

М. Е. ЛОБАШЕВ

**ИЗУЧЕНИЕ ОБРАТИМЫХ СУБСТАНЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В КЛЕТКАХ СЕМЕННИКОВ ДРОЗОФИЛЫ МЕТОДОМ
ВИТАЛЬНЫХ ОКРАСОК**

(Представлено академиком К. М. Быковым 17 XI 1947)

В проблеме изучения действия внешних факторов на мутационный процесс становится все более необходимым применение цитофизиологических методов исследования интимных внутриклеточных процессов. Представление о непосредственном действии агентов на изменение гена игнорирует изучение клеточных процессов, разыгрывающихся в живом веществе клетки при действии на нее извне. Поэтому изучение цитофизиологическими методами изменения реакции живого вещества клетки в момент воздействия может дать нам более полное представление об условиях возникновения мутаций.

При изложении физиологической (паранекротической) гипотезы мутационного процесса (1) нами было высказано предположение, что мутации возникают в результате перестройки белковых молекул в процессе ренативации их из паранативного состояния, которое вызывается действием внешних условий на клетку. Важно было выяснить, действительно ли в клетках семенников дрозофилы под влиянием индуцирующих мутации агентов происходят обратимые субстанциональные изменения. В качестве одного из показателей таких изменений можно было принять, в частности, изменение адсорбционных свойств цитоплазмы.

Материал и методика. Хотя опыты с витальной окраской семенников дрозофилы трудоемки, представляло все же интерес провести их именно на этом объекте. В этом случае облегчается возможность сопоставления полученных результатов с известными для дрозофилы генетическими данными.

Материалом служили самцы дрозофилы из нормальной линии и однородных культур; мухи перед постановкой опыта тщательно перемешивались и затем разделялись на группы соответственно числу опытов в серии. В качестве агентов были избраны X-лучи и высокая температура. Оба эти агента известны своим действием на увеличение частоты возникновения мутаций. После воздействия тем или другим агентом у части самцов (20—25) отпрепарировались семенники в рингеровском растворе. С остальными производилось то же самое через определенные промежутки времени. Контрольные самцы препарировались вслед за подопытными. Семенники переносились в раствор нейтральной красной (0,05 или 0,025%) на 20, 30 или 40 мин. Затем следовала промывка от краски, которая длилась 10—15 мин., и дополнительная препаровка собственно семенников в месте слияния vasa efferentia с придаточными железами, так что выводящий проток vas deferens для получения вытяжек не использовался. Из окрашенных

семенников делались спиртовые вытяжки, причем поврежденные семенники браковались. В процессе работы строго регистрировалась температура на рабочем столе. Объем спирта брался пропорционально числу семенников. Вытяжки фотометрировались.

Результаты опытов. Прежде всего возник вопрос о том, не являются ли препаровка и окраска губительными для семенников. Для этой цели были проведены предварительные опыты по сравнению поглощения краски семенниками (а) сразу после препаровки, затем (б) после предварительного (до окраски) выдерживания их в растворе Рингера и (в) заведомо мертвых. Первые сразу после препаровки помещались в раствор краски, вторые перед окраской находились в рингеровском растворе (от 20 до 300 мин.), третьи после препаровки убивались высокой температурой (60—70°), охлаждались и затем окрашивались нейтральной красной. Эти опыты показали, что интен-

Таблица 1

Влияние X-лучей на обратимое увеличение адсорбции нейтральной красной клетками семенников дрозофилы

№№ серий	Время, прошедшее с момента облучения гонад до начала их окраски, в час.	Длительность прокраски гонад в нейтральной красной, в мин.	Интенсивность окраски вытяжек в % к контролю		
			Дозы облучения X-лучами в г		
			2000	4000	8000
1	2—8	40	102	146	119
	96—100	40	144	115	96
2	2—3	30	125	138	143
	96—100	30	113	125	—
3	1—4	20	102	112	120
	22—28	20	94	92	96
	72—76	20	101	100	105

сивность окраски вытяжек из семенников, окрашенных в первый момент после препаровки, несколько выше, чем из семенников, находившихся до окрашивания в рингеровском растворе. Это временное повышение адсорбции гонадами краски через 30—60 мин. исчезает; повидимому, оно обязано механическому раздражению семенников, вызванному препаровкой. Вытяжки из заведомо убитых и окрашенных семенников по интенсивности экстрагированной краски значительно превышают живые (более чем на 200%). Предварительные опыты убедили нас в том, что обратимое увеличение сорбционных свойств, наблюдаемое в семенниках после воздействия, отражает изменения в живом субстрате половых элементов. Изменение количества адсорбированной семенниками краски в прижизненном состоянии может служить некоторым показателем субстанциональных изменений.

При изучении действия X-лучей и высокой температуры на витальную окраску семенников дрозофилы нами были поставлены две задачи: во-первых, выяснить зависимость увеличения адсорбции семенниками краски от глубины наносимого им раздражения; во-вторых, установить обратимость этого явления.

Г. Надсон⁽²⁾ при действии лучей радия установил значительное усиление окраски цитоплазмы дрожжей витальными красителями. Работами Д. Н. Насонова и В. Я. Александрова⁽³⁾ и их сотрудников было показано, что увеличение отложения краски в тканевых клетках есть общее явление и характерно для паранекротической фазы. В данных опытах применен наиболее объективный, количественный метод оценки адсорбированной тканью краски по вытяжкам из витально окрашенных семенников после воздействия⁽⁴⁾.

В разное время было проведено три серии опытов с X-лучами. В каждой из них применялись три дозы облучения: 2000, 4000 и 8000 г. Результаты приведены в табл. 1. Следует заметить, что в указанных трех сериях было отпрепарировано более 700 семенников.

Из табл. 1 видно, что интенсивность окраски вытяжек в первый момент после рентгенизации значительно и без исключения превышает контроль. С повышением дозы облучения увеличивается и отложение

краски. Остались неясными исключение в первой серии и незначительные понижения в третьей серии. Параллельно проводившиеся опыты с учетом возникающих у облученных самцов мутаций показали обычную картину — прямо пропорциональную зависимость (соответственно дозам: 2,17, 5,48 и 9,09⁰/₀).

Анализ последствий Х-лучей, как это видно из табл. 1, показал неполную обратимость в течение 100 час. В двух сериях (1 и 2) имеется следовой эффект: в первой серии, через 100 час. после облучения 2000 г, остался непонятным скачок в увеличении адсорбции семенниками краски. Однако эти исключения относятся главным образом к вторичному эффекту Х-лучей, который неоднократно отмечался в экспериментальной цитологии. Более подробный анализ окраски в третьей серии (табл. 1) показал, что через 22—28 час. после облучения отложение краски не превышает контроля.

Цитофизиологическими исследованиями (4) ранее было установлено влияние высокой температуры на обратимое увеличение отложения краски в соматических тканях (эпителий кишечника, мышц и др.).

Представлялось интересным выяснить зависимость величины отложения краски в половых клетках от глубины наносимого температурой раздражения и скорости восстановления вызываемых температурой изменений. В опытах были испытаны температуры от 30 до 36° С. Контрольная температура в разных опытах была 15, 20 и 25°. Результаты фотометрирования вытяжек приведены в табл. 2 (последняя колонка). В этих опытах было отпрепарировано более 500 семенников. Контроль ставился одновременно к каждому варианту опыта.

Как видно из табл. 2, высокая температура значительно увеличивает отложение краски в семенниках по сравнению с контролем (от 120 до 191⁰/₀), причем это увеличение прямо зависит от повышения температуры и длительности воздействия. Так как препаративка и окраска производились одновременно и в контрольной температуре, то, следовательно, наблюдаемое увеличение отложения краски относится не к непосредственному действию температуры, а именно к происшедшим обратимым изменениям в субстанции клеток семенников. Последующий анализ показывает, что это увеличение оказывается временным, обратимым. Восстановление к норме имеет определенную зависимость от повышения температуры при воздействии, длительности ее действия и от температуры, при которой содержались самцы после воздействия (см. опыты №№ 8 и 12).

Таким образом, экспериментальный анализ действия внешних условий — агентов, индуцирующих мутации, позволяет сделать следующие выводы.

1. Методом витальной окраски удастся обнаружить обратимое увеличение адсорбционных свойств цитоплазмы половых клеток в прямой зависимости от дозы Х-лучей и температуры.

Таблица 2

Влияние высокой температуры на обратимое увеличение адсорбции нейтральной краской клетками семенников дрозофилы

№№ опытов	Температура в опыте и в контроле в °С	Длительности воздействия температуры в час.	Время, прошедшее с момента окончания воздействия до начала окраски	Интенсивность окраски вытяжки в опыте в % к контролю
4	33	6,5	40 мин.	123
	24,5	21	21 час	100
8	33	16	10 мин.	138
	25,5	24	24 часа	126
9	30	8	10 мин.	116
	—	—	—	—
10	30—32	15	5 мин.	145
	15—17	27	27 час.	83
12	35—37	12	10 мин.	191
	15—17	24	24 часа	124
	19—20	75	75 час.	109

2. Изменение сорбционных свойств цитоплазмы является косвенным показателем обратимых субстанциональных изменений в половых клетках.

3. Темп восстановления (обратимость) субстанциональных изменений в клетке к „норме“ обусловлен: а) глубиной наносимого клетке раздражения (дозы воздействия), б) условиями температуры и, видимо, многими другими факторами, при которых происходит репарация обратимого изменения в клетке.

Если в результате воздействия клетка сохраняет способность в какой-либо мере репарировать возникшие в ней изменения после прекращения действия агента, то легко допустить, что как белковые молекулы, так и морфологическая структура хромосом способны восстанавливаться к состоянию, нормально функционирующему, но отличному от исходного строения. Как следствие подобной нетождественной реверсии белков цитоплазмы можно допустить возникновение новых изменений типа мутаций. В пользу этого толкования говорят многочисленные факты и прежде всего то, что мутации возникают при повреждающем действии факторов среды или агентов — при применении их в сублетальных дозах воздействия на организм и клетку. Это не исключает, а предполагает, что и незначительные колебания факторов среды, являющихся раздражителями для половых клеток, таким же путем могут приводить к перестройке живого вещества клетки, обуславливая спонтанный мутационный процесс, который лежит в основе природы изменчивости в процессе прогрессивной эволюции.

Биологический институт
Ленинградского государственного
университета

Поступило
17 XI 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ М. Е. Лобашев, Вестн. Лен. ун-та, № 8 (1947). ² G. Nadson, Bioch. Z., 155 (1925). ³ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, изд. АН СССР, 1940. ⁴ А. А. Браун и М. Ф. Иванов, Арх. анат., гист. и эмбр., 12 (1933).