДНК, котрансформируя клетки двумя линейными фрагментами исходной плазмиды, содержащими перекрывающийся участок гена gpt. Частота трансформации в этом случае составляла около 10% от соответствующего значения для кольцевой молекулы, причем для всех четырех линий клеток. Таким образом, изложенные данные также свидетельствуют, что репарация ДНР ДНК в клетках млекопитающих путем лигирования осуществляется более эффективно, чем рекомбинационная репарация.

Пониженную эффективность репарации ДНР ДНК у АТ-клеток авторы объясняют смещением равновесия между лигированием и экзонуклеазной деградацией ДНК в сторону последней.

Аналогичная схема была применена также в работе Бреннера и др. [25], где показано, что плазмида, несущая ДНБ, репарировалась в клетках мышинной лимфомы путем гомологичной рекомбинации, при

этом восстанавливается первоначально отсутствующая последовательность (ДНБ). Здесь же показано, что если ДНР внесен в гетерологичную последовательность одной из плазмид (инсерция в гомологичную область) или примыкающую к ней, клетки способны генерировать ДНБ размером 150—250 н. п., после чего имеет место ее репарация.

Таким образом, на основании представленных данных можно сделать следующие предварительные выводы относительно путей репарации ДНР ДНК в клетках про- и эукариот.

У дрожжей и клеток *E. coli* рекомбинационная репарация ДНР плазмидной ДНК (осуществляющаяся посредством гомологичной рекомбинации) довольно эффективна и является более вероятным процессом, нежели нерекомбинационная репарация, причем складывается впечатление, что ДНР ДНК у дрожжей является более рекомбиногенным, т. е. эффективнее вступает в рекомбинационный процесс, чем в клетках *E. coli*. Напротив, для клеток млекопитающих вероятность репарации ДНР ДНК путем незаконной рекомбинации, по-видимому, более высока, нежели воссоединение ДНР посредством гомологичной рекомбинации между поврежденной и неповрежденной последовательностями ДНК. На наш взгляд, сверхвысокая скорость репарации ДНР ДНК у клеток млекопитающих (для быстрого компонента время полувосстановления около 2—3 мин [26]) может быть объяснена эффективным процессом внутриврохромосомной незаконной рекомбинации в этих клетках.

Тем не менее, ДНР ДНК в клетках млекопитающих также является рекомбиногенным и эффективно вступает во взаимодействие с гомологичными последовательностями ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Luchnik A. N., Glaser V. M. and Shestakov S. V. *Molec. Biol. Reps.* **7**, 437—449, 1977.
2. Frankenberg-Schwager M., Frankenberg D., Blucher D. and Adamczyk C. *Radiat. Res.* **82**, 3, 498—510, 1980.
3. Глазунов А. В., Глазер В. М. *Молек. генет., микробиол., вирусол.* **8**, 36—41, 1988.
4. Королев В. Г., Грачева Л. М. *Генетика*, **8**, 1, 111—120, 1972.
5. Resnick M. A. *J. Theor. Biol.*, **57**, 1, 97—106, 1976.
6. Resnick M. A., Moore P. D. *Nucl. Acid. Res.*, **6**, 9, 3145—3160, 1979.
7. Orr—Weaver T. L., Szostak J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 10, 4417—4421, 1983.
8. Conley E. C., Sounders J. R. *Mol. Gen. Genet.*, **194**, 112, 211—218, 1984.
9. Conley E. C., Sounders J. R. *Nucl. Acid. Res.*, **14**, 22, 8919—8932, 1986.
10. Садожанк Р. И., Тимченко Т. В., Дашнов Г. А. *Дневник АН СССР*, **296**, 1, 226—230, 1987.
11. Orr—Weaver T. L., Szostak J. W., Rothstein R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 10, 6354—6358, 1981.
12. Kunes S., Botstein D., Fox M. S. *J. Mol. Biol.*, **184**, 3, 375—387, 1985.
13. Imai Y., Suzuki K., Yamashida J., Fukui I., Fukui S. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 4, 915—918, 1983.
14. Suzuki K., Imai Y., Yamashida J., Fukui S. *J. Bacteriol.*, **155**, 2, 747—754, 1983.
15. Глазунов А. В., Перера Д. Р., Глазер В. М., Борейко А. В. *Молек. генет., микробиол., вирусол.*, **8**, 36—41, 1987.

16. Perera D. R., Glasunov A. V., Glaser V. M., Borelko A. V. *Molec. Gen. Genet.*, 213, 421—424, 1988.
17. Clancy S., Mann C., Davis R. W., Calos M. P. *J. of Bacteriol.*, 159, 3, 1065—1067, 1984.
18. Symington L. S., Morrison P., Kolodner R. *J. Mol. Biol.*, 186, 3, 515—525, 1985.
19. Webb M. B. T., Debenham P. *Int. J. Radiat. Biol.*, 48, 3, 458, 1985.
20. Kobayashi I., Takahashi N. *Genetics*, 119, 4, 751—757, 1988.
21. Kolowski K. S., Szalay A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 15, 5578—5582, 1986.
22. Thacker J. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50, 1, 1—30, 1986.
23. Roth D., Wilson J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 10, 3355—3359, 1985.
24. Cox R., Masson N. K., Debenham P. G., Webb M. B. *J. British J. of Cancer.*, 49, 6, 67—72, 1984.
25. Bennett D. A., Smigajski A. C., Cantarini—Cicco R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6, 1762—1766, 1986.
26. Radford I. R. *Int. J. Radiat. Biol.*, 52, 4, 555—563, 1987.

Получено 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989

УДК 577.391/575.113:575.85.

## ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ОРГАНИЗМОВ ПО РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Б. И. САРАПУЛЬЦЕВ, С. А. ГЕРАСЬКИН

Всесоюзный НИИ сельскохозяйственной биологии, г. Обнинск

Դեմոսի կառուցվածքային կազմակերպումը հանդիսանում է առաջատար գործակերպ մեկը որը ընտրողում է օրգանիզմների ինչպես միջտեսակային, այնպես ներտեսակային զիջերենցիացիան՝ ըստ ադապտացիոնային մակարդակի: Օրգանիզմների ադապտացիոն տարտեմիայի արդյունքները արտացայտվեն որդի գենետիկական ապարատի հուսարիության հերթադիտիկ համակարգի կազմավորման հարողական փուլերը և վկայում են այդ պրոցեսների ֆունկցիոնալ նշանակության մասին Ծրկրի վրա կյանքի էվոլյուցիայում:

Structural organization of genome is one of the leading factors, defining not only interspecific, but also intraspecific differentiation of organisms by the level of radioresistance. Results of radiation taxonomy of organisms reflect successive stages of formation of hierarchie system of safety of the cell genetic apparatus and testify the fundamental importance of these processes in the evolution of life on the Earth.

В основе современных представлений о действии ионизирующих излучений на биологические объекты лежат принципы попадания и мишеней, постулирующие квантовый и вероятностный характер поражения критических структур клетки. Сформулированные в общем виде Дессауэром (1922 г.) и Кроузером (1924 г.) и получившие развитие в работах Н. В. Тимофеева-Ресовского [1], эти принципы способствовали превращению радиобиологии в одну из наиболее точных биологических дисциплин. Успехи, достигнутые в последние годы, позволили в полной мере оценить фундаментальный характер и важнейшую методологическую роль сформулированных в работах Н. В. Тимофеева-Ресовского принципов анализа радиационного поражения биологических объектов.

Именно эти принципы стали теоретической основой сравнительного изучения радиорезистентности широкого круга живых организмов.

В радиобиологии накоплен и в значительной степени систематизирован обширный фактический материал, свидетельствующий о разнообразии ответных реакций живых систем с различной структурной организацией генома на действие ионизирующих излучений. Парадоксальность проблемы радиорезистентности при этом заключается в том, что устойчивость к действию радиации присуща всем без исключения известным организмам, однако реально выявляется только в специальных экспериментах с применением мощных искусственных источников ионизирующих излучений. Более того, наблюдаемые уровни радиорезистентности, очевидно, не являются результатом адаптации к действию естественного радиационного фона как фактора отбора устойчивых генотипов, поскольку даже с учетом возможности его  $10^1$ — $10^2$ -кратного варьирования на поверхности Земли и, вероятно, имевших место в некоторые геологические эпохи радиационных аномалий [2], поглощенные в течение клеточного цикла дозы ( $2 \times 10^{-7}$  Гр/60 мин) не идут ни в какое сравнение с дозами, которые могли бы приводить к гибели даже наиболее радиочувствительных вирусов ( $10^3$  Гр), бактерий ( $10^2$  Гр), дрожжей ( $10^1$  Гр) и клеток высших эукариот ( $10^0$  Гр). По существующим оценкам [3], на территории США и Европы даже после увеличения радиационного фона за счет антропогенных источников (ядерные технологии, выпадение радионуклидов после испытания ядерного оружия, медицинская техника и др.) до 0,054 Гр/год, лишь незначительная часть генетических нарушений (не более 6% от общего числа спонтанных мутаций) может быть отнесена к действию радиационного фактора. В этой связи закономерен вопрос о механизме возникновения и истинном предназначении этого удивительного свойства живых систем. Является ли устойчивость к действию ионизирующих излучений не более чем любопытным лабораторным феноменом, или же радиобиологи действительно имеют дело с одной из фундаментальных характеристик живых самореплицирующихся систем? Ответ на этот принципиальный вопрос может быть получен только в случае выяснения генетических механизмов формирования этого загадочного свойства биологических систем в ходе прогрессивной эволюции. Если радиорезистентность организмов действительно является фундаментальной характеристикой генетического аппарата клетки, то результаты радиационной таксономии несомненно должны отражать основные этапы структурной реорганизации генома в ходе прогрессивной эволюции.

Уже в пионерских работах Терзи [4] и Каплана, Мизеса [5] была обнаружена корреляция между радиорезистентностью вирусов, бактерий, дрожжей, культур клеток эукариот и содержанием в них нуклеиновых кислот. Дальнейшее развитие это направление получило в работах Спэрроу [6], который, исследуя зависимость радиорезистентности от объема интерфазных хромосом, разделил выборку из 79 организмов на 8 групп, названных им «радиотаксонами». Однако в одни и тот же радиотаксон попадали организмы, принципиально отличающиеся по структурной организации генома, а в разных радиотаксонах оказыва-

лись близкородственные организмы. На основании этого Спэрроу пришел к выводу о том, что радиотаксономия не имеет отношения к биологической систематике и не отражает эволюционных преобразований генома. Однако Шальнов [7], основываясь на данных о содержании нуклеиновых кислот, структурной организации генома и эффективности ферментативной репарации ДНК, выделил 6 радиотаксонов, принципиально соответствующих эволюционным изменениям структурно-функциональной организации живых систем. Идея М. И. Шальнова получила развитие в работах ближайшего сотрудника Н. В. Тимофеева-Ресовского—В. И. Корогодина [8, 9], в которых в качестве радиотаксонов рассмотрены группы организмов с близкой удельной надежностью генома.

Следует отметить, что использованный в работах [4—9] способ объединения биологических объектов в радиотаксоны с помощью линейной регрессии не позволял применять количественные критерии для определения истинного числа радиотаксонов, необходимых для аппроксимации экспериментальных данных. При отсутствии объективных критериев каждый автор определял количество радиотаксонов исключительно из соображений принимаемой им концепции. Субъективность такого подхода привела не только к выделению разного числа радиотаксонов (три—у Каплана и Мозеса [5], четыре—у Терзи [4] и Корогодина [8, 9], шесть—у Шальнова [7] и восемь—у Спэрроу [6]), но и явилась основной причиной существенно различной содержательной интерпретации результатов радиационной таксономии.

Указанные недостатки позволяют избежать методы объективной компьютерной классификации. В этом случае результаты радиационной таксономии оцениваются с двух точек зрения: удачно ли разделены экспериментальные данные (внутренний критерий качества классификации) и сохраняются ли выявленные закономерности на других независимых выборках биологических объектов (внешний критерий качества классификации или непротиворечивости). Внутренний и внешний критерии являются независимыми и не сводятся друг к другу.

В качестве внутреннего критерия нами предложено использовать величину нормированной внутритаксонной дисперсии  $T$  [10]:

$$T = nRSS(=)/(N - n),$$

где  $N$ —объем выборки тестируемых организмов,  $n$ —число выделяемых кластеров (сложность модели).

Полученные решения тем точнее описывают структуру взаимосвязей исследуемых объектов, чем меньше величина  $T$ . Характерной особенностью критерия  $T$ , выгодно отличающей его от других точностных критериев, является наличие интервалов, на которых его значения остаются практически неизменными. При этом участки кривой  $T(n)$ , параллельные оси абсцисс, соответствуют кластерным моделям, увеличение сложности которых не компенсируется соответствующим уменьшением среднеквадратической ошибки, т. е. свидетельствуют об однородности структуры в этих интервалах сложности кластерных моделей. В соответствии со второй теоремой Шеннона [11] из решений, объясня-

ющих одинаковую долю остаточной дисперсии, выбирается содержащее наименьшее количество кластеров (радиотаксонов).

Метод объективной компьютерной классификации был использован для анализа экспериментальных данных, на основе которых Спэрроу сформировал концепцию 8-ми радиотаксонов [6], и сформированной нами независимой выборки, включающей 183 различных организма от вирусов до клеток высших эукариот (рис. 1).

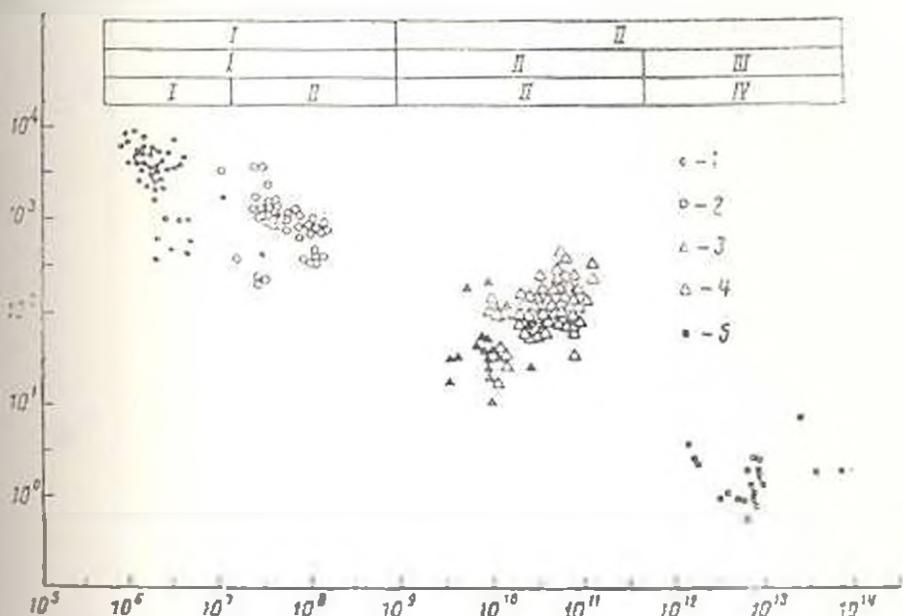


Рис. 1. Радиорезистентность клеток 183 организмов с различным содержанием пуриновых кислот в геноме. 1—вирусы с одноцепочечной ДНК (РНК); 2—вирусы с двуцепочечной ДНК; 3—бактерии; 4—грибы, водоросли; 5—высшие растения и животные (культуры клеток). По оси абсцисс—молекулярная масса ДНК (РНК), Дальтоны; по оси ординат—величина  $D_0$ , Гр.

Из рис. 2 видно, что изменения критериев таксономии и перебор кластеризаций по критерию непротиворечивости свидетельствуют о существовании нескольких поддающихся интерпретации решений в виде двух, трех и четырех таксонов, удовлетворяющих внутреннему и внешнему критериям качества классификации. Решение в виде семи кластеров, полученное на выборке Спэрроу (рис. 2), не подтверждается критерием непротиворечивости и из дальнейшего рассмотрения исключено.

Полученные кластерные решения имеют четкий биологический смысл и поддаются содержательной интерпретации. Решение, содержащее 2 радиотаксона, отделяет вирусы от остальных организмов, содержащее 3 радиотаксона—вирусы, прокариоты и эукариоты. Выделение 4 радиотаксонов приводит к разделению одно- и двуцепочечных вирусов, прокариот и эукариот. Анализ результатов автоматической классификации позволяет сделать вывод о принципиально важном свойстве радиотаксонов—их иерархичности, которую можно определить как последовательность вложенных разбиений, каждое из которых имеет ясный биологический смысл. Полученная классификация

характеризуется не только сходством входящих в радиотаксоны организмов, но и положением в иерархическом древе общепринятой систематики, что свидетельствует об общеприимчивости радиационной таксономии, непосредственно отражающей основные этапы структурных преобразований генома в ходе эволюции.

Выявленные при анализе радиорезистентности организмов с различной структурной организацией генома закономерности не позволяют ответить на вопрос о роли размеров генома в формировании диф-

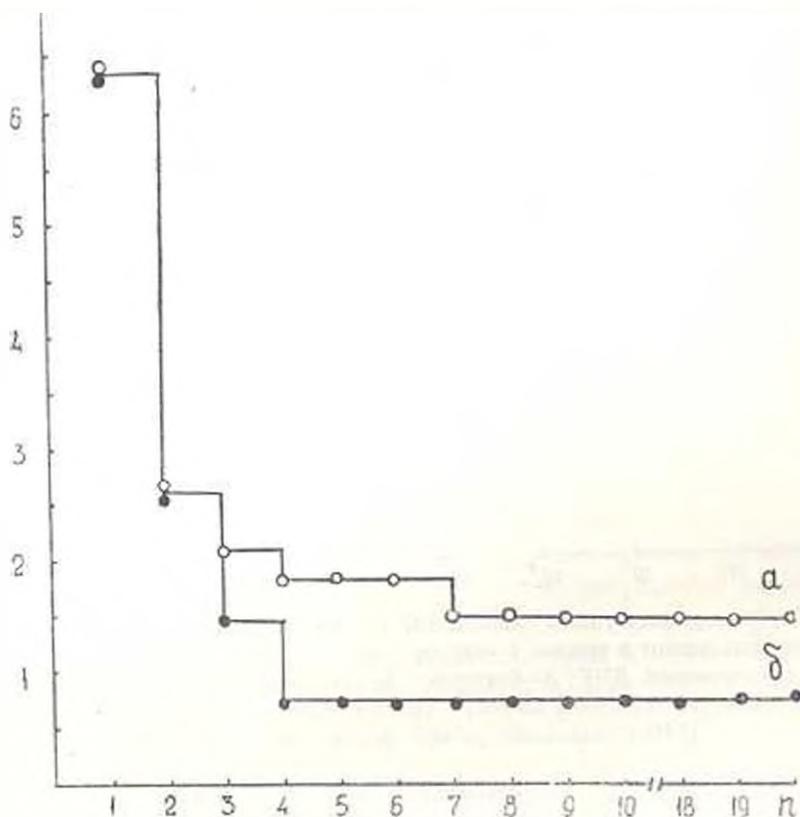


Рис. 2. Определение подлежащих выделению кластерных решений при радиотаксономии клеток 79 организмов — выборка Спэрроу [6] — (а) и клеток 183 организмов — независимая выборка [10] — (б). По оси абсцисс — число выделяемых кластеров; по оси ординат — величина критерия таксономии.

ференциальной радиорезистентности видов и ее связи с филогенезом среди организмов с одинаковой структурной организацией генетических систем. Полученные в ходе радиотаксономии эукариотических клеток результаты [4—10] позволяют с большой вероятностью предположить существование в рамках 4-го радиотаксона дополнительных уровней иерархии. Среди эукариотических организмов наибольшей изученностью видового радиополиморфизма характеризуются высшие растения, что делает их удобным объектом для проверки высказанной гипотезы.

На рис. 3 представлены данные о соотношении радиорезистентности и содержания ДНК в ядре у 99 видов голо- (2 семейства) и покрытосеменных (3 семейства класса однодольных и 25 семейств класса

двудольных растений. Всего, с учетом разновидностей, сортов, линий, а также данных разных авторов об идентичных ботанических объектах, компьютерному анализу было подвергнуто 143 экспериментальные характеристики, отражающие варьирование межвидовой радиорезистентности в 400 раз при изменении содержания ДНК от  $10^{12}$  до  $10^{14}$  Дальтон.

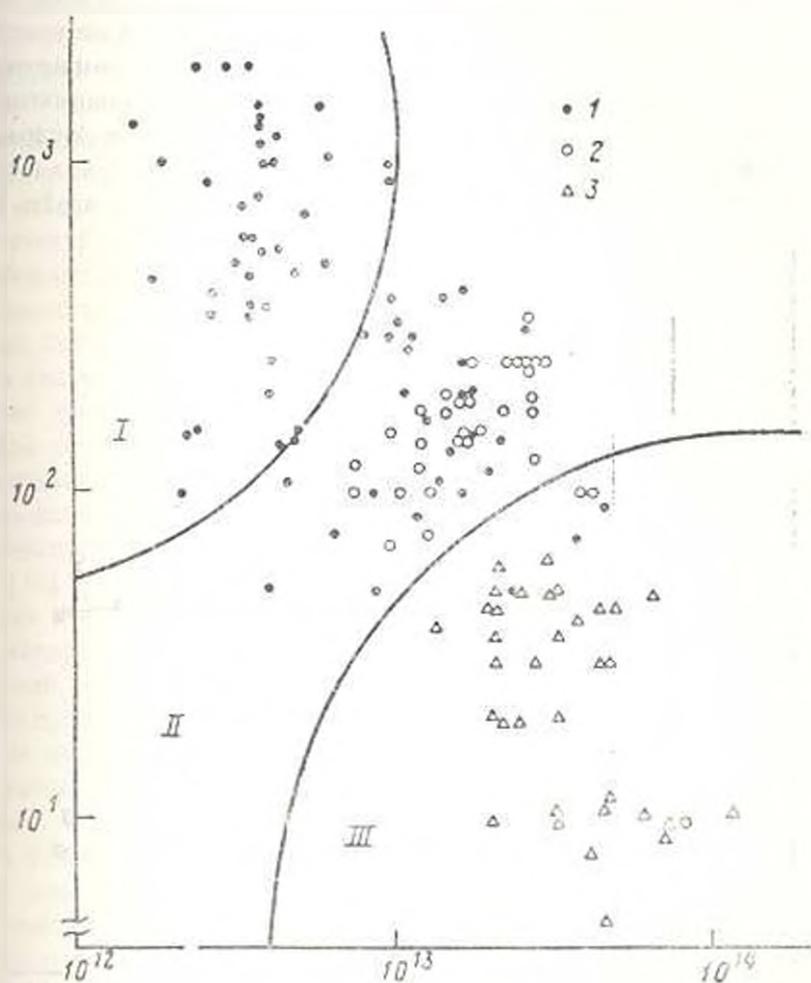


Рис. 3. Радиорезистентность в фазе покоящихся семян и содержание ДНК в геноме 143 представителей 99 видов высших растений (выборка Б. И. Сарапульцева и С. А. Гераськина [13]). По оси ординат—величина  $LD_{50}$ , Гр; по оси абсцисс—содержание ДНК в геноме, Дальтон.

На рис. 4 показано изменение критерия таксономии, указывающее на необходимость выделения двух уровней иерархии, соответствующих 2- и 3-кластерным моделям. Анализ полученных решений свидетельствует о том, что более древние виды отдела Голосеменных, являясь наиболее радиочувствительными и обладая высоким содержанием ДНК в геноме, ограничены рамками радиотаксона III. С продвижением по филогенетическому древу радиополиморфизм растений возрастает: представители класса однодольных формируют радиотаксон II, однако их наиболее древние виды (лилия, лук, крокоцвет) обнаруживаются в

радиотаксоне III среди наиболее радиочувствительных организмов; представители класса Двудольные формируют свой собственный радиотаксон I, объединяющий наиболее эволюционно продвинутые и радиорезистентные виды с низким содержанием ДНК в геноме, однако представители древних семейств (бобовые, пасленовые, мальвовые) присутствуют в радиотаксонах II и III. Аналогичные результаты были получены при радиотаксономии 64 видов высших растений в фазе вегетации [12]. Таким образом, анализ результатов объективной компьютерной классификации свидетельствует о связи выделенных радиотаксонов с филогенезом высших растений от голосеменных до одно- и двудольных покрытосеменных видов и позволяет сделать вывод о том, что и среди эукариотических организмов размеры генома продолжают играть важ-

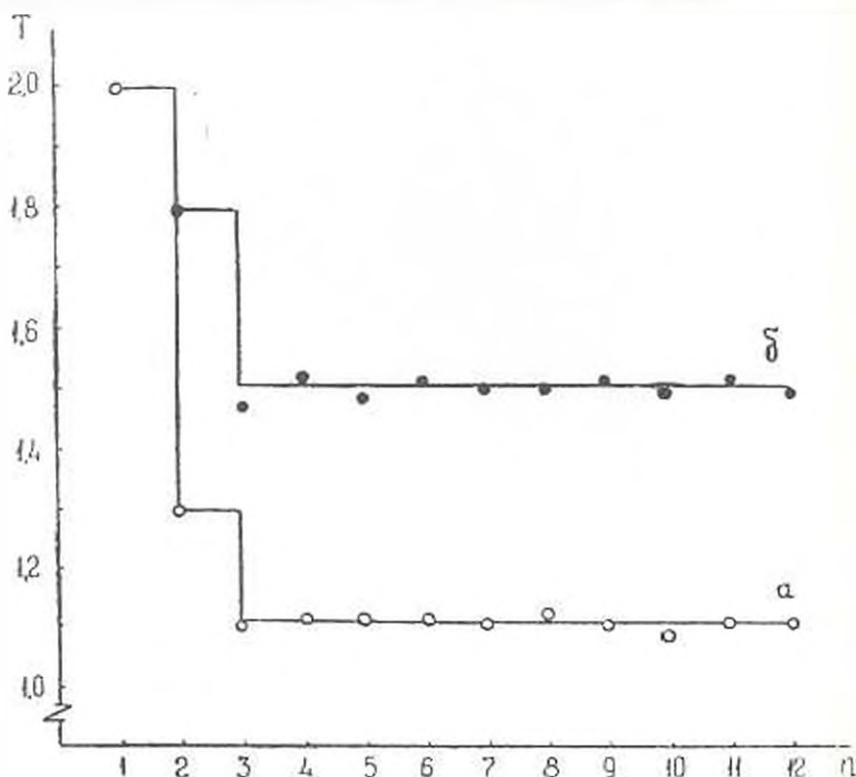


Рис. 4. Определение подлежащих выделению кластерных решений при радиотаксономии в фазе покоящихся семян (а) и вегетации (б). По оси абсцисс — количество выделяемых кластеров; по оси ординат — величина критерия таксономии.

ную роль в формировании радиорезистентности, позволяющую объяснить дифференциацию по этому признаку между отделами, классами и семействами высших растений.

В свете полученных результатов представлял интерес вопрос о возможности применения методов автоматической классификации на основе физических параметров ядра для интерпретации радиополиморфизма мелких таксономических групп. Однако проведенный нами компьютерный анализ 33 видов шавеля показал, что изменение критерия таксономии аналогично таковому при анализе нормально распределен-

ной случайной выборки, т. е. тестируемая выборка не содержит внутренней структуры, является гомологичной и не подлежит классификации на основе физических параметров клеточного ядра. Неэффективность предпринятой классификации при анализе уже внутривидового радиополиморфизма делает необходимой разработку качественно новых методических подходов для интерпретации экспериментально установленного внутривидового полиморфизма по радиорезистентности, регистрируемого на фоне константных параметров клеточного ядра. Вместе с тем иерархическая организация радиотаксонов, отражающая основные этапы структурной реорганизации генетических систем в ходе биологической эволюции, позволяет сформулировать гипотезу о том, что в основе внутривидового радиополиморфизма также лежат факторы структурной природы, связанные, однако, не с размерами генома, а с особенностями его тонкой структурной организации. В пользу этого свидетельствуют результаты анализа радиорезистентности нулли-тетрасомных линий пшеницы Чайниз Сириг, указывающие на различный вклад индивидуальных хромосом аллогексаплоидного генома в формирование уровней радиорезистентности анеуплоидных серий [14].

Для установления роли тонкой структурной организации генома в формировании внутривидового радиополиморфизма была использована модель контрастных сортов гексаплоидной пшеницы, уровни радиорезистентности которых различались в 2—5 раз [15]. Предложенный в работе [16] метод факторного анализа неравновесности по сцеплению аллелей гланинкодирующих и изоферментных локусов позволил выявить иерархическую организацию генетических систем, маркирующих геномный, хромосомный, кластерный и локусный уровни тонкой структурной организации генома аллогексаплоидной пшеницы. Классификацию 24 контрастных по радиорезистентности сортов в пространстве биохимических признаков проводили с помощью Q-техники факторного анализа. Результаты классификации свидетельствуют о том, что только на основании информации о полиморфизме гланинкодирующих генов, маркирующих различные уровни иерархии тонкой структурной организации генома, без использования радиобиологических тестов, возможно выделить дискретные и генетически гомогенные группы сортов с близкими уровнями радиационной устойчивости [17]. Факт сопряженности радиационного и биохимического полиморфизма однозначно указывает на важную роль тонкой структурной организации генетических систем в поддержании внутривидового радиационного полиморфизма.

Таким образом, получен целый ряд доказательств ведущей роли структурной организации генома как фактора межвидовой и внутривидовой дифференциации организмов по уровням радиационной устойчивости. Выявленное объективными методами соответствие основных этапов структурной реорганизации генома от «голых» одно- и двуцепочечных молекул нуклеиновых кислот вирусом до хроматинового комплекса ДНК высших эукариот, включая возможность внутривидовой дифференциации тонкой структурной организации их генома, экспериментально регистрируемым уровням радиорезистентности организмов и их

положению в иерархии радиотаксонов, очевидно, не является простым совпадением и отражает последовательные этапы формирования иерархической системы надежности генетического аппарата клетки. Результаты радиационной таксономии свидетельствуют о том, что радиорезистентность является фундаментальной характеристикой живых самореплицирующихся систем, позволяющей реконструировать наиболее вероятные пути эволюции генома с момента перехода автокаталитических арханчих прокариот к ферментативному катализу матричных процессов (радиотаксон 1), удвоения одноцепочечной молекулы ДНК и создания молекулярного механизма рекомбинации и репарации поврежденных кодирующих матриц (радиотаксон 2), совершенствования упаковки ДНК в нуклеоид прокариот с повышением эффективности репарации вследствие жесткой фиксации поврежденных цепей ДНК белковым матриксом (радиотаксон 3) и переходом к полихромосомным эукариотическим клеткам с максимальной степенью конденсации нуклеиновых кислот белками хроматина при параллельном создании и шлифовке молекулярного механизма сегрегации множественных компактизированных элементарных геномов—хромосом (радиотаксон 4).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тимофеев-Ресовский Н. В., Иванов В. И., Коргодин В. И. Применение принципа попадания в радиобиологии, 228, М., 1968.
2. Неручаев С. Г. Природа, 1, 72—81, 1988.
3. Дубинин Н. П. Общая генетика, 559, М., 1986.
4. Terzi M. Nature, 191, 4787, 461—463, 1963.
5. Kaplan H. S., Moses L. E. Science, 145, 3627, 21—25, 1964.
6. Sparrow A. H., Underbrink A. G., Sparrow R. C. Radiat. Res., 32, 4, 915—945, 1967.
7. Шальнов М. И. Радиобиология, 17, 5, 652—671, 1977.
8. Корогодин В. И. Радиобиология, 22, 2, 147—154, 1982.
9. Корогодин В. И. Чтения памяти Н. В. Тимофеева-Ресовского (под ред. Атаяна Р. Р.). Ереван, 27—40, 1983.
10. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 28, 2, 160—165, 1988.
11. Шеннон К. Работы по теории информации и кибернетике. 820, М., 1963.
12. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 29, 1, 100—107, 1989.
13. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 29, 1, 94—99, 1989.
14. Сарпульцев Б. И. Докл. ВАСХНИЛ, 2, 7—10, 1989.
15. Корнеев И. А., Сарпульцев Б. И., Сарпульцев Б. И., Моргунова Е. А. и др. Радиобиология, 25, 6, 768—773, 1985.
16. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Сельскохозяйственная биология, 1, 76—82, 1989.
17. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А., Корнеев И. А. Докл. АН СССР, 305, 6, 1988.

Поступило 26.VI 1989 г.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

В. А. ШЕВЧЕНКО

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

*Բնթված են ուսումնասիրությունների արդյունքները, որոնք հնարավորություն են տալիս իրականացնել ուսումնասիրվող գոտու ռադիացիոն ֆոնի կենսաբանական մասերի համախորհրդային գնահատումը՝ բարձրագույն օրգանիզմների ժառանգական ապարատի համար:*

Results of studies are stated, allowing to evaluate systematically the biological danger of radiation background of the investigated zone for hereditary apparatus of the higher organisms.

Изучение генетических эффектов при воздействии ионизирующих излучений в результате аварии на Чернобыльской АЭС проводится сотрудниками Института общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР в направлении применения лабораторных радиочувствительных тест-объектов для проведения биологической дозиметрии окружающей среды; оценки первичных радиационно-генетических эффектов при воздействии ионизирующих излучений на популяции растений и животных в 30-километровой зоне и за ее пределами; изучения отдаленных (в ряде поколений) генетических последствий действия ионизирующих излучений на объекты окружающей среды.

Для анализа мутационного процесса и природных популяциях растений и животных в районе Чернобыльской АЭС (в 30-километровой зоне и вокруг нее) в 1988 году заложены 25 экспериментальных участков с целью проведения многолетних комплексных эколого-генетических исследований. Здесь проводится сбор экспериментального материала по 20—25 видам дикорастущих растений, отлов животных, и первую очередь мышевидных грызунов и дрозофилы. Кроме того, на ряде участков были размещены радиочувствительные лабораторные объекты—традесканция клона 02 и линии мыши. В настоящей работе представлены некоторые итоги проведенных в 1986—1988 годах исследований, результаты которых были ранее частично опубликованы.

Примером реализации первого направления могут быть эксперименты с традесканцией клона 02.

Учет соматических мутаций производился в ВТН цветков этого растения. Регистрировалось изменение окраски клеток в волосках от фиолетово-синей к розовой. С июня по август 1986 года производился ежедневный подсчет числа мутаций, индуцированных радиоактивным загрязнением у растений, выставленных в ящиках на участках с мощностью дозы по гамма-излучению 0,3; 5,0 и 15 мр/час. Параллельно проводили анализ мутационного процесса у традесканции в контроле. Усредненный за этот период выход мутаций оказался равным соответственно 0,23, 0,6 и 1,1%. В контроле он составлял 0,2%.

Сокращения: ВТН—волоски тычиночных нитей, РТ—реципрокные транслокации.

В 1987 году растения градеканции были выставлены на участки с более высокими уровнями мощностей доз: 20, 100 и 250 мр/час. Максимальное число мутаций в этом эксперименте достигало 25%. В целом, по итогам двух экспериментов можно заключить, что достоверное возрастание числа мутаций, индуцированных радиоактивным излучением, достигается уже при помощи дозы 5 мр/час, т. е. около 0,1 р/сутки.

Изучался уровень мутационного процесса в природных популяциях *Arabidopsis thaliana*, широко распространенного в зоне аварии.

В 1986 году было проанализировано 10 популяций, произрастающих при мощности дозы по гамма-излучению от 0,3 до 240 мр/час (мощность дозы бета-излучения в несколько раз выше мощности дозы гамма-излучения). Лишь в двух наиболее сильно загрязненных радионуклидами популяциях (60 и 240 мр/час) наблюдалось статистически значимое превышение частоты эмбриональных леталей по сравнению с контролем. В дальнейшем в 1987 и 1988 годах проводили наблюдения за уровнем мутационного процесса в обследуемых популяциях арабидопсиса. Показано, что на участках с высоким первоначальным уровнем радиоактивного загрязнения частота летальных мутаций в течение трех лет остается на сравнительно высоком уровне или даже растет, несмотря на общее снижение уровня радиоактивности за это время в несколько десятков рад. Например, для популяции № 1 мощность дозы в 1986 году по гамма-излучению составила 240, в 1987—2,5, в 1988—2,0 мр/час. Частота растений  $M_1$ , дающих расщепляющееся по эмбриональным леталем потомство, в этой популяции по годам менялась соответственно следующим образом:  $12,2 \pm 3,1$ ,  $27,3 \pm 6,3$  и  $41,0 \pm 4,9\%$ . В контрольных популяциях обычно она составляла 1—5% летальных мутаций. В популяциях, произрастающих на участках со сравнительно низким уровнем первоначального загрязнения радионуклидами (около 10 мр/час и ниже), уровень мутационного груза в последовательных поколениях значимо не отличался от уровня мутагенеза в контрольных популяциях.

В 1989 году проведено исследование генетической структуры 16 популяций *Arabidopsis*, произрастающих в 30-километровой зоне аварии, по электрофоретическому разнообразию аллелей 9 ферментных систем: Got, Idh, Lap, Ap, Est, Pgm, b-Pgd, Kdh, Per. Из 17 изученных локусов у 14 выявлена генетическая изменчивость. По полиморфным локусам вычислен показатель внутрипопуляционного разнообразия. Для ряда полиморфных локусов (Lap-2, Ap-2, Idh) проведен генетический анализ, позволивший установить кодоминантный характер наследования выявленных аллелей. Анализ структуры популяций арабидопсиса по биохимическим маркерам показал обеднение генотипического состава популяций, произрастающих на участках с высоким уровнем первоначального загрязнения (около 200 мр/час и выше).

Для проведения цитогенетических исследований в районе аварии в качестве природного тест-объекта было использовано *Crepis tectorum*. Это растение имеет 4 пары крупных, хорошо отличимых друг от друга хромосом. Исследования, проводимые с этим объектом в течение двух лет, позволили установить, что частота aberrаций хромосом в проростках семян (всего проанализировано 20 тысяч метафаз) возрастает

увеличением мощности дозы. Для второго и третьего года хронического облучения характерно появление растений с измененными карноти-лами. Эти растения являются гетерозиготными по «жизнеспособным» aberrациям, способным преодолевать митотический и мейотический отбор. Появление карнотиписки измененных растений свидетельствует об активных микроэволюционных процессах в хронически облучаемых популяциях.

Исследования по оценке частоты клеток с aberrациями хромосом в корневой меристеме проростков семян *Taraxacum officinale* Web. ex Wigg. и *Oenothera biennis* L. показали их линейную зависимость от мощности дозы.

Исследование генетических эффектов, обусловленных ионизирующими излучениями, проведено на трех естественных популяциях дрозофилы, населяющих участки с различными уровнями загрязнения. *Drosophila melanogaster* были отловлены в июне 1986 года на участках с мощностью дозы гамма-излучения 80,6 и 0,2 мр/час. При анализе уровня доминантных леталей было обнаружено соответственно  $14,7 \pm 0,4$ ;  $9,3 \pm 0,3$  и  $6,2 \pm 0,2\%$  леталей. Это свидетельствует о том, что наибольшая частота характерна для популяций из районов с наибольшим уровнем радиационного фона. Указанные величины достоверно превышают уровень доминантных леталей в контрольной популяции ( $4,3 \pm 0,1\%$ ).

При оценке генетических эффектов у мышевидных грызунов установлено, что частота хромосомных нарушений во всех популяциях, обитающих на загрязненных участках, достоверно выше, чем в контроле. Наиболее подробно анализ генетических эффектов проводили на *Mus musculus* (домовых мышах), отловленных на трех участках, различающихся по мощности дозы гамма-излучения: 0,1—0,15; 1—2; 60—100 мр/час соответственно. Признаков лучевой болезни у животных не обнаружено. Все самцы были скрещены с лабораторными самками F<sub>1</sub> (СВАХС57В1). Средний размер помета не различался по участкам и составил 8,5 мышонка на самку. Всего было получено более 2000 потомков. Изучение частоты доминантных леталей у самцов не выявило различий между животными с разных участков. Анализ частоты аномальных головок спермиев у самцов также не выявил существенных различий между группами. Изучение частоты РТ показало, что у мышей, отловленных на 2 и 3 участках, частота транслокаций повышена (0,37 и 0,43% по сравнению с 0,17% на участке 1).

В мае-июне 1987 года половозрелых самцов (СВАХС57В1)—F<sub>1</sub> экспонировали на трех участках вблизи ЧАЭС. Длительность экспозиции составила 25 дней. Суммарные поглощенные дозы гамма- и бета-излучения в гонадах составили на 1 участке 10, на 2—70, на 3—2500 рад. Изучение накопления радионуклидов в тушках животных показало, что даже на максимально загрязненных участках доза от внутреннего излучения составила не более 1% от общей поглощенной дозы. Анализ плодовитости самцов после окончания экспозиции показал, что все самцы с максимально загрязненного участка были необратимо стерильными. У животных 2 участка в течение 30—40 дней после окончания экспозиции

наблюдалась временная стерильность. Плодовитость животных с участка не отличалась от контроля. Частота РТ была проанализирована в 6884 метафазах от 44 самцов, экспонированных на 1 и 2 участках. Уровень РТ оказался относительно низким и не превышал долей процента, независимо от участка экспонирования.

Для определения первичных генетических эффектов в популяциях рыб, обитающих в водоеме-охладителе ЧАЭС, загрязненном радионуклидами, оценивали частоту клеток с aberrациями хромосом в эпителии роговицы глаз карпа. Частота клеток с aberrациями хромосом у карпов, обитающих в этом водоеме, в мае 1986 года составила  $3,1 \pm 0,3\%$ , а в контрольном водоеме —  $3,0 \pm 0,2\%$ . В 1987 году в обследуемой популяции она составила  $3,6 \pm 0,5\%$ . Из этого следует, что в популяциях рыб водоема-охладителя ЧАЭС не ожидается заметного увеличения генетического груза за счет воздействия ионизирующих излучений.

Полученные результаты подтвердили сделанный ранее анализ более чем 20-летних исследований по оценке генетических последствий хронического воздействия бета-излучения  $^{90}\text{Sr}$ — $^{90}\text{Y}$  на природные популяции микроорганизмов, растений и животных. Еще до Чернобыльской аварии было установлено, что при мощности дозы порядка 0,1 рад/сутки и выше (около 40 рад в год и выше), как правило, удается зарегистрировать те или иные генетические эффекты (нарушение числа и структуры хромосом, различные виды точковых мутаций), однако такие уровни облучения не приводят к каким-либо существенным генетическим последствиям для природных популяций. Процесс экологического сдвига, связанный с выпадением чувствительных видов и перестройкой структуры облучаемых сообществ, начинается при более высоких мощностях доз хронического облучения — 1 рад/сутки и выше. Исследования, проведенные в Чернобыле, позволили подтвердить эти оценки мощностей доз редкоионизирующих излучений, вызывающих в популяциях статистически значимые генетические эффекты. Кроме того, получена уникальная информация о начальных процессах радиационного поражения объектов природных экосистем.

Поступило 26 VI 1989 г.

## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ТОЧКОВЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ У ЭУКАРИОТ

И. Б. МОССЭ

Институт генетики и цитологии АН БССР, г. Минск

*Հողվածում վերլուծվում են կետային և բրոմոսպուրմին ռադիացիոն մուտացիաների էլթի տարրեր աստիճանի մասին գրական տվյալները՝ կախված բիոչների մետաբոլիկ վիճակից, վերականգնիչ համակարգերի աշխատանքի արդյունավետությունից և այլ կեղտուն ու էկզոգեն գործոններից: Քննարկվում է նաև նախնական վնասվածքների բնդհանրությունը և այդ երկու տիպի կազմավորումների մեխանիզմների տարբերությունը:*

Сокращения: ФГА — фитогеомоаглютинин; ФУДР — фтордезоксигуанидин; БДУ — бромдезоксигуанидин; СХО — сестринские хроматидные обмены.

In the paper there are analysed literature data on different dependence of yield of point and chromosomal radiation mutations upon metabolic cell state, effective work of repair systems and upon other endogenous or exogenous factors. The common character of primary damages and difference of mechanisms developing these two types of mutations are discussed.

Предположение о неодинаковой зависимости выхода точковых и хромосомных мутаций от эффективности репарационных систем было высказано нами в 1974 г. [12] и подтверждено многочисленными работами последних лет.

Данные, свидетельствующие о независимости (или слабой зависимости) формирования точковых мутаций от интенсивности процессов репарации, получены при исследовании различных факторов:

1. *Радиочувствительность стадий гаметогенеза.* В радиобиологии существует установившееся положение о том, что радиочувствительность стадий гаметогенеза неодинакова. Это объясняется разной эффективностью репарационных процессов на разных стадиях. Однако указанное положение верно лишь для мутаций абберрантного происхождения. Что же касается точковых мутаций, то по этому тесту радиочувствительность разных стадий как сперматогенеза, так и овогенеза оказывается одинаковой. Так, Лефевр [41] не обнаружил никаких различий в радиочувствительности постмейотических половых клеток дрозофилы по тесту точковых мутаций и пришел к выводу, что радиочувствительность спермиев и сперматид по точковым мутациям одинакова. В то же время выход транслокаций в сперматидах выше, чем в спермиях, в 11,6 раза, а рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (смесь хромосомных и точковых) — в 3,7 раза [38].

Японскими исследователями показано, что при облучении выход мутаций *dumpy* точкового происхождения одинаков на всех стадиях сперматогенеза у дрозофилы, в то время как индукция мутаций *dumpy* хромосомной природы различается [47].

Не обнаружил различий между зрелыми и незрелыми ооцитами и чувствительности к индукции облучением мутаций *dumpy* точковой природы и Фуйкава [30]. Миamoto и соавт. [48] показали, что вариации в общей частоте мутаций на протяжении овогенеза обусловлены мутациями абберрантного происхождения, тогда как выход точковых мутаций мало зависит от фазы овогенеза. Эти данные полностью согласуются с результатами [59], полученными при исследовании индукции мутаций в 10 специфических локусах половой хромосомы в ооцитах и овогониях дрозофилы.

Таким образом, по тесту точковых мутаций спермии имеют практически одинаковую со сперматидами радиочувствительность, а овогонии с ооцитами, несмотря на огромную разницу в метаболизме и эффективности репарационных процессов в этих клетках.

11. *Радиочувствительность разных линий.* При изучении разных линий дрозофилы, отличающихся по своей радиочувствительности, показано [2], что выход точковых мутаций одинаков, а различия обусловлены лишь неодинаковой индукцией хромосомных абберраций.

*III. Кислородный эффект.* Известно, что кислород, присутствующий во время облучения, подавляет работу репарационных систем [3]. Кислородный эффект является модификацией способности к репарации [23].

Изменение кислородом частоты радиационных мутаций показано лишь для хромосомных аббераций, а индукция облучением точковых мутаций не изменяется при воздействии кислородом или азотом. Например, по данным Собелса [57], обработка половых клеток дрозофилы азотом после облучения в кислороде повышает частоту транслокаций в этих клетках, но не изменяет выхода точковых мутаций (рецессивные летальные мутации в кольцевой X-хромосоме). Аналогично воздействие кислородом после облучения в азоте уменьшает выход аббераций хромосом, но не влияет на индукцию точковых мутаций [48].

Выдерживание в кислороде после облучения в азоте способствует репарации повреждений в сперматидах дрозофилы, при этом уменьшается выход индуцированных облучением аббераций, но частота генных мутаций в специфических локусах половой хромосомы и аутосомы II не изменяется [40].

*IV. Влияние мощности дозы.* В работах Фуйикава [29, 30] изучался выход видимых мутаций и мутаций *dimpy* у дрозофилы при облучении  $\gamma$ -лучами с разной мощностью дозы—3000 рад/мин и 30 рад/мин. Оказалось, что частота мутаций абберантной природы была значительно ниже при малой мощности дозы, чем при высокой, но выход точковых мутаций оставался одинаковым при уровнях мощностей дозы, различающихся в 100 раз. Таким образом, индукция точковых мутаций не зависит от мощности дозы облучения.

*V. Влияние вида излучения.* Репарация повреждений, индуцированных нейтронным облучением, не обнаружена. Такие повреждения либо вообще не репарируются, либо репарируются с большим трудом. При изучении выхода мутации *dimpy* у дрозофилы установлено, что ОБЭ нейтронов по сравнению с рентгеновским излучением в 2 раза выше для мутаций хромосомной природы, чем для точковых [29]. Аналогичные данные получены и Александровым [1].

*VI. Влияние гена, нарушающего рекомбинацию.* При исследовании влияния  $\gamma$ -лучей на индукцию мутаций у дефектной по рекомбинации линии дрозофилы *e3G* было установлено [49], что частота точковых мутаций в сперматоцитах мутантной и дикой линии одинакова, а индукция у гиперплондных самцов различна. Автор предполагает, что *e3G* ген включается в процесс индукции ионизирующей радиацией больших структурных изменений и не связан с индукцией генных мутаций.

Для всех приведенных фактов возможно лишь одно объяснение—отсутствие влияния вообще или слабое влияние репарационных систем на выход точковых мутаций.

В отличие от точковых мутаций, индукция хромосомных аббераций не только эффективно изменяется под воздействием физических и химических модификаторов, но и зависит от многих факторов, зачастую неконтролируемых экспериментатором. Рассмотрим основные из них,

Известно, что разные виды живых существ обладают различной радиочувствительностью. Известно также, что и стадии гематогенеза и клеточного цикла тоже обладают различной радиочувствительностью. Однако нельзя говорить о радиочувствительности вообще, так как общая радиочувствительность, определяемая по летальной или полuletальной дозе, не всегда коррелирует с цитогенетической радиочувствительностью разных органов, тканей и клеток, между которыми часто отсутствует корреляция по индукции хромосомных aberrаций. Что же касается определения генетической радиочувствительности с помощью разных тестов, то, как показано в предыдущем параграфе, можно получить противоположные результаты, так как стадии клеточного цикла и гематогенеза, линии животных с разным генотипом и т. д. различаются по радиочувствительности, определяемой по тесту хромосомных aberrаций, но обладают одинаковой радиочувствительностью по тесту точковых мутаций. Чтобы избежать получения противоречивых данных, надо учитывать специфику каждого используемого теста, а также разнообразные факторы, изменяющие или искажающие результаты оценки кластогенного действия ионизирующей радиации (равно, как и любых других мутагенов).

*I. Генотип.* Известно, что индукция облучением хромосомных перестроек существенно отличается у особей разных генотипов.

Межлинейные различия в радиочувствительности ряд авторов связывают с неодинаковой эффективностью репарационных процессов у разных линий. В частности, различная степень восстановления ДНК в клетках млекопитающих разных линий оказалась ответственной за различия в их радиочувствительности [31].

Известно, что радиочувствительность клеток зависит от плоидности. Например, повышенная радиочувствительность мутанта дрожжей *gad51* обнаружена лишь у диплоидов, а аналогичный гаплоидный мутант обладает такой же устойчивостью к радиации, что и дрожжи дикого типа [14].

Такие же результаты получены японскими исследователями Накан с соавт. при изучении мутанта дрожжей *gad52* [13].

На цитогенетическую радиочувствительность клеток влияют даже небольшие изменения генотипа. Так, показано, что частота aberrаций, индуцируемых в культивируемых фибробластах человека, значительно выше в клетках с трисомией хромосом по сравнению с диплоидными клетками [60], а частота транслокаций в клетках мышей с нормальным кариотипом оказалась выше, чем у мышей, гетерозиготных по транслокации [24].

При этом межлинейные различия по цитогенетической радиочувствительности могут не коррелировать с общей радиочувствительностью. Так, мыши линии 101/H оказались более чувствительными в отношении вызываемой рентгеновским излучением гибели сперматогонимальных клеток, чем гибриды (СЗН/HeN×101/H) F<sub>1</sub>, но в то же время уровень транслокаций у мышей 101/H оказался существенно ниже [26].

*II. Тканевая специфичность.* Сравнение радиочувствительности по тесту хромосомных перестроек затрудняется еще и тем, что нет корреляции

ляции между различной частотой aberrаций у разных линий и в клетках разных тканей животных, т. е. линия, более чувствительная к индукции перестроек в каких-то соматических клетках, оказывается устойчивой к индукции aberrаций в половых клетках, и наоборот. Так, в работе Домаревой с соавт. [8] показано, что относительная радиочувствительность мышей четырех генотипов, определяемая по выходу хромосомных перестроек в сперматоцитах, обратна таковой в клетках роговицы глаза. Аналогичные данные получены и в других работах [60].

Одной из причин, обуславливающих разную индукцию aberrаций в разных тканях организма, и являются различия в эффективности репарационных систем. Показано, например, что в клетках млекопитающих репарационные энзимы обладают неодинаковой активностью в тканях разных органов.

*III. Возраст и пол.* Известно, что цитогенетическая радиочувствительность увеличивается по мере старения организма. Однако влияние возраста на индукцию мутаций не всегда однозначно. Так, уровень реинтрональных транслокаций и фрагментов хромосом у мышей значительно возрастает с увеличением возраста от 75 до 850 дней, а частота гиперплоидных и анеуплоидных клеток не изменяется [51].

У старых облученных самок мыши частота aberrаций в 3 раза выше, чем у молодых [55]. Интересно, что при этом играет роль репродуктивный статус самок: после облучения девственных старых самок они завали помёт меньшего размера, чем повторнородящие самки того же возраста [55].

Возрастные различия в повреждаемости хромосом выявлены и для культивируемых клеток человека [5, 60], и для клеток печени плода мышей [33].

Увеличение частоты индуцированных мутаций при старении можно объяснить нарушением репарационных процессов. Эффективность систем восстановления весьма лабильна, она различна в клетках с разным уровнем метаболизма и может быть подержана воздействию самых разнообразных факторов, с которыми соприкасается организм в течение жизни. Лохман [43] указывает, что эффективность систем репарации изменяется с возрастом, а также имеет видовую, органныю и тканевую специфичность.

Хорошо известны и различия в работе репарационных систем у особей разного пола. Например, в сперматозоидах дрозофилы ферменты репарации отсутствуют, а повреждения, возникающие в этих клетках, репарируются после оплодотворения за счет репарационных ферментов самки. Однако различный выход структурных мутаций в клетках особей разного пола может определяться и разной чувствительностью этих клеток к облучению [4].

*IV. Специфика стадий клеточного цикла и гаметогенеза.* Известно, что радиочувствительность разных стадий клеточного цикла по тесту хромосомных перестроек не одинакова [50], что обусловлено это явлением не различной чувствительностью самого генетического материала, а разной эффективностью репарационных процессов на этих стадиях [6].

Однако кроме различий в эффективности репарационных процессов, протекающих на разных стадиях клеточного цикла, на индукцию облучением хромосомных перестроек может влиять длительность протекания одной и той же стадии. Так, при сравнении радиочувствительности нейробластов двух линий кобылок, имеющих периоды клеточных циклов 2 и 4 часа, было показано, что значительно большее число фрагментов хромосом возникает в клетках с четырехчасовым циклом [32]. Авторы связывают это явление с тем, что при данной дозе облучения начальное индуцирование у клеток с четырехчасовым циклом выше, чем у клеток с двухчасовым циклом, хотя кривые митотического восстановления одинаковы у обеих линий.

Хорошо известна различная радиочувствительность по тесту хромосомных перестроек разных стадий гаметогенеза. Одной из причин этого явления служит большая степень селекции премейотическими клетками с нарушением хромосом по сравнению с постмейотическими [15]. Что же касается последних, то, безусловно, главную роль в изменении выхода структурных мутаций играют различия в эффективности репарационных процессов, протекающих в клетках разной степени зрелости. В экспериментах с четырьмя линиями дрозофилы, в том числе с нарушенными системами репарации ДНК, Тихомирова [20] изучала чувствительность разных стадий оогенеза к рентгеновским лучам и экспериментально показала, что работа систем репарации ДНК стадийспецифична.

Поскольку стадии клеточного цикла и гаметогенеза имеют неодинаговую радиочувствительность по тесту перестроек хромосом, то при обработке клеток необходимо учитывать, не вызывает ли применяемый агент сдвиг стадий.

Многие физические и химические факторы вызывают изменения в скорости митотического цикла, при этом разные клетки вступают в метафазу в разное время после обработки. Это приводит к тому, что сравнение будет сделано на метафазах клеток, которые прошли разное количество делений и имеют разную частоту aberrаций, так как частота aberrаций уменьшается с каждым последующим делением.

Например, Вольфом и Арутюняном [61] при обработке лимфоцитов мутагеном и протектором с помощью метода «карлекиновой» окраски хромосом установлено, что при фиксации лимфоцитов через 54 ч от начала культивирования лишь 25,5% клеток находятся в первом митозе, а 73,5% — во втором митозе. При этом протектор не влиял на частоту aberrаций, индуцированных в клетках первого митоза, но снижал число aberrантных клеток, вступивших во второй митоз, деление которых протекает быстрее. Эксперименты с <sup>3</sup>H-тимидином показали, что часть клеток второго митоза во время добавления мутагена находилась в стадии клеточного цикла, а следовательно, снижение частоты aberrаций при действии протектора перед добавлением мутагена может быть артефактом клеточной селекции [61].

Установлено, что введение в организм или культуральную среду <sup>3</sup>H-тимидина приводит не только к задержке вступления клетки в митоз, но и «перескакиванию» из  $\mu_2$  фазы в  $\mu_1$  или  $\mu_0$  следующего митоза.

к уменьшению периода деления клетки, гибели клеток, индукции хромосомных перестроек и т. д. [10]. Все это может привести к самым неожиданным и противоречивым результатам при исследовании выходящих структурных мутаций под действием ионизирующей радиации (равно, как и любого другого мутагена), а особенно при изучении действия двух и более факторов.

V. *Размер (дифференцировка) клетки*. Существуют две субпопуляции лимфоцитов — большие и малые. Лимфоциты большого размера устойчивы к облучению, а малые чувствительны. В процессе дифференцировки лимфоциты в значительной степени утрачивают способность к аксиальной репарации. Обусловлено это тем, что при дифференцировке клетки возрастает спирализация и плотность упаковки ДНК, что препятствует доступу ферментов репарации к месту повреждения. При обработке клеток ФГА, который обычно используется при культивировании лимфоцитов, происходит дедифференцировка клеток, вследствие чего возрастает и их устойчивость к облучению [21]. Лимфоциты людей, больных красной волчанкой, теряют свою суперспирализацию и поэтому в них лучше репарируются повреждения, ведущие к хромосомным перестройкам или гибели клеток. Все это приводит к различному выводу aberrаций хромосом при тестировании кластогенного действия мутагенных факторов.

VI. *Диаметр и специфичность хромосомы*. Радиочувствительности клеток, как оказалось, зависит и от диаметра хромосом прохлуклеуса — такой вывод был сделан на основании изучения двух популяций комаров, одна из которых живет в Альпах, а другая — в Берлине, частота перестроек различалась у этих популяций в 10—20 раз и коррелировала с числом витков и хромосомной спирали [36]. По мнению автора, повышенная радиочувствительность клеток с большим числом витков в хромосомной спирали объясняется тем, что каждый виток является единицей внутри- и межхромосомных контактов, ведущих к возникновению aberrаций хромосом. Нам представляется возможным и другое объяснение: чем более спирализована ДНК (большее число витков), тем труднее осуществляется репарация потенциальных повреждений и выше выход структурных мутаций. Интересно, что по общей радиочувствительности эти популяции различались всего лишь в 1,5 раза, что еще раз свидетельствует об отсутствии корреляции между общей и цитогенетической радиочувствительностью.

Не только величина диаметра хромосом, но и другие их характеристики влияют на индукцию хромосомных перестроек.

Существует вполне логичное мнение, что частота образования структурных мутаций в хромосомах пропорциональна их длине. Действительно, чем хромосома длиннее, тем вероятнее и ней и возникновение первичных повреждений, и формирование хромосомных перестроек. Однако Касперсон [25] обнаружил, что в разных парах хромосом частота образования aberrаций различается и при этом не соответствует длине хромосомы.

К такому же выводу пришли японские исследователи Хайата и соавт. [34] при изучении с помощью Q- и R-окрашивания хромосом-

ных перестроек, возникающих в костном мозге крыс и мышей после  $\gamma$ -облучения. Они показали, что частота aberrаций в индивидуальных хромосомах распределена не случайным образом. Были выделены более ранимые и более резистентные хромосомы, причем было установлено, что эти показатели не коррелируют с длиной хромосом. Особенно интересно, что среди наиболее часто поражаемых хромосом мыши и крысы три пары оказались гомологичными [34].

К выводу о неравномерности распределения хромосомных повреждений во фракциях метафазных хромосом, различающихся по размеру, пришли и другие авторы [7].

*III. Чувствительность участков внутри хромосомы.* Все исследователи, изучавшие локализацию индуцированных хромосомных перестроек, отмечали неравномерность распределения разрывов по длине хромосомы. Это явление обычно связывают с распределением эухроматина и гетерохроматина, структурная организация и биохимическая дифференциация которых различны [17]. Показано, что при различных воздействиях (ионизирующая радиация, химические вещества, температурная обработка) повреждения хромосом локализуются преимущественно в гетерохроматиновых районах хромосомы [16, 17]. Однако, несмотря на то, что aberrации хромосом в большей степени локализованы в гетерохроматиновых участках или на стыках гетеро- и эухроматина, последний сильнее подвержен прямому действию повреждающих агентов (ионизирующая радиация, химические канцерогенные соединения, ДНКаза I и т. д.) [7]. Такое противоречие может быть вызвано тем, что относительное количество первичных повреждений существенно выше в эухроматине, но в гетерохроматиновых участках затруднены процессы репарации [7].

Кроме того, были установлены и другие причины неравномерного распределения aberrаций по длине хромосом. Так, Шуберт [54], отмечая, что «горячие» точки у многих видов выявляются в позидореплицирующемся гетерохроматине, указывают, что на распределение хромосомных перестроек влияют также: 1) тип используемого мутагена; 2) относительное положение участка внутри кариотина; 3) наличие структурных перестроек хромосом до воздействия; 4) число потенциальных «горячих» сегментов на хромосому и т. д.

Холмберг с соавт. [35] показали, что разрывы хромосом лимфоцитов человека под действием облучения возникают преимущественно в R-областях хромосом и частота разрывов в каждой хромосоме пропорциональна длине этих участков. При этом оказалось, что структурные изменения хромосом не затрагивают C-областей [7].

Интересно, что существуют отдельные особенно «ломкие» участки хромосом, причем они специфичны для разных генотипов. Например, при изучении двух инбредных генетически чистых линий мышей для одной из них были обнаружены 3 ломких участка (12A2, 15A2, 19A2), а для другой — один (19B). Частота клеток с ломкими участками 15A2 и 19B увеличивалась при добавлении ФУДР [53]. Существует мнение, что разрывы хромосом происходят в результате не только специфиче-

ского биохимического действия мутагена, но и биофизических или физико-химических напряжений [44].

*VIII. Сроки воздействия и фиксации.* Результаты определения уровня хромосомных перестроек в соматических клетках существенно искажаются при длительном воздействии мутагенных факторов. Одной из причин этого является элиминация короткоживущих клеток, вместе с которыми элиминируются и перестройки. Тем более, что вероятнее гибели клеток с повреждениями выше. Вторая причина — это гетерогенность клеток по чувствительности к мутагенам. Так, Леонард [11] отмечает, что популяции лимфоцитов обладают разной чувствительностью, причем более чувствительная субпопуляция активно элиминируется, что приводит к снижению клеток с хромосомными нарушениями. При длительных воздействиях мутагенных агентов происходит адаптация популяций к этим мутагенам. Популяции становятся более резистентными, что также приводит к существенному занижению результатов оценки генетической опасности мутагенных факторов по сравнению с результатами исследования однократных мутагенных воздействий.

Необходимо учитывать и тот факт, что с увеличением сроков культивирования клеток в них нарастает асинхронизация. Так, даже в синхронизированной культуре лимфоцитов человека уже через 5 ч культивирования появляются клетки второго деления [11], на 48-м часу мы анализируем смесь клеток двух делений, а на 80-м — смесь клеток пяти делений [18].

При облучении гепаринизированной цельной крови индийских мушкетеров через 48 ч культивирования обнаружена разная частота хромосомных aberrаций в метафазах 1-, 2- и 3-го митозов [27]. Авторам установлено, что 50% дицентриков и 12% колец переносятся из первого цикла во второй. В первом цикле после облучения в дозе 4 Гр было найдено 94% аномальных клеток, а во втором — 73%. После третьего цикла частота хромосомных нарушений существенно снижается [27]. Эти данные неоспоримо свидетельствуют о том, что нельзя изучать количественные закономерности индуцирования цитогенетических повреждений в клетке без идентификации первого и последующих клеточных делений.

*IX. Роль условий проведения опытов.* На результаты цитогенетических исследований могут оказывать влияние условия проведения опыта. Например, в лимфоцитах периферической крови человека был обнаружен «эффект хранения» [28]. Для изучения его влияния на частоту aberrаций хромосом Эвансом с соавт. [28] были проведены исследования в двух вариантах: в первом обработанные мутагеном лимфоциты стимулировали к делению с помощью ФГА и БДУ в течение 0—9 дней, а во втором варианте опытов ФГА и БДУ добавляли в культуру клеток сразу же после обработки мутагеном. Оказалось, что в обоих вариантах опытов частота хромосомных перестроек хроматидного и хромосомного типа интенсивно увеличивалась вплоть до последнего срока культивирования, в то время как частота СХО возрастала постепенно, достигая максимума на 6-й день, а затем начинала снижаться.

Установлено, что на частоту aberrаций в лимфоцитах влияют не только сроки хранения, но и температура хранения, и посуда, в которой хранилась кровь перед облучением [37]. Так, в клетках крови, хранившейся при  $t=5^{\circ}\text{C}$  в течение 173 ч в пластиковых сосудах после облучения, частота aberrантных клеток была в 2 раза больше, чем в лимфоцитах свежей крови. Статистически значимое увеличение уровня хромосомных перестроек наблюдалось и при хранении крови до облучения в течение 24, 48 и 72 ч при  $t=5, 20$  и  $37^{\circ}\text{C}$ . Однако хранение крови в течение 48 ч при  $t=20^{\circ}\text{C}$  в стеклянных сосудах не приводило к повышению частоты aberrаций по сравнению со свежей кровью. Автор делает вывод о сенсibiliзирующем действии пластмассы на наследственную структуру лимфоцитов [37].

Возможны и другие артефакты, влияющие на результаты генетических исследований. Так, Митчел [45] указывает, что размер проб, количество повторностей, выбор метода статистической обработки данных а также экспериментальные артефакты и случайные ошибки могут быть причинами противоречивости данных, получаемых в разных лабораториях при исследовании одного и того же генотоксического агента. Например, к артефактам может привести также отсутствие тщательной отмывки культуры [56]. В некоторых опытах даже показатели осмотического давления, концентрация ионов и pH среды влияли на результаты цитогенетических исследований [58].

Таким образом, на индукцию хромосомных перестроек в отличие от точковых мутаций, влияют самые разнообразные факторы. Зависимость уровня структурных мутаций от многообразных клеточных характеристик свидетельствует о том, что образование aberrаций тесно связано с метаболическими процессами в клетке, в частности, с репарационными.

Различия в индукции хромосомных и точковых мутаций, очевидно, связаны с их разной природой и разными путями становления. Так как точковые мутации—это изменения на уровне нуклеотидов ДНК, не затрагивающие белковый компонент нуклеопротеина и не нарушающие в процессе своего формирования целостность хромосомы, а для образования структурных перестроек обязательны разрыв в сахарофосфате и участие белкового компонента, то возможности для репарации предмутационных повреждений при образовании точковых и структурных мутаций различны.

Значение белково-нуклеиновых взаимодействий для репарации ДНК в клетках эукариот не вызывает сомнений, так как плотная упаковка хроматина препятствует репарации радиационных повреждений.

Следовательно, повреждения на уровне нуклеотидов могут быть недоступны для ферментов репарации, так как защищены «белковым футляром». Повреждения репарабельны или нерепарабельны в зависимости от их локализации [22]. Очевидно, часть изменений нуклеотидов ускользает от репарации: либо не узнаются репарационными ферментами, так как не нарушают вторичную структуру молекулы, либо прикрыты белком и недоступны для репарационных ферментов.

Нерепарабельные или нерепарированные повреждения доживают

до синтеза ДНК и фиксируются в точковые мутации репликационным механизмом [9].

Механизмы образования замены пар оснований путем неправильного спаривания описаны в ряде работ [9, 19, 39].

Различие в путях становления точковых и хромосомных мутаций очевидно. В то же время многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют об общности первичных повреждений, приводящих к различным генетическим эффектам. Например, не только точковые, но и хромосомные мутации возникают под действием неионизирующих излучений, неспособных вызвать разрывы ДНК, при введении в пиримидиновое ядро заместителей Вг, С1 и при включении в ДНК бромдезоксигуанидина, а также при встраивании транспозонов, меняющих порядок нуклеотидов. При реплицирующейся нестабильности хромосом перестройки возникают спустя десятки клеточных поколений после воздействия мутагеном. Поскольку реплицироваться могут лишь изменения нуклеотидной последовательности, следовательно, такие изменения способны привести к абберации хромосом. В работе Ли с соавт. [42] наглядно продемонстрировано, что вполне определенные повреждения ДНК—межнитевые сшивки типа димеров тимина—служат причиной образования перестроек хромосом.

В 1980 г. Престон [52] выдвинул гипотезу, согласно которой в основе инициации хромосомных перестроек лежат нарушения оснований ДНК: при действии репарационных ферментов на поврежденные основания ДНК образуются одиночные разрывы хромосом, которые в свою очередь ферментативно преобразуются в двойные разрывы, дающие начало структурным мутациям.

Таким образом, можно сделать следующий вывод. Если первичные повреждения азотистых оснований не подвергаются воздействию репарационных ферментов (из-за нерепарабельности или недоступности для этих ферментов), то повреждения фиксируются в виде точковых мутаций. Если же системы восстановления узнают измененное основание и взаимодействуют с ним, то повреждение либо восстанавливается к норме, либо дает начало формированию хромосомной перестройки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александров И. Д. Докл. АН СССР, 275, 2, 483—486, 1984.
2. Александров И. Д. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов, 68—75, М., 1976.
3. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. 458, М., 1978.
4. Ватти К. В. 14 Ежегод. конф. Европ. об-ва по мутагенам внешней среды. М., 11—14 сентября 1984. 546—547, М., 1984.
5. Вилкшич М. М., Хохлов А. И., Аксюткина М. С., Обухова Л. К., Мамас В. В. В сб.: Повреждение и репарация ДНК. 56—67, Пушкино, 1980.
6. Ганасса Е. Э. Радиационное повреждение и репарация хромосом. 103, М., 1976.
7. Горин А. И., Ермаков А. В., Спитковский Д. М. Бюлл. exper. биол. и мед. 10, 9, 279—281, 1986.
8. Домарева О. П., Дмитриева Т. Н. Радиобиология, 13, 1, 61—65, 1973.
9. Дубинин И. П. Потенциальные изменения в ДНК и мутации. 242, М., 1978.
10. Козлов А. А., Туманишвили Г. Д. Изв. АН ГрузССР. Сер. биол. 7, 3, 277—279, 1980.

11. Леонард А. Цитол. и генет., 20, 2, 115—121, 1986.
12. Моссэ Н. Б. Проблемы химической защиты в радиационной генетике 152, Минск, 1974.
13. Нахаш С., Матида И., Сээки Т. XIV МКГ. Секц. заседания. Тез. докл., 1, 211, М., 1978.
14. Петин В. Г. XIV МКГ, Секц. заседания. Тез. докл., 1, 211, М., 1978.
15. Померанцева М. Д. 5 Съезд Всесоюз. об-ва генет. и селекционеров им. Н. И. Вавилова, М., 24—28 нояб., 1978. 1. Общ. и молекул. генет. Тез. докл., 219, М., 1987.
16. Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом 431, М., 1986.
17. Прокофьева-Бельговская А. А. В сб.: Ионизирующие излучения и наследственность. 7, М., 1960.
18. Салачева В. А. Цитол. и генет., 20, 2, 97—102, 1986.
19. Тарасов В. А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. 226, М., 1982.
20. Тихомиров М. М. Генетика, 20, 12, 1981—1985, 1984.
21. Филиппович И. В., Сорокина Н. И., Сидитенков В. А., Романцев Е. Ф. И с по пробл. радиобиологии, 27, 31—35, 1983.
22. Abel H. Stud. biophys., 76, 1, 3—7, 1979.
23. Binz P., Buechi C., Cordt L., Fritz-Kiggli H., Schäppli K. Jahresber. 1981. Schweiz. Inst. Nuclearforsch. Appendices. Sin. Newslett. 14 Sin. Med. Newslett. 3 Villigen s. a. NL. 112.
24. Bui P. P. W., van, Hoer de P., Zwanenburg S., Richardson F. Mutat. Res., 73, 1, 221—226, 1980.
25. Carpersson T., Haglung Ulla, Lindel B. Zech Lore Exp. Cell Res., 75, 2, 541—543, 1972.
26. Cattanach B. M., Kirk M. J. Mutat. Res., 176, 1, 69—79, 1978.
27. Das B. C., Sharma T. Mutat. Res., 176, 1, 93—104, 1987.
28. Evans H. J., Vijayalaxmi A. Nature, 234, 5754, 370—372, 1980.
29. Fujikawa K., Inagaki E. Mutat. Res., 63, 139—146, 1979.
30. Fujikawa K. Jap. J. Genetics, 55, 5, 409—413, 1980.
31. Fujiwara Y. Mutat. Res., 46, 119—120, 1977.
32. Gauden M. E., Weber N. B., Selbert G. B. Environ. Mutagenes., 6, 3, 441, 1984.
33. Harper B. L., Legator M. S. Environ. Mutagenes., 9, 8, 46, 1987.
34. Hayata Isamu, Dutritiaux Bernard Proc. Jap. Acad. 61, 5, 180—182, 1985.
35. Holmberg Mats, Jonasson Jon. Hereditas., 74 1, 57—67, 1973.
36. Israelewski N. Chromosome, 70, 2, 263—276, 1979.
37. Ivanov B. A. Acta med. bulg., 4, 1, 63—67, 1979.
38. Ives P. T. Genetics, 48, 8, 981—982, 1963.
39. Janion Acta biochim. pol., 31, 1, 183—192, 1984.
40. Inagaki E., Sobets F. H. Mutat. Res., 15, 2, 229—232, 1972.
41. Lefevre G. J. Genetics., 55, 2, 263—268, 1967.
42. Liu V. W., Heddle J. H. Environ. Mutagenes., 3, 3, 314, 1981.
43. Lohman P. H. M., Vijg J., Utterlinden A. G., Slagboom P., Gossen J. A., Berends F. Mutat. Res., 181, 2, 227—234, 1987.
44. Manna G. K. Symp. Struct. and Funct. Aspects Chromosomes, 1, 2, Bombay, 1975.
45. Mitchell I. de G. Mutagenesis, 2, 2, 141—145, 1987.
46. Miyamoto E. Genetics, 102, 4, 783—794, 1982.
47. Miyamoto T., Ikebuchi M., Terahtski J. Jap. J. Genet., 56, 3, 301—308, 1981.
48. Miyamoto T., Nakao J. Jap. J. Genet., 53, 3, 175—181, 1978.
49. Miyamoto Tomio Mutat. Res., 120, 1, 27—36, 1983.
50. Okada S., Ono T. Mutat. Res., 46, 145, 1977.
51. Pacchierotti Francesca, Quaggia Sandro, Russo Antonella. Atti Assoc. genet. Ital., 30, 165, 1984.
52. Preston R. J. Mutat. Res., 69, 71—79, 1980.
53. Sanz M., Jenkins E., Brown T., Davlsson M., Kevin M., Roderick T., Wisniewski H. Amer. J. Hum. Genet., 36, 4, 111, 1984.
54. Schubert I. Clin. Genet., 28, 5, 403, 1985.

55. Searle A. G., Beecher C. V. *Mutat. Res.*, 147, 6, 357—362, 1985.
56. Shore Julie A., Wong Teresa K., Evans Bettie L. B., Cody David B. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Test.*, 172, 1, 77—87, 1986.
57. Sobels F. H. In: *Repair from Genetic Radiation Damage*. Oxi.—L.—N.—Y.—Paris, 179—185, 1963.
58. Stankowski L. F., Gudek E. G., Tuwan W. G., Bieszczyk M. J., Stec E. E., Polinsky T., Mathews R. J., Naismith R. W. *Environ. Mutagenes.*, 9, 8, 101, 1987.
59. Valencia R. M., Valencia J. I. *Radiation Res.*, 14, 513—517, 1961.
60. Waller Horst, Waller Margarete *Eur. J. Cell Biol. Suppl.*, 42, 15, 34, 1986.
61. Wolff J., Arutyunyan R. *Environ. Mutagenes.*, 1, 1, 5—13, 1979.

Поступило 26.VI 1989.

Биол. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989

УДК 581.167:581.132.1

## МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

Ю. Е. ГИЛЛЕР

Институт физиологии и биофизики растений  
АН Таджикской ССР, г. Душанбе

*Ստատիստիկական է քլորոֆիլի վիճակը (նատիվ ձևերի կազմը, սիդոնտի բաշխումն ըստ ձևերի և էներգիայի փոխադրումը նրանց միջև) միարջիչ շրմուռների և բարձրակարգ բույսերի մուտանտային զմերի ջյրոպլաստներում: Յույց է տրվել, որ այդ հատկանիշների մուտացիոն փոփոխականությունը զուրս չի գալիս նրանց ֆիլոգենետիկական և օնոտգենետիկական բազմազանության սահմաններից: Ստացված արդյունքները քննարկվել են ըստ Ն. Վ. Տիմոֆևն-Ռեսոսկու էվոլյուցիոն կոնցեպցիայի:*

The chlorophylls state (content of native forms, distribution of the pigment between the forms and their donor—acceptor interaction during energy transfer) was studied in chloroplasts of mutant strains of unicellular green algae and higher plants. It was shown that mutation variability of these characteristics did not overstep the limits of its phylogenetic and ontogenetic variety. Obtained data are discussed in the light of N. V. Timofeyev—Resovskii evolutionary concepts.

Конверсия световой энергии в энергию химических связей при фотосинтезе представляет собой сенсбилизированный хлорофиллом окислительно-восстановительный процесс, протекающий в специализированных мембранных структурах хлоропластов высших растений и жидкородель и хромофорон бактерий. Целенаправленное управление фотосинтезом, как одно из важнейших условий получения высоких и устойчивых урожаев и поиска путей осуществления этого процесса в искусственных системах невозможны без ясного понимания принципов экогенного управления молекулярной организацией фотосинтетического аппарата в растительном организме. Одно из центральных мест в этой проблеме занимает вопрос о природе нативного состояния хлорофилла, обеспечивающего его функциональную активность в процессе фотосинтеза.

Особенности нативного состояния хлорофилла—связь с белками пластидных мембран, структурная и функциональная гетерогенность характерны не только для зрелых хлоропластов, они прослеживаются на всех этапах формирования фотосинтетического аппарата. Эти особенности возникают при биогенезе мембран в результате сопряжения биохимических (синтезы молекул) и биофизических (самосборка надмолекулярных структур) процессов, ход которых определяется взаимодействием генетического потенциала организма с комплексом внешних условий. Следовательно, выяснение механизмов генетического управления состоянием хлорофилла в хлоропластах следует рассматривать как неотъемлемую часть общепфизиологической проблемы регулирования свойств целостной биологической системы.

К настоящему времени накоплена обширная информация, позволяющая представить молекулярную организацию системы нативных форм хлорофилла, осуществляющей поглощение, перераспределение и первичную трансформацию энергии света при фотосинтезе [1—4].

Уже развиты представления о кооперированном взаимодействии генетических и белок-синтезирующих систем ядра, цитоплазмы и пластыд в биогенезе фотосинтетического аппарата [5—7] вплоть до локализации теней и биосинтеза ряда полипептидов реакционных центров фотосистем, светособирающего комплекса и компонентов системы переноса электронов [8—10]. В то же время имеющиеся сведения о наследственной детерминации нативного состояния хлорофилла чрезвычайно ограничены. Исходя из этого, для выяснения принципов генетического управления образованием системы нативных форм хлорофилла в фотосинтетических мембранах представлялось необходимым исследовать мутационную изменчивость признаков состояния пигмента в хлоропластах.

На основе учения Н. В. Тимофеева-Ресовского о микроэволюционном процессе, где важная роль отводится мутациям как элементарному эволюционному материалу [11], результаты таких исследований необходимы также для понимания путей эволюции механизмов фототрофного типа питания живых организмов.

*Объекты, выбор экспериментальных критериев, методы.* Пигментные мутанты и исходные штаммы хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer.) и хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii* Dang.) были получены из Петергофской генетической коллекции зеленых водорослей Биологического НИИ ЛГУ [12]. Водоросли выращивали на жидкой агаризованной среде ФДАГА в темноте при 30° (хлорелла) или на среде 12, обогащенной в темноте или на свету (10 тыс. лк) при 25° (хламидомонада).

Листья мутантов и исходных линий гороха (*Pisum sativum* L.) из коллекции Института цитологии и генетики СО АН СССР [13], арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) и хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) из коллекции Отдела общей генетики хлопчатника АН Таджикской ССР [14, 15] брали с растений коллекционных или экспериментальных посевов.

Анализ известных к началу наших исследований и подтвержденных в последующие годы экспериментальных фактов и выработанных на их основе представлений о природе нативного состояния хлорофилла убедительно показал, что основой компонентного пигментного аппарата хлоропластов—хлорофилла *a* входит в состав пигмент-белковых глобул пластидной мембраны в виде совокупности молекулярных агрегатов—

системы нативных форм. Характерными признаками состояния хлорофилла в хлоропластах являются:

—спектральные свойства нативных форм—признак, характеризующий типы образовавшихся в мембране упаковок молекул пигмента;

—распределение пигмента по нативным формам—признак, характеризующий различные условия для возникновения того или иного типа упаковки;

—особенности переноса энергии в системе нативных форм—признак, отражающий взаимное расположение и ориентацию форм, а также расстояние между ними в мембранных глобулах. В качестве экспериментальных критериев изменений этих признаков использовались соответственно: —положение максимумов полос в спектрах поглощения и низкотемпературной флуоресценции хлорофилла в исследуемых растениях.

Положение максимумов эмиссионных полос спектральных форм хлорофилла определялось по спектрам низкотемпературной ( $-196^{\circ}$ ) флуоресценции, абсорбционными полосами — на разностных спектрах поглощения листьев. Расстояния между обнаруженными полосами в подавляющем большинстве случаев были таковыми, что погрешность в определении положения их максимумов не превышала по известным данным [16],  $\pm 1-2$  нм.

Изменения относительной концентрации спектральных форм хлорофилла оценивались по разностным спектрам поглощения, что позволяло сделать заключение об изменении распределения пигмента по группам форм  $X_{668-672}^{668-672}$  (здесь и далее: верхний индекс — положение максимумов полос флуоресценции, нижний — поглощения),  $X_{662-666}^{668-672}$  и  $X_{675-681}^{668-672}$ . Качественные оценки изменений эффективности сенсбилизации флуоресценции одних спектральных форм хлорофилла другими формами или сопровождающими пигментами, а также особенностей донорно-акцепторных связей форм в процессах переноса энергии возбуждения основывались на результатах анализа трех типов спектров: флуоресценции, поглощения и возбуждения флуоресценции.

Спектральные измерения выполнялись на спектрофотометрах: СФ-10 и СФ-14 и регистрирующих спектрофлуориметрах, собранных в нашей лаборатории. Для количественного и качественного анализа пластидных пигментов применялась аналитическая хроматография на бумаге [17] или спектрофотометрия экстрактов [18].

*Результаты и обсуждение.* На рис. 1 и 2 показано положение полос поглощения и флуоресценции нативных форм хлорофилла, обнаруженных нами в пластидах мутантов [19-24], в сравнении с результатами



Рис. 1. Филогенетическая и мутационная изменчивость положения максимумов полос поглощения нативных форм хлорофилла. Среди зеленых водорослей отдельными строчками показаны данные для хлореллы (1) и хламидомонады (2); среди высших растений—для гороха (1) и арабидонсиса (2). Мутанты высших растений: 3 — горох, 4 — арабидонсис, 5 — хлопчатник.

последования различных систематических групп растений [25—27]. У мутантов обнаружены нативные формы пигмента, свойственные данному роду или встречающиеся у растений иной таксономической принадлежности, но не найдены спектральные формы, которые существенно отличаются по положению абсорбционного и эмиссионного максимумов от форм, выявленных при изучении филогенетической изменчивости

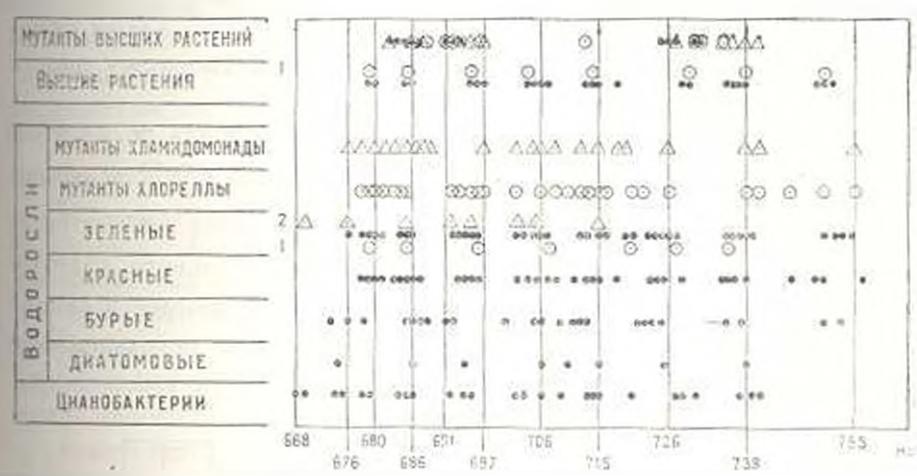


Рис 2. Филогенетическая и мутационная изменчивость положения максимумов полос низкотемпературной флуоресценции нативных форм хлорофилла. Обозначения—см. рис. 1.

нативного состояния хлорофилла. Кроме того, в пластидах мутантов высших растений и зеленеющих на свету мутантов хламидомонады нами обнаружены спектральные формы хлорофилла, ранее описанные [28] как промежуточные в процессе биогенеза системы его нативных форм. Следовательно, мутационная изменчивость спектральных свойств нативных форм пигмента не выходит за пределы филогенетического и онтогенетического многообразия этого признака. Сравнение имеющейся информации об особенностях спектральных характеристик хлорофилла в пластидах пигментных мутантов с результатами изучения филогенетической изменчивости этого признака [25—27] подтверждает этот вывод. Например, в спектрах низкотемпературной флуоресценции двух мутантов кукурузы обнаружены полосы с максимумами 682 или 690 нм и 729 или 712—717 нм [29], характерные не только для высших растений (713—715 нм и 729 нм), но и для водорослей — 681 и 691 нм [26]. Так вызываемые «инфракрасные» мутанты ячменя накапливают в пластидах форму хлорофилла *a* с максимумом поглощения при 745 нм [30]. Этой формы в пластидах высших растений нет [25,26], но абсорбционные полосы около 730—740 и 750—760 нм были обнаружены у водорослей [31]. В спектре низкотемпературной флуоресценции одного пигментного мутанта хламидомонады наблюдалась полоса с максимумом при 705 нм [32]. Такой полосы нет в спектрах клеток диких типов этой водоросли [27, 32], но она характерна для эмиссионных спектров хлорофилла в клетках водорослей родов *Enteromorpha* и *Euglena* [26]. В ря-

де работ также было установлено, что часто различия спектральных характеристик хлорофилла в клетках диких типов мутантов одноклеточных зеленых водорослей невелики и обусловлены изменениями в количественных соотношениях нативных форм пигмента [27,32,33—37].

Таким образом, рассмотренные данные показывают, что мутационные изменения типов нативных форм хлорофилла в пластидах зеленых одноклеточных водорослей и высших растений состоят в замене упаковки молекул пигмента, характерных для данного рода, на формы, присущие другим родам этой группы растений, или встречающиеся у представителей иных таксономических групп.

Мутационные изменения распределения хлорофилла по нативным формам состоят в увеличении доли пигмента в виде  $\text{Хл}_{662-675}^{668-675}$  уменьшении —  $\text{Хл}_{661-675}^{668-675}$  и отклонениях от нормы относительной концентрации  $\text{Хл}_{662-675}^{668-675}$ . Изменения в пластидах мутантов относительного содержания  $\text{Хл}_{662-675}^{668-675}$  и  $\text{Хл}_{661-675}^{668-675}$  одинаковы для зеленых водорослей и высших растений, а  $\text{Хл}_{662-675}^{668-675}$  — зависит от таксономической принадлежности организма (рис. 3).

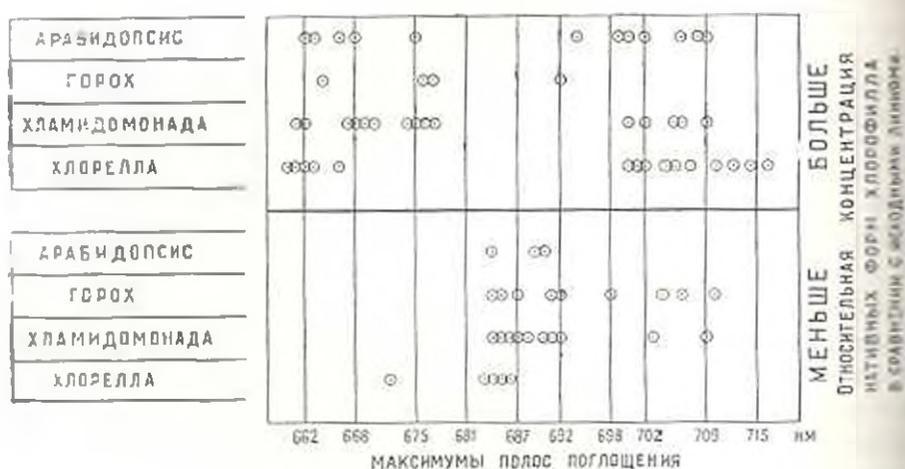


Рис. 3. Мутационная изменчивость относительной концентрации нативных форм хлорофилла в пластидах одноклеточных водорослей и высших растений.

В литературе отсутствуют систематические данные о мутационной изменчивости распределения хлорофилла по нативным формам. Имеются лишь сведения об относительном содержании в пластидах пигментных мутантов культурного и дикого видов томатов и льняного зена двух групп упаковок молекул пигмента, ответственных за полосы с максимумами 673 и 684 нм в спектре второй производной оптической плотности листьев при невысоком разрешении [38, 39]. Установлено, что у мутантов в подавляющем большинстве случаев (38 из 41 обследованной линии) отношение концентраций  $\text{Хл}_{684}/\text{Хл}_{673}$  меньше, чем у диких типов [38]. Исследование больших коллекций пигментных мутантов зеленых одноклеточных водорослей показало, что у мутантных клеток в спек-

трах низкотемпературной флуоресценции преобладают коротковолновые полосы, а красный максимум поглощения сдвинут в область меньших длин волн по сравнению с таковым у клеток диких типов [40]. Описаны мутанты кукурузы с аномально высоким выходом флуоресценции хлорофилла при комнатной температуре [41], возможной причиной которой является увеличение относительного содержания в пластидах коротковолновых нативных форм пигмента. Получены мутантные штаммы одноклеточных зеленых водорослей с дефицитом длинноволновых упаковок Хл<sub>690</sub> [35, 36] или Хл<sub>704-705</sub> [35, 42], однако не известны мутанты, лишенные коротковолновых нативных форм хлорофилла. Более того, у мутанта гороха с дефицитом вскомогательного светособирающего пигмент-белковолипидного комплекса, в который, как известно [3], входит Хл<sub>662-665</sub>, обнаружено увеличение относительного содержания коротковолновых нативных форм хлорофилла в изолированных мембранных комплексах, обогащенных реакционными центрами фотосистемы II [33]. Эти факты не противоречат сделанному на основе полученных нами данных (рис. 3) заключению о характере мутационной изменчивости распределения хлорофилла по нативным формам в пластидах одноклеточных зеленых водорослей и высших растений.

Анализ результатов изучения особенностей сенсбилизации флуоресценции хлорофилла в пластидах пигментных мутантов растений [21, 23], [24], систематизированных в таблице, показал, что мутационная измен-

Мутационная изменчивость процессов переноса энергии и пигментной системы пластид одноклеточных водорослей и высших растений

Обнаруженные отклонения от нормы

Объекты	нарушен перенос энергии					Между длинноволновыми нативными формами	Коротковолновый сдвиг максимума красной полосы возбуждения низкотемпературной флуоресценции Хл <sub>731-735</sub>	Энергия передается только на самые длинноволновые формы хлорофилла
	от хлорофилла в и каротиноидов	от Хл <sub>670-668</sub>	от Хл <sub>680-675</sub>	от Хл <sub>686-681</sub>	от Хл <sub>691-687</sub>			
Хлорелла	+				+	+		+
Хламидомонада		+	+			+		+
Горох	+	+	-		+	+	+	
Арабидопсис					+			

чивость этого признака нативного состояния хлорофилла проявляется в виде количественных и качественных изменений. Количественная сторона обусловленных мутациями аномалий—это снижение эффективности переноса энергии между нативными формами хлорофилла и от сопровож-

дающих пигментов к хлорофиллу *a*. Этот тип мутационных изменений одноклеточных водорослей и высших растений. Обусловленные мутациями качественные нарушения состоят в изменении характерных для диких типов донорно-акцепторных связей нативных форм хлорофилла в процессе переноса энергии.

В спектрах возбуждения флуоресценции клеток или листьев мутантов относительная интенсивность (в сравнении с полосой Соре хлорофилла *a*) полосы, обусловленной поглощением хлорофилла *b* и каротиноидов, была меньше, чем в спектрах исходных линий, даже в тех случаях, когда отношение  $X_l b/X_l a$  у мутанта увеличено. Следовательно, в результате мутаций снижается эффективность сенсibilизации сопрягающимися пигментами флуоресценции хлорофилла *a*.

В спектрах низкотемпературной флуоресценции клеток или листьев мутантов обнаружены (рис. 2) выявляемые только методами производной спектроскопии полосы минорных нативных форм хлорофилла, относительная концентрация которых не больше или даже меньше, чем у исходных линий. Увеличение доли пигмента в виде  $X_l^{676}$ ,  $X_l^{677}$  и группы форм  $X_l^{706-715}$  длинноволновых (рис. 3) только у некоторых мутантов приводило к появлению в эмиссионных спектрах полос этих форм. Поскольку известно, что низкий выход флуоресценции большинства нативных форм хлорофилла обусловлен стоком поглощенной энергии на основные флуоресцирующие формы, полученные данные, вероятно, указывают на снижение в пластидах мутантов эффективности переноса энергии между нативными формами пигмента.

Повышение в пластидах мутантов водорослей относительной концентрации  $X_l^{706-715}$  (рис. 3) в ряде случаев приводило к увеличению в спектрах флуоресценции клеток интенсивности полос с максимумами при 738—740 и 755 нм. У некоторых мутантов высших растений наблюдался коротковолновый сдвиг главного эмиссионного максимума листьев, что свидетельствует об увеличении выхода флуоресценции  $X_l^{725}$ , относительное содержание которого в листьях этих мутантов не больше или даже меньше, чем у исходных линий. Поскольку основными акцепторными формами пигмента в хлоропластах зеленых водорослей являются  $X_l^{715}$  и  $X_l^{725}$ , а в пластидах высших растений —  $X_l^{738}$  [42], полученные данные могут быть интерпретированы как результат мутационных изменений энергетических донорно-акцепторных связей нативных форм хлорофилла, приводящих у водорослей к переносу энергии на самые длинноволновые формы, минуя  $X_l^{715}$  и  $X_l^{725}$  (что характерно для высших растений), а у высших растений — к повышению эффективности сенсibilизации флуоресценции  $X_l^{725}$ , присущему водорослям.

В спектрах возбуждения низкотемпературной флуоресценции  $X_l^{725-735}$  в листьях мутантов гороха главный (красный) максимум был сдвинут относительно его положения в спектре контроля на 8—18 нм в коротковолновую область [21]. Это не связано с изменением распределения хлорофилла по донорным нативным формам (рис. 3), т. е. вероятной причиной сдвига являются изменения переноса энергии на  $X_l^{725-735}$  состоянии в переходе функций основного сенсibilизатора к более коротковолновым формам. Коэффициенты миграции энергии на основ-

ные акцепторные формы пигмента от  $\text{Хл}_{682-692}^{665-697}$  у зеленых водорослей примерно одинаковы (0,46—0,5), а у высших растений уменьшаются от 0,55 ( $\text{Хл}_{692}^{697}$ ) до 0,35 для  $\text{Хл}_{682}^{688}$  [42]. Следовательно, донорно-акцепторным связям нативных форм при переносе энергии в пластидах мутантов высших растений присущи определенные черты, характерные для водорослей.

Таким образом, мутационная изменчивость характеристик переноса энергии возбуждения в пигментной системе пластид проявляется в виде уменьшения эффективности этого переноса и изменений энергетических донорно-акцепторных связей нативных форм хлорофилла. Первый тип мутационных изменений универсален для исследованных групп растений. Второй сближает по этим характеристикам состояния пигмента мутанты высших растений с дикими типами водорослей и наоборот, т. е. мутационная изменчивость особенностей донорно-акцепторных связей нативных форм хлорофилла в процессах переноса энергии аналогична их филогенетическому разнообразию.

Рассмотренные данные показали, что у одноклеточных зеленых водорослей и высших растений имеет место параллелизм мутационной изменчивости признаков состояния хлорофилла. Обнаружено существенное сходство возникающего в результате пигментных мутаций многообразия спектральных характеристик нативных форм хлорофилла и их донорно-акцепторных связей в процессах переноса энергии с филогенетической и онтогенетической вариабельностью этих признаков. Такие результаты находятся в полном соответствии с законом гомологических рядов и наследственной изменчивости [43] и не противоречат сделанному позже выводу (фактически подтверждающему закон Вавилова), что при искусственном мутагенезе новые, не входящие в естественное разнообразие признаки возникают у растений крайне редко [44, 45].

Анализируя изменчивость фенотипических признаков у представителей семейства бобовых, Н. И. Вавилов обнаружил сходство видового разнообразия окраски листьев по крайним градациям (зеленая или желтая) [43]. Поскольку этот признак определяется соотношением скоростей биосинтеза и распада хлорофилла, зависящих от его состояния в пластидах, результаты этих наблюдений можно рассматривать как указание на возможность гомологической изменчивости параметров нативного состояния хлорофилла. Уже получены прямые доказательства применимости закона гомологических рядов к изменчивости признаков фотосинтетического аппарата. Обнаружена гомология филогенетической, онтогенетической и мутационной изменчивости ультраструктурной организации хромофоров и хлоропластов [46]. Установлен параллелизм мутационных изменений соотношения скоростей биогенеза функционально активных надмолекулярных комплексов фотосинтетических мембран зеленых водорослей [47].

Считается, что гомология морфологических (в рассматриваемом случае — молекулярно-структурных) признаков определяется гомологией на генетическом уровне [43, 48]. Так, гомологию изменчивости строения фотосинтетических мембран бактерий, водорослей и высших растений и параллелизм обусловленных мутациями отклонений от нормы темпов

биогенеза мембранных комплексов у различных родов зеленых водорослей авторы объяснили гомологией структуры генотипов растений [46, 47]. Следовательно, обнаруженные нами черты гомологии мутационной изменчивости признаков нативного состояния хлорофилла у одноклеточных водорослей и высших растений однозначно указывают на прямую последовательную детерминированность этих признаков и ее консервативный характер у представителей автотрофных эукариот.

В серии работ со специфическими ингибиторами биосинтеза РНК и белка было показано, что генетические системы растительного организма (ядерный геном и пластом) через биосинтез белков компонентов пластидных мембран управляют организацией хлорофилл-белковых комплексов и концентрацией пигмента в клетках, регулируя состав нативных форм хлорофилла, его распределение по формам и донорно-акцепторные связи форм в процессах перекачки энергии [49—53]. На основе этих данных становятся понятными механизмы мутационной изменчивости признаков нативного состояния хлорофилла, а сходство многообразия этих признаков, поставляемого мутагенезом, с их филогенетическим микробразием можно рассматривать как доказательство возможности «использования» мутаций эволюционным процессом. Это еще одно подтверждение справедливости микроэволюционных представлений Н. В. Тимофеева-Ресовского.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Красновский А. А. Преобразование энергии света при фотосинтезе. Молекулярные механизмы, М., 64, 1974.
2. Литвин Ф. Ф. Автореф. докт. дисс., 50, М., 1978.
3. Гиллер Ю. Е. *Studia biophysica*, 71, 2, 99—114, 1978.
4. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений, 109—182, М., 1986.
5. Насыров Ю. С. Фотосинтез и генетика хлоропластов, 144, М., 1975.
6. Shlyk A. A., Prudnikova I. V., Sauchenk G. E. et al. Genetic Aspects of Photosynthesis. (Nasyrov Yu. S., Šesták, eds.) *The Hague: Junk*, 119—132, 1975.
7. Ellis R. J. *Biochim. et Biophys. Acta*, 463, 1, 185—215, 1977.
8. Westhoff P., Alt J., Nelson N. et al. *Plant Mol. Biol.*, 2, 2, 95—107, 1983.
9. Орт Д. Р., Говинджи. Фотосинтез под ред. Говинджи, 8—89, М., 1987.
10. Семенов Б. Е. Фотосинтез и продукционный процесс. Под ред. Ничипоровича А. А., 69—81, М., 1988.
11. Тимофеев-Ресовский Н. В. *Бот. журн.*, 43, 3, 317—336, 1958.
12. Квитко К. В., Борщевская Т. Н. Методы исследования структуры фотосинтетического аппарата, 139—154, Пушкино, 1972.
13. Сидорова К. К. Генетика мутантов гороха, 168, Новосибирск, 1981.
14. Касьяненко А. Г. Автореф. канд. дисс., 22, Душанбе, 1966.
15. Бикасия Г. Р. Автореф. канд. дисс., 43, Баку, 1974.
16. Гуляев Б. А., Литвин Ф. Ф., Веденев Е. И. и др. *Биол. науки*, 4, 49—57, 1971.
17. Бажанова Н. В., Маслова Т. Г., Полова Н. А. и др. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования, 121, Л., 1964.
18. Vernon L. P. *Analut. Chem.*, 32, 1144—1150, 1960.
19. Гиллер Ю. Е., Столбова А. В., Вахидова Л. Р. и др. *Биофизика*, 16, 1, 67—77, 1971.
20. Гиллер Ю. Е., Касьяненко А. Г., Вахидова Л. Р. и др. Фотосинтез и использование солнечной энергии, (под ред. Заленского О. В.), 247—254, Л., 1971.
21. Гиллер Ю. Е., Асоева Л. М. Биохимия и биофизика фотосинтеза, 52—58, Иркутск, 1971.

20. Гиллер Ю. Е., Асоева Л. М., Бободжанов В. А и др. Изв. АН Тадж. ССР. Отд. биол. наук, 1 (46), 3—10, 1972.
21. Гиллер Ю. Е., Асоева Л. М. Биофизика, 18, 2, 299—306, 1973.
22. Чундоев А. С., Липкин Б. И., Кайтко К. В., Гиллер Ю. Е. Биол. науки, 6, 38—43, 1978; 11, 45—51, 1979; 11, 35—41, 1981.
23. Литвин Ф. Ф., Гуллев Б. А., Корнеева М. В. Биол. науки, 4, 95—105, 1970.
24. Литвин Ф. Ф., Стадничук И. Н., Шубин В. В. Биол. науки, 9, 36—46, 1976.
25. Лодыгин В. Г., Костиков А. П. Физиол. растений, 25, 3, 500—509, 1978.
26. Власов О. Б., Корнеева И. В., Стадничук И. Н., Литвин Ф. Ф. Биохимия, 40, 5, 951—961, 1975.
27. Fritsch-Daniel A., Lang F., Fradkin I. I. Biochemistry of chloroplasts. (Goodwin T. W., ed.), London, New York: Acad. Press, 269—274, 1966.
28. Wittelstiel D., von, Heutingsen K. W., Kannagara J. E., Nielsen O. F. Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. (Boardman N. K., Linnane A. W., Smillie R. M., eds.) Amsterdam, 205—223, 1971.
29. Windje, Cederstrand C., Rabinowitch E. Science, 134, 3416, 391—392, 1961.
30. Аброськина Л. С., Воробьева Л. М., Кайтко К. В. Физиол. раст., 26, 1, 383—397, 1979.
31. Вершинин А. В., Шутилова Н. И. Генетика, 16, 4, 667—676, 1980.
32. Воробьева Л. М., Аброськина Л. С., Кайтко К. В., Красковский Л. А. Физиол. раст., 25, 1, 341—349, 1978.
33. Bennoit P., Jupin E. Biochim. et Biophys. Acta, 440, 1, 120—130, 1976.
34. Picaud A., Acker S. FEBS Letters, 54, 1, 13—17, 1975.
35. Powls R. Proc. of 2nd Int. Cong. on Photosynthesis Research. (Forti G., Avron M., Melandri A., eds.) The Hague: Dr. Junk W. Publishers., 3, 2611—2618, 1972.
36. Meister A. Exper. Techn. der Physik, 14, 3, 168—173, 1966.
37. Meister A. Die Kulturpflanze, 21, 295—311, 1973.
38. Аброськина Л. С. Автореф. канд. дисс., 20, М., 1980.
39. Miles C. D., Daniel D. J. Plant Physiol., 53, 4, 589—595, 1974.
40. Levine R. P. Annual Rev. of Plant Physiol., 20, 523—540, 1969.
41. Литвин Ф. Ф., Синещев В. А., Шубин В. В. Биофизика, 21, 4, 669—675, 1976.
42. Шубин В. В. Генетика, 2, 1, 9—30, 1966.
43. Тагеева С. В. Особенности организации функциональных структур растений в связи с процессами жизнедеятельности. 162, М., 1971.
44. Абдуллаев Х. А., Усманов П. Д., Тагеева С. В. Журн. общей биол., 40, 1, 43—49, 1979.
45. Кайтко К. В. Автореф. докт. дисс., 47, Л., 1979.
46. Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции, 297, М., 1977.
47. Насыров Ю. С., Гиллер Ю. Е., Усманов П. Д. Хлорофилл (Под ред. Шлика А. А.), 256—268, Минск, 1974.
48. Гиллер Ю. Е. Автореф. докт. дисс., 48, Минск, 1982.
49. Giller Yu. E. Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin. Math.—Nat. K. 33, 4, 293—295.
50. Гиллер Ю. Е., Асоева Л. М., Коляго В. М., Фрайкин Л. И. Докл. АН СССР, 287, 2, 502—506, 1986.
51. Дудник Н. В., Вахидов Л. Р., Гиллер Ю. Е. Докл. АН Тадж. ССР, 32, 1, 68—72, 1989.

Поступило 26.VI 1989 г.

## ОБЩИЙ КОНТРОЛЬ СТАБИЛЬНОСТИ ХРОМОСОМ И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА У САХАРОМИЦЕТОВ

Н. А. КОЛТОВАЯ, М. Е. СМИРНОВА\*, А. Б. ДЕВИН\*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна,

\*Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Անանձնացված են *sgm* միտոկոնդրիալ մուտացիաները, որոնք իջնում են շաքարանկալի բիոսինթեզի միտոսոմիոզի  $\text{rho}^-$ -մուտացիոնիտետը Այդ մուտացիաներից մեկը՝ *sgm5*-ը տեղայնացված է *CDC28* բջջային ցիկլի ստարտի գենում կոդավորող պրոտեինիկոդան:

Nuclear mutations *sgm*, lowering the mitochondrial  $\text{rho}^-$  mutability of yeast cells have been distinguished. One of these mutations *sgm5* is localized in the start gene of cellular cycle *CDC28*, coding protein kinase.

Механизмы клеточного цикла обеспечивают точное воспроизведение и передачу наследственного аппарата вновь образующимся клеткам. Выделяя и изучая мутации, снижающие генетическую стабильность клеток, можно надеяться идентифицировать новые гены цикла клеточного деления или лучше понять действие уже известных генов этого типа.

Нами выделены ядерные мутации *sgm*, снижающие митохондриальную  $\text{rho}^-$ -мутабильность дрожжевых клеток [2]. Одна из этих мутаций *sgm5*, локализована в гене старта клеточного цикла *CDC28* [1], кодирующем протеинкиназу [3, 4].

Результаты измерения темпа спонтанных мутаций  $\text{rho}^-$  у группы моноспорных клонов с различными генотипами представлены в табл. 1. Для исходного клона этот темп составляет около 10%, у клонов *sgm2*, 4, 5 темп на порядок ниже, мутация в гене *sgm1* снижает темп в 60 раз.

Таблица 1. Темп спонтанных мутаций  $\text{rho}^-$  у линий с различным генотипом

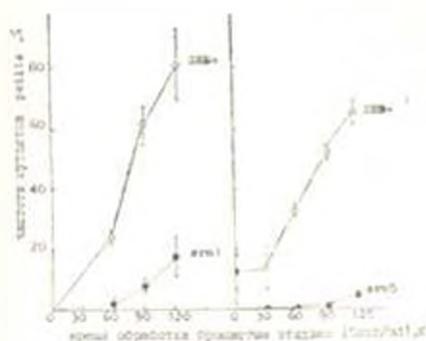
Генотип	Средний темп спонтанных мутаций $\text{rho}^-$ , %
SRN: II	11,3
<i>sgm1</i>	0,2
<i>sgm2</i>	2,4
<i>sgm3</i> , <i>sgm5</i>	1,0
<i>sgm1</i> , <i>sgm5</i>	1,01
дисомки (IV и XIV)	2,3

Две из этих мутаций, а именно *sgm1* и *sgm5*, влияют также на чувствительность клеток к индукции мутаций  $\text{rho}^-$ -мутаций под действием бромистого этидия. Чувствительность к индукции  $\text{rho}^-$ -мутаций определяли у моноспорных клонов из двух тетрад, полученных от гетерозигот.

Сокращения: БЭ—бромистый этидий.

готного диплоида. Данные усредняли для клонов одного генотипа. Мутации *sgm1* и *sgm5* существенно снижают чувствительность клеток к мутагенному действию БЭ и в этом отношении отличаются от *sgm2*, *sgm3* и *sgm4*.

Обнаружено, что помимо мутаций *sgm* на стабильность митохондриального генома влияют нарушения баланса хромосом. Дисомии по не-



Зависимость выхода мутаций *gho-* от времени обработки БЭ.

которым хромосомам, в частности IV, VII и XIV, отличаются от изогенных им гаплоидов сниженной (приблизительно в 5 раз) спонтанной митохондриальной *gho-*мутабильностью.

Вместе с тем мутации *sgm1* и *sgm5* вызывают существенное (до 2 порядков величины) повышение темпа спонтанной утраты парных хромосом IV и XIV у дисомиков (табл. 2).

Таблица 2. Митотическая стабильность парных хромосом у дисомиков

Генотип	Темп спонтанной утраты хромосом, %		
	IV	XIV	VII
SRM-	0.07±0.03	0.26±0.07	0.00±2
<i>sgm1</i>	9.7±3.2	5.61±3.43	<0.01
<i>sgm5</i>	1.75±1.19	—	0.43±0.15

Таким образом, обнаружены скоординированные изменения митотической стабильности хромосом и митохондриального генома. Заметим, что по существующим представлениям в основе *gho-*мутационеза лежат фрагментация митохондриального генома и амплификация образовавшихся фрагментов (мт плазмид). Падение *gho-*мутабильности может быть обусловлено снижением митотической стабильности мт плазмид.

Из табл. 2 видно, что мутация *sgm1* оказывает заметное влияние на митотическую стабильность хромосом IV и XIV, но не VII хромосомы. По-видимому, продукт гена *SRM1* взаимодействует со структурами или компонентами, имеющимися в мт геноме и хромосомах IV и XIV, но не в VII хромосоме. Перспективными моделями для изучения вза-

имодействия генов SRM с генетическими структурами являются рекомбинантные плазмиды

Как в хромосомной, так и в митохондриальной ДНК обнаружены ARS-последовательности [5]. Если митотическая стабильность природных генетических структур зависит от взаимодействия гениных продуктов SRM с ARS-последовательностями, то можно ожидать, что соответствующие мутации *sgm* скажутся и на митотической стабильности ARS-содержащих рекомбинантных плазмид. Действительно, мутация *sgm5* умеренно, но вполне заметно увеличивает темп потери центромерных плазмид, несущих ARS1 из IV хромосомы (табл. 3)

Таблица 3. Стабильность кольцевых мини-хромосом

Плазмида	Генотип клеток, несущих плазмиду			
	<i>sgm1</i> + <i>sgm5</i>	<i>sgm1</i> <i>sgm1</i>	<i>sgm5</i> <i>sgm5</i>	
YCr19 (CEN IV)	0.73±0.10	0.88±0.02	0.23±0.09	
pYe (CEN II) 10	0.67±0.06	0.82±0.03	0.36±0.07	

Использованные кольцевые мини-хромосомы [6, 7] содержат элемент ARS1 и ген TRP1, а также центромерные последовательности *S. cerevisiae*, наименования которых указаны в скобках. Гаплоидные трансформанты генотипа *sgm1*, *sgm5*, несущие в отдельности данные плазмиды, были любезно предоставлены В. Т. Пешехоновым и О. В. Чепурной (ЛИЯФ). Трансформанты скрещивали с родственными им гаплоидными линиями генотипов SRM<sup>-</sup>, *sgm1* и *sgm5*. У полученных трех групп диплоидов определяли митотическую стабильность плазмид, мерой которой служила доля клеток Trp<sup>+</sup> в двухсуточных клонах, выращенных в неселективных условиях. Величина тестируемой выборки для каждого генотипа составляла 150—180 клеток.

По предварительным данным мутация *sgm5* снижает митотическую стабильность не только кольцевых центромерных плазмид, но и плазмид, не содержащих центромеры. В отличие от мутации *sgm5*, мутация *sgm1* приводит к некоторому повышению стабильности плазмид.

Можно предположить, что в обеспечении митотической стабильности природных хромосом, mt плазмид *rho*<sup>-</sup> и рекомбинантных молекул у дрожжей заметную роль играют взаимодействия определенных фосфорилируемых белков с последовательностями ARS. Эти взаимодействия могут быть существенны, например, для инициации репликации ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова М. Е., Колтуная Н. А., Арман И. П., Делин А. Б. Докл. АН СССР, 301, 2, 461, 1988
2. Devin A. B., Koltovaaya A. A. Mutation Res., 91, 6, 451, 1981.
3. Lohmeier A. T., Reed S. J. Nature, 307, 183, 1984

4. Reed S. I., Hadwiger J. A. and Lörincz A. T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v2, 4055, 1985.

5. Homan B. C., Cramer J. M., Rownd R. H. Gene, 26, 2, 223, 1983.

6. Stinchcomb D., Mann C. and Davis R. W. J. Mol. Biol., 158, 157, 1982.

7. Fitzgerald-Hayes M., Buhler J. M., Cooper T. G. and Gordon J. Mol. Cell Biol., 2, 82, 1982.

Получено 26.VI 1989 г.

Биодор. ж. Армения, № 9—10. (42). 1989

УДК 575.224.582.282.23

## ДРОЖЖИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕНОВ

Ю. И. ПАВЛОВ, О. В. ТАРУНИНА

Ленинградский государственный университет, кафедра генетики и селекции

Երևանում արված է մամանտիակից մոտեցումների անալիզ՝ մուտացիաների մակնայլար սպեցիֆիկության ուսումնասիրման համար խմորանկների բջիչների պտտորթմամբ, ինչպես նաև բերված են սեփական փորձերի տվյալները ըստ խմորանկի LYS2 գենում մուտացիաների անալիզի:

Analysis of modern approaches for the study of mutagenesis molecular specificity by yeasts use is given in the article, as well as data of own experiments according to mutations analysis in LYS2 gene of the yeasts are stated.

Одним из наиболее плодотворных современных подходов в исследовании механизмов мутагенеза является молекулярно-генетический анализ мутаций методами геной инженерии. Знание типов и распределения изменений нуклеотидных последовательностей позволяет выяснить механизм действия мутагенов, прогнозировать степень их генетической опасности, сферу их применения в качестве инструментов генетического анализа.

Сахаромицеты позволяют анализировать природу мутаций на генно-инженерном уровне. Эти низшие эукариотические микроорганизмы обладают ядром с хромосомами, напоминающими хромосомы высших эукариот, являются популярным объектом для анализа мутагенеза у эукариот [16]. Дрожжи, прекрасно изученные генетически и биохимически [2], являются одним из наиболее разработанных генно-инженерных объектов [23]. В отношении дрожжей-сахаромицетов разработаны методы не только отбора мутантов в определенных генах, но и их тонкого внутригенного картирования и анализа нуклеотидных последовательностей мутантных аллелей, что позволяет прямо изучать молекулярную специфичность мутагенов [10,17]

Принадлежность дрожжей к эукариотам позволяет соотносить данные, полученные на них с результатами работ по высшим эукариотам.

### Молекулярная специфичность мутагенеза—общие принципы анализа

Для успеха при анализе специфичности мутагенеза важен удачный выбор гена, в котором изучают мутации. Долгое время, в эпоху «до

Сокращения: ЭМС—этилметансульфонат; ГАП—гидроксиламинопуриин.

сиквенирования: практически единственным таким геном был ген *SYS1*, так как в этой системе были разработаны и селективные методы получения мутантов, и методы анализа их по изучению последовательности довольно короткого белка — продукта гена [16, 21]. Увеличение числа генов, в которых можно изучить природу мутаций, помогли современные методы сиквенирования ДНК. Основные требования к современным системам анализа генов специфичности следующие:

- легкость отбора мутантов (наиболее удобны селективные методы отбора, например в гене *URA3* или *LYS2*) [7, 8];
- наличие плазмид с клонированным геном;
- знание нуклеотидной последовательности гена;
- возможность перевода мутантных аллелей в форму, в которой можно определять их нуклеотидную последовательность.

Последнее требование определяет успех всей работы, поэтому мы считаем необходимым рассмотреть этот этап подробнее. Принципы методов, разработанных на дрожжах, могут быть применены и к другим объектам.

#### *Методы клонирования и сиквенирования аллелей генов дрожжей.*

Невысокая сложность генома дрожжей позволяет исследовать нуклеотидные последовательности небольших генов, например, генов т-РНК, прямо на хромосомной ДНК, при использовании меченых олигонуклеотидных праймеров [14]. Этот метод не нашел пока широкого применения на дрожжах из-за плохой воспроизводимости и того, что он применим не для всех генов. У высших эукариот для прямого анализа генов с успехом применяют технику энзиматической амплификации заданных участков ДНК цепными реакциями ДНК-полимеразы [22]. В отношении дрожжей пока неясно, что проще: подобный подход или использование методов клонирования мутаций в бактериальные векторы, о которых речь пойдет ниже.

#### *Переклонирование мутантных аллелей с хромосомы на бактериальный вектор.*

Легче всего определить нуклеотидную последовательность ДНК в составе специальных векторов — однонитчатых или двунитчатых [9, 18]. У дрожжей разработаны быстрые методы клонирования хромосомных аллелей в такие векторы.

Наиболее прямолинейный подход — прямое клонирование, т. е. создание мини-библиотеки генома из фрагментов ДНК генома заданного размера на бактериальном векторе. В результате лишь малая доля рекомбинантных векторов несет нужный фрагмент. Эти единственные плазмиды находят, исключая поиск гомологичной последовательности *in vitro* меченым фрагментом ДНК того гена, аллель которого надо выделить. Так изучали мутации в супрессорном гене т-РНК, индуцированные ICR-170 [12]. При отлаженной технике клонирования этот путь наиболее быстрый, так как не требует предварительного конструирования специальных штаммов. Но его вряд ли можно рекомендовать во всех случаях, так как он требует очень хороших ферментов и реактивов и ювелирной техники молекулярного клонирования.

Более остроумным является метод «выселения» мутантной последовательности, в котором для ее поиска в геноме также используют гомологичный ген дикого типа, но в условиях *in vivo*, при этом вектор оказывается связанным с нужной последовательностью в результате гомологичной рекомбинации [25] (рис. 1). Ген дикого типа на плазмиде становится «проводником» вектора к мутантной аллели. Теперь подобранные рестриктазы будут вырезать из геномной ДНК штамма мутан-

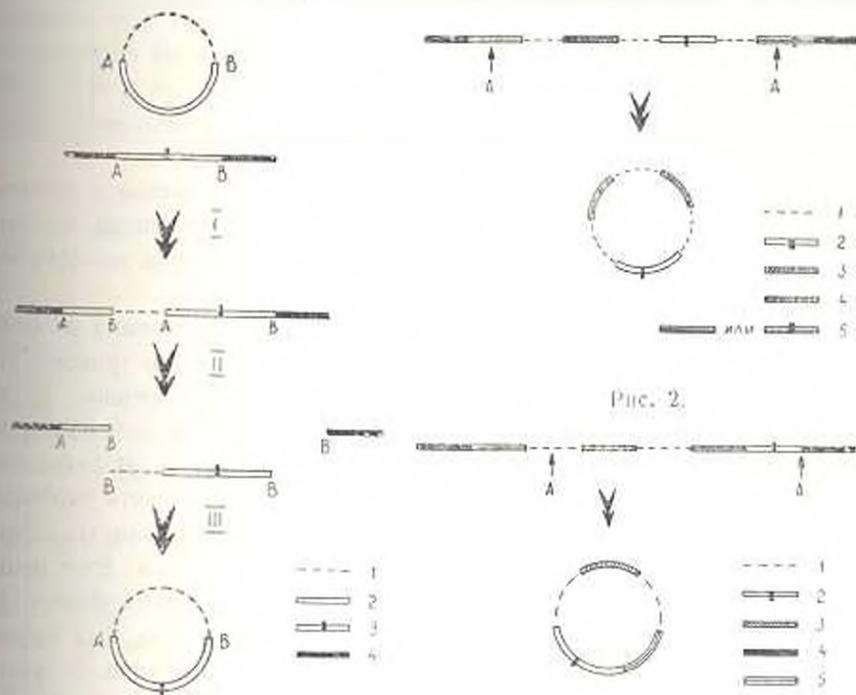


Рис. 1.

Рис. 2.

Рис. 1. «Выселение» мутантной последовательности из хромосомы на интегративную плазмиду. А, В—сайты узнавания рестриктаз. I—интеграция плазмиды в хромосому при трансформации, II—разрезание хромосомной ДНК интегранта рестриктазой «В», III—лигирование. 1—последовательность бактериального вектора, 2—изучаемый ген, аллель дикого типа, 3—этот же ген, мутантная аллель, 4—прочая хромосомная ДНК дрожжей. Рис. 2. Структура интегранта трехмаркерной плазмидой и «выселение» мутантного гена. «А»—сайты узнавания рестриктаз. 1, 4—см. подпись к рис. 1, 2—мутантная аллель изучаемого гена, 3—аллели гена, по которому проводили интеграцию.

Рис. 3. Структура интегранта при интеграции по гомологии с фрагментом ДНК, прилегающим к изучаемому гену, и результат «выселения». «А», 1, 4—см. подпись к рис. 1, 2—изучаемая мутантная аллель, 3—дрожжевой селективный маркер, 5—участок дрожжевой ДНК, прилегающий к исследуемому гену.

тную аллель вместе с вектором и закольцованные лигазой фрагменты с вектором смогут трансформировать бактерии. Недостатком этого метода является необходимость для каждой новой мутации проводить трансформацию дрожжей и генетически и биохимически охарактеризовывать трансформант. Кроме того, в зависимости от места «кроссовера» при интеграции тип рестриктазы, вырезающей нужную плазмиду, будет разным.

Развитием этой идеи является получение штаммов, у которых вторичная плаزمиды постоянно интегрирована в геном и ассоциирована с последовательностью изучаемого гена. У таких штаммов получают мутации и сразу же проводят серию «выселения».

В одном из вариантов этой техники исследуемый ген вводят в штамм с делением исходной копии гена в составе интегративной трехмаркерной плазмиды по гомологии с каким-нибудь дрожжевым маркером плазмиды [17] (рис. 2). Третий маркер служит для генетического контроля структуры интегратов. С помощью такой системы был исследован УФ-индуцированный и спонтанный мутагенез в гене *URA1* [17]. Недостатком является необычное положение исследуемого гена в геноме.

В другом варианте специальные вектора вводят рядом с резидентным геном по гомологии с фрагментом ДНК, примыкающим к этому гену [12] (рис. 3). Это наиболее удачное решение, так как ген остается на своем «законном» месте.

Принципиально иная идея клонирования также основана на феномене гомологичной рекомбинации — геной конверсии. При трансформации дрожжей репликативной плазмидой с двушнтовой брешью происходит застройка этой брешли с использованием в качестве донора информации хромосомной гомологичной аллели [19] (рис. 4). В результате автономно реплицирующаяся плазмиды *in vivo* «клонировать» необходимый фрагмент и может быть легко извлечена из дрожжей при трансформации препаратом их тотальной ДНК кишечной палочки. Этот метод позволяет клонировать и точковые и структурные мутации, вплоть до инсерции транспозона [6]. Для того, чтобы этот метод был эффективным, необходимы плазмиды с делением тех рестрикционных фрагментов, которые предполагается клонировать. Привлекательность этого метода в минимуме биохимических манипуляций.

#### *Мутагенез на плазмидных генах.*

Всех этапов клонирования, приведенных в предыдущем разделе можно избежать, изучая мутации в гене, находящемся на плазмиде. На такой системе изучены спонтанные и УФ-индуцированные мутации в гене одной из т-РНК дрожжей [15,20].

По данным этих авторов, до крайней мере спонтанные мутации в плазмидной системе получаются такие же, как и на хромосоме. В то же время есть данные о том, что индуцированный мутагенез в генах на плаزمидах может существенно отличаться от мутагенеза на хромосоме [1].

#### *Особенности мутагенеза у дрожжей.*

С помощью методов, описанных выше, у дрожжей изучены спонтанные и индуцированные ICR—170 и УФ-светом мутации. Оказалось, что ICR—170 индуцирует в основном вставки пар оснований в мосты монотонных повторов и тех участков ДНК, которые могут образовывать «шпильки» за счет несовершенных повторов [10, 12]. Это показывает важность вторичной структуры ДНК, определяемой, в свою оче-

вид. первичной структурой, в детерминации специфичности и интенсивности мутационного процесса у эукариот.

Мутации при действии УФ-света у дрожжей происходят в основном в тех сайтах, где возникают циклобутановые димеры и 6—4 фотопродукты, что показано также для бактерий и клеток человека [13].

Типы возникающих мутаций позволяют проследить и схожесть и особенности механизма мутагенеза у дрожжей и у бактерий [17]. К сожалению, некоторые гены одного организма по типам мутаций могут отличаться сильнее, чем гены двух разных организмов, что затрудняет интерпретацию результатов. Мы попытались связать распределение

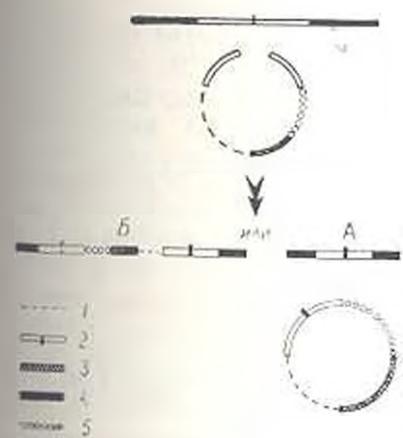


Рис. 4.

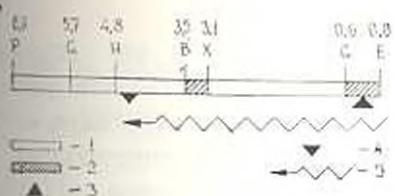


Рис. 5.

Рис. 4. Конверсия хромосомной аллели на плазмиду. «А»—конверсия на плазмиду, «Б»—интеграция плазмиды (нежелательный для данного метода исход). 1, 2, 4, см. подпись к рис. 3. 3—селективный дрожжевой маркер плазмиды, 5—репликатор плазмиды.

Рис. 5. Физическая карта гена *LYS2*. Обозначения рестриктаз: E—EcoRI, G—BglII, X—XhoI, B—BamHI, H—HindIII, P—PstI. Цифры над рестриктазами—координаты расстояний в тыс. нукл. пар. 1—ген *LYS2*, 2—сильноиницированные районы гена, 3—точка начала трансляции гена, 4—точка терминации трансляции, 5—транскрипт гена.

Рис. 6. Плазмиды, применяемые для изучения мутаций по гену *LYS2*. Обозначения рестриктаз такие же, как и на рис. 5. 1—ген *LYS2*, 2—ген *LEU2*, 3—ген *ADE2*, 4—фрагмент двухмикроспиральной плазмиды дрожжей, 5—последовательность бактериального вектора, обуславливающая устойчивость к тетрациклину, 6—то же, но к ампициллину.

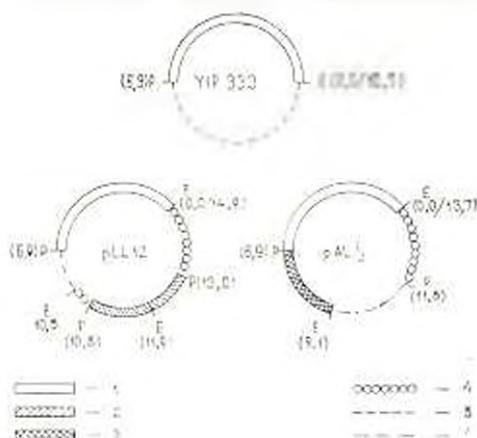


Рис. 6.

мутаций в гене *LIRAZ* с особенностями его хроматина, так как известна «фазировка» нуклеосом в этом гене [24]. Оказалось, что частота возникновения мутаций в линкерных и нуклеосомных реакциях неодинакова ( $P > 0,05$ ). Так что по крайней мере при данной выборке мутантов, полученных в работе [17], не удастся связать специфику мутагенеза у высших эукариот с нуклеосомами.

## Нуклеотидные последовательности мутаций в гене

Объект, мутаген (ме- год клони- рования)	Синкви- русский уча- сток	Исходные и мутантные нуклеотидные последовательности
дрожжи, ГАП (1)	ген <i>LYS 2</i> , район E-G	ACA TAT TCG TTA CAG — — > ACA TAT TAG TTA CAG Thr Tyr Ser Leu Gln — — > Thr Tyr .3. Leu Gln
дрожжи, ГАП (2)	ген <i>LYS 2</i> , район E-G	AGT GTA TGG GGT GCA — — > AGT GTA TGA GGT GCA Ser Val Trp Ala Ala — — > Ser Val .2. Ala Ala
дрожжи, ЭМС (3)	ген <i>LYS 2</i> , район X-B	GTT ACC GGT GCT ACA — — > GTT ACC GAT GTC ACA Val Thr Gly Ala Thr — — > Val Thr Asp Ala Thr
дрожжи, ЭМС (3)	ген <i>LYS 2</i> , район X-B	GTC ACA GGA TTT CTG — — > GTC ACA GAA TTT CTG Val Thr Gly Phe Leu — — > Val Thr Glu Phe Leu
дрожжи, ЭМС (3)	ген <i>LYS 2</i> , район X-B	GTT CAC TGG GTT TAT — — > GTT CAC TAG GTT TAT Val His Thr Val Tyr — — > Val His .3. Val Tyr
<i>E. coli</i> (3)	ген <i>lacZ</i>	GTT AAC CAA CTT AAT — — > GTT ACC TAA CTT AA Val Thr Glu Leu Asn — — > Val Thr .1. Leu Asn
<i>E. coli</i> (3)		CGC CCT TCC CAA CAG — — > CGC CCT TTC CAA CAG Arg Pro Ser Gln Gln — — > Arg Pro Phe Gln Gln

Применение: 1; 2; и 3. обозначают nonsense кодоны «окр», «ония» и «самбер» соответственно. Методы клонирования: 1—репарация бреши, 2—«выселение», 3—получение мутантов на плазмидном гене.

### Изучение мутаций в гене *LYS 2*.

Мы разработали систему для анализа мутаций в гене дрожжей *LYS 2* [4, 5] (рис. 5). Для клонирования мутаций мы применяли (рис. 6) и метод «выселения» (при использовании плазмиды YIP333, и метод конверсии на репликативную плазмиду pL12, и получение мутаций в плазмидном гене (плаزمиды pAL11). Результаты анализа мутантов, индуцированных ЭМС и ГАП, приведены в таблице. Для сравнения мы привели последовательности двух мутаций, индуцированных ГАП у кишечной палочки в гене *lacZ*. Существенным, на наш взгляд, является то, что трансзионы при действии этих мутагенов (относимых к мутагенам «репликативного» типа) возникают в тех сайтах, где есть повторы 2—3 GC-пар. Эти сугубо предварительные данные все же позволяют кофактизировать. По-видимому, ДНК-полимеразы испытывают «неудобства» при копировании таких повторов и ошибаются. Репликативному мутагенезу в этом случае и эволюции отводится роль разрушителя монотонных повторов. Если коррекция гетеродуплексов при взаимодействии несовершенных повторов восстанавливает повторы [3], то можно полагать, что репликативный мутагенез и рекомбинационно-репарационный мутагенез являются антагонистами.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева Я. М., Касинова Г. В., Королев В. Г. и др. Генетика, 24, 1178, 1988.
2. Инге-Вечтомов С. Г. Итоги науки и техники. Серия «Общие проблемы биологии», 1, 148, 1982.
3. Колчанов Н. А. Докт. дисс., 542, Новосибирск, 1988.
4. Павлов Ю. И., Носков В. Н., Тюлякова Т. С. и др. В сб.: Чувствительность организмов к мутагенным факторам и возникновение мутаций. 5б, Вильнюс, 1986.

5. Тарутина М. Г., Янушка А. П., Павлов Ю. И. В сб.: Использование биосферных и модельных объектов для генетического мониторинга загрязнителей окружающей среды. 103. Ереван, 1987.
6. Чернов Ю. О., Горденин Д. А. Генетика, 23, 30, 1987.
7. Boeki J. M., LaCroute F., Fink G. R. Mol. Gen. Genet., 197, 345, 1981.
8. Chatoov B. V., Sherman F., Azubalis D. et al. Genetres, 93, 51, 1979.
9. Chen E. Y., Seeburg P. H. DNA, 4, 165, 1985.
10. Ernst J. F., Hampsey D. M., Sherman F. Genetics, 111, 231, 1985a.
11. Ernst J. F., Hampsey D. M., Stewart J. W. et al. J. Biol. Chem., 260, 13225, 1985b.
12. Hampsey D. M., Hosht R. A., Sherman F. Mol. Cell. Biol., 6, 4425, 1986.
13. Hsia M. C., Lebkowski V. S., Leong P. et al. J. Mol. Biol., 205, 103, 1989.
14. Hulbregtse J., Engelke D. R. Gene. 14, 151, 1986.
15. Kunz B. A., Pierce M. K., Mis J. R. et al. Mutagenesis, 2, 445, 1987.
16. Lawrence C. W. Adv. Genet., 21, 173, 1982.
17. Lee G.-S., Savage E. A., Ritzel R. G. et al. Mol. Gen. Genet., 214, 396, 1988.
18. Messing J. Meth. Enzymol., 101, 26, 1983.
19. Orr-Weaver T. L., Szostak J. W. Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4117, 1984.
20. Pierce M. K., Gilman C. V., Kunz B. A. Mutation Res., 182, 65, 1987.
21. Prakash L., Sherman F. J. Mol. Biol., 79, 65, 1973.
22. Salk R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Science., 39, 487, 1988.
23. Struhl K. Nature, 305, 391, 1983.
24. Thomas F. J. Mol. Biol., 199, 177, 1986.
25. Winston F., Forrest C., Fink G. R. Met. Enzymol., 101, 111, 1983.

Поступило 31.V 1989 г.

## АНТРОПОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТОМКОВ ВЫХОДЦЕВ С ТЕРРИТОРИИ ИСТОРИЧЕСКОЙ АРМЕНИИ. БАЯЗЕТ (ЖИТЕЛИ с. НОРАДУЗ РАЙОНА им. КАМО)

Р. М. АРУТЮНЯН, Г. С. ШИРИНЯН, К. Ю. МАРТИРОСЯН,  
Н. Р. КОЧАР, А. А. КАЗАРЯН

Ереванский государственный университет,  
Институт археологии и этнографии АН АрхССР, Ереван

Վատական Հայաստանի՝ Բայազետի շրջանից Արևելյան Հայաստան տեղափոխված և ՀայկեՍՍՀ-ի կամոյի շրջանի նորադուզ գյուղում բնակվող զարթածների ժառանգորդների որոշ անտրոպոգենետիկական ցուցանիշների սաստմանսիրությունը ցույց է տվել, որ սերնդի ժամանակաշրջանի սեռոպոթիզներ հավասար է մտափոխակա 21 տարեկանի, օպորոգուկտիվ շրջանի սոցիալապես պայմանավորված սահմանները միջինում կազմել են 21,10—38,02 տարեկան, ուպորոգուկտիվ շրջանը՝ 20,6 տարեկան, ֆենիթիփիզայնոյի Նկատմամբ զգայունության զեհատականը եղել է ցածր: Գերմասոգիփիզական հատկանիշների հաճախականության անուղիք ցույց է տվել, որ դրանք պտնվում են հայկական պոպուլյացիայի դերմասոգիփիզական հատկանիշների փոփոխականության սահմաններում: Ուսումնասիրված խումբն օժտված է անոպալոթուսիական հատկանիշների կոպլեքսի մաքրմամբ արտահայտված զծրոպի:

The study of some anthropogenetic characters of a group of persons, that live now in the village of Noraduz of the Kamo region of the Armenian SSR and whose great parents had arrived from the region of historical Armenia—Bayazet (territory of modern Turkey), is presented. It is shown

that the generation period is equal to 21 years, the socially conditioned frames of reproductive period are equal to 21.10—19.02 years, the reproductive period to 20.6 years.

The low hypersensitivity to phenylthiourea is revealed. The comparative analysis of the frequency of dermatoglyphic characters show that they are in the limits of variation for Armenian population and are highly similar to the Forward Asian complex of those characters.

Основной целью наших исследований является изучение антропологических различий, формировавшихся на протяжении веков древней популяции армянского этноса. Данная работа является продолжением исследований, касающихся потомков выходцев из других регионов исторической Армении: Сасуна [1] и Алашкерты [4].

*Материал и методика.* Материал собран в июле 1988 г. сотрудниками проблемной лаборатории цитогенетики Ереванского государственного университета в районе им. Камо АрмССР. Исследован 91 потомок выходцев из Баязета, переселившихся из Исторической Армении (современная Турция) в 1829—30 гг. и основавших на месте поселения Гавар город Нор Баязет (Камо). Методика популяционного исследования описана нами ранее [1, 3].

*Результаты и обсуждение.* Средний возраст вступления в брак для мужчин составил 23,25 лет, для женщин—18,48 лет. Социально обусловленные границы репродуктивного периода находились в пределах 24—40 лет для мужчин и 19—35 лет для женщин. Репродуктивный период в среднем составил 16 лет.

Временная протяженность поколения приблизительно соответствует среднему возрасту родителей при появлении первого ребенка (для семей, закончивших репродукцию) [2]. В настоящей выборке протяженность поколения равна приблизительно 21 году. Число погибших детей пробандов, не достигших репродуктивного возраста, в среднем составило 14,75%. Интервалы между последовательными деторождениями для потомков пробандов, доживших до половозрелого возраста, в пределах 3,0—3,9 лет. Нам были определены средние размеры семей в четырех поколениях баязетской популяции. Согласно произведенному опросу, в первом (условно) поколении (дедушка и бабушка пробанда) среднее число детей в семьях составляло 6,80, во втором (отец, мать пробанда)—4,85, в третьем (пробанд)—6,11, в четвертом (дети пробанда)—4,50. Данные по I и II поколениям, возможно, являются несколько приближенными.

Анализ пороговой чувствительности к фенилтиомочевине показал, что большинство индивидов чувствительны к трем пороговым значениям—2, 5, 6 [5]. Как и в предшествующих исследованиях [1, 4], гиперчувствительность к фенилтиомочевине не обнаружена.

Антропоморфические признаки имели следующие частоты: скрещивание рук на груди—I (40,66%), II (59,34%); переплетение пальцев—I (28,58%), II (71,42%); ведущая рука—I (12,08%), II (87,92%).

Изучение вредных привычек показало, что доля курящих среди мужчин составляет 43,18%, а употребляющих спиртное—79,54%.

Частоты дерматоглифических признаков представлены в табл. 1—4. Размах вариаций по всем дактилоскопическим признакам не выходит за пределы такового для тотальной армянской популяции.

Распределение главных ладонных линий носит следующий характер: линия D чаще всего оканчивается в полях 11 и 9, линия A—в полях 3, 4, 5, линия C—чаще в полях 9, 7 и 6, а линия B—и полях 5, 6, 7. Полные различия по этому признаку в группе незначительны (табл. 1, 2).

Таблица 1. Частота окончаний главных ладонных линий у 41 мужчин—потомков выходцев из Баязета, %

Пол	Л а д о н ь											
	А		В		С		D					
	левая	правая	обе	левая	правая	обе	левая	правая	обе	левая	правая	обе
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	5.26	5.56	5.41	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	23.68	25.00	24.34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	71.06	30.11	53.54	8.57	2.63	5.60	—	—	—	—	—	—
5	—	30.56	15.28	28.57	7.89	18.23	8.35	—	4.17	—	—	—
6	—	2.77	1.38	40.00	28.95	34.48	5.71	5.41	5.56	—	—	—
7	—	—	—	14.29	15.79	15.04	13.88	18.91	16.39	—	—	—
8	—	—	—	8.57	34.22	21.40	18.90	10.81	14.86	11.21	8.62	9.92
9	—	—	—	—	5.26	2.63	—	5.41	2.70	13.88	18.91	16.40
10	—	—	—	—	—	—	—	22.86	37.83	30.34	41.87	13.51
11	—	—	—	—	—	—	—	—	5.41	2.71	16.77	16.22
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.21	42.74
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.98
X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	13.16	10.81	11.99	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	17.14	5.41	11.28	5.56	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.78

Таблица 2. Частота окончаний главных ладонных линий у 44 женщин—потомков выходцев из Баязета, %

Пол	Л а д о н ь											
	А		В		С		D					
	левая	правая	обе	левая	правая	обе	левая	правая	обе	левая	правая	обе
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	3.13	5.27	4.20	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	31.25	21.06	26.16	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	50.00	36.84	43.42	—	5.72	3.86	—	—	—	—	—	—
5	16.62	28.94	22.73	20.54	31.46	26.02	—	—	—	—	—	—
6	—	7.89	3.95	24.47	17.14	20.81	6.33	2.85	4.59	—	—	—
7	—	—	—	17.64	40.00	28.82	8.82	22.85	15.84	—	—	—
8	—	—	—	35.29	2.85	19.07	21.21	11.43	16.32	2.94	5.72	4.33
9	—	—	—	—	—	—	3.03	2.85	2.94	8.82	22.85	15.84
10	—	—	—	—	—	—	27.27	31.15	32.21	41.18	11.43	26.31
11	—	—	—	—	—	—	—	5.72	2.86	17.66	17.14	17.40
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.46	42.86	34.66
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	18.18	11.43	15.39	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	2.86	15.16	5.72	10.44	2.94
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.47

Направление линии D к полю 11 чаще наблюдается на правых ладонях, а к полю 9—на левых. Индекс Камминса на правых руках у мужчин равен 8,88, а на левых—7,86. У женщин эти показатели состав-

дуют 8,51 и 8,59 соответственно. В мужской группе индекс Камминса по сравнению с женской несколько ниже (табл. 3).

Изучение встречаемости истинных ладонных узоров показало, что частота узора на гипотенаре у мужчин равна 15%, у женщин—46,6%. На  $ThI$  встречаемость узора значительно ниже: у женщин—6,08%, у мужчин—1,25%. Узор на III и IV ингердигитальной подушечке чаще встречается у женщин (33,21 и 27,63%). На II межпальцевой подушечке он отмечается у 6,08% женщин, у мужчин узорности отсутствуют (табл. 3).

В отношении встречаемости осевых трирадиусов следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев (61,70%) в армянской популяции встречается один осевой трирадиус, расположенный у основания (I). Реже (15,47%)—промежуточный осевой трирадиус (I'). Центральный трирадиус (I'') в сочетании с двумя (II'' и I'II'') и тремя трирадиусами (II'II'') встречается крайне редко. Половые различия при этом очень незначительны [3].

В исследуемой группе частота карнального осевого трирадиуса (I) у мужчин составляет 65,90%, у женщин—62,28%, причем на правых руках она выше, чем на левых. Частота промежуточного осевого трирадиуса (I') у мужчин—15,68%, у женщин—16%. Центральный трирадиус (I'') в мужской группе практически отсутствует, у женщин он составляет 4,33%. Сочетание II', II'', I'II'', II'II'' для мужчин и женщин соответственно равно: 3,955; 13,155; 2,630%, и 8,70; 4,33; 4,38%. Как видно из приведенных данных, имеются некоторые половые различия в частоте встречаемости II''. Так, у мужчин она выше ( $\approx 9\%$ ), чем у женщин (табл. 4).

Анализ пальцевых узоров указывает на существование половых различий в распределении их типов.

У женщин чаще, чем у мужчин, встречаются дуги и ульнарные петли, в то время как у мужчин, по сравнению с женщинами, выше частота завитков. Групповые различия в дерматоглифике более четко прослеживаются по пальцевым узорам и значению дельтового индекса ( $DI_{10}$ ). В нашей группе величина  $DI_{10}$  составляет в среднем 14,00%. У мужчин она достигает 14,87%, а у женщин—13,8%. Представленные в табл. 3 индексы пальцевых узоров имеют различия той же направленности, что и частоты пальцевых узоров, ибо в них участвуют основные узорные типы пальцев.

Для качественного сопоставления групповых сходств и различий в этнической антропологии существует так называемый метод полигонов, предложенный в 1947 г. Г. Ф. Дебецом. Этот метод не претендует на точную количественную оценку сходства или различия строения сравниваемых популяций, но дает возможность в удобной, простой и наглядной форме выявить сходство или различие [6].

В предыдущих публикациях [1, 4] нами были представлены полигоны групп выходцев из Сасуна и Алашкерта. Было показано их генетическое сходство с популяциями Восточной Армении. В данном случае сравнительный визуальный анализ показал большое сходство «бязетского» полигона с «обобщенным армянским», что указывает на генети-

Таблица 3. Частота пальцевых узоров, их индексов, ладонные узоры у потомков— выходцев из Баязета, %

Признак		A	K	U	R+U	W	D <sub>1,0</sub>	$\frac{A}{W} \times 100$	$\frac{W}{R+U} \times 100$	$\frac{A}{I+U} \times 100$	Инд. Камм	Hу	Th:1	II	III	IV
Муж- чины	Левая	2.07	2.65	43.97	46.62	53.81	14.52	4.63	110	4.4	7.85	15	0	0	12.5	15
	Правая	0.51	1.54	45.15	46.69	52.80	15.22	0.97	113.03	1.09	8.88	15	0.5	0	22.5	12.5
	Средняя	1.29	2.095	44.56	46.655	52.659	14.87	2.5	111.54	2.745	8.37	15	1.25	0	17.5	13.75
Жен- щины	Левая	7.19	2.05	5.395	56	36.05	12.810	19.94	64.37	12.83	8.59	44.73	9.52	—	28.94	28.14
	Правая	5.79	1.52	52.49	54.01	40.02	13.441	14.30	71.47	10.72	8.51	47.36	2.63	5.26	39.47	26.31
	Средняя	6.49	1.79	53.22	55	38.13	13.13	17.17	69.4	11.79	8.55	46.06	6.08	2.63	34.21	27.13

Условные обозначения: А—дуга; R—радиальные петли; U—ульнарная петля; W—защиток; D<sub>1,0</sub>—дельтовый индекс;  $\frac{A}{W} \times 100$ — инд. Денкмейера;  $\frac{W}{R+U} \times 100$ — инд. Фурузаты;  $\frac{A}{R+U} \times 100$ — инд. Пола; Hу—циротенар; Th:1—гетер и I—межпальцевая подушечка; II, III, IV— межпальцевые подушечки.

Таблица 4. Частота осевых триадиусов на правых и левых руках у потомков выходцев из Байзета

Признак	Мужчины			Женщины		
	левая	правая	средняя	левая	правая	средняя
I	58,12	73,68	65,90	8,74	65,71	62,28
I'	18,20	13,15	15,675	20,58	11,13	16
I''	0	0	0	2,94	5,72	4,33
II	5,26	2,65	3,955	8,82	8,57	8,70
II'	13,79	10,52	13,15	2,94	5,72	4,33
II''	2,63	0	2,63	5,88	2,85	4,38
III	—	—	—	—	—	—

Словные обозначения: осевые триадиусы—I—карпальный, I'—промежуточный, I''—центральный.

ческое родство и этническую общность всех армянских микропопуляций.

Представляет интерес сравнение обобщенных полигонов Западной и Восточной (Советской) Армении. Однако это возможно при равном (приблизительном) количественном соотношении исследуемых выборов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Р. М., Кочар Н. Р., Чавушян С. А., Казарян А. А., Абрамян Л. Г., Киракосян А. Г. Биолог. ж. Армении, 41, 9, 1988.
2. Кашиненко В. И. Вопросы антропологии, 76, 78—91, 1986.
3. Кочар Н. Р. Автореф. канд. дисс., М., 1981.
4. Кочар Н. Р., Арутюнян Р. М., Чавушян С. А., Абрамян Л. Г., Казарян А. А., Мартиросян К. Ю. Биолог. ж. Армении, 41, 9, 1988.
5. Рачкова Ю. Г., Бородина С. Р. Генетика, 9, 7, 141—152, 1973.
6. Сребровский А. С. Генетический анализ. М., 1970.

Поступило 6.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10. (42), 1989

УДК 575.24.576

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АКТИВНОСТИ ФИТОГОРМОНОВ НА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Э. Г. МУГНЕЦЯН, И. П. БЕГЛАРИЯН

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии

Ուսումնասիրված են ֆրոստհորմոնների գերբերվածությունը (ԳՔ-ԱՅ) և ստերոիդ մոլեկուլային-զինետիկական էֆեկտները, մասնավորապես զենային մասնագիտանք առարարներու ունակութունը և ազդեցինքը թուղիկի ակտիվացմանը շտամների ուլտրամանիշակագույն մասնագիտանքի հանդիպ ունեցած պայտանության վրա կրանք թարմ ազդեցութունը Ուսումնասիրված շտամների մոտ փորձարկված

Сокращения: ГК-АЗ—гибберелловая кислота; мРНК—информационная рибонуклеиновая кислота, ГМК—гидроксималениновая кислота.

2 Ֆիտոհորմոնների ցույց է տրված սպոնտան և բխիական մուտացիաներով հանդիման հիմալին մուտացիաների և ՌՄ-ճառագայթների նախնայ պայմանների իրենցում *E. coli*-ի K12(λ) մուտանտների՝ Ռիմենային տուկսոտրոֆների մաս:

The molecular-genetical effects of phytohormones-gibberellic acid (GA-A3) and auxins, in particular, the ability to induce gene mutations in the Ames test-system, as well as their influence on the sensitivity of repair-marked strains of *Escherichia coli* to UV-irradiation were investigated. The possibility of equal decrease by both phytohormones of spontaneous and induced by chemical mutagenesis gene mutations in Ames test-system and also the decrease of UV-sensitivity in *E. coli* K12 (λ) of thymine mutants is demonstrated.

Метаболизму регуляторов роста и развития растений, биохимическим механизмам физиологической и генетической активности посвящены многочисленные публикации [1—3]; изучен латеральный транспорт, роль света, пигментов и силы тяжести растения в этом процессе, однако механизмы при этом остаются нераскрытыми.

Для ауксина показан транспорт в клетки-мишени, где они связываются с молекулой специфического рецептора, вероятно, белковой природы. При этом не исключается возможность включения комплексов специфических генов, которые транскрибируются и мРНК, затем транслируются в специфические белки-ферменты, усиливающие физиологическую реакцию клетки [3]. Получены цитогенетические, электронно-микроскопические и молекулярно-генетические данные, свидетельствующие о генетической активности ГК-А3 и в какой-то мере проливающие свет на ее механизмы [2—5]. Данные такого рода для ауксина отсутствуют.

Целью настоящей работы являлось углубление исследований молекулярно-генетических аспектов фитогормональной активности ГК-А3, а также включение в эксперименты по индукции генных мутаций ауксина, изучение его влияния на УФ-чувствительность репарационно-маркированных штаммов *E. coli*.

**Материал и методика.** ГК-А3 и ауксин предварительно растворяли в спирте и щелочи соответственно, использовали их в физиологически активной концентрации: 0,1-, 0,01- и 0,02%-ные растворы соответственно.

Индукцию генных мутаций оценивали по реверсии от ауксигрофности по отношению к прототрофности в тест-системе Эймса, с учетом метаболической активации промутагенов [5, 6], при этом в качестве промежуточного хозяина использовали растение кукурузы сорта «Краснодарская-5».

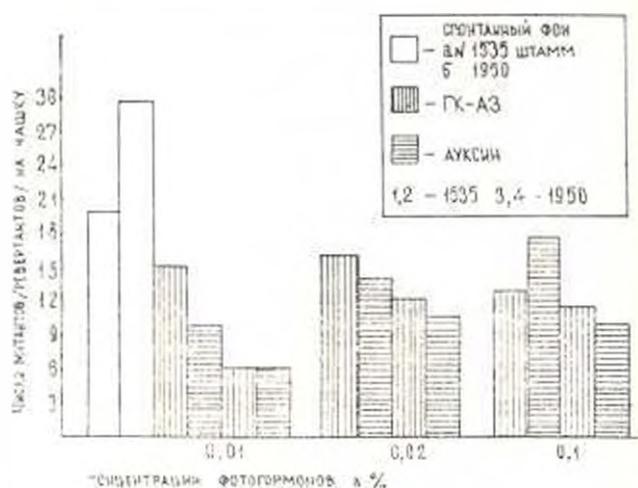
Методика модифицирована нами. В частности семена, обрабатываемые регуляторами в течение 5 ч и затем промытые, проращивали рулонным методом до 3-летнего стадии, гомогенизировали, гомогенат пропускали через бактериальные фильтры и тестировали на мутагенность [5].

Репарационно-маркированные штаммы кишечной палочки, дозы облучения УФ-лучами описаны нами ранее [4].

В качестве классического прямого мутагена использовали 0,05%-ный водный раствор азота натрия, промутагеном служила натриевая соль ГМК в концентрациях, повышающих спонтанный фон реверсий более чем на порядок (0,02%-ный раствор).

**Результаты и обсуждение.** Как видно из рис. 1, ГК-А3 и ауксин в изученных концентрациях не только не накапливались в растениях как

мутагенные факторы, но и понижали уровень спонтанных и индуцированных мутаций в отдельных случаях примерно на порядок. Как правило, они проявляли слабый защитный эффект как в прямом тестировании, так и в экспериментах с учетом *in vivo* метаболической активации.



Генетическая активность ГК-А3 и ауксина по индукции генных мутаций в тест-системе Эймса

или промутагенов. Таким образом, серия этих экспериментов выявила неспецифическое действие изученных фитогормонов, которые, как было показано в экспериментах по изучению ДНК-повреждающего действия [5], не вступают в непосредственное взаимодействие с ДНК.

Индукцию генных мутаций фитогормонами изучали в среде с хлорамфениколом в концентрациях, не приводящих к инактивации бактериальных культур, поскольку уровень генных мутаций возможно оценить при титрах культур не ниже  $5 \cdot 10^4$  кл./мл. Однако такое ограничение могло сказаться на объективной оценке роли синтеза белка в этих процессах. При указанных концентрациях хлорамфеникола не обнаружено влияния синтеза белка на защитное действие обоих фитогормонов. Однако этот вопрос требует дальнейших углубленных исследований, поскольку механизм слабого защитного действия фитогормонов не может быть полностью раскрыт без оценки роли синтеза белка в этом процессе.

Таким образом, физиологически оптимальные концентрации ГК-А3 и ауксина не только не повышали уровень гистидиновых ревертантов у всех штаммов тест-системы Эймса, но и понижали его более чем в 3-4 раза, практически не инактивируя при этом бактериальные культуры. Выживаемость бактериальных культур при этом составляла более 98%.

Для выяснения вопроса о путях реализации обнаруженного эффекта требуются самостоятельные исследования. Возможными представляются взаимодействие фитогормонов с экзогенными мутагенами и их блокирование за счет изменения нуклеофильности последних; образование комплекса, чисто стерически затрудняющего взаимодействие мутагена с ДНК; непосредственная защита ДНК в результате образова-

ния комплекса с ней; образование комплексов, действующих на уровне структурных или регуляторных генов; вмешательство в репарационные процессы.

Для изучения вопроса о возможном влиянии фитогормонов на репарационные процессы нами изучена УФ-чувствительность более десяти репарационно-маркированных штаммов кишечной палочки. Эти эксперименты поставлены на модельных системах микроорганизмов ввиду отсутствия маркированных растительных систем, на которых такого рода исследования представляли бы неоспоримую ценность.

Нами получены предварительные данные, свидетельствующие о проникновении фитогормонов и отсутствии непосредственного взаимодействия с ДНК.

Результаты изучения УФ-чувствительности репарационно-маркированных штаммов эшерихий представлены на рис. 2.

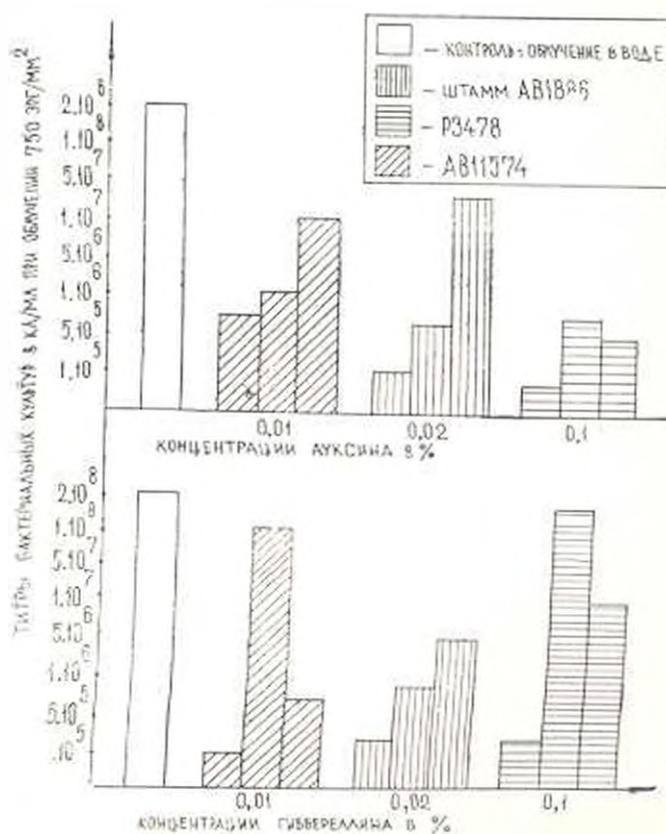


Рис. 2. Влияние ГК-А3 и ауксина на УФ-чувствительность *E. coli*.

Методические подходы этой серии экспериментов для ГК-А3 нами описаны ранее [5].

Из десяти штаммов, включенных в эксперимент, на графике представлены три, поскольку на них обнаружено защитное действие обоих фитогормонов от УФ-облучения, проявляющееся с одинаковой эффективностью. На других штаммах статистически достоверного защитного действия указанных соединений не выявлено.

В этой серии экспериментов учтен эффект экранизации при облучении штаммов, обработанных фитогормонами в присутствии или отсутствии их в среде.

Штаммы АВ11574 и Р3478 высокочувствительны к дозам 250 и 750 эрг/мм<sup>2</sup> и несут мутацию в гене по тимину, образованию димеров которых отводится основная роль в УФ-чувствительности и УФ-мутатезе. Именно на этих штаммах обнаружен защитный эффект фитогормонов, которые в некоторых случаях снимали эффект радиации, доводя до контрольного уровня чувствительности. Делается заключение о возможности вмешательства с помощью фитогормонов в репарационные процессы микроорганизмов, в частности эшерихий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бегларян Н. П. Биолог. ж. Армении, 10, 878—883, 1986.
2. Бегларян Н. П. Сб. Генотип культурных растений и их диких сородичей в Закавказье. Ереван, 1986.
3. Гайбург К. Э. Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. Новосибирск, 1976.
4. Топузян М. А., Муснецян Э. Г., Бегларян Н. П. Биолог. ж. Армении, 4, 284—286, 1986.
5. Фонштейн Л. М., Малинина Л. М., Полухина Г. Н., Абилов С. К., Шапиро Л. М. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (методические указания). М.,
6. Wagner E. D., Flewa M. Mutat Research, 101, 19, 1982.

Поступило 10.VIII 1989 г.

## МЕХАНИЗМ ГИБЕЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ

С. А. ТОНОЯН, Р. А. САГАТЕЛЯН, Г. М. АВАКЯН, Ц. М. АВАКЯН,  
А. В. АРАКЕЛЯН, Н. В. ДЖАНПОЛАДЯН, Н. В. СИМОНЯН, Я. Г. СТЕПАНИАН

Ереванский физический институт ГКАЭ, Ереван  
Ереванское производственное объединение «Молоко».

Показано, что логарифм выживаемости бактерий *E. coli* K-12 при воздействии сильного электрического поля линейным образом зависит от длительности прямоугольного электрического импульса и согласуется с теоретической кривой. Гибель клеток бактерий является следствием появления в липидном матриксе мембраны дефекта типа инвертированной поры. Оценен коэффициент линейного натяжения кромки поры.

Քիչառանցում ուսումնասիրված է ուժեղ էլեկտրական զաշտի ազդեցությունը *E. coli* K-12 բակտերիաների կենսամակաբյան վրա: Ցույց է տրված, որ կենսամակաբյան լոգարիթմը զծային ձևով է կախված ուղղանկյուն էլեկտրական իմպուլսի տևողությունից և համընկնում է տեսական կորի հետ: Բակտերիաների ըջիչների կենսամակաբյան կորուստը հետևանք է թաղանթի լիպիդային մատրիքում էլեկտրական զաշտի ազդեցության տակ ղեֆեկտի տիպի փոխակերպված թախաթի առաջացման: Անց է կացվել ծակուտի կորի ղծային լարվածության գործակցի գնահատում:

The effect of strong electric field on the survival of *E. coli* K-12 cells has been investigated. The linear relationship of logarithm of survival versus the longevity of electric pulse has been shown, thus confirming the theoretical curve. The death of bacterial cells is caused by development of the "inverted pore" type defect in the lipid matrix of membrane under the electric field. The linear tension coefficient of pore edge has been estimated.

Электрический пробой—бактерии *E. coli*—выживаемость

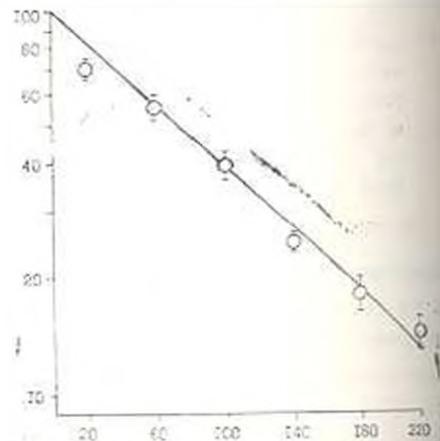
Известно, что кратковременное наложение сильного электрического поля на суспензию микроорганизмов приводит к их гибели [8—12]. Хотя считают, что гибель клеток в электрическом поле связана с электрическим пробоем мембран, однако детальный механизм гибели не исследован. Существует точка зрения, согласно которой гибель клеток наступает в результате развития после обратимого электрического пробоя клеточных мембран вторичных осмотических процессов. В данной работе нами показано, что в основе гибели микроорганизмов в электрическом поле и электрического пробоя плоских бислойных мембран лежит один и тот же общий механизм, а именно появление в липидном бислое в электрическом поле надкритического дефекта типа инвертированной поры.

Материал и методика. В работе использовали клетки бактерий *E. coli* K-12 штамма АВ1167 «дикого» типа из коллекции ЛИЯФ АН СССР. Бактериальные культуры выращивали в жидком питательном бульоне в течение 18 ч при 37° до стационарной фазы роста (2—3 · 10<sup>9</sup> клеток в 1 мл). Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 g) и ресуспендировали в жидкую питательную среду. Разведения клеточной суспензии для опыта готовили таким образом, чтобы исходная концентра-

нии клеток, подвергаемых воздействию электрическим полем, была равна примерно  $\bar{t} = 2 \cdot 10^6$  кл/мл. Для электрообработки был специально сконструирован генератор прямоугольных импульсов. Принцип работы генератора основан на накоплении энергии в конденсаторе с последующим быстрым ее разрядом. Коммутация осуществляется двумя мощными высоковольтными тиристорами. Один из них включен последовательно с ячейкой и при открывании формирует передний фронт импульса. Второй, открываясь, шунтирует первый тиристор вместе с ячейкой и тем самым формирует задний фронт импульса. Включение тиристов в нужный момент времени обеспечивается блоком управления, собранным на микросхемах. Генератор позволяет получать регулируемые амплитуду ( $0,4 \div 1,6$  кВ) и длительность ( $10 \div 220$  мкс) импульсов. Амплитуду и форму импульса контролировали с помощью записывающего осциллографа. Суспензию обрабатывали в плексигласовой ячейке с электродами из нержавеющей стали, расположенными на расстоянии 1 мм. Объем ячейки составлял 0,1 мл. Число клеток, сохранявших жизнеспособность после обработки в рабочей ячейке вышеописанного прибора, определяли подсчетом макроколоний, вырастающих на твердой питательной среде. Подсчет макроколоний проводили через сутки некубации клеток при температуре 37°. В течение этого времени успевали сформироваться колонии из всех неповрежденных клеток.

*Результаты и обсуждение.* Для выяснения механизма гибели микроорганизмов под действием сильного электрического поля была исследована зависимость выживаемости клеток от длительности импульса. Амплитуда импульса (16 кВ/см) была подобрана таким образом, чтобы в широком интервале изменения длительности импульса (от 40 мкс до 220 мкс) иметь достаточно сильный эффект [11]. На рис. представлены экспериментальные точки этой зависимости. Видно, что точки хо-

Зависимость выживаемости клеток *E. coli* от длительности импульса. По оси абсцисс — длительность импульса (мкс), по оси ординат — выживаемость (%).



рошо ложатся на прямую. Отметим, что аналогичная зависимость получена также в работах [11, 12]. Для объяснения кривой на рис. будем исходить из детально разработанной теории электрического пробоя плоских бислойных мембран [1]. В первом приближении бактериальную клетку аппроксимируем сферической клеткой с радиусом  $r$ . Если поместить такую клетку во внешнее поле с напряженностью  $E$ , то потенциал на мембране будет иметь вид  $\varphi = 1,5 E \cdot r \cos \theta$  [13], где  $\theta$  — угол между направлением поля и нормалью к выбранному участку мембраны. Учитывая то обстоятельство, что толщина мембраны  $\sim 100 \text{ \AA}$ , т. е. намного меньше, чем радиус клетки ( $r = 0,44 \text{ мкм}$ ) [2], а также то, что дефекты, приводящие к резкому уменьшению сопротивления мем-

браны, имеют размеры порядка толщины мембраны, можно считать плоским участок мембраны, где реализуется максимальное напряжение. Заметим, что максимальное напряжение падает на передний и задний участки (по отношению к вектору  $E$ ) мембраны клетки и эти напряжения равны по величине. Если происходит пробой мембраны одного из участков, то все напряжение немедленно падает на второй участок, что приводит к пробое мембраны также второго участка. Так что практически одновременно происходит пробой переднего и заднего участков мембраны клетки. Появление поры на любом из участков, где реализуется максимальное напряжение, можно описать формулами, полученными для плоских слоев. Отметим, что мембраны сферических замкнутых клеток, которые находятся в изотонических условиях, находятся в ненапряженном состоянии. Для достаточно больших клеток, имеющих размеры  $\sim 1$  мкм, упругая энергия весьма мала и ее вкладом в свободную энергию порообразования можно пренебречь [3]. Принимая это во внимание и считая, что электрический ток через пору мал, можно, основываясь на результатах работы [1], получить следующее выражение для среднего времени жизни мембраны при потенциале

$$\tau = \frac{kT^{3/2}}{4\pi nD\gamma (0.5 C\varphi^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{\pi\gamma^2}{0.5 C\varphi - kT}\right). \quad (1)$$

Здесь  $k$ —постоянная Больцмана;  $T$ —температура;  $n$ —среднее число дефектов на участке мембраны;  $D$ —коэффициент диффузии дефектов;  $C = C_0 \left(\frac{\epsilon_s}{\epsilon_m} - 1\right)$ ,  $C_0$ —удельная емкость мембраны;  $\epsilon_s, \epsilon_m$ —диэлектрические проницаемости раствора и мембраны соответственно;  $\gamma$ —линейное натяжение кромки поры. Для критического радиуса дефекта ( $r_*$ ) и высоты энергетического барьера ( $\Phi_*$ ) имеем

$$r_* = \frac{\gamma}{0.5 C\varphi^2}, \quad \Phi_* = \frac{\pi\gamma^2}{0.5 C\varphi^2}. \quad (2)$$

Из (2) видно, что при  $\varphi \rightarrow 0$  бесконечно увеличиваются  $r_*$  и  $\Phi_*$ . Это означает, что появление дефектов критических размеров на мембране, на которой  $\varphi = 0$ , маловероятно. Формулы (2) показывают также резкую зависимость критических величин  $r_*$  и  $\Phi_*$  от потенциала. Это важное обстоятельство может сыграть существенную роль при заживлении пор. При появлении на мембране дефекта критического размера уменьшается  $\varphi$  в области поры, а это в свою очередь приводит к резкому увеличению как  $r_*$ , так и  $\Phi_*$ . Таким образом надкритическая пора может оказаться (после некоторого уменьшения  $\varphi$ ) подкритической, т. е. фактически произойдет заживление пор [4]. Исходя из указанных обстоятельств, мы можем описать процесс кратковременной потери барьерной функции клеточной мембраны под действием электрического поля. Анализ литературы, проведенный в работе [8], показал, что пробой клетки в электрическом поле может быть «результатом временного (обратимого) увеличения проницаемости мембран». Вероятность пробоя участка мембраны за время  $t$  равна [1]

$$F(t) = 1 - \exp(-t/\tau), \quad (3)$$

где  $\tau$  — задается формулой (1). Если имеем суспензию, в которой имеется  $N_0$  — число клеток микроорганизмов, то, используя (3), можно показать, что число пробитых клеток  $N$  равно

$$N = N_0(1 - \exp(-t/\tau)). \quad (4)$$

Из (4) следует, что зависимость логарифма процента выживших клеток (т. е.  $\ln\left(\frac{N_0 - N}{N_0} \cdot 100\%\right)$ ) от длительности импульса электрического поля  $t$  должна быть линейной. Именно такая линейная зависимость и наблюдается в эксперименте (рис. 1, а также [11, 12]). Отметим, что тангенс угла наклона на рис. 1 есть  $\tau^{-1}$ . Это позволяет оценить такой важный параметр устойчивости биологических мембран, как коэффициент линейного натяжения кромки поры  $\gamma$ . Примем, что  $T = 300^\circ\text{K}$ ,  $C_0 = 1$  мкф/см<sup>2</sup> [5],  $\varphi = \varphi_{\text{max}} = 1,5$ ,  $E_0 \cos\theta \sim 1$  В ( $r = 0,44$  мкм,  $\theta = 0$ ). Поскольку величина  $pD$  для биологических мембран неизвестна, для оценок возьмем соответствующее значение  $pD = 10^{-13}$  см<sup>2</sup>/с [6] для биосов. (Заметим, что если среднее число дефектов на мембране  $p = 1$ , то это означает, что коэффициент диффузии дефектов  $D \sim 10^{-13}$  см<sup>2</sup>/с. Если же  $D \sim 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с, то мембрана фактически бездефектна). Взяв экспериментальное значение  $\tau^{-1}$  из рис. 1 и подставив соответствующие значения величины  $T$ ,  $k$ ,  $pD$ ,  $C_0$  в формулу (1), можно получить уравнение относительно  $\gamma$ . Численное решение этого уравнения дает значение  $\gamma \approx 1,55 \cdot 10^{-11}$  Н. Эта величина хорошо вписывается в экспериментально определяемый диапазон значений  $\gamma$  для модельных биологов [7].

Таким образом, с одной стороны, то обстоятельство, что в экспериментах по исследованию гибели клеток бактерий в электрическом поле реализуется предсказанная теорией линейная зависимость выживаемости от длительности импульса, а с другой стороны, найденное значение  $\gamma$ , близкое к коэффициенту линейного натяжения биологов, указывает на то, что гибель клеток в электрическом поле связана с образованием на липидных участках их мембран надкритических дефектов типа инвертированных пор.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арикеян В. Б. Канд. дисс., М., 1981.
2. Черномордик Л. В. Успехи современной биологии, 99, 67—80, 1985.
3. Пастушченко В. Ф. Биофизика, 28, 1036—1039, 1983.
4. Пушманский А. В., Черномордик Л. В. В кн.: Биомембраны. 278—294, Рига, 1981.
5. Ашмо В. В кн. Мембраны. 129—236, М., 1981.
6. Чумаков Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушченко В. Ф., Абидор И. Г. В кн.: Проблемы науки и техники, Биофизика мембран, 2, 161—266, М., 1982.
7. Черномордик Л. В., Меликян Г. Б., Чизмаджев Ю. А. Биол. мембраны, 4, 117—161, 1987.

Постулило 10.VIII 1989г.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЦЕПЦИЯ МОЛЕКУЛ ДНК И ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

Р. А. ЗАХАРЯН, В. А. ОВСЕЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Методом аффинной хроматографии выделены и идентифицированы ДНК- и РНК-связывающие белки плазматической мембраны печени крысы; показано, что взаимодействие ДНК и РНК с клетками печени высокоспецифично и что трансмембранный перенос молекул ДНК в клетки печени происходит в составе клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

Աֆինային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով անջատվել են ի հայտ եկ լեզրվել ստանաների վարդի պրոմոտորիկ թաղանթներում ԴՆԹ- և ՌՆԹ-կապող սպիտակուցները: Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի փոխազդեցությունը վարդի բջիջներին հետ ունի բարձր սպեցիֆիկություն և որ ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի մուգեկուլների միջխաղանջային փոխադրումը վարդի բջիջներում կատարվում է կլատրին-պարունակող ենթբջջային զեգիկուլների կազմում:

Both DNA- and RNA-binding proteins of rat liver plasmatic membrane have been isolated and identified using affinity [chromatography] technique. It has been shown that DNA and RNA interactions with liver cells are highly specific, and DNA-RNA transmembrane transfer in liver cells takes place due to clathrine-containing endocytosis vesicles.

*Мембрана—ДНК- и РНК-связывающие белки—клатрин*

Перенос молекул ДНК через плазматическую мембрану обеспечивает процесс генетической трансформации.

Молекулы ДНК, РНК успешно пересекают клеточную мембрану, и транзитория экспрессия введенного генетического материала может достигать 10% от числа обработанных клеток [9, 11]. Получены данные, свидетельствующие об участии ДНК и РНК-связывающих белков плазматических мембран клеток как про-, так и эукариот в процессе трансмембранного переноса ДНК и РНК [2—4, 6, 7].

Целью работы было показать, что взаимодействие ДНК и РНК с клетками печени высокоспецифично и трансмембранный перенос молекул ДНК и РНК в клетках печени происходит в составе клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

*Материал и методики* Манипуляции с животными проводили под наркозом 0,5%-ным пембуталом из расчета 10/мл/г веса. В экспериментах были использованы крысы линии Вистар и белые мыши. Клетки печени препарировали из срезов в сбалансированном солевом растворе Хэнкса, содержащем 0,05%-ную коллагеназу, по описанному методу [8]. Взаимодействие нуклеиновых кислот с клетками печени осуществлялось в сбалансированном растворе Хэнкса в присутствии 5 мМ  $CaCl_2$ , 10 мМ HEPES (рН 7,4) при 4°. В экспериментах использовано  $10^7$  клеток. Плазматическую мембрану клеток печени крысы получали по известному методу [1].

Сокращения: РИ—реконструированные нуклеосомы

Использовали ДНК печени крысы с  $M_n$  в  $20 \cdot 10^6$  Дальтон и активностью  $8 \cdot 10^4$  ит/мин/мкг ДНК и РНК-вызывающие белки из плазматических мембран клеток печени получали методом аффинной хроматографии на колонке сефарозы 4В с нимобил-дольными ДНК и РНК.

Солюбилизацию мембранных белков проводили в присутствии тритона X-100, сорбик — в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,2), 100 мМ NaCl; сорбированные белки элюировали 0,5 М NaCl в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,2). Полученные образцы белков идентифицировали электрофорезом в 7–10%-ном ПААГ.

Плазмидную ДНК рBR 322 реконструировали в нуклеосомы после предварительного меткирования ДНК S-1 нуклеазой [12]. Процесс интернализации ДНК рBR322 реконструированной в нуклеосомы, в клетках печени мыши изучали в условиях *in vivo* через 45 мин после внутривенного введения 100 мкг ДНК в составе РН из печени мыши были выделены ДНК-содержащие эндодигитарные везикулы по методу, описанному [12]. везикулы были проанализированы на содержание белка клатрина [14], интактной молекулы ДНК. Для гибридизации использована меченая ДНК рBR322 со специфической активностью  $10^8$  итп/мин на 1 мкг ДНК. Электрофорез ДНК проводили в 0,6%-ном агарозном геле.

**Результаты и обсуждение.** Чтобы определить, насколько специфично по взаимодействию ДНК и РНК [13] с плазматической мембраной клеток печени, мы изучали процесс сорбции ДНК и дсРНК на клетках печени в суспензии.

На рис. 1 приведены кривые насыщения связывания молекул ДНК и РНК с поверхностной мембраной клеток печени.

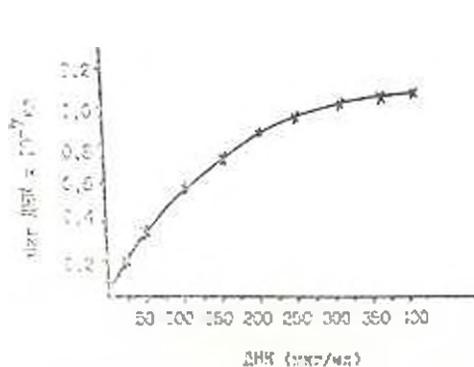


Рис. 1.

Рис. 1. Связывание [ $^{14}C$ ] ДНК с клетками печени ( $10^{-7}$  клеток). На оси ординат — количество связанных молекул ДНК в мкг, на оси абсцисс — количество добавленной ДНК в мкг/мл.

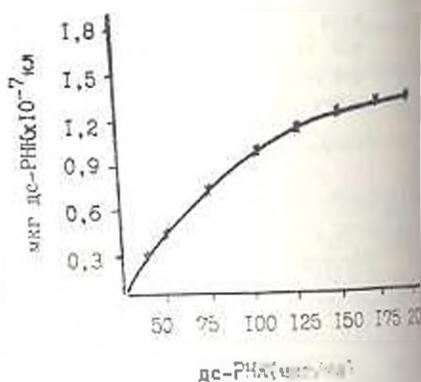


Рис. 2.

Рис. 2. Связывание [ $^{3}H$ ] дсРНК с клетками печени ( $10^{-7}$  клеток). На оси ординат — количество связанных молекул дсРНК в мкг, на оси абсцисс — количество добавленной РНК в мкг/мл.

$K_d$  для ДНК и дсРНК составил около  $2,03 \cdot 10^{-7}$  и  $10^{-8}$  М соответственно. Присутствие «холодной» РНК или ДНК не влияло на связывание соответственно [ $^{14}C$ ] ДНК или [ $^{3}H$ ] РНК (рис. 2).

Предварительная обработка клеток печени трипсином (150 мкг/мл) практически полностью снимала ДНК и дс-РНК-связывающую способность клеток печени; обработка ДНКазой (100 мкг/мл) и РНКазой (50 мкг/мл) не влияла на сорбцию ДНК и РНК на клетках. Полученные данные свидетельствуют, что фактор связывания на поверхности клеток представлен белками и взаимодействие молекул ДНК и РНК с белками плазматической мембраны специфично.

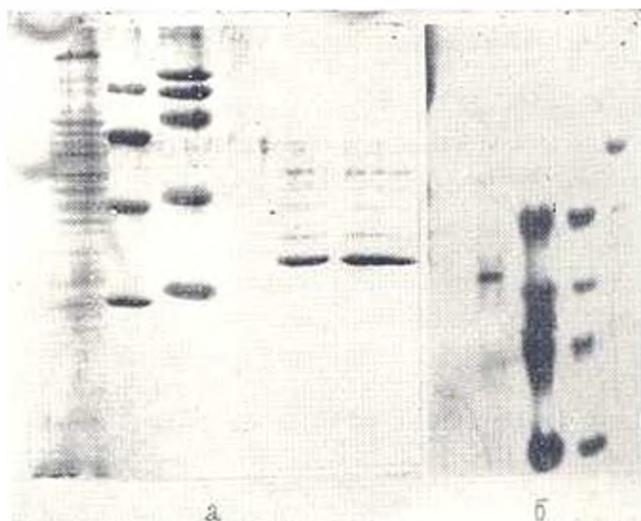


Рис. 3. а) Гель-электрофорез в 7% ном ПААГ белков, элюированных 0,5 М NaCl с колонки ДНК-сефароза—4В. Слева направо: 1—белки плазматической мембраны клеток печени, 2, 3—маркеры, 4—ДНК-связывающиеся белки. б) Гель-электрофорез в 7% ном ПААГ белков, элюированных 0,5 М NaCl с колонки РНК-сефароза—4В. Слева направо: 1—ДНК-связывающиеся белки, 2, 3, 4—маркеры.



Рис. 4. а) Гель-электрофорез в 7,5% ном ПААГ белков эндцитотических везикул, содержащих ДНК, выделенных из печени крысы через 45 мин после внутривенной инъекции 100 мкг ДНК рВР322 в составе РИ. 1—белки мембраны с  $M_r$  в  $180 \times 10^3$  и  $90 \times 10^3$ , 2—белки клатрин-содержащих везикул, изолированных из печени крысы (см. в тексте); 3—белки-маркеры с  $M_r$  в  $48 \times 10^3$  и  $38 \times 10^3$ . б) Идентификация экзогенной ДНК рВР322 в клатрин-содержащих эндцитотических везикулах, выделенных из печени крысы. ДНК фракционировали в 0,6 н-ном агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозные фильтры по Саудерну и тибризовывали с  $[^{32}P]$  ДНК рВР322, слева—ДНК рВР322, изолированная из везикул, справа—маркер, суперспирализованная форма молекулы ДНК рВР322.

Далее был проведен анализ белков плазматической мембраны клеток печени, избирательно связывающихся с ДНК или дсРНК. Солюбилизованная в присутствии Тритона X-100 очищенная фракция плазматических мембран клеток печени была сорбирована на дсРНК или ДНК, иммобилизованных на сефарозе 4В [10].

Гель-электрофорез сорбированных белков, элюированных 0,5 М NaCl, показал, что с молекулами ДНК связывался в основном белок с М.в. около 35 kd, с молекулами дсРНК — в основном белки с М.в. 52—48 kd (рис. 3а, б, см. вклейку).

С целью выяснения возможной роли клатрин-содержащих эндоцитарных везикул в процессе трансмембранного переноса и интернализации молекул ДНК в клетки печени мы изолировали клатрин-содержащие везикулы из клеток печени через 45 мин после внутривенной инъекции 100 мкг ДНК в составе РН.

Гель-электрофорез белков выделенных эндоцитарных везикул показал, что они содержат белок клатрин с М.в.  $180 \times 10^3$  и  $33—36 \times 10^3$  Дальтон, а также белки с М.в. около  $110 \times 10^3$  и  $50—55 \times 10^3$  Дальтон (рис. 4а, см. вклейку).

Вместе с тем в составе выделенных клатрин-содержащих эндоцитарных везикул методом гибридизации с [ $^{32}$ P] ДНК pBR322 [15] были идентифицированы интактные молекулы ДНК pBR322.

Полученные данные доказывают, что трансмембранный перенос ДНК и дсРНК в клетки млекопитающих может осуществляться по механизму рецептор-обусловленного эндоцитоза.

Ранее нами было показано, что молекулы РНК и ДНК, взаимодействуя с плазматической мембраной клетки, индуцируют трансмембранный сигнал, сопровождающийся поступлением в клетку  $Ca^{2+}$  с последующей активацией фосфолипазы  $A_2$ , накоплением в мембране лизоформ фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот и повышением подвижности в липидном бислое мембраны [10, 15].

Очевидно, что индуцированные изменения способствуют кластеризации на поверхности клетки полинуклеотид-связывающих белков, кеплированной лиганда-полнуклеотида на плазматической мембране и, в конечном итоге, формированию клатрин-содержащих эндоцитарных везикул.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования мембран (Под ред. Э. Медди), 49—50, М., 1979.
2. Габриелян А. Г., Аракелян А. Г., Захарян Р. А. Докл. АН СССР, 398, 5, 1250—1253, 1988.
3. Захарян Р. А., Карагезян К. С. В сб. Структура и фракция белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI Двустороннего симп. СССР—Франция, 132, 1982.
4. Захарян Р. А., Бакуиц К. А., Скобелева Н. А. Нейрохимия, 8, 1, 34—38, 1989.
5. Захарян Р. А., Галстян Г. Г., Геворкян Н. Р., Галстян М. Г., Алиханова Л. М. Биополимеры и клетки, 4, 1, 48—53, 1988.
6. European meeting on bacterial transformation and transfection IV (abst.), Lisbon, 1982.
7. Gabril A., Bennett R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 3, 1034—1039, 1984.
8. Gussicstein K., Morland Y. Anal. Biochem., 108, 76—82, 1980.

9. Gorman C. M., Howard B. N. *Nucleic Acids Research*, 11, 21, 7631—7648, 1983.
10. Karageuzyan K. G., Zakharian R. A., Bakantz K. A., Ovaktmian S. S. *Giuseppe Porcellati Foundation International Meeting on Neurochem. Aspects of Phospholipid Metab.*, May 26—28, Perygia, Italy, 66, 1988.
11. Lyster A., Scungos G., Yuricek D., Keene D., F. H. Ruddle. *Experimental Cell Research*, 139, 223—234, 1982.
12. Nandi P. K., Legrand A., Nicolau C. *The J. of Biological Chemistry*, 261, 3, 16722—16726, 1986.
13. Southern E. M. *J. Mol. Biol.*, 98, 3, 503—517, 1975.
14. Willingham M. C., Postan I. *Intern. Rev. of Cytology*, 92, 51—85, 1984.
15. Zakharian R., Karageuzyan K., Ovaktmian S. *ISF—JOCS World Congress*, Sep 26—30, Tokyo, 3, P12, 357, 1988.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989

УДК 597:591.58

## БИОАКУСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОЗЕРНЫХ ЛЯГУШЕК (*RANIDAE: RANA RIDIBUNDA*) В АРМЕНИИ КАК ВКЛАД В ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОСТОЧНОЙ ФОРМЫ

ГЛАС ШНЕЙДЕР\*, Э. М. ЕГИЛАЗАРЯН

\*Боннский университет. ФРГ.

Ереванский государственный университет, кафедра зоологии

На основании результатов биоакустических исследований делается вывод, что лягушка *R. ridibunda*, обитающая в Армении, принадлежит к восточной форме, которая распространена по всей Малой Азии.

Անհասկացողության ուսումնասիրությունների արդյունքների հիման վրա եզրակացություն է արվում, որ Հայաստանում բնակվող *R. ridibunda* զորտը պատկանում է արևելյան տիպին, որը տարածված է Փոքր Ասիայում:

In a lake near Yerevan ca 1200 m above sea level the lake frogs were in the main spawning phase during the second half of April. At the same time they were only in the prespawning phase in Lake Sevan which is about 1900 m above sea level. Mating calls were recorded in the range from 13 to 24.6° water temperature. Many call parameters are correlated with temperature. According to the structure of the mating calls the lake frogs in Armenia represent the eastern form which has already been found in Israel, western Turkey and in the delta of the Nile. However, there are differences demonstrating that the lake frogs in Armenia are more closely related to the lake frogs in western Turkey than to those in Israel and the Nile delta.

Фауна Армении—лягушка озерная *Rana ridibunda*—биоакустические параметры.

Результаты недавно проведенных биоакустических исследований *Rana ridibunda* свидетельствуют о том, что лягушки, которые до сих пор от-

\* Директор Института зоологии, профессор.

(к ст. Х Шнейдера, Э. М. Егнazarян)

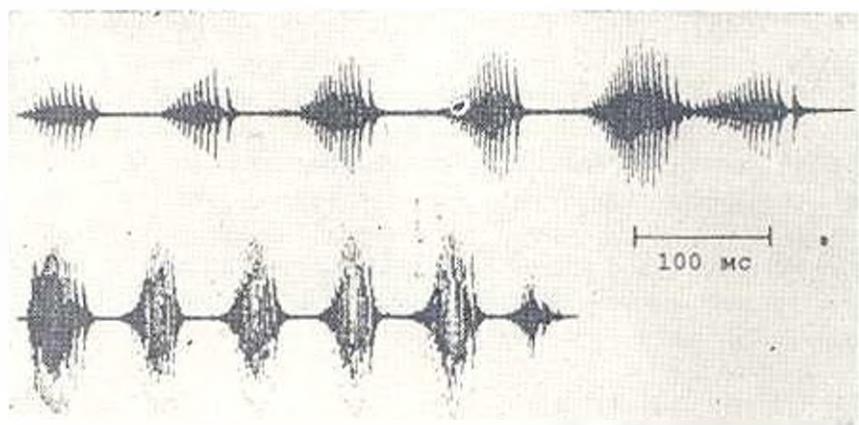


Рис. 1. Осциллограммы двух брачных криков, зарегистрированных при температуре воды 16° (наверху) и 24° (внизу).

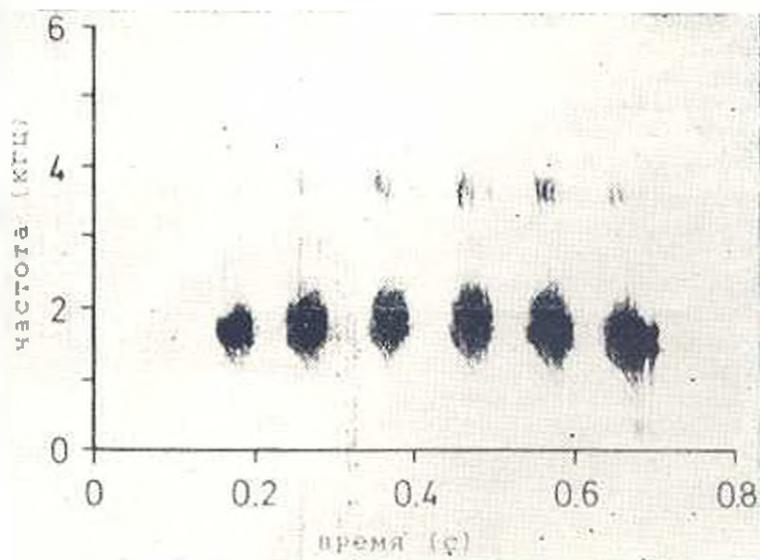


Рис. 2. Спелограмма брачного крика при 18°. Установление фильтра «wide».

воспелись к этому виду, неодинаковы. Анализ брачных криков *R. ridibunda* в Северной Греции [8], Израиле [5] и Южной Югославии [3] показал почти полное соответствие их у особей из Греции и Югославии к значительные отклонения у озерных лягушек, обитающих в Израиле, что привело к мысли, что озерные лягушки в Израиле представляют собой новый подвид или даже новый вид [8]. Это мнение подтвердилось также сравнительными электрофоретическими исследованиями [6].

Поскольку брачные крики являются чрезвычайно специфическими и поэтому ценными признаками для выяснения родственных связей, в дальнейшем исследовались две новые популяции озерной лягушки. Эти исследования показали, что восточная форма озерной лягушки имеет широкое распространение. Ермани и др. [2] доказали ее распространение в окрестностях Измира и в 220 км к юго-западу от Измира, Аксиф и Шнейдер [1] — в дельте Нила.

Брачные крики озерных лягушек в Египте и в Израиле одинаковы. В Западной Турции они несколько отличаются, поэтому можно предположить, что здесь речь идет о популяциях, обитающих на окраине ареала.

Из проведенных до сих пор исследований вытекает, что восточная форма озерной лягушки обитает на территории, примыкающей с востока к Средиземному морю, насколько нам известно, от Турции до Египта. В связи с этим возникает другой вопрос: какова протяженность области распространения новой формы озерной лягушки в восточном направлении. Для выяснения этого вопроса мы провели биоакустические исследования популяций озерных лягушек в Армении.

*Материал и методика.* Магнитофонные записи производили от 20 апреля до 4 мая 1989 г. на берегу озера, расположенного на окраине Еревана (1200 м над ур. м.) при температурах воды 14,8—24,6°. Были записаны также крики озерных лягушек озер Севан, Паралич и вод долины р. Марярик в 15 км. от г. Раздана (около 1900 м над ур. м.). Температура воды при записи криков в этих водоемах составляла 13—18,9°.

Запись коммуникационных сигналов производили магнитофоном *Stellavox SP 8* в микрофоне *Sennheiser MKH 816T*. Обработка их производилась на основании осциллограмм (*Tektronix 502 A*, *Goelites Recording Camera*), сонограмм (*Kay Electric Sonograph 7029 A*) и спектрограмм (*Nicole UA 400 A*). Статистический учет проводили при помощи программы *Staigraphics (STSC, Inc. Rockville, CIAA)*.

Для достижения как можно более стандартизированных данных, определения длительности криков и интервалов между криками из средней части серии криков были выделены по три крика и три интервала, вымеренные на осциллограммах, и установлена их средняя величина. Таким же образом для определения длительности группы импульсов и интервалов между ними для трех криков одной серии, каждый раз, начиная со второй группы, вымеряли три группы импульсов и по три интервала между ними и устанавливали соответствующую среднюю величину. В основе статистических учетов лежат средние величины, лишь учет длительности криков с 4, 6 и 8 группами импульсов опирается на отдельные значения.

*Результаты и обсуждение.* В начале наблюдений озерные лягушки, обитающие в озере под Ереваном, находились в главном периоде нереста. Как днем, так и ночью самцы квакали очень терпеливо. Имелись три группы квакающих лягушек: две на юго-западном берегу

озера и очень большая группа (более 100 лягушек), обитающая в 50 м от берега в участке с богатой вегетацией. В ночь на 21 апреля 1989 г. многие пары нерестились.

Несколько дней спустя наступил период после нереста. Число квакающих самцов в местах квакания значительно сокращалось. Самая высокая активность квакания теперь отмечалась до обеда, сразу после обеда и вечером. От 17.00 до 18.00 ч квакание было совсем незначительным, в основном царилла совершенная тишина. Лягушки в это время занимались поисками корма. При этом многие, прежде всего молодые особи, часто выходили из воды и охотились на насекомых, в большинстве случаев на мух.

Фенологически эти лягушки представляли собой три вида: особь с травянисто-зеленой спиной, покрытой темно-зелеными пятнами, с коричневатой спиной и со светло-зелеными линиями в основном на коричневатой спине.

В расположенных на более высоком уровне регионах озер Севан, Паралич и водах долины р. Мармарик озерные лягушки с 26 апреля до 3 мая 1989 г. проходили лишь фазу до нереста. Активность квакания соответственно до обеда и вечером была высокой.

Характерно, что брачные крики состоят из группы импульсов. Амплитуда импульсов в начале каждой группы является небольшой, затем быстро увеличивается и около середины достигает максимума (рис. 1, см. вклейку). Согласно сонограмме (рис. 2, см. вклейку) и амплитудной спектрограмме, звуковая энергия распределяется в основном в диапазоне частот 1500—2500 Гц, диапазон примерно 3500 Гц содержит энергию. Брачные крики озерных лягушек озер Севан, Паралич и р. Мармарик не отличаются от криков лягушек под Ереваном, т. е. все записанные крики составляют одну выборку.

Озерные лягушки производят брачные крики всегда как ряд криков. Число криков, составляющих такую серию, значительно колеблется.

Как и следовало ожидать, многие параметры криков коррелируют с температурой воды (табл.). При повышении температуры сокращается как длительность криков (рис. 3а, б), так и перерывы между ними (рис. 4). Эти изменения отражаются и на периоде крика (рис. 5), т. е. промежутке времени от начала крика до начала следующего крика. При температуре воды 13° он в среднем составляет 2239,48 мс, при 23° — 1180,38 мс, т. е. сокращается приблизительно наполовину. Сокращение длительности крика основывается на отрицательной корреляции трех параметров крика с температурой воды — длительности группы импульсов (рис. 6), интервала между ними (рис. 7) и числа импульсов на группу (рис. 8). Это приводит к радикальному сокращению периода группы импульсов (рис. 9) со средней величиной 134,52 мс при температуре воды 13° до 73,32 мс при 23° и к сильному увеличению частоты повторения группы импульсов (рис. 10). Кроме того, из этого следует, что сокращение длительности крика при повышении температуры тем значительнее, чем больше группа импульсов содержит крик (рис. 3б). Число групп импульсов на крик, однако, не коррелирует с температурой воды и составляет  $5,86 \pm 1,33$  (х и стандартное отклонение, n = 100).

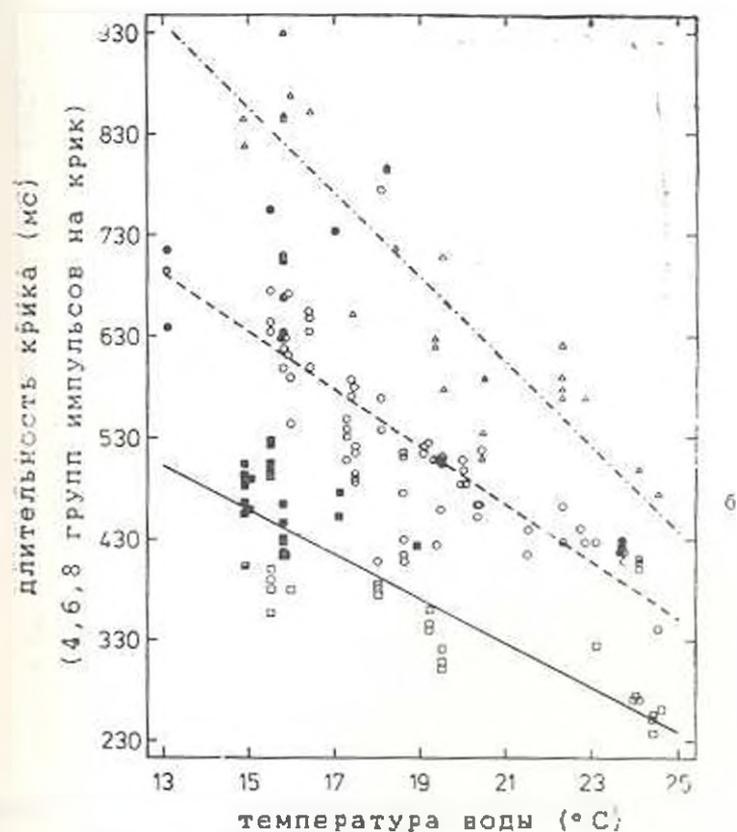
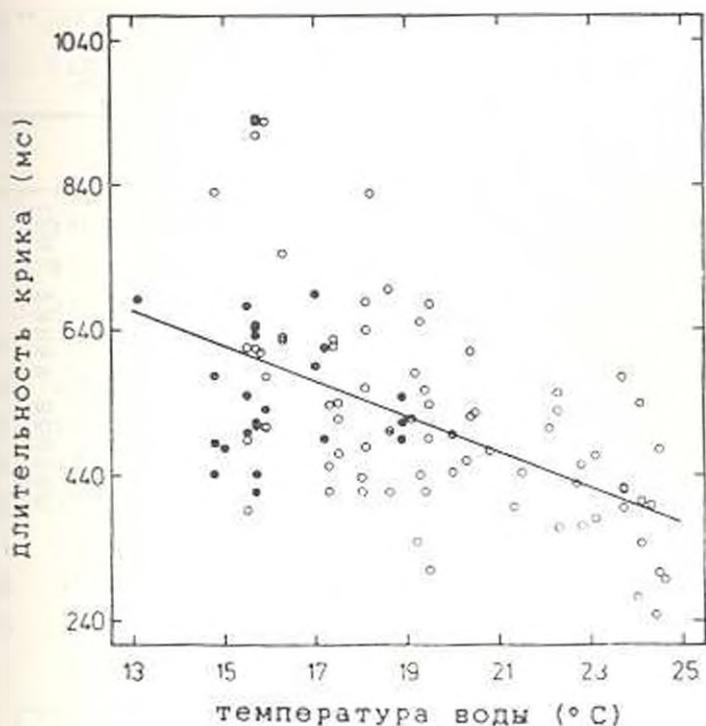
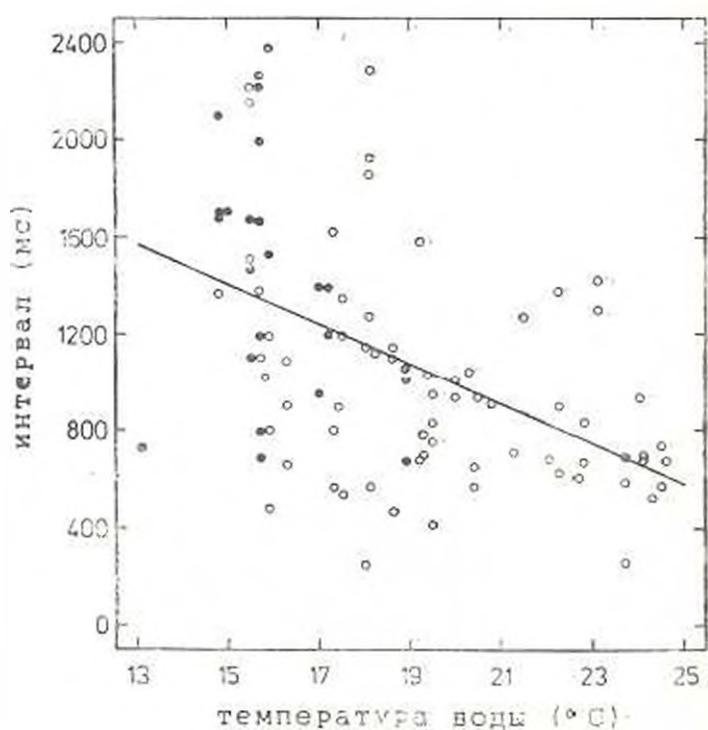


Рис. 3. Длительность крика в зависимости от температуры воды; (3а) у всех записанных криков и (3б) у криков с четырьмя (—), шестью (---) и восьмью (-·-) группами импульсов. Рис. 3а, и также 4—10: неокрашенные окружности—записи под Ереваном, черные окружности—записи на берегу озера Севан, Паралич и р. Мармарик.

Результаты статистического учета. Уровень значимости: \* — 5%; \*\* — 1%;

\*\*\* — 0,1%, ги — группа импульсов; x — температура воды в °С; Y — независимая величина

Величина, Y	n	r	Регрессия	t-крит
Длительность крика	100	-0.53***	$Y = 981.69 - 24.16x$	39.20***
Интервал между криками	94	-0.50***	$Y = 2637.62 - 82.24x$	31.00***
Период крика	94	-0.61***	$Y = 616.31 - 105.91x$	55.00***
Длительность крика при 4 ги	47	-0.88***	$Y = 787.89 - 21.9x$	147.60***
Длительность крика при 6 ги	84	-0.83***	$Y = 1063.15 - 28.36x$	180.60***
Длительность крика при 8 ги	25	-0.89***	$Y = 1484.80 - 41.77x$	92.20***
Длительность ги	100	-0.74***	$Y = 118.82 - 3.09x$	121.21***
Интервал между ги	100	-0.76***	$Y = 95.58 - 3.04x$	134.70***
Импульсы на группу	100	-0.25*	$Y = 22.09 - 0.22x$	6.37*
Период ги	100	-0.85***	$Y = 214.08 - 6.12x$	255.56***
Группы импульсов, с	100	-0.88***	$Y = 2.13 + 0.73x$	343.62***



\* Рис. 4. Интервал между криками.

\* Рисунки 4—10. Некоторые параметры криков в зависимости от температуры воды.

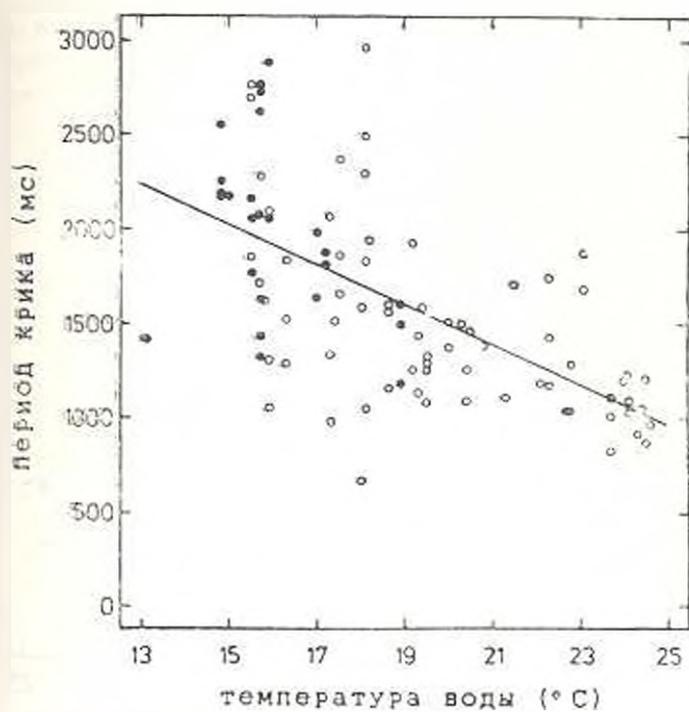


Рис. 5. Период крика.

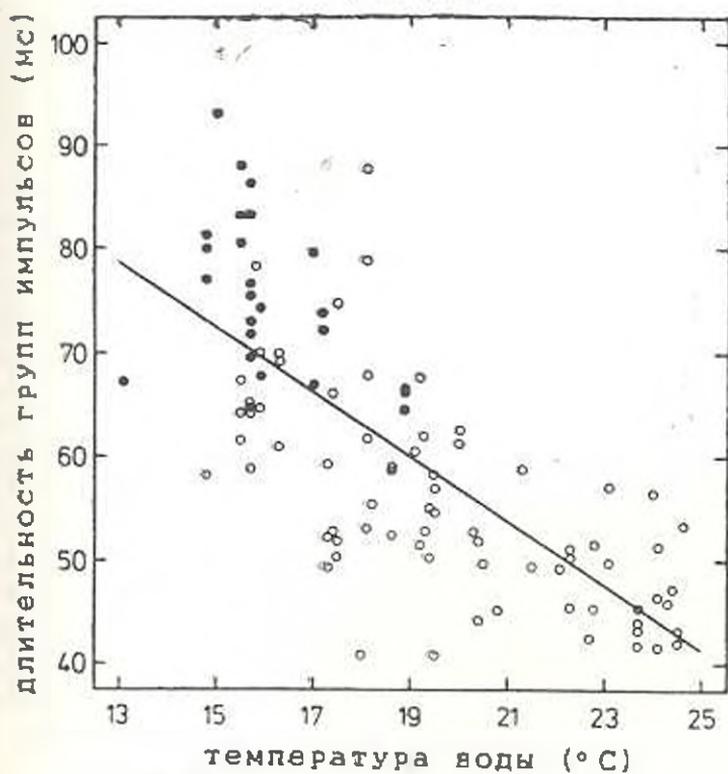


Рис. 6. Длительность групп импульсов.

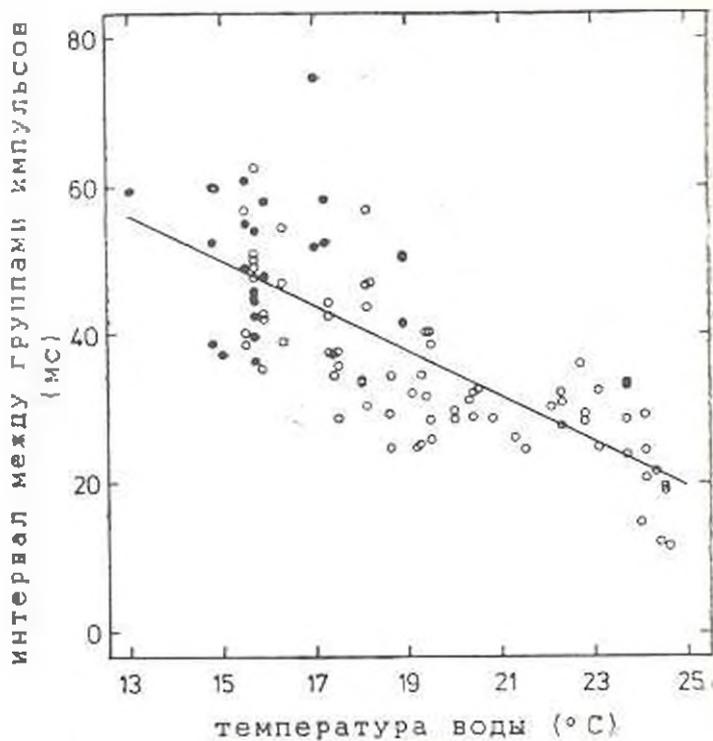


Рис. 7. Интервал между группами импульсов.

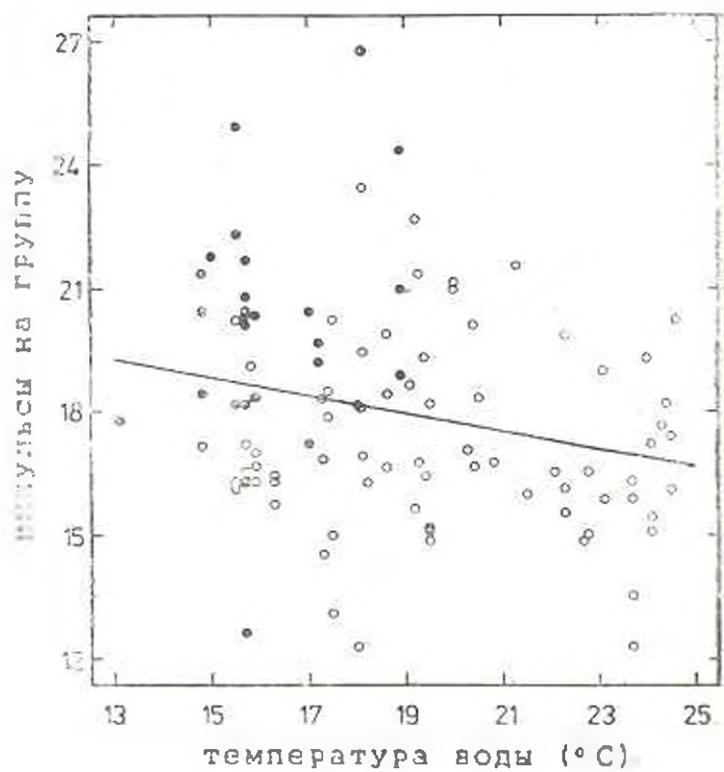


Рис. 8. Число импульсов на группу.

Анализ брачных криков озерных лягушек, обитающих в Армении, показал, что их следует отнести к восточной форме, к которой, как уже доказано, принадлежат лягушки Израиля [5], западной Турции [2] и дельты Нила [1]. Так как исследованные до сих пор места обнаруже-

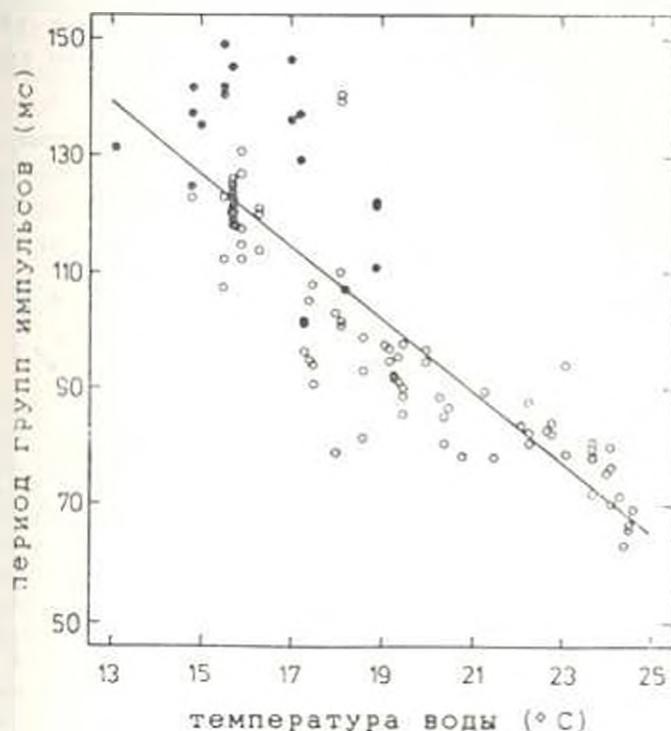


Рис. 9. Период групп импульсов

ния лягушек восточной формы находились вблизи побережья, возникла мысль, что они могли бы быть обитателями побережья и низменности, как и в случае с *Rana epirotica*. Область распространения *R. epirotica* ограничивается прибрежным регионом западной Греции и, согласно нашим данным, находится на высоте до 500 м над ур. м. [10—12]. Согласно полученным в Армении результатам, восточная озерная лягушка не является исключительно обитателем низменности, так как места находки здесь расположены на высоте 1200 м (Ереван) или 1900 м (озера Севан, Парзлич, р. Мармарик). Примечательно, кроме того, то обстоятельство, что новые места находки в Армении находятся только в 950 км от Гурьева, расположенного на северном берегу Каспийского моря и являющегося, согласно Мертенсу и Вермуту [4], *terra typica restricta R. ridibunda*.

О принадлежности озерных лягушек Армении к восточной форме в особенности свидетельствует еще один признак крика, являющийся характерным для озерных лягушек Израиля, Западной Турции и дельты

Нила, который, однако, до сих пор не оценивался. Ход амплитуды групп импульсов брачных криков лягушек всех этих мест тождествен. Каждая группа начинается импульсами с небольшой амплитудой, которая постепенно увеличивается и в середине или во второй половине группы достигает максимума. Максимум хода амплитуды брачных криков *R. ridibunda* в Греции и Югославии, наоборот, следует сразу после начала группы, затем амплитуда сравнительно медленно уменьшается [7, 8].

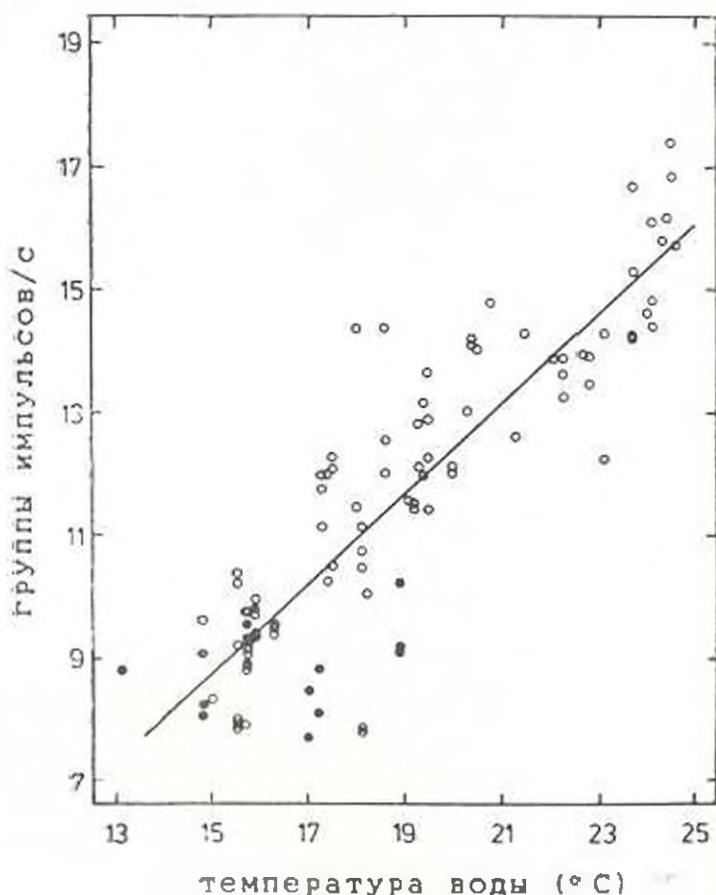


Рис. 10. Группы импульсов.

Хотя принадлежность озерных лягушек в Армении к восточной форме установлена биоакустическими методами, сравнение с озерными лягушками других мест выявляет дифференцированную картину. Брачные крики лягушек в Израиле и дельте Нила идентичны [1]. Расстояние между местами нахождения исследованных популяций в Израиле и Египте составляет только 500 км по прямой линии, в связи с чем следовало ожидать сходства криков, точное сходство, однако, все-таки удивительно. По сравнению с этим в некоторых параметрах озерных лягушек Западной Турции имеются различия [2], еще больше отличаются крики озерных лягушек в Армении. Брачные крики озерных лягушек в Армении больше совпадают с таковыми в Западной Турции, чем в Из-

равле. Это интересно, так как расстояние (1500 км по прямой линии) между местами находки в Армении и Западной Турции больше расстояния от мест находки в Израиле, которые находятся приблизительно в 1200 км от мест в Армении.

Из брачных криков, исследованных до сих пор восточных форм озерных лягушек для криков озерных лягушек в Армении лишь число групп импульсов на крик больше отклоняется. Оно не коррелирует с температурой воды и для 5,86 групп в среднем является меньшим, чем у других восточных озерных лягушек.

Основываясь на результатах исследования новых мест находки восточной формы лягушки в Армении, можно предположить, что эти лягушки обитают во всей Малой Азии и, кроме того, на других территориях Азии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Akof M., S. A., Schneider H. Zool. Anz., 1989, in press.
2. Joermann G., Baran I., Schneider H. Zool. Anz., 220, 5/6, 225—232, 1988.
3. Kunn B., Schneider H. Zool. Anz., 212, 5/6, 273—305, 1984.
4. Mertens R., Wermuth H., Verlag W. Kramer, Frankfurt/Main, 1960.
5. Nevo E., Schneider H. Israel J. Zool., 32, 1, 45—60, 1983.
6. Nevo E., Filippucci M. G. Zool. Anz., 221, 5/6, 118—124, 1989.
7. Schneider H. Bonn.Zool. Beitr., 24, 1/2, 51—61, 1973.
8. Schneider H., Sofianidou T. S. Zool. Anz., 214, 5/6, 309—319, 1985.
9. Schneider H., Sofianidou T. S. In: Rocek Z. (ed.): Studies in Herpetology—Proc. 3rd Meet. Soc. Europ. Herpet., Prague, 561—564, 1986.
10. Schneider H., Sofianidou T. S. and Kyriakopoulou-Sklavounou P. Z. Zool. Syst. Evolut.—forsch., 22, 4, 349—366, 1984.
11. Sofianidou T. S., Schneider H., Astmakopoulos B. Proc. 4th Meet. Soc. Europ. Herpet., Nijmegen, 365—367, 1987.
12. Sofianidou T. S., Schneider H. Zool. Anz., 223, 1/2, 13—25, 1989.

Поступило 8 IX 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10.(42).1989

УДК 577.352.5:577.354

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ *HELIX* ПРИ ТРАНСМЕМБРАННОМ ПОТОКЕ ВОДЫ

А. С. СТЕПАНЯН, А. Г. МАРКАРЯН, М. А. СУЛЕЯМЯНИ,  
В. Б. АРАКЕЛЯН, Г. Е. РЫЧКОВ, С. Н. АЙРАПЕТАН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,  
отдел биофизики, Ереван

Показано, что модель Ходжкина-Хаксли одинаково хорошо описывает процесс изменения калиевой проводимости мембраны *Helix pomatia* как в норме, так и при наличии трансмембранного потока воды. Экспериментальные кривые изменения калиевой проводимости описываются лучше при введении в модель Ходжкина-Хаксли начальной временной задержки, которая уменьшается при наличии трансмембранного потока воды как выходящего, так и входящего направлений.

Յույց է տրվել, որ Հոջկին-Հաքսլիի մոդելը նույն չափանիշներով բնութագրում է կալիումական չափորդականության փոփոխությունը *Helix pomatia*-ի նեյրոնի թաղանթում՝ ինչպես նորմալում, այնպես էլ թաղանթի միջով անցնող ջրի սրահամեմբրանային հոսքի առկայության դեպքում: Բացահայտվել է, որ կալիումական չափորդականության փոփոխության փորձնական կորերը ավելի լավ են նկարագրվում, երբ սկզբնական ժամանակաչի են ուշացումը մտցվում է Հոջկին-Հաքսլիի մոդելի մեջ, որը փոքրանում է թաղանթի միջով ջրի հոսքի առկայությամբ՝ ինչպես մուտքային, այնպես էլ ելքային ուղղության դեպքում:

It has been shown that Hodgkin-Huxley model is well describing the process of change of potassium permeability in a membrane of *Helix pomatia* both under normal conditions and in the presence of transmembrane water flux. It has been established that experimental curves of potassium permeability change are described better, when the initial delay is involved in the Hodgkin-Huxley model, which decreases in the presence of transmembrane water flux both in outside and inside directions.

Калиевая проводимость — трансмембранный поток воды — модель Ходжкина-Хаксли.

Обычно для описания трансмембранных ионных токов и проводимости мембраны используются уравнения Ходжкина-Хаксли, разработанные для мембраны гигантского аксона кальмара [7], а затем модифицированные для нейронов *Aplysia* [6]. Однако в этих уравнениях не учитывается вклад трансмембранного потока воды в процесс возбудимости. Между тем в последнее время исследователями было обнаружено, что при нормальной жизнедеятельности клетки изменение активности Na-K насоса сопровождается изменением объема клетки и потоком воды через мембрану [1, 5].

Тасакки [10] было установлено, что объем гигантского аксона кальмара изменяется во время генерации одиночных потенциалов действия: на восходящей стадии потенциала действия аксон набухает, а на нисходящей стадии — сжимается. Подобная вариация клеточного объема неизбежно сопровождается трансмембранным потоком воды. Механизм действия последнего на трансмембранные ионные токи, потенциал-зависимые каналы, проводимость и на другие свойства мембраны еще до конца не выяснены.

Цель настоящей работы — оценить применимость модели Ходжкина-Хаксли для описания калиевого трансмембранного ионного тока и изменения калиевой проводимости на анализированных нейронах виноградной улитки *Helix pomatia* при наличии трансмембранного потока воды.

**Материал и методика.** Опыты проводили на нейронах охоложденного ганглия виноградной улитки *Helix pomatia*. Одиночные нейроны (70—100 мкм в диаметре) выделяли после 1-часовой обработки ганглия в 0,1%-ном растворе тронал-3. Внутриклеточный диалез в режиме фиксации потенциала на мембране проводили по описанной методике [2, 9].

Использовали растворы следующего состава. Внутренний (в мМ): KF—110, Трис-НСI (pH—7,4)—20. Наружный (в мМ): CaCl<sub>2</sub>—7, MgCl<sub>2</sub>—13, KCl—4, Трис-НСI (pH—7,4)—106. Выходящий поток воды создавали добавлением в наружный раствор 70 мМ сахарозы, входящий поток — уменьшением концентрации Трис-НСI в наружном растворе на 65 мМ.

Симметричный емкостный ток и лавинные токи утечки вычитали из регистрируемого тока путем сложения ответов на деполаризующие и гиперполаризующие смещения потенциала одинаковой амплитуды и длительности на анализаторе ф-37. Кривые изменения калиевого тока выводили на графопостроитель анализатора.

Для количественного анализа опытных данных была использована программа на алгоритмическом языке Фортран-4. Расчеты производили на ЭВМ ЕС 1045.

**Результаты и обсуждение.** Сложность изучения исходящей фазы выходящего калиевого тока вынудила нас ограничиться лишь изучением процесса активации калиевого тока, для описания которого справедлива модель Ходжкина-Хаксли.

$$I_k = g_k n^4 (E_m - E_k), \quad (1)$$

где  $I_k$  — значение выходящего калиевого тока;  $\bar{g}_k$  — максимальное значение калиевой проводимости;  $n$  — переменная активации калиевого тока;  $E_m$  — мембранный потенциал;  $E_k$  — потенциал реверсии калиевого тока.

Ходжкин и Хаксли [7] предложили изучать кинетику калиевого тока через изменение калиевой проводимости в условиях фиксации мембранного потенциала на мембране гигантского аксона:

$$g_k(t) = \left\{ (g_{k0}^4 - g_{k\infty}^4) e^{-\frac{t}{\tau}} + g_{k\infty}^4 \right\}^{\frac{1}{4}}, \quad (2)$$

где  $g_k(t)$  — значение калиевой проводимости в момент  $t$  после подачи тестирующего мембранного потенциала;  $g_{k0}$  — первоначальное значение калиевой проводимости при  $t=0$ , характеризуемое мембранным потенциалом фиксации;  $g_{k\infty}$  — стационарное значение калиевой проводимости при  $t \rightarrow \infty$ , характеризуемое тестирующим мембранным потенциалом;  $t$  — время;  $\tau$  — постоянная активации.

Для этого они от значений тока, получаемого в эксперименте, переходили к значениям калиевой проводимости согласно закону Ома:

$$g_k(t) = \frac{I_k(t)}{E_m - E_k}, \quad (3)$$

где  $I_k(t)$  — значение калиевого тока в момент  $t$ . При этом предполагается, что  $E_k$  не изменяется с течением времени в период активации калиевого тока и равен Нернстовскому потенциалу для данного распределения внутри- и внеклеточных концентраций.

На рис. 1 показаны экспериментальные и теоретические кривые калиевой проводимости при наличии выходящего (Б) и входящего (Г) потоков воды через мембрану соответственно. На рис. 1А и В показаны соответствующие изменения калиевой проводимости в норме. Теоретические кривые строили с помощью ЭВМ таким образом, чтобы среднеквадратическое отклонение (SD) экспериментальных значений от теоретических было минимальным. Влияние потока воды на абсолютные отклонения между теоретическими и экспериментальными кривыми оказалось незначительным, однако начальный период активационной компоненты калиевого тока плохо описывается моделью Ходжкина-Хаксли как в нормальных условиях (рис. 1А и В), так и при наличии выходящего (рис. 1Б) и входящего (рис. 1Г) потоков воды.

Несоответствие начального участка экспериментальных и теоретических кривых изменения калиевой проводимости не помешало Ходжкину и Хаксли удовлетворительно описать потенциал действия на ги-

гантском аксоне кальмара [7]. Поэтому они ограничились лишь предположением о том, что начальный период активационной компоненты описывается экспонентой более высокого порядка и порекомендовали обращать особое внимание на это обстоятельство. Позднее Кейнесом и Роджесом [8] была сделана попытка оценить кинетику начального периода нарастания активационной компоненты натриевого тока. Они отказались от использования экспонент с более высоким порядком, так как при использовании кинетики  $pt^2h$  вместо  $pt^3h$  была хорошо описана стадия начальной временной задержки, однако дальнейшее нараста-

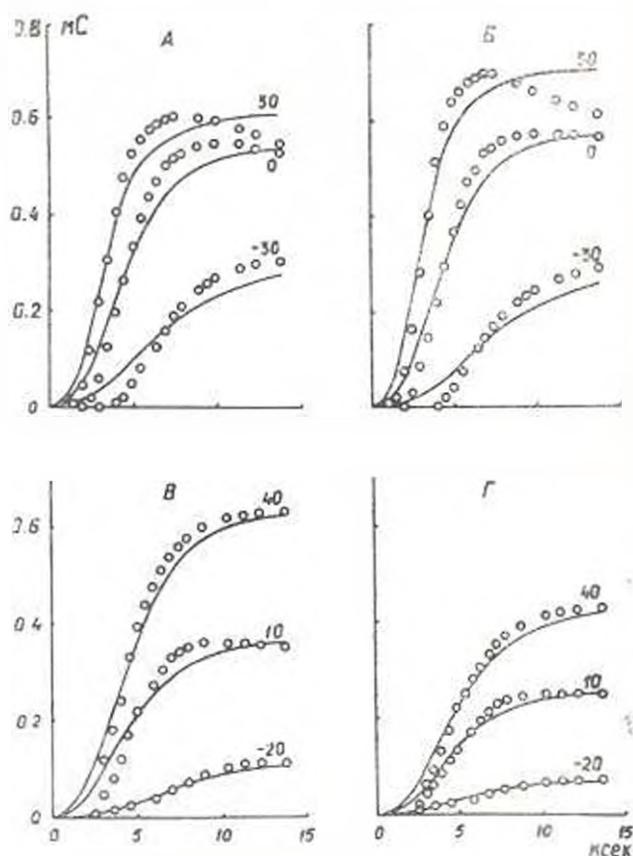


Рис. 1. Семейство кривых изменения каллевой проводимости в норме (А, В) и при наличии трансмембранного выходящего (Б) и входящего (Г) потока воды. Полными кружками показаны экспериментальные значения каллевой проводимости, а непрерывными линиями—теоретические кривые. Потенциал фиксации для А и Б поддерживался на уровне 90 мВ, а для В и Г—на уровне 60 мВ. Значение тестирующих потенциалов указаны в правой части кривых. На верхней и нижней части рисунка приведены сведения для двух различных клеток.

ние натриевой проводимости удовлетворительно описать не удалось. Поэтому они в модель Ходжкина-Хаксли просто ввели начальную временную задержку  $\delta t$ .

На рис. 1 видно, что нарастание каллевой проводимости начинается через определенный период после подачи тестирующего мембранно-

го потенциала. Для описания калиевой проводимости с учетом  $\delta t$  мы использовали следующее выражение:

$$g_k(t) = \begin{cases} [(g_{k0} - g_{k\infty})e^{-\frac{t-\delta t}{\tau}} + g_{k\infty}]^2; & \text{если } t > \delta t \\ g_{k0}; & \text{если } t < \delta t. \end{cases} \quad (4)$$

На рис. 2 и 3 показаны экспериментальные кривые (того же эксперимента, что и на рис. 1, но при тестирующем потенциале +20 мВ) калиевой проводимости (А), абсолютные (Б) и относительные (В) откло-

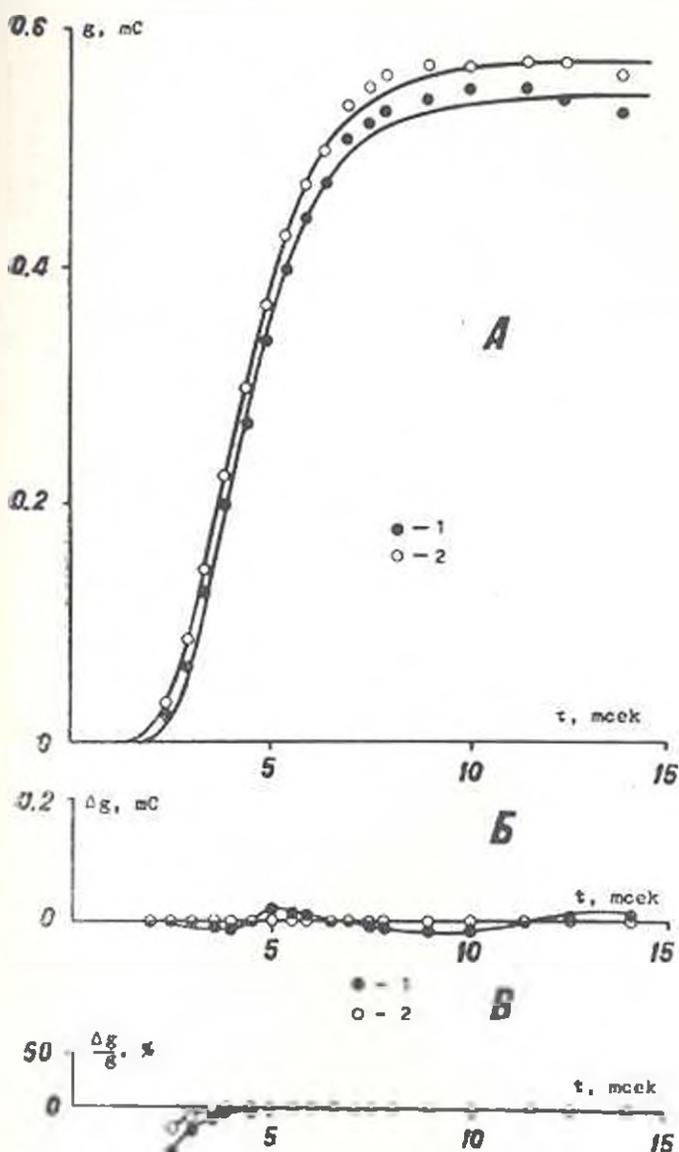


Рис. 2. Описание экспериментальных данных теоретическими кривыми с учетом начальной временной задержки (А), а также абсолютное (Б) и относительное (В) отклонения теоретических кривых от экспериментальных. Условные обозначения: 1, норма; 2, выходящий поток воды.

нения между экспериментальными и теоретическими кривыми в норме и при наличии выходящего и входящего потоков воды через мембрану соответственно. Теоретические кривые получены с помощью уравнения (4). Судя по абсолютным и относительным отклонениям теоретических

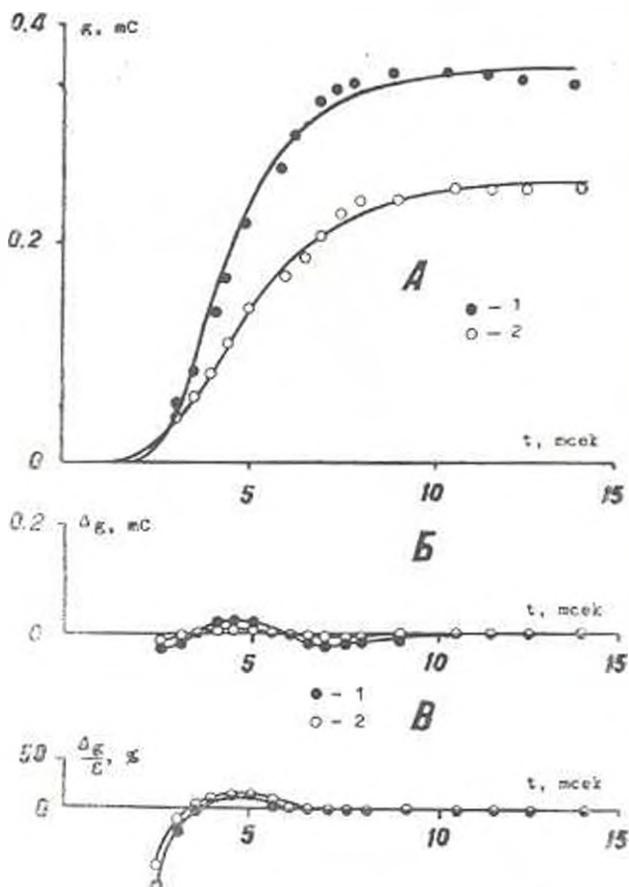


Рис. 3. Описание экспериментальных данных теоретическими кривыми с учетом начальной временной задержки (А), а также абсолютное (Б) и относительное (В) отклонения теоретических кривых от экспериментальных. Условные обозначения: 1. норма; 2. входящий поток воды.

кривых от экспериментальных, можно заключить, что при учете начальной временной задержки модель Ходжкина-Хаксли описывает процесс изменения калиевой проводимости (тока) как в норме, так и при трансмембранном потоке воды. Следует также отметить, что даже при введении  $\delta t$  начальный период активации калиевого тока описывается хуже, чем оставшийся участок кривой нарастания калиевой проводимости, хотя и это отклонение гораздо меньше такового без учета  $\delta t$ .

Если для подгонки теоретических кривых, согласно выражению (2), использовали один параметр  $\tau$ , то для соответствующей подгонки с помощью выражения (4) были привлечены два параметра —  $\tau'$  и  $\delta t$ . Параметры модели Ходжкина-Хаксли находили с помощью вычислительной машины таким образом, чтобы среднеквадратическое отклоне-

ние SD рассчитанной кривой от экспериментальной было минимальным. Соответствующие параметры модели Ходжкина-Хаксли сведены в табл. 1 и 2. В них показаны рассчитанные согласно выражениям (2)

Таблица 1. Изменение экспериментальных и расчетных характеристик мембраны, обусловленное выходящим потоком воды.

V	$\delta_{\text{вх}}$	(мс)	$\tau$	(мс)	$\tau'$	(мс)	$\delta_1$	(мс)
мВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ
-30	0.295	0.286	3.54	3.78	1.95	2.29	3.05	2.78
-20	0.426	0.422	3.06	3.09	1.93	2.03	2.21	2.09
-10	0.511	0.52	2.67	2.63	1.67	1.69	1.83	1.72
0	0.546	0.574	2.35	2.28	1.48	1.48	1.66	1.54
10	0.594	0.637	2.13	1.97	1.39	1.26	1.4	1.38
20	0.599	0.675	1.93	1.81	1.27	1.17	1.25	1.22
30	0.609	0.703	1.77	1.66	1.21	1.1	1.09	1.09

Таблица 2. Изменение экспериментальных и расчетных характеристик мембраны, обусловленное входящим потоком воды.

V	$\delta_{\text{вх}}$	(мс)	$\tau$	(мс)	$\tau'$	(мс)	$\delta_1$	(мс)
мВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ	H	ВхПВ
-20	0.108	0.07	3.29	3.01	3.01	3.01	0.6	0.01
-10	0.192	0.139	2.9	2.87	2.3	2.59	1.23	0.58
0	0.277	0.202	2.63	2.72	1.78	2.08	1.67	1.27
10	0.362	0.253	2.37	2.51	1.53	1.81	1.75	1.44
20	0.442	0.311	2.29	2.57	1.53	1.97	1.5	1.13
30	0.537	0.37	2.31	2.67	1.75	2.22	1.15	0.88
40	0.631	0.428	2.34	2.72	1.8	2.16	1.08	1.04
50	0.693	0.487	2.34	2.68	1.83	2.11	1.02	1.09
60	0.735	0.499	2.28	2.58	1.69	1.97	1.16	1.16

Примечание. H—норма. ВхПВ—поток воды входящего направления, выхПВ—поток воды выходящего направления.

и (4) значения  $\tau$ ,  $\tau'$  и  $\delta_1$ . Введение начальной временной задержки в модель Ходжкина-Хаксли позволило улучшить описание экспериментальных данных как в норме, так и при трансмембранном потоке воды. Это обусловлено уменьшением SD в  $5,56 \pm 1,74$ ,  $5,35 \pm 2,04$ ,  $3,75 \pm 2,03$  и  $3,42 \pm 1,82$  раза для серий кривых, представленных на рис. 1, А, Б, В и Г соответственно.

Как при выходящем (табл. 1), так и при входящем (табл. 2) потоках воды начальная временная задержка  $\delta_1$  уменьшается. Изменение как  $\tau$ , так и  $\tau'$  при выходящем и входящем потоках воды носит неодинаковый характер: при выходящем потоке воды они уменьшаются, а при входящем—увеличиваются (по крайней мере при значениях тестирующего потенциала не менее  $-10$  мВ).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Айрипетян С. И., Рычков Г. Е. ДАН СССР, 285, 6, 1464—1467, 1985.
2. Крыжаль О. А., Педопличко В. И. Нейрофизиология, 9, 644—646, 1977.

3. Чинмаков И. В., Сорокина Э. А. *Нейрофизиология*, 18, 518—525, 1986.
4. *Adelman W. J., Patti Y. & Senft J. P. J. Membrane Biol.*, 13, 387—420, 1973.
5. *Arcapetyan S. N. & Sutymanyan M. A. J. Comp. Biochem. Physiol.*, 61A, 571—575, 1979.
6. *Connor J. A., Stevens C. F. J. Physiol.*, 213, 1—19, 1971.
7. *Hodgkin A. & Huxley A. J. Physiol.*, 117, 500—544, 1952.
8. *Keynes R. D. and Rojas E. J. J. Physiol.*, 255, 157—189, 1976.
9. *Kostyuk P. G. Annu. Rev. Neurosci.*, 5, 107—120, 1982.
10. *Tasaki I., Nakaya T. Biomedical Research*, 7, 27—32, 1986.

Поступило 12.IV 1989 г.

Биол. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989

УДК 612.822

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕРЕНТОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ В ПОЯСНОЙ ИЗВИЛИНЕ

И. М. ИПЕКЧЯН, О. Г. БАКЛАВАДЖИИ

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН АрмССР, Ереван

Показано, что поле 7 теменной коры, в отличие от поля 5, проецируется в поясную извилину. Эфференты поля 7 оканчиваются в части поясной извилины, расположенной над телом мозолистого тела между средней частью перегородки и перекрестом зрительных нервов. Место окончания этих эфферентов соответствует полям 23, 31 и передней части поля 30.

*Ցույց է արվել, որ կաստիլի գաղաթի կեղևի 7-րդ դաշտը, ի տարբերություն 5-րդ դաշտի, պրոյեկցիում է գոտկավոր դաշտում: 7-րդ դաշտից սկսվող էֆերենտները վերջանում են գոտկավոր դաշտի այն նախվածում, որը գտնվում է կոշտահաման մարմնի մարմնային մասի վրա՝ ժիջնորմի և տեսողական եկրվերի խաչման միջև: Այն նամայատարանում է 23, 31 և 30-րդ դաշտերի առաջնային մասին:*

It has been shown that area 7 of top cortex, in difference from area 5, is projected in gyrus cinguli. The area 7 efferents terminate in the part of the gyrus cinguli, localized on the corpus of the corporis callosi between the middle part of the septum and chiasma of nervi optici. The place of termination of these efferents corresponds to 23, 31 areas and anterior part of the area 30.

*Кора теменная—поясная извилина—эфференты поля 7.*

Основанием для проведения настоящего исследования послужили противоречивость литературных данных, касающихся окончания эфферентов теменной коры в поясной извилине, и отсутствие морфологических исследований по топографическому и количественному распределению ассоциативных волокон полей 5 и 7 в разных полях лимбической коры.

**Материал и методика.** Опыты проводили на кошках. Под нембуталовым наркозом (45 мг/кг веса) электролитически разрушали поля 5 и 7 теменной коры. Сроки послеоперационной жизни 3—8 суток. Животных убивали перфузией 10%-ного нейтрального формалина на физиологическом растворе. Срезы мозга окрашивали по методу Наута-Тигаке [8] для выявления дегенерировавших волокон и галлоцанином— для определения поля коры, в котором оканчиваются волокна. Поля теменной коры

дифференцировались согласно Хасслеру, Мус-Клементу [6], а поля поясной извилины—по Гуревич, Хачатурину, Хачатурову [2]

**Результаты и обсуждение.** При разрушении передней супрасильвиевой и латеральной извилины, соответствующих полю 5 в поясной извилине, дегенерированных волокон не обнаружено. Следовательно, поле 5 не проецируется в лимбическую кору.

При разрушении передней и средней частей средней супрасильвиевой извилины, соответствующих полю 7, дегенерированные волокна направляются через подкорковое белое вещество ко дну спленальной борозды (рис. 1, 1—5). Затем они изгибаются дно спленальной борозды

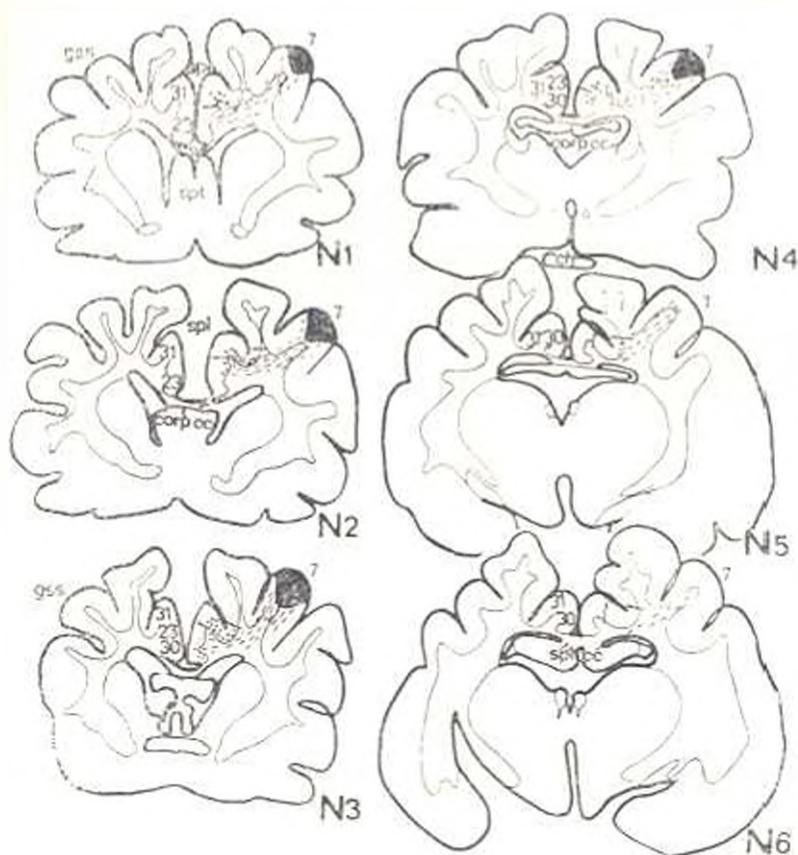


Рис. 1. Фронтальная серия срезов мозга кошки с разрушенным полем 7. Очаг разрушения закрашен тушью, черточками показаны дегенерированные волокна, точками дегенерированные претерминали. Обозначения: *ch*—перекрест зрительных нервов, *corp cc*—тело мозолистого тела, *gss*—супрасильвиевая извилина, *spl*—спленальная борозда, *spl cc*—утолщение мозолистого тела, *spl*—переторodka.

и проходит медиально в поясную извилину. Переход дегенерированных волокон в поясную извилину начинается на уровне средней части перетордки (рис. 1, 1). Эти волокна оканчиваются в ветви поясной извилины, расположенной над телом мозолистого тела в области заднего (поле 31) и медиального (поле 23) лимбических полей (рис. 1, 1, 2). Кзади количество дегенерированных волокон нарастает, достигая

максимума в части поясной извилины, расположенной над телом мозолистого тела между задним краем перегородки и перекрестом зрительных нервов (рис. 1, 3, 4). Место окончания дегенерированных волокон соответствует полям 31, 23 и переднему краю заднего ретролимбического поля—30. Кзади от этого уровня количество дегенерированных волокон убывает и единичные волокна прослеживаются в части поля 31, расположенной на дне спленальной борозды (рис. 1, 5). В области поясной извилины, локализованной над утолщением мозолистого тела, дегенерированных волокон не обнаружено (рис. 1, 6). Таким образом, претерминальная дегенерация занимает большую часть полей 23, 31 и передний край поля 30 (рис. 2). Наибольшее количество дегенериро-

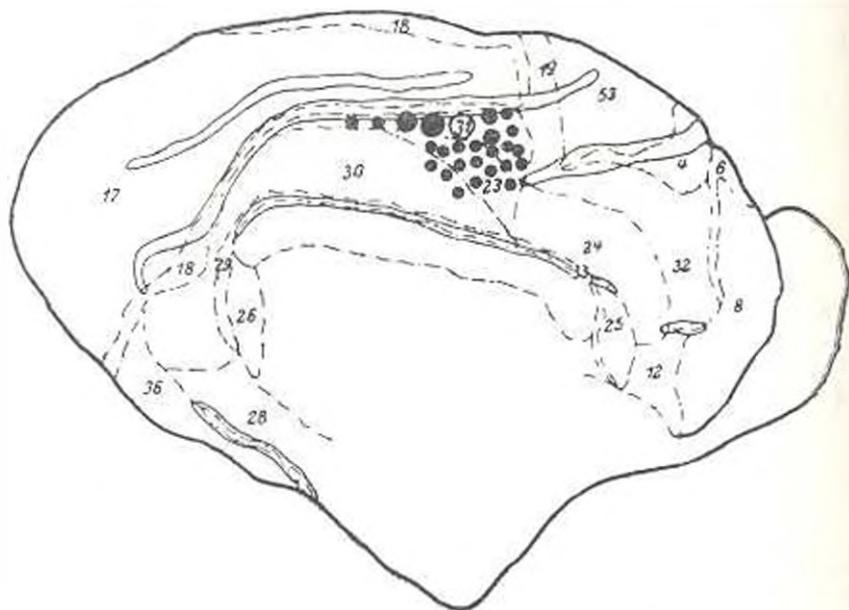


Рис. 2. Медиальная поверхность полушария мозга кошки. Кружками указана область окончания дегенерированных волокон в полях 23, 31 и 30 поясной извилины. ● — небольшое количество дегенерированных терминалей, ● — выраженная дегенерация, ● — наибольшее количество дегенерированных терминалей.

ванных претерминалей имеется в части полей 23 и 31, расположенной над телом мозолистого тела между задним краем перегородки и перекрестом зрительных нервов. Плотность дегенерированных волокон убывает в передне-заднем направлении от указанных частей полей 23 и 31. Что касается послойного распределения дегенерированных волокон, то нами показано, что в полях 23, 30 и 31 густая претерминальная дегенерация проникает в слои III и IV. В V и VI слоях преобладают проходящие волокна.

Результаты нашего исследования не соответствуют литературным данным, указывающим на наличие проекции полей 5 и 7 в поясную извилину [3, 5] или отрицающим ее существование [1]. Они подтверждают данные Кавамура [7] относительно проекции только поля 7 в

поясную извилину. При исследовании топографического распределения эфферентных волокон поля 7 и отдельных полях поясной извилины мы установили, что эти эфференты оканчиваются лишь в определенной зоне указанной извилины, расположенной над телом мозолистого тела в области задней (поле 31), медиальной (поле 23) и передней части заднего ретросплендального (поле 30) поля лимбической коры.

Определение количественного распределения эфферентов поля 7 в указанных полях поясной извилины (23, 31, 30) наибольшее количество их выявило в части полей 23 и 31, расположенной над телом мозолистого тела между задним краем перегородки и перекрестом зрительных нервов (рис. 2). Кпереди и кзади от указанной области количество дегенерированных волокон уменьшалось до полного их исчезновения в области лимбической коры, расположенной на уровне колена и утолщения мозолистого тела.

Полученные нами данные об отсутствии связей лимбической коры с полем 5 и преимущественном окончании эфферентов поля 7 в полях 23, 31 и 30 совпадают с результатами исследований Вогт, Пандия [9], полученными на обезьянах методами меченых аминов и пероксидазы хрена. Можно предположить, что снижение эмоционального поведения, вызванного разрушением поля 7 [4], явилось следствием прерыва волокон, связывающих поле 7 с полями 23, 31 и 30 поясной извилины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бибаян С. А. Изв. АН АрмССР, биол. науки, 10, 6, 75—82, 1957.
2. Гуревич М. О., Хачатурян А. А., Хачатурян А. В кн.: Высшая нервная деятельность, 171—184, М., 1929.
3. Замбрицкий Н. А. В кн.: Лимбическая область большого мозга, М., 1972.
4. Малюкова И. В. В кн.: Ассоциативные системы мозга, 241—246, Л., 1985.
5. Gobbel W. G., Liles G. W. J. Neurophysiol., 8, 4, 257—266, 1945.
6. Hassler R., Muhs-Clement K. J. J. Hirnforschung, 5, 6, 377—420, 1964.
7. Kawamura K. Brain Res., 51, 23—40, 1973.
8. Nauta W. J. H., Gigax P. A. Stain Technol., 29, 1, 91—93, 1954.
9. Vogt B. A., Pandya D. N. J. Comp. Neurol., 262, 2, 271—289, 1987.

Поступило 28.XI 1988 г.

## КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ФОСФОЛИПИДОВ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС

А. М. ДАВТЯН, А. О. ВАРДЕВАНЯН, Л. М. ОВСЕЯН, К. Г. КАРАГЕЗЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии,  
Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Идентифицировано 7 индивидуальных представителей фосфолипидов хроматина, впервые выявлен лизофосфатидилхолин. Показано увеличение суммарного содержания фосфолипидов как при гормональной, так и негормональной формах индукции, причем содержание одних индивидуальных фосфолипидов хроматина увеличивается, а других—уменьшается. Гормональные и негормональные формы индукции различаются по степени выраженности и глубине перестроек фракций фосфолипидов.

Իդենտիֆիկացվել են քրոմատինի ֆոսֆոլիպիդների 7 անհատական ներկայացուցիչներ, առաջին անգամ բացահայտվել է լիզոֆոսֆատիդիլխոլինը: Գույց է տրվել ֆոսֆոլիպիդների զուգարային պարունակության ավելացումը ինդուկցիայի ինչպես հորմոնայ, այնպես էլ ոչ հորմոնայ մեթոդի դեպքում, բնօրրում նկատվել է քրոմատինի ֆոսֆոլիպիդների որոշ անհատական ներկայացուցիչների ավելացում, իսկ մյուսների՝ նվազում: Հորմոնայ և ոչ հորմոնայ ինդուկցիայի մեթոդ տարբերվում են ֆոսֆոլիպիդների արտահայտման աստիճանով և վերափոխման խորությամբ:

The 7 individual phospholipids of the chromatin are identified, the lysophosphatidylcholin is identified for the first time. The summary content of the phospholipids increases not only at hormonal, but also at non-hormonal forms of induction. At the same time some of the individual phospholipids increase and others—decrease. At the hormonal and non-hormonal forms of the induction deep changes of the fractions of the phospholipids are obtained.

*Фосфолипиды—хроматин—индукция.*

В наших предыдущих исследованиях было показано, что повышение активности катаболических ферментов аминокислотного обмена в печени крыс при введении животным смеси аминокислот является результатом биосинтеза соответствующих ферментов. Это явление, названное негормональной индукцией, осуществляется, как и следовало ожидать, вовлечением в механизм хроматина. При этом значительно повышается атакующая способность хроматина ДНК-азами (I и II) с увеличением выхода ее активной фракции [5, 6]. При негормональной индукции происходят также определенные сдвиги в белковом составе и показателях плавления активной фракции хроматина [6].

Методами кругового дихроизма и термической денатурации выявлены определенные конформационные изменения хроматина при негормональной индукции [2, 6]. Существенно, что и при гормональной индукции (гидрокортизоном) происходят определенные изменения в упо-

Сокращения: МФН—монофосфоинозитиды, ЛФХ—лизофосфатидилхолины; СФМ—сфингомиелины; ФХ—фосфатидилхолины, ФС—фосфатидилсерины, ФЭ—фосфатидилэтанолламины; К—кардиолипины.

мянутых показателях хроматина, однако указанные изменения при этих двух формах индукции имеют свои существенные различительные особенности. Очевидно, они отражают различия в происходящих при этом структурных перестройках хроматина и, следовательно, в механизмах индукции в целом.

В настоящее время получен ряд данных, свидетельствующих о том, что входящие в состав хроматина фосфолипиды и нейтральные липиды играют важную роль в структурной организации и функциональной активности генома [1, 7—9, 12, 13]. Установлено, что при воздействии гидрокортизона происходят существенные количественные сдвиги фосфолипидов и нейтральных липидов хроматина [3, 4].

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения качественных и количественных сдвигов фосфолипидов хроматина печени крыс при гормональной и негормональной индукции.

**Материал и методика.** Исследования проводили на белых беспородных крысах с массой тела 100—150 г. Животных забивали через 4 и 5 ч после введения гидрокортизона и смеси аминокислот [5]; хроматин из ядер печени крыс выделяли описанным методом [15].

Экстракцию фосфолипидов производили по [10]. Фракционирование индивидуальных фосфолипидов осуществляли с помощью одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля марки КСК в системе растворителей хлороформ—метанол—аммиак в соотношении 65:35:5. Идентификацию пятен фосфолипидов производили с помощью химически чистых свидетелей производства «Sigma» (США). Минерализацию липидов для определения осуществляли в среде с борной и азотной кислотами с последующим пересчетом его содержания на мкг/1 мг сухого остатка хроматина.

**Результаты и обсуждение.** В таблице показано, что из хроматина печени животных методом хроматографии в тонком слое силикагеля удалось фракционировать и идентифицировать 7 индивидуальных представителей фосфолипидов, располагающихся от линии старта в следу-

Количественные изменения фосфолипидов, связанных с хроматином (в мкг липидного фосфора на 1 мг сухого остатка хроматина) печеночной ткани интактных белых крыс (1), под действием аминокислот (2) и гидрокортизона (3).

Фосфолипиды	1	2	% разницы от 1	3	% разницы от 1
МФИ	0,23±0,01	0,27±0,01 <sup>a</sup>	+17	0,30±0,01 <sup>a</sup>	+32
ЛФХ	0,19±0,01	0,17±0,01 <sup>a</sup>	-9	0,16±0,01 <sup>b</sup>	-14
СФМ	0,17±0,01	0,18±0,01 <sup>c</sup>	+3,5	0,28±0,01 <sup>a</sup>	+62
ФХ	0,67±0,04	0,59±0,01 <sup>c</sup>	-10	0,43±0,01 <sup>a</sup>	-36
ФС	0,18±0,02	0,37±0,01 <sup>d</sup>	+105,5	0,39±0,01 <sup>a</sup>	+118
ФЭ	0,39±0,01	0,47±0,01 <sup>d</sup>	+18	0,51±0,01 <sup>a</sup>	+28
К	0,14±0,01	0,16±0,01 <sup>e</sup>	+16	0,16±0,01 <sup>b</sup>	+16
Сумма ФЛ	1,975	2,223		2,250	

Примечание: приведенные в таблице буквенные обозначения соответствуют следующим степеням достоверности: P<0,001—а, 0,002—б, 0,05—г, 0,1—д, 0,25—е

ющей последовательности: МФИ, ЛФХ, СФМ, ФХ, ФС, ФЭ и К. Сумма указанных соединений в составе печеночного хроматина колеблется в пределах 1,975 мкг липидного фосфора на 1 мг сухого хроматина. В

количественном отношении преобладают ФХ (33,9%), несколько ниже содержание ФЭ (19,7%) и намного ниже МФИ (11,6%), ЛФХ (9,6%), ФС (9,1), СФМ (8,6%), К (7%). О низком содержании К и хроматине сообщалось и другими авторами [3, 9]. Следует подчеркнуть что впервые в составе хроматина выявлены ЛФХ.

Под воздействием гидрокортизона, как видно из той же таблицы, суммарное содержание фосфолипидов повышается на 13,9%, а при введении смеси аминокислот—на 12,5%. При этом количество ФС увеличивается на 118 и 105,5% соответственно, МФИ—на 32 и 17%, ФЭ—на 28 и 18%, К—на 26 и 16%, СФМ—на 62 и 3,5% и уменьшаются ФХ—на 30 и 10% и ЛФХ—на 14 и 9%. Таким образом, при гормональной индукции на фоне увеличения содержания суммарных фосфолипидов происходит разнонаправленное изменение содержания отдельных представителей фосфолипидов.

Увеличение содержания ФЭ, СФМ и К и уменьшение содержания ФХ в хроматине печени крыс при гидрокортизоновой индукции отмечалось и другими исследователями [3].

Наблюдаемое в наших экспериментах уменьшение количества ФХ не сопровождается возрастанием уровня ЛФХ, являющегося продуктом деацилирования ФХ под действием соответствующих фосфолипаз. Наоборот, уровень ЛФХ имеет даже некоторую тенденцию к уменьшению.

Таким образом, уменьшение содержания ФХ при индукции осуществляется иным механизмом, не связанным с действием фосфолипаз. Полученные данные позволяют заключить, что при индукции возможны взаимопереходы фосфолипидов-глицеридов, а именно ФС, ФЭ и ФХ хроматина. Процесс трансформирования этих соединений друг в друга установлен как в нормально метаболизирующих тканях, так и при различных экстремальных и патологических состояниях организма. Четко установлено, что ФХ деметилированием превращается в ФЭ, а взаимопревращение ФЭ и ФС осуществляется фосфатидилсериндекарбоксилазой. На основании результатов наших экспериментов можно допустить возможность переноса при индукции фосфорилхолина с молекулы ФХ на молекулу СФМ, что предполагается также другими авторами [13, 14].

Полученные нами данные позволяют заключить, что при обеих формах индукции происходят глубокие количественные сдвиги в фосфолипидах хроматина. Очевидно, эти изменения могут играть существенную роль в механизмах индукции. Однако при сравнении сдвигов, имеющих место при гормональной и негормональной индукциях, выявляются определенные различия. На фоне одинаковой направленности эти сдвиги различаются по степени выраженности. Наиболее наглядными являются сдвиги в содержании СФМ. Если при гидрокортизоновой индукции содержание этого фосфолипида хроматина увеличивается на 62%, то при негормональной индукции—всего на 3,5%. Столь выраженная разница в глубине фосфолипидных перестроек хроматина предполагает и существенные различия в механизмах гормональной и негормональной индукции.

Факт увеличения содержания суммарных фосфолипидов в хроматине печени крыс при индукции находится в полном соответствии с тем обстоятельством, что при старении параллельно снижению транскрипционной активности генома происходит уменьшение количества общих фосфолипидов в хроматине печени [9].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алесенко А. В. В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. Под ред. С. Е. Северина. 4—16. М., 1981.
2. Вардеванян П. О., Тирацунян С. Г., Галстян Р. Г., Шибид Г. Х., Давтян М. А. Вопросы мед. химии, 1989 (в печати).
3. Геворкян Э. С., Явроян Ж. В., Паносян Г. А. Укр. биох. журн., 57, 4, 78—81, 1985.
4. Геворкян Э. С., Явроян Ж. В., Паносян Г. А. Укр. биох. журн., 59, 5, 87—90, 1987.
5. Давтян М. А., Вардеванян П. О., Тирацунян С. Г., Шибид Г. Х. Биохимия, 52, 5, 737—742, 1987.
6. Давтян М. А., Вардеванян П. О., Тирацунян С. Г., Шибид Г. Х. Биолог. журн. Армении, 11, 1, 38—45, 1988.
7. Карагезян К. Г., Овсепян Г. А., Демин Ю. М., Овсепян Л. М. Нейрохимия, 7, 3, 397—404, 1988.
8. Левитина М. В. Успехи современной биологии, 80, 1, 57—70, 1975.
9. Никитин В. Н., Полова Л. Я., Лоборнева Л. И. В кн.: Актуальные проблемы возрастной физиологии и биофизики. 32—36. Киев, 1979.
10. Folch S., Lees M., Stanley G. A. J. Biol. Chem., 226, 497—509, 1957.
11. Goureau M. F., Rankin S. Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 941—948, 1970.
12. Hoveyan G. A. and Karageuzyan K. G. ISI—JOCSS World Congress, Tokyo, 360, 1988.
13. Murray D. K., Ruhmen—Weanhold A. R., Nelson D. H. Endocrinology, 105, 774—777, 1979.
14. Nelson D. H., Weanhold A. R., Murray D. K. J. Steroid Biochem., 14, 321—325, 1981.
15. Umansky S. R., Kovalev Y. S., Tokarskaya V. I. Biochim. Biophys. Acta, 39, 242—247, 1975.

Поступило 28.IV 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10 (42), 1989

УДК 631.523:575.127.2

### ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ САМОФЕРТИЛЬНОСТИ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ

А. М. АГАДЖАНИЯН, Е. М. НАВАСАРДЯН, К. С. АДАМЯН

Институт земледелия Госагропрома АрмССР, г. Эчмиадзин

В поколениях гибридов культурного томата с дикой *Lycopersicon hirsutum f. glabratum* установлена зависимость формообразовательного процесса от уровня самосовместимости исходных растений дикяря. Наибольший размах фенотипической изменчивости и самый высокий выход хозяйственно-полезных форм наблюдаются в потомствах гибридов, полученных с участием автофертильных растений дикого томата.

Մշակված սոմատի և վարրի *L. hirsutum* f. *glabratum*-ի խաչակրումից ստացված ճիբրիդային սերունդներում բացահայտվել է ձևադրսցման սրտցւեր կախմտ-տուժյունը վարրի տեսակի էլանչուժային բույսերի ինքնաֆերտիլության մակարդակից: Ամենամեծ ֆենտուրային փոփոխութունները և տեստասպեւ-օգտակար ձևերի ամենամեծ էլրը գրանցվել են վարրի սոմտայի ինքնաֆերտիլ բույսերի մտանակցությանը ստացված ճիբրիդային սերունդներում:

In generations of hybrids of culture tomato with wild *L. hirsutum* f. *glabratum* it has been established the dependence of formation process on the level of original plant's autofertility of wild form. The greatest swing of phenotypic changeability and the highest exit of economically-useful forms are found in progenies of hybrids, obtained with the participation of autofertile plant of wild tomato.

Межвидовые гибриды томата—формообразовательный процесс—самосовместимость—окраска плодов.

Известно, что у гибридов первого поколения от скрещивания культурного томата с дикими зеленоплодными видами проявление многих признаков заметно отклоняется в сторону дикого вида [7, 8]. Существенное влияние на характер расщепления в последующих поколениях оказывает система размножения скрещиваемых видов. Так, например, гибриды, полученные от скрещивания самосовместимого культурного томата с диким самонесовместимым видом *L. hirsutum* также самонесовместимы. В последующих поколениях у них происходит спонтанное замещение генома культурного вида геномом дикого, вследствие чего усиливается проявление признаков отцовского родителя [2]. В таких случаях широкий формообразовательный процесс наблюдается при беккроссировании гибридов  $F_1$  на культурный вид [7—9]. Когда же и скрещиваниях с культургеном участвуют дикие самофертильные формы, такие, например, как *L. hirsutum* f. *glabratum* и *L. pennellii* и *Solanum pennellii*), полученные гибриды характеризуются более широкой генетической изменчивостью и среди них уже встречаются типы, близкие к культурному томату [1, 5, 6].

В настоящем сообщении приведены результаты изучения фенотипической изменчивости и продуктивности в ряду поколений гибридов, полученных от скрещивания культурного томата с различными образцами самофертильной разновидности *L. hirsutum* f. *glabratum*.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили три поколения гибридов, полученных от скрещивания сорта *Midseason 427* с автофертильной линией 7924 дикого томата *L. hirsutum* f. *glabratum* и пять—от скрещивания сорта Арзаванди 45 с линией 2970, представляющей как самофертильными (SF), так и самонесовместимыми (SI) растениями.  $F_1$  получено опылением кастрированных цветков соответствующих сортов культурного томата смесью пыльцы группы растений линии 7924 и пыльцой с отдельных растений линии 2970. Гибридные растения всех поколений подвергались принудительному самоопылению. Для получения  $F_2$  и последующих поколений использовали семена как от самоопыления, так и от свободного опыления. Проводили фенотипические наблюдения и описание растений. В конце вегетации подсчитывали количество завязавшихся плодов, отмечали их окраску и величину.

Исходные формы существенно различаются по многим морфологическим признакам. Сорта культурного томата имеют крупные, жесткие, темно-зеленые листья без

ложноприлистников, соцветия без прицветников, цветки с коротким невыступающим столбиком, плоды многокамерные, красивые, диаметром 5—6 см. Образцы дикого томата—крупные растения с тонкими, разветвленными, частично лежащими стеблями. Листья светло-зеленые, с ложноприлистниками, соцветия с прицветниками, цветки с выступающим до 1—2 мм столбиком, плоды темно-зеленые, двухкамерные, в диаметре 1—2 см.

*Результаты и обсуждение.* Гибриды  $F_1$  от скрещивания культурного томата (сорт *Midseason 427*) с линией 7924 представляют собой крупные жизнеспособные растения, значительно превосходящие по мощности родительские формы. Листовые сегменты как у *glabratum*, но значительно крупнее, имеются ложноприлистники. Соцветия с прицветниками, величина цветков промежуточная, рыльце выступает над концом тычиночной колонки, но меньше, чем у *glabratum*. Плоды ярко-желтые, 2—3-камерные, 1,5—2,5 см в диаметре. По количеству завязавшихся плодов гибриды существенно превосходят исходные формы. Так, среднее число плодов на растение у гибридов  $F_1$  составило 266,2, тогда как у дикого томата—135,1, а у материнского сорта—30—40. Предполагается, что интенсивное плодообразование у гибридных растений, обусловленное, в частности, их мощностью, связано также с усилением самосовместимости по сравнению с *glabratum* [3].

Среди гибридов второго поколения большого фенотипического разнообразия не отмечено. В большинстве случаев проявление многих признаков носило промежуточный характер с некоторыми отклонениями в сторону одного из родителей. Из 47 изученных гибридов  $F_2$  значительную часть (18 растений) составляли растения типа  $F_1$ —мощные, толстостебельные, высокорослые, с широкими листьями, средними или крупными цветками, обычно хорошо плодоносящие. Другая группа растений (5 растений) по мощности значительно уступала растениям типа  $F_1$ , это более нежные, с мелкими или средними цветками растения, относительно плохо плодоносящие. Растений с признаками, приближающими их к культурному томату, было всего три. Это небольшие растения со сравнительно крупными (2,5—3,5 см в диаметре) и более интенсивно окрашенными плодами. Отмечено также появление растений с тонкими и гибкими стеблями, сильно- или слабоветвящимися. Листья у них очень узкие, с мелкими долями, цветки небольшие, бледные, иногда со слаборасходящимися тычиночками. Как правило, такие растения плохо плодоносили, окраска плодов в основном зеленая или желто-зеленая.

Окраска плодов у растений  $F_2$  в большой степени зависела от уровня их самосовместимости. Известно, что по самосовместимости гибриды *L. esculentum* × *L. hirsutum* f. *glabratum* значительно превосходят дикую форму, но не достигают уровня таковой у культурного томата, о чем свидетельствует безрезультатное, как правило, опыление гибридных растений пыльцой *L. esculentum* [11]. Однако, по нашим данным, растения  $F_2$  по реакции на самосовместимость и совместимость с пыльцой культурного томата четко разделились на три группы: 1—самосовместимые и совместимые с культурным; 2—самосовместимые, но несовместимые с культурным и 3—самонесовместимые и несовместимые с

культигеном. Очевидно, что наиболее автофертильными являются растения первой группы. Так вот, окраска и величина плодов на растениях  $F_2$  в большой степени зависела от того, к какой группе самосовместимости они относятся. Растения первой, наиболее самосовместимой, группы имели сравнительно более крупные и более интенсивно окрашенные плоды. Окраска плодов у них варьировала от оранжево-бурой до желтой. Во второй группе растений окраска плодов менее интенсивная—желтая, лимонная, желто-зеленая, зеленая. Растения третьей группы образовали только светло-желтые и зеленые плоды. Обнаружена также тесная связь между уровнем самосовместимости растений и их плодообразовательной способностью. Так, в условиях свободного опыления число плодов на растение в первой группе составило 225,4, второй—177,0 и третьей—только 19,6. В среднем этот показатель для растений  $F_2$  был равен 113,2. Таким образом, по продуктивности  $F_2$  более чем в 2 раза уступает гибридам  $F_1$ .

Третье поколение гибридов было представлено потомством от самоопыления и свободного опыления трех растений I группы, трех растений II группы и свободного опыления двух растений III группы. В общей сложности проанализировано 167 растений, из которых плодоносило только 104. Количество завязавшихся на растениях плодов составляло от 1 до 70 и лишь у пяти растений—свыше 100. При этом не отмечено какой-либо зависимости продуктивности семей  $F_3$  от уровня самосовместимости исходных растений  $F_2$ . Среднее число плодов на растение в различных семьях  $F_3$  составило всего 3,7—13,0% от продуктивности гибридов  $F_1$ . Бесплодные растения, в единичном количестве появляющиеся в  $F_2$  и  $F_3$  достигают 23,3—60,6%. Такое резкое понижение продуктивности гибридов, несомненно, является следствием геномного и плазмемного несоответствия скрещиваемых видов.

Анализ 81 растения  $F_3$  в аспекте проявления морфологических признаков родительских форм показал, что большая часть (45) растений фенотипически относилась к промежуточному типу, одно растение имело тип культурного томата, 8 растений—промежуточные с уклоном к культурному типу, а у остальных растений (27) преобладали признаки дикого томата. Определенная зависимость от уровня самосовместимости исходных растений  $F_2$  проявилась по признаку окраски плодов. Оказалось, что в  $F_3$  наиболее широкий спектр по этому признаку выявлен в потомстве растений первой группы. Здесь выщепились растения с красными, розовыми, оранжевыми и желтыми плодами. В потомстве растений двух других групп спектр окраски плодов был значительно уже—желтые, желто-зеленые, зеленые. Таким образом, полученные результаты дают основание предположить, что чем больше выражена самосовместимость гибридных растений, тем выше возможность выщепления в их потомстве растений типа культурного томата.

Для более подробного исследования закономерностей формообразовательного процесса в чреде поколений гибридов в зависимости от уровня самосовместимости родительских форм были использованы гибриды культурного томата (сорт Аргаванди 45) с линией 2970. Эта линия, как уже сказано, состоит из SF- и SI-растений и характеризуется

сильным полиморфизмом по степени самонесовместимости [6]. Как и у предыдущей комбинации, растения  $F_1$  в основном были очень мощными, хорошо плодоносящими, однако часть их характеризовалась гибридной депрессией в форме некроза [4]. Окраска плодов здоровых растений  $F_1$  ярко-желтая, независимо от того, получены они с участием SF- или SI-растений дикаря. А вот в  $F_2$  обнаружались существенные различия в поведении гибридов. Было изучено 14 семей  $F_2$ , представляющих потомство  $F_1$ , от SF-растений линии 2970, и 15 семей  $F_2$ —от SI-

Таблица 1. Распределение растений  $F_2$  Аргаванди 45×линии 2970 по окраске плодов в зависимости от автофертильности исходных особей дикого томата.

Всего растений	Число плодonoсящих растений	Из них с окраской плодов													
		красной — красно-желтой		розовой — желто-розовой		оранжевой — оранжево-желтой		желтой — желто-зеленой		белесой		зеленой — светло-зеленой		зеленой (незрелые плоды)	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
гибриды сорта Аргаванди 45 × SF-растениями линии 2970															
231	175	21	12,0	11	6,3	25	14,3	51	29,1	1	0,6	26	14,9	40	22,9
гибриды сорта Аргаванди 45 × SI-растениями линии 2970															
226	153	1	0,7	5	3,3	19	12,4	30	32,7	11	7,2	42	27,5	25	16,3

растений. Как показывают обобщенные данные, представленные в табл. 1, фенотипическое разнообразие по признаку окраски плодов у гибридов первой группы более широкое, чем у гибридов второй группы. В общем в семьях от SF-растений линии 2970 было описано 18 оттенков окраски плодов, а в семьях от SI-растений—только 10. По данным таблицы видно также, что в первой группе значительно выше и доля растений с интенсивно окрашенными плодами. Выявлена также прямая связь между величиной и окраской плодов гибридов (табл. 2) У растений с наиболее интенсивно окрашенными плодами последние преимущественно бывают и более крупными.

Следовательно, если в поколениях гибридов SC×SI, по сути дела, не имеет место расщепление по окраске плодов, не говоря уже о выщеплении гомозигот  $S_c S_c$  [2], то в потомстве гибридов SC×SF имеются не только реальные возможности возникновения высокосамосовместимых  $S_c$ -гомозигот, но и выхода хозяйственно-ценных форм. Об этом свидетельствуют и результаты изучения последующих поколений гибридов Аргаванди 45×линии 2970, которые были получены путем дисруптивного отбора. В одном случае отбор проводился на тип культивируемого вида. Исходные растения линии 2970 были SF. Для отбора использованы растения  $F_2$  с красными и оранжевыми плодами. В итоге, выделенные в  $F_2$  растения оказались очень близкими к сорту Аргаванди 45, имели красные или оранжевые слабоосеменные плоды диаметром от 3—4 до 7—8 см, нормальные цветки, но несколько мельче, чем у исходного сорта. При отборе в этом направлении восстанавливается и репродуктивная способность растений. Так, в  $F_1$  плодоносили все здоровые рас-

Таблица 2. Распределение растений по признакам окраски и величины плодов в F<sub>2</sub> Аргаванди 45Хлиния 2970.

Окраска плодов	Диаметр плодов, см										Всего растений	
	0.5-0.9	1.0-1.4	1.5-1.9	2.0-2.4	2.5-2.9	3.0-3.4	3.5-3.9	4.0-4.4	4.5-4.9	5.0-5.9	шт.	%
Красная — красно-желтая			1		1	9	3	7	3		27	8.7
Розовая — желто-розовая			3	4	5	4	1	2	1	3	20	6.4
Оранжевая — оранжево-желтая		2	6	18	10	7	1	2			46	14.7
Желтая — желто-зеленая	2	33	38	29	13	9	2	2			128	41.0
Зеленая — светло-зеленая	1	14	14	11	3	1					44	14.1
Зеленая (незрелые плоды)	5	20	7	13	1	1					47	15.1
<b>Всего</b>	<b>шт.</b>	8	69	69	75	33	31	7	13	4	3	312
<b>растений</b>	<b>%</b>	2.6	22.1	22.1	24.0	10.6	9.9	2.2	4.2	1.3	1.0	

тения, в  $F_2$  (потомство от SG-растений дикаря, табл. 2)—75,1%, из 35 растений  $F_2$ —37,1%, а из 60 растений  $F_4$  и 46 растений  $F_5$ —уже 80,0 и 73,9% соответственно.

В другом случае отбирались экземпляры, близкие к типу дикого томата. Исходные растения линии 2970—SI. Для отбора использованы растения  $F_2$  с желтыми и светло-желтыми плодами. У растений  $F_2$  цветки в основном яркис, нормальные, но имелись и бледные, слабдеформированные. В  $F_4$  почти у всех растений были очень мелкие, бледные, деформированные цветки. Плоды зеленые, диаметром 1—2 см, и основном с недоразвитыми семенами. В этом ряду поколений число плодоносящих растений в  $F_2$  составило 67,6%, в  $F_3$  из 16 растений плодоносили 6, а в  $F_4$  из 47 растений—лишь 2. Как видим, отбор в направлении дикой формы ведет к сильной депрессии генеративной сферы. Следовательно, восстановление генома культурного томата в цитоплазме своего вида идет менее болезненно, чем замещение генома культурного геномом дикаря, приводящее к возникновению аллоплазменных форм.

Таким образом, самофертильные аллели шкого вида обеспечивают как большой размах формообразовательного процесса в поколении  $F_2$ , так и значительно больший выход тех фракций растений, которые ближе стоят к культурному типу. А это в конечном счете означает, что, используя явление внутривидового полиморфизма по степени перекрестноопыляемости, можно прогнозировать и регулировать рекомбиногенез при отдаленной гибридизации растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. М. Биолог. ж. Армении, 35, 7, 551—558, 1982.
2. Агаджанян А. М. Биолог. ж. Армении, 40 11, 902—910, 1987.
3. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Биолог. ж. Армении, 27, 10, 51—56, 1974.
4. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Докл. АН АрмССР, 72, 1, 42—46, 1981.
5. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Тез. докл. конф. «Адаптация и рекомбиногенез у культурных растений». 83, Кишинев, 1982.
6. Агаджанян А. М., Навасардян Е. М. Сельскохозяйственная биология, 6, 36—38, 1988.
7. Воробьева Г. А. Тр. по прикл. бот. ген. и селекции, 58, 1, 94—109, 1976.
8. Георгиева Р. Род *Lycopersicon*. Биоксистематическое и генетические исследования. София, 1976.
9. Жученко А. Л. Генетика томатов. Кишинев, 1973.
10. Махалова Н. П., Кригвой С. Я. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 381—392, 1972.
11. Навасардян Е. М., Агаджанян А. М. Биолог. ж. Армении, 33, 7, 698—702, 1980.

Поступило 7.IV 1989 г.

## СИНТЕЗ И ДЕЙСТВИЕ НЕПРЕДЕЛЬНЫХ $\gamma$ -ЛАКТОНОВ С ТИАЗОЛЬНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

А. А. АВЕТИСЯН, Г. С. МЕЛИКЯН, С. А. СОГОМОНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра органической химии,  
кафедра генетики и цитологии

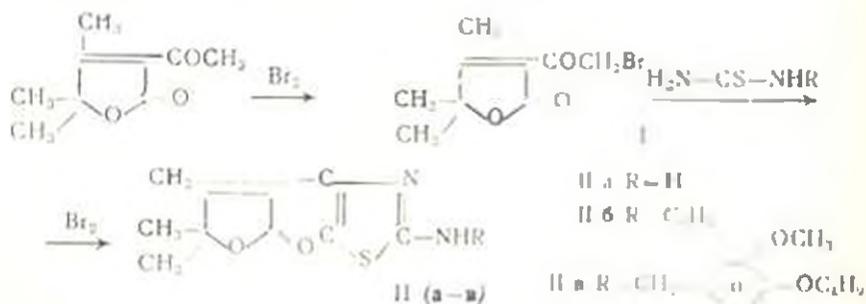
Установлено стимулирующее действие функционально-замещенных  $\gamma$ -лактонов на всхожесть, энергию прорастания, митотическую активность, и на хромосомные aberrации меристематических клеток корешков. Выделены оптимальные концентрации растворов исследуемых соединений.

Հաստատված է ֆունկցիոնալ շաղկապված  $\gamma$ -լակտոնների խթանի, ազդեցությունը նրանց ծլուծակունքի, բողբոջման էներգիայի, միտոտիկ ակտիվության և արմատիկների մերիստեմատիկ բջիլների քրոմոսոմային արևաացիաների վրա: Որոշված են օպտիմալները ուսումնասիրվող միացությունների լուծույթների օպտիմալ կենտրոնացիաները:

It is determined the stimulating influence of functionally substituted  $\gamma$ -lactones on the sprouting energy of germination on mitotic activity and on chromosome aberrations of meristematic cells of roots. The optimal concentrations of solutions from the studied compounds are obtained.

*Овощные культуры —  $\gamma$ -лактоны.*

Широко известна биологическая активность соединений, сочетающих в структуре непредельное  $\gamma$ -лактонное кольцо с другими гетероциклами [1, 2]. Известно также применение (предпосевная обработка семян) некоторых представителей непредельных  $\gamma$ -лактонов в качестве стимуляторов роста древесных культур [4, 5]. Однако в литературе отсутствуют данные о применении непредельных  $\gamma$ -лактонов в качестве росторегуляторов овощных культур. С целью синтеза новых производных непредельных  $\gamma$ -лактонов с 2-аминотиазоловым фрагментом в качестве потенциально биологически активных соединений нами было изучено взаимодействие замещенного 3-бромацетил- $\Delta^3$ -бутенолида с тиомочевинной и замещенными тиомочевинами. 3-Бромацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолид был получен с количественным выходом бромированием 3-ацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолида [3] эквимолярным количеством брома при 25—30° в среде хлороформа. При взаимодействии бутенолидов с мочевиной наблюдалось образование 3-(2-аминотиазолил)-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолидов с выходом 60—75%



Реакцию осуществляли при комнатной температуре в течение 4 часов. Строение полученных соединений доказано данными ИК-спектров и элементным анализом. В ИК-спектрах имеются полосы поглощения, характерные для непредельного  $\gamma$ -лактонного кольца ( $1750 \text{ см}^{-1}$ ), двойной связи ( $1620 \text{ см}^{-1}$ ), бензольного кольца ( $1590 \text{ см}^{-1}$ ) и аминной группы ( $3300 \text{ см}^{-1}$ ).

В настоящей работе представлены результаты исследования действия синтезированных соединений (II а-в) на всхожесть, энергию прорастания семян, МА и частоту хромосомных перестроек меристематических клеток корешков у растений лука, моркови и томата (табл. 2).

*Материал и методика.* Исследования проводили на воздушно-сухих семенах, взятых из Института земледелия МСХ АрмССР. Для определения действия вышеуказанных веществ на всхожесть и прорастание семян их обрабатывали водными растворами в трех концентрациях (0,1; 0,01; 0,001%) при 5-часовой экспозиции. После обработки подопытных семян их промывали, высушивали и высевали в чашках Петри. Исследования проводили в двух направлениях: морфофизиологическом (определение энергии прорастания, всхожести); цитогенетическом (определение МА, хромосомных аберраций). Контролем служили растения, выращенные из семян, замоченных в дистиллированной воде. Опыты проводили в трех повторностях.

Для цитогенетических исследований фиксировали корешки длиной около 1 см, фиксатором Карнуа. Для определения МА из каждой экспозиции было взято по 10—12 корешков. Из фиксированного материала готовили временные ацетокарминовые препараты. МА клеток меристемы первичных корешков определяли из расчета из 1.000 клеток в каждом корешке, а в каждой комбинации анализу подвергали по 10 корешков. Данные статистически достоверны.

*Результаты и обсуждение.* Результаты анализа полученных данных показали, что предпосевная обработка семян растворами указанных выше веществ значительно стимулирует рост и развитие растений лука, моркови и томата. Эффект стимуляции проявился в повышении всхожести, энергии прорастания, митотической активности в меристеме корешков. Однако семена различных культур по-разному реагируют на разные концентрации веществ. Разница между подопытными и контрольными семенами видна сразу же после прорастания и закономерно сохраняется в течение всего периода роста растений в лабораторных условиях.

Таблица 1. Непредельные  $\gamma$ -лактоны

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Найдено, %				Вычислено, %			
			C	H	N	S	C	H	N	S
IIa	75	145—147 гексавензол	53.41	6.04	12.70	14.25	53.07	6.25	12.58	14.17
IIб	73	143—165 оксаол	63.70	5.86	9.48	10.52	63.54	6.01	9.27	10.60
IIв	58	143—114	62.19	6.68	7.29	8.33	62.34	6.99	6.93	7.92

На лук эффективнее действует 0,001%-ный раствор II а, повышающий всхожесть на 20%, энергию прорастания—на 27%, МА— $5 \pm 1,4\%$ ; на морковь—0,0011 и 0,01% растворы II в, повышающие всхожесть и

Таблица 2. Действие ненасыщенных лактонов на прорастаемость, энергию прорастания семян и митотическую активность меристематических клеток корешков томата, лука и моркови

Культура	Вещество	Концентрация, %	Всхожесть, %	Энергия прорастания	МИ, %	% нарушенных анафаз	
Лук	H <sub>2</sub> O	контроль	80	70	20,0 ± 2,03	0,43 ± 0,3	
		IIб	0,1	93	75	20,1 ± 1,3	1,47 ± 0,5
			0,01	95	80	20,9 ± 1,8	1,50 ± 0,6
	IIв	0,001	100	89	23,6 ± 1,3	1,24 ± 0,5	
		0,1	84	70	17,5 ± 1,2	1,29 ± 0,5	
			0,01	99	85	22,5 ± 1,3	1,08 ± 0,4
	IIа	0,001	97	82	21,6 ± 1,3	1,02 ± 0,4	
		0,1	87	71	19,8 ± 1,3	1,06 ± 0,5	
			0,01	82	67	17,04 ± 1,2	0,95 ± 0,5
	Морковь	IIб	0,001	100	97	24,7 ± 1,4	0,60 ± 0,3
			0,1	99	89	33,3 ± 1,4	1,57 ± 0,5
				0,01	100	98	38,2 ± 1,5
IIв		0,001	100	100	38,0 ± 1,5	0,83 ± 0,3	
		0,1	99	85	33,7 ± 1,5	1,29 ± 0,5	
			0,01	100	97	35,6 ± 1,5	1,08 ± 0,4
IIа		0,001	100	96	32,4 ± 1,5	1,02 ± 0,4	
		0,1	90	80	30,1 ± 1,4	1,16 ± 0,4	
			0,01	96	93	32,0 ± 1,5	1,12 ± 0,4
Томат		H <sub>2</sub> O	0,001	100	88	35,9 ± 1,5	0,98 ± 0,4
			контроль	87	84	28,4 ± 1,4	0,78 ± 0,3
				97	93	37,7 ± 1,5	1,68 ± 0,5
	IIб	0,01	100	99	41,9 ± 1,6	1,48 ± 0,5	
		0,001	100	100	41,8 ± 1,6	1,13 ± 0,4	
			0,1	100	100	46,7 ± 1,6	2,18 ± 0,5
	IIв	0,01	100	100	41,7 ± 1,6	1,83 ± 0,4	
		0,001	100	100	39,4 ± 1,5	1,80 ± 0,4	
			0,1	93	86	34,5 ± 1,5	1,24 ± 0,4
	IIа	0,01	97	94	37,7 ± 1,5	1,02 ± 0,4	
		0,001	99	95	38,0 ± 1,5	0,82 ± 0,3	

энергию прорастания до 100%, т. е. выше контроля на 25—35%. У томата наибольший эффект (всхожесть—на 100%, энергия прорастания—на 100% и митотическая активность—на  $(46,7 \pm 1,6\%)$ ) наблюдался при действии 0,001%-ного раствора IIб, что превышает контроль на 13, 16 и 12% соответственно.

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают стимулирующее действие исследуемых соединений на лук, морковь и томат в начальных фазах роста и развития. Они позволяют оценить испытуемое вещество (низкие концентрации) как физиологически активное, которое стимулирует начальные стадии роста и развития растений. Установлена линейная зависимость эффекта вещества от его концентрации.

#### Экспериментальная часть.

*Получение 3-бромацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолида.* К 16,8 г (0,1 моля) 3-ацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолида в 40 мл хлороформа при перемешивании медленно добавляли 6,5 г Br<sub>2</sub> в 6 мл хлороформа. Наблюдалось обесцвечивание раствора. Через 3 ч отгоняли хлороформ и остаток перегоняли в вакууме. Получили 22,4 г (90%) продукта с

Т. кип. 168—170°/2 мм,  $n_D^{20}$ —1,5381. Найдено, %: С 43,51; Н 4,78; Вг 32,69.  $C_9H_{11}O_3Br$ . Вычислено, %: С 43,74; Н 4,5; Вг 32,34. ИК-спектр  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1750 (СО лактон), 1590 (С=С), 1710 (СОСН<sub>2</sub>).

*Взаимодействие 3-бромацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолида с мочевиной.* К 0,02 моля тиомочевины в 25 мл ацетона по каплям добавляли 4,5 (0,02 моля) 3-бромацетил-4,5,5-триметил- $\Delta^3$ -бутенолида в 10 мл ацетона. Смесь перемешивали 4 ч, отгоняли растворитель и остаток перегоняли в вакууме (табл. 1).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян А. А., Динсян М. Т. Усп. химии, 7, 1250, 1977.
2. Аветисян А. А., Токмаджян Г. Г. ХГС, 6, 723, 1987.
3. Аветисян А. А., Мангисарян Ц. А., Меликян Г. С., Мацолян С. Г., Динсян М. Г. ЖОрХ, 7, 962, 1971.
4. Данышин И. И., Пономарев Ф. Г., Харитонов В. Ф. Авт. свид. СССР, № 740209, 1980.
5. Пономарев Ф. Г., Данышин И. И., Пономарев Л. Ф., Казадан С. Л. Авт. свид. СССР, № 536804, 1976.

Поступило 23.XI 1988 г.

## 1 ВСЕСОЮЗНЫЙ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СЪЕЗД

Всесоюзный радиобиологический съезд, проходивший в Москве 22—27 августа 1989 года, явился крупным форумом, посвященным современному состоянию советской радиобиологии. В работе съезда приняли участие около 1000 радиобиологов и специалистов из смежных областей науки.

Съезд отметил, что в связи с развитием атомной энергетики, радиационных технологий и широкого использования ионизирующих излучений и научных исследований возрастает роль и значение радиобиологии как фундаментальной науки, имеющей огромное практическое значение. Развитие радиобиологии становится социальной необходимостью.

Отечественная радиобиология, возникшая в 50—60-х годах, внесла существенный вклад в развитие мировой науки. Исследованы молекулярные и клеточные механизмы возникновения и развития лучевых поражений, природной и модифицируемой радиорезистентности; открыто явление пострадиационного восстановления клеток, исследованы процессы репарации ДНК и выявлена их роль в гибели и выживании клеток; изучены молекулярные механизмы гибели облученных клеток, установлены роль радиационных повреждений генома, структурных и функциональных нарушений биомембран, а также участие возникших в организме токсических веществ в формировании лучевых повреждений. Разработаны теории химической защиты организмов от облучения и на этой базе предложены для практического применения ряд противолучевых препаратов и средств.

На съезде было представлено множество работ по действию ионизирующих излучений на кроветворение, ЦНС, иммунитет, эмбриогенез, наследственность. Значительное число работ было посвящено прикладной радиобиологии, в частности, исследованиям в области молекулярной и клеточной радиобиологии нормальных и опухолевых тканей.

Широко были представлены работы по

радиомутагени-поведению естественных и искусственных радиоэлементов в окружающей среде, их миграции, аккумуляции и биологическому действию на растительный и животный мир.

В связи с аварией на Чернобыльской атомной электростанции перед радиобиологией встала задача дальнейшего углубленного изучения таких проблем, как биологическое действие плутония, стронция-90, цезия-137 и других инкорпорированных радионуклидов и горячих частиц. На съезде по этим вопросам было представлено большее количество докладов украинских и белорусских ученых, исследовавших также механизмы развития отдаленных последствий радиации—канцерогенеза, гермагенеза, наследственных патологий и др.—при облучении в малых дозах с целью разработки мер снижения риска, больших групп людей. Исследовано влияние естественного радиационного фона и его повышение в десятки и сотни раз из биосферы, на различные популяции с целью правильного прогнозирования последствий длительного действия ионизирующей радиации в малых дозах. Особенно подчеркивалась проблема синергизма факторов лучевой и тепловой природы.

Съезд отметил на ряд существенных недостатков в организации фундаментальных радиобиологических исследований. В СССР нет единого центра или института, который занимался бы проблемами развития фундаментальных исследований и практического внедрения достижений радиационно-биологической технологии в промышленность, сельское хозяйство, медицину. Съезд отметил также заметное отставание отечественной радиобиологии от мировой, указал на крупные недостатки в подготовке кадров радиобиологов, в распространении радиознаний.

I Всесоюзный радиобиологический съезд направил обращение к Верховный Совет и Совет Министров СССР по вопросам дальнейшего развития радиобиологии в СССР.

Ц. М. АВАКЯН