

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

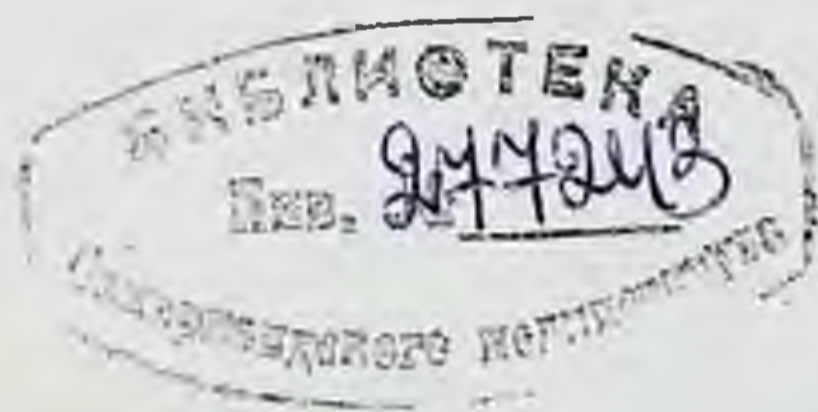
**ПРОБЛЕМЫ
МИОГЕНЕЗА**

Б 11-01
П 781

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

ПРОБЛЕМЫ МИОГЕНЕЗА

Под редакцией
Г. П. ШИНАЕВА и В. Б. УШАКОВА



ЛЕНИНГРАД
«НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ
ОТДЕЛЕНИЕ
1981

УДК 577.95+591.3 : 591.473 (048)

Проблемы мюогенеза. Л. : Наука, 1981. — 268 с.

В сборнике обсуждаются морфологические, физиологические и молекулярные аспекты развития мышечной ткани. Основное внимание уделено формированию сократительных структур, биосинтезу сократительных белков, изменению их физико-химических свойств, соотношению процессов дифференцировки и пролиферации разных типов мышечных клеток, количественной оценке дифференцировки мюогенных клеток. Рассмотрены механизмы регенерации и изменения в мышечной ткани при злокачественном росте.

ПРОБЛЕМЫ МЮОГЕНЕЗА

Утверждено к печати

*Научным советом по проблемам цитологии и Институтом цитологии
Академии наук СССР*

Редактор издательства Л. В. Калинина

Художник М. И. Разулевич. Технический редактор Г. А. Смирнова
Корректоры О. В. Олендская, С. И. Семиглазова и М. А. Стрелетова

ИБ № 20094

Сдано в набор 25.09.80. Подписано к печати 13.01.81. М-19910. Формат 60×90^{1/16}.
Бумага типографская № 2. Гарнитура обыкновенная. Печать высокая. Печ. л. 17 +
+14 вкл. (1^{3/4} печ. л.) = 18.75 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 21.5^{1/2}. Тираж 1150. Изд. № 7747.
Тш. зак. 1811. Цена 3 р. 60 к.

Ленинградское отделение издательства «Наука»
199164, Ленинград, В-164, Менделеевская линия, 1

Ордена Трудового Красного Знамени Первая типография издательства «Наука»
199034, Ленинград, В-34, 9 линия, 12

П $\frac{21005-516}{055(02)-81}$ 559-81 2001040000

© Издательство «Наука», 1981 г.

ОТ РЕДАКТОРОВ

Предлагаемый вниманию читателей настоящий сборник содержит материалы 2-й Всесоюзной школы по проблемам биологической подвижности. Эта школа проходила в период с 25 марта по 5 апреля 1979 г. в поселке Репино под Ленинградом.

Если 1-я школа была посвящена вопросам унификации методов изучения сократительных белков (см. сборник «Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков». Л., Наука, 1978), то тему работы 2-й школы составили различные аспекты развития мышечной ткани.

Морфологи, биохимики, биофизики и физиологи, изучающие становление сократительной функции мышц в онто- и филогенезах, в своей ежедневной работе разобщены между собой и встречаются друг с другом на специальных симпозиумах и конференциях, которые обычно посвящены только отдельным разделам этой крупной биологической проблемы. Поэтому свою главную задачу организаторы школы видели в том, чтобы привлечь к участию в ней специалистов разных профилей и по возможности всесторонне, комплексно обсудить современные вопросы миогенеза. Успех школы показал, что избранный путь был правильным. После лекций нередко возникали содержательные многоплановые дискуссии, которые были бы невозможны в иной, более специализированной аудитории. Кроме того, между представителями разных дисциплин устанавливались дружеские контакты, поддержание которых будет, несомненно, способствовать развитию исследований по проблеме биологической подвижности.

Комплексный подход к анализу миогенеза в полной мере отражен в содержании данной книги. Помещенные в сборнике статьи логически можно объединить в три больших цикла.

К первому из них относятся те работы, в которых обсуждается гистогенетическое происхождение мышечных волокон разных типов, их морфогенез, принципы формирования сократительного аппарата, а также соотношение между пролиферацией и дифференцировкой в миогенных клетках и в дифференцированных мышечных волокнах. Специальное внимание уделено процессам самосборки сократительных структур *in vivo* и *in vitro*.

Второй раздел посвящен описанию свойств белковых молекул, определяющих структуру и функциональную активность сократительного аппарата. Подробно рассмотрены этапы синтеза специфических сократительных белков и некоторые формы его контроля, показаны принципиальные отличия немускульных сократительных белков от типичных мышечных. К этому же циклу отно-

сятся статьи, в которых прослеживается последовательность смены изоформ сократительных белков, изменение их физико-химических свойств в миогенезе, рассматривается развитие ферментных систем, обеспечивающих энергией сократительный акт.

Завершает сборник цикл работ, в которых обсуждаются возможности использования различных методологических подходов для изучения миогенеза. К ним относятся обзоры, посвященные методу клеточных культур, а также вопросам регенерации мышц после повреждения и изменениям мышечных клеток в процессе их злокачественного перерождения. Эти подходы позволяют получить ценную информацию о событиях, происходящих в мышечных волокнах при регрессивном развитии и утрате ими терминальных признаков дифференцировки.

Готовя сборник к печати, редакторы особое внимание обращали на то, чтобы материал в статьях был изложен в такой форме, которая делала бы его доступным для понимания специалистами, работающими в разных областях биологической подвижности в целом и мышечного сокращения в частности.

К сожалению, не все аспекты рассматриваемой проблемы нашли свое отражение в настоящей книге. В ней отсутствуют, например, такие важные разделы, как влияние гормонов на дифференцировку мышечной ткани, влияние экстремальных условий на развитие мышц, некоторые аспекты патологии мышечной системы. Тем не менее, предлагаемая читателям книга достаточно полно охватывает основной круг проблем миогенеза и без сомнения будет полезной для всех исследователей, интересующихся мышечным сокращением и биологической подвижностью.

В заключение мы благодарим издательства «Pergamon Press», «Excerpta Medica», а также редакторов журналов «Experientia», «Journal of Molecular Biology», «Biologie Cellulaire», «Journal of Biochemistry» за любезное разрешение воспроизвести некоторые иллюстрации.

Ленинград
10 июля 1980 г.

Г. П. Пинаев, В. Б. Ушаков

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФ, АДФ, АТФ	— аденозинмоно-, -ди- и -трифосфорные кислоты
АТФаза	— аденозинтрифосфатаза
АХ	— ацетилхолин
АХЭ	— ацетилхолинэстераза
БМ	— быстрый миозин (миозин из быстрых мышц)
Г-актин	— глобулярный актин
ДНК	— дезоксирибонуклеиновые кислоты
ДНКаза	— дезоксирибонуклеаза
ДТНБ	— 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота
ИЭТ	— изоэлектрическая точка
кД	— килодальтоны
КФ	— креатинфосфат
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛММ	— легкий меромиозин
ЛЦ	— легкая цепь миозиновой молекулы
м. в.	— молекулярный вес
ММ	— медленный миозин (миозин из медленных мышц)
МПП	— мембранный потенциал покоя
ПД	— потенциал действия
РНК	— рибонуклеиновые кислоты
РНКаза	— рибонуклеаза
СР	— саркоплазматический ретикулум
ТМ	— тропомиозин
ТММ	— тяжелый меромиозин
ТН	— тропоин
ТТБК	— тропоин-тропомиозиновый белковый комплекс
ТЦ	— тяжелая цепь миозиновой молекулы
УФ	— ультрафиолетовая часть спектра
Ф-актин	— фибриллярный актин
ХР	— холинорецептор
цАМФ	— циклическая форма аденозинмонофосфата
цГМФ	— циклическая форма гуанозинмонофосфата
ЭГТА	— этиленгликольтетраацетат
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат
ЭМС	— электромеханическая связь (сопряжение)
g	— ускорение силы тяжести
pH	— водородный показатель
S	— константа седиментации

ся статьи, в которых прослеживается последовательность смены изоформ сократительных белков, изменение их физико-химических свойств в мюгенезе, рассматривается развитие ферментных систем, обеспечивающих энергией сократительный акт.

Завершает сборник цикл работ, в которых обсуждаются возможности использования различных методологических подходов для изучения мюгенеза. К ним относятся обзоры, посвященные методу клеточных культур, а также вопросам регенерации мышц после повреждения и изменениям мышечных клеток в процессе их злокачественного перерождения. Эти подходы позволяют получить ценную информацию о событиях, происходящих в мышечных волокнах при регрессивном развитии и утрате ими терминальных признаков дифференцировки.

Готовя сборник к печати, редакторы особое внимание обращали на то, чтобы материал в статьях был изложен в такой форме, которая делала бы его доступным для понимания специалистами, работающими в разных областях биологической подвижности в целом и мышечного сокращения в частности.

К сожалению, не все аспекты рассматриваемой проблемы нашли свое отражение в настоящей книге. В ней отсутствуют, например, такие важные разделы, как влияние гормонов на дифференцировку мышечной ткани, влияние экстремальных условий на развитие мышц, некоторые аспекты патологии мышечной системы. Тем не менее, предлагаемая читателям книга достаточно полно охватывает основной круг проблем мюгенеза и без сомнения будет полезной для всех исследователей, интересующихся мышечным сокращением и биологической подвижностью.

В заключение мы благодарим издательства «Pergamon Press», «Excerpta Medica», а также редакторов журналов «Experientia», «Journal of Molecular Biology», «Biologie Cellulaire», «Journal of Biochemistry» за любезное разрешение воспроизвести некоторые иллюстрации.

Ленинград
10 июля 1980 г.

Г. П. Пинаев, В. Б. Ушаков

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФ, АДФ, АТФ	— аденозинмоно-, -ди- и -трифосфорные кислоты
АТФаза	— аденозинтрифосфатаза
АХ	— ацетилхолин
АХЭ	— ацетилхолинэстераза
БМ	— быстрый миозин (миозин из быстрых мышц)
Г-актин	— глобулярный актин
ДНК	— дезоксирибонуклеиновые кислоты
ДНКаза	— дезоксирибонуклеаза
ДТНБ	— 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота
ИЭТ	— изоэлектрическая точка
кД	— килодальтоны
КФ	— креатинфосфат
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛММ	— легкий меромиозин
ЛЦ	— легкая цепь миозиновой молекулы
м. в.	— молекулярный вес
ММ	— медленный миозин (миозин из медленных мышц)
МПП	— мембранный потенциал покоя
ПД	— потенциал действия
РНК	— рибонуклеиновые кислоты
РНКаза	— рибонуклеаза
СР	— саркоплазматический ретикулум
ТМ	— тропомиозин
ТММ	— тяжелый меромиозин
ТН	— тропоин
ТТБК	— тропоин-тропомиозиновый белковый комплекс
ТЦ	— тяжелая цепь миозиновой молекулы
УФ	— ультрафиолетовая часть спектра
Ф-актин	— фибриллярный актин
ХР	— холинорецептор
цАМФ	— циклическая форма аденозинмонофосфата
цГМФ	— циклическая форма гуанозинмонофосфата
ЭГТА	— этиленгликольтетраацетат
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат
ЭМС	— электромеханическая связь (сопряжение)
g	— ускорение силы тяжести
pH	— водородный показатель
S	— константа седиментации

А. Г. КНОРРЕ

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Педиатрический медицинский институт, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

Способность использовать энергию химических связей для производства механической работы является одним из элементарных свойств живой протоплазмы и тем самым любой клетки. У *Eukaryota* эта функция обеспечивается наличием молекул сократительных белков, прежде всего актина и миозина, которые содержатся в гиалоплазме любых клеток. С их участием осуществляется, например, сокращение псевдоподий лейкоцитов, пигментных клеток и т. д. Клетки (а также симпластические мышечные волокна) в составе мышечных тканей характеризуются не просто способностью к сокращению, как в перечисленных случаях, а специализацией на функции сокращения. Способность к сокращению, свойственная элементам мышечных тканей в отношении как силы, так и скорости сокращения, увеличена в десятки и сотни раз по сравнению с этой же способностью в клетках любых других, немускульных тканей. Это представляет собой яркий пример одного из главнейших модусов прогрессивной эволюции — модуса (т. е. принципа) усиления, или интенсификации, функций [1, 2]. В специализированных на сократительной функции элементах мышечных тканей (мышечных клетках, мышечных волокнах) сократительные белки образуют более или менее сложные надмолекулярные комплексы — видимые в электронный микроскоп протомиофибриллы и видимые в световой микроскоп миофибриллы. Впрочем, в последние годы и десятилетия дифференцировка сократительных органоидов обнаружена и в специализированных клетках некоторых других (немускульных) тканей (микротрубочки, мионд в периферических отростках фоторецепторных и обонятельных клеток у позвоночных и др.). Собственно, специализацией на функции сократимости, которая обеспечивается наличием молекул сократительных белков, организованных в миофибриллы и способных к прямому превращению энергии АТФ в механическую энергию мышечных сокращений, исчерпываются общие особенности мышечных тканей, свойственные любым их представителям независимо от происхождения, типа тканевых элементов (клетки, волокна), характера иннервации и т. д. К этим общим осо-

бещностям можно еще добавить большую или меньшую удлинненность элементов всех мышечных тканей (мышечных клеток, мышечных волокон, в отдельных случаях — отростков клеток), что, разумеется, дает выигрыш в отношении максимально допустимых степеней сокращения в сравнении с округлой или любой другой формой тканевого элемента. Во всем остальном мышечные ткани чрезвычайно разнообразны. Это разнообразие касается основных структурных компонентов тканей (мышечные клетки, цепочки клеток, симпластические мышечные волокна и т. д.), строения миофибрилл и в связи с этим самих тканевых элементов (гладкие, кососчерченные, поперечносчерченные мышечные клетки и волокна), характера иннервации (соматическая, или анимальная; автономная, или вегетативная; двойная антагонистическая либо только симпатическая или, наоборот, парасимпатическая), характера сократительной деятельности (произвольная и непроизвольная, тоническая и тетаническая и т. д.).

Источниками развития различных мышечных тканей могут быть различные участки мезодермы (у позвоночных — миотомы и спланхнотомы), мезенхима, эктодерма (у позвоночных — нейроэктодерма), энтодерма (например, у кишечнополостных) и т. д. При этом утверждение старых гистологов (XIX—начала XX в.) о том, что мышечные ткани могут развиваться из любого источника (зародышевого листка, зачатка), нуждается в той существенной коррекции, что мышечные ткани разного происхождения имеют неодинаковую совокупность свойств. В частности, у позвоночных животных и человека они обладают различной способностью к восстановлению после повреждений, характеризуются неодинаковым источником и способом регенерации, по-разному растут в культуре *in vitro*, дают начало неодинаковым типам опухолей и т. д. Иначе говоря, источник развития накладывает неизгладимый отпечаток на всю совокупность свойств и поведение тканей (в том числе мышечных) в условиях нормы, патологии и эксперимента [3—5]. Все сказанное делает необходимой разработку генетической (филогенетической, точнее — гистогенетической) классификации мышечных тканей, каковая и была создана и экспериментально обоснована Н. Г. Хлопиным и его сотрудниками в 1930—1940-е годы.

По классификации Н. Г. Хлопина, существует 5 самостоятельных резко очерченных типов мышечных тканей.

1. Мышечные ткани соматического (у членистоногих и позвоночных — скелетного) типа. Источник развития — мезодерма (у позвоночных — миотомы).

2. Мышечные ткани целомического типа (у позвоночных — сердечная мышца). Источник развития — висцеральный листок целомической мезодермы (у позвоночных — миокардальная пластинка висцерального листка спланхнотомы).

3. Гладкая мышечная ткань внутренних органов и сосудов (только у позвоночных). Источник развития — мезенхима.

4. Мышечная ткань нейрального происхождения (только у позвоночных: сфинктер и дилататор зрачка, возможно, также цилиарная мышца глаза). Источник развития — нейральный зачаток (края глазного бокала).

5. Мезоэпидермальные клетки слюнных, потовых и молочных желез (только у позвоночных). Источник развития — кожная эктодерма и прехордальная пластинка.

МЫШЕЧНЫЕ ТКАНИ СОМАТИЧЕСКОГО ТИПА

Мышечные ткани соматического (у членистоногих и позвоночных — скелетного) типа — ткани произвольного сокращения, иннервируемые соматической (анимальной) частью нервной системы. Источником их развития служит мезодерма: у многих беспозвоночных — мезенхима либо париетальный листок целомической мезодермы, у позвоночных — миотомы. Следует, однако, помнить, что соматические мышечные элементы имеются уже у двуслойных, т. е. не имеющих мезодермы животных, и тогда они возникают в составе как эктодермы, так и энтодермы (гидра и многие другие кишечнополостные с их эпителиально-мышечными клетками). Более того, сократительные элементы имеются уже у губок (порциты, регулирующие ширину просвета устьев). Сократительные элементы простейших, например мюлемы у инфузорий, аналогичны (а возможно, и гомологичны) мюфибриллам мышечных клеток и мышечных волокон многоклеточных, у некоторых видов (стенатор, радиолярии) они обладают даже поперечной исчерченностью.

Регенерация соматических мышечных тканей осуществляется по мюбластическому типу, как показано А. А. Заварзиним и его школой. Рост в культуре сопровождается образованием мюсимпластов. В случае опухолевой катаплазии мышечная ткань скелетного типа у млекопитающих животных и человека дает начало рабдомиобластам (называть эти опухоли рабдомиосаркомами принципиально неправильно, так как все виды сарком — опухоли соединительнотканной или гладкомышечной природы, т. е. в конечном счете мезенхимного происхождения).*

Все остальные типы мышечных тканей характеризуются произвольным сокращением и вегетативной иннервацией, но во всех других отношениях чрезвычайно разнородны.

Мышечные ткани соматического типа наиболее древние, они возникают уже у кишечнополостных и протекли в ряду типов и классов животного мира наиболее длительную эволюцию. Неудивительно, что они и наиболее разнообразны.

Уже в ряду различных форм типа кишечнополостных можно обнаружить все три главных этапа эволюционного усложнения

* Согласно Международной гистологической классификации опухолей (ВОЗ, 1969), опухоли скелетных мышц относятся к группе мезенхимных опухолей под названием «рабдомиосаркомы». (Прим. ред.).

тканевых элементов соматической мускулатуры [7, 8]. У *Pelmatohydra* это — эпителиально-мышечные клетки, у *Tiaropsis* — обособленные от эпителия гладкомышечные клетки, а у активно плавающей медузы *Aglantha* — сетевидно связанные друг с другом поперечнополосатые мышечные волокна, образующие в совокупности многоядерный сипласт.

Как показано М. В. Атамановой [8], миоэпителиальные клетки бескишечных турбеллярий (*Convoluta convoluta*) при всей примитивности этих животных имеют очень сложную структуру, вводившую в заблуждение прежних исследователей.

У высшестоящих животных типов строение соматической мышечной ткани в значительной степени зависит от уровня двигательной активности. У сравнительно малоподвижных нематод туловищная мускулатура, входящая в состав кожномускульного мешка, состоит из своеобразных эпителиально-мышечных клеток, у медленно движущихся иглокожих и моллюсков — преимущественно из веретеновидных гладкомышечных клеток, а у членистоногих и позвоночных — из поперечнополосатых симпластических мышечных волокон (мионов). Широко распространены у аннелид, моллюсков и некоторых других типов беспозвоночных животных кососчерченные мышечные волокна и мышечные клетки (подробнее см. [9]).

Для поперечнополосатых мышечных волокон, кроме их многоядерности и саркомерного строения миофибрилл, характерны две сложно разветвленные системы каналов и цистерн: Т-система, образуемая ветвлением впячиваний плазмалеммы в толще саркоплазмы, и L-система, представляющая специфическую модификацию цистерн и каналов цитоплазматической (эндоплазматической) сети. В 1961 г. Мауро [10] открыл миосателлиты — веретеновидные уплощенные одноядерные клетки, находящиеся под сарколеммой, но не входящие в состав самого скелетномышечного волокна. Выяснилось, что миосателлиты представляют собой дремлющий камбий — резервные миобласты, за счет которых может происходить репаративная регенерация поврежденного мышечного волокна. Это открытие показало, во-первых, что мион не представляет собой тотально симпластической структуры, но содержит в своем составе и клетки, и, во-вторых, что скелетномышечную ткань нельзя считать лишенной камбия (некамбиальной), как думал в свое время акад. А. А. Заварзин.

У большинства животных мышечная ткань соматического типа имеет обычную эффекторную иннервацию. В частности, у позвоночных разветвления нейритов двигательных нервных волокон образуют на каждом мышечном волокне обычно моторную бляшку. Однако довольно широкое распространение имеет и другой тип иннервации, при котором, напротив, мышечные клетки образуют подчас довольно длинные отростки, входящие в мозг или в нервные стволы и образующие синаптические контакты с нервными волокнами. Такой «сарконейральный» тип нервно-мышечных соедине-

ний характерен для аскариды, иглокожих, ланцетника, обнаружен даже у гидры и ряда других животных [11]. То, что издавна считалось вентральными двигательными нервами у ланцетника, оказалось пучками отростков мышечных пластинок (клеток), направляющихся к нервной трубке и вступающих в синаптические контакты с ее моторными нейронами.

Существует большая литература о типах мышечных волокон [12], среди которых различают красные, белые и промежуточные, однако вдаваться в обсуждение этого специального вопроса здесь не место.

В эмбриогенезе позвоночных мышечная ткань скелетного типа, возникая из материала миотомов, проходит в своем развитии ряд стадий. Клетки миотомов приобретают веретеновидную форму, ядро становится более вытянутым, овальным, цитоплазма накапливает большое количество РНК, становясь базофильной. Так формируются одноядерные миобласты, которые пока лишены миофибрилярного аппарата. Затем, мигрируя поодиночке или группами к местам закладок мышц, они образуют цепочки и сливаются в длинные миосимпласты. Поскольку и на этой стадии развивающиеся мышечные элементы лишены признаков специфической тканевой дифференцировки, следует считать стадию миосимпластов относящейся к периоду доспецифической (дотканевой) дифференцировки. Специфическая (тканевая) дифференцировка начинается с появления миофибрилл сначала по периферии (периметру) миосимпласта, вследствие чего такая стадия получила название миотуб (мышечных трубочек). Иногда различают еще промежуточную стадию промиотуб. Процесс формирования (сборки) миофибрилл, которые вскоре становятся поперечнопсчерченными, прогрессирует в направлении от периферии к центру, и миотуба превращается в молодое мышечное волокно. По мере завершения формирования миофибрилярного аппарата ядра оттесняются к периферии, в сторону сарколеммы. Часть миобластов, не вошедших в состав симпласта, превращается в миосателлиты.

В литературе существуют попытки доказать происхождение части мускулатуры скелетного типа «на месте» из мезенхимы [13, 14]. Однако не следует забывать о том, что мезенхима в период формирования мускулатуры уже не представляет собой однородного зачатка. К ней оказываются примешанными клеточные элементы различного происхождения, находящиеся на пути миграции к местам закладки тех или иных органов (ганглиев, гонад и т. д.), в том числе и мало отличающиеся морфологически от окружающих мезенхимных клеток миобласты (или промиобласты), мигрирующие к местам закладки мышц конечностей и т. д. На основании совокупности современных данных о развитии мышечной ткани скелетного типа можно утверждать, что основным, если не единственным, источником образования ее элементов (мионов и миосателлитов) являются миотомы. По данным И. Н. Борисова [15], миобластическая детерминация распространяется и на небольшой дорсальный участок дерматома, перегибающийся в миотом; иначе

говоря, граница между дерматомом и мпотомом, формально («анатомически») проходящая по месту сгиба, по существу (в смысле характера детерминации клеточного материала) проходит латеро-вентральнее, по территории, обычно целиком относимой к дерматому.

Заслугой А. А. Заварзина и его школы является доказательство на широком круге объектов (кольчатые черви, моллюски, членистоногие, позвоночные) способности мышечных тканей соматического типа к регенерации и расшифровка (светооптическими исследованиями) источника и способа восстановления мышечных клеток и мышечных волокон. Было показано, что характерным для любых элементов соматической мышечной ткани является мнобластический способ регенерации. Из поврежденной одноядерной мышечной клетки дождевого червя или беззубки (при условии неповрежденности ее ядра) выползает мнобласт, состоящий из ядра и базофильной цитоплазмы, и дифференцируется в новую мышечную клетку, а остающийся от прежней клетки саркоплазматический чехол и мнотрибриллярный аппарат рассасываются либо фагоцитируются [16]. То же самое имеет место при регенерации многоядерных мышечных волокон у позвоночных [16, 17] и членистоногих [18], но с той разницей, что мнобластов из каждого волокна образуется сразу много. По мысли А. А. Заварзина, эти мнобласты возникают за счет сохранившихся способность к митозу «генеративных» ядер мышечного волокна, окружающих базофильной и свободной от мнотрибрилл саркоплазмой, тогда как остальные («трофические») ядра погибают вместе с мнотрибриллярным аппаратом и саркоплазматическим чехлом. Мнобласты сливаясь формируют симпластическую «мышечную почку», которая, вытягиваясь в длину, дифференцируется затем в мышечное волокно с новым сарколеммой и мнотрибриллярным аппаратом. В настоящее время сохранили только исторический интерес попытки отрицать мнобластическую стадию в регенерации мышечных волокон. Так, Н. Г. Хлопня [5] и другие исследователи полагали, что за счет поврежденного мышечного волокна формируется сразу симпластическая мышечная почка. Однако З. Ф. Шавлаев [19] убедительно показал, что мнобластическая стадия весьма кратковременна и потому ускользала от внимания ряда исследователей, изучавших процесс, начиная с недостаточно ранних сроков регенерации.

Упомянувшееся открытие мнотрибриллитов [10] и многочисленные исследования их участия в регенеративном процессе внесли существенный корректив в трактовку А. А. Заварзинным механизмов регенерации мышечных волокон. Стало ясно, что источником возникновения и размножения мнобластов являются не ядра с участками саркоплазмы самого симпластического мышечного волокна, а именно мнотрибриллиты.

Исследованиями А. Н. Студитского [20, 21] и сотрудников было впервые показано, что регенерировать могут не только мышечные волокна и мышечная ткань, но при определенных условиях

и скелетная мышца как орган. А. Н. Студитский отметил следующие условия, необходимые для полноценного восстановления мышечного органа: наличие грануляционной ткани, натяжение в области раны, возможности реиннервации и реваскуляризации, на более поздних стадиях — функционирование (сократительная деятельность). А. Н. Студитским и рядом других исследователей, проверявших и подтвердивших полученный им результат, было показано, что в кашице из измельченных мышц, внесенной в область удаленного мышечного органа, сохраняются участки неразрушенных мышечных волокон, за счет которых (как теперь ясно, за счет миосателлитов которых) могут строиться новые мышечные волокна и в конечном счете восстанавливается мышца как орган. Эти данные первоначально трактовались А. Н. Студитским как доказательство возникновения мышечных волокон из неклеточного живого вещества в духе «новой клеточной теории» О. Б. Лепешинской. Конъюнктурность этого пункта трактовки не должна заслонять большого значения установления самого факта не только тканевой, но и органной регенерации мышц соматического типа.

Н. Г. Хлопин [4] внес свой вклад в разработку проблемы регенерации скелетномышечных волокон, показав, что многократное отрезание концов мионов в условиях культивирования вне организма ведет к столь же многократному восстановлению их целостности, что уже тогда свидетельствовало о значительных регенеративных потенциях скелетномышечной ткани. Но главным в экспериментах Хлопина по культивированию частиц скелетномышечной ткани было установление своеобразного типа роста ее в культуре, не похожего на рост ни одной другой ткани: зона роста в этом случае образована миосимпластами, способными к дальнейшей дифференцировке в мышечные волокна вплоть до появления поперечной исчерченности миофибрилл и способности к спонтанным сокращениям.

Опухоли скелетномышечного происхождения — рабдомиобластомы («веретеночлеточная саркома») зачастую настолько теряют всякие признаки исходной нормальной ткани, что их подлинную тканевую природу удалось расшифровать только после многократных пассажей в тканевой культуре [22].

МЫШЕЧНЫЕ ТКАНИ ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ТИПА

Мышечные ткани целомического типа у позвоночных представлены сердечной мышцей и отчасти мышечной тканью легочной вены и ее разветвлений. У членистоногих, кроме мускулатуры сердца, целомическое происхождение имеет и мускулатура средней кишки [23]. Разумеется, мышечная ткань целомического типа могла появиться в филогенезе не раньше, чем появился целом с его эпителиальной выстилкой, производным которой эта мышечная ткань и является. Следовательно, мышечные ткани цело-

мического типа филогенетически значительно моложе, чем соматические. В связи с этим они и значительно менее разнообразны.

Как у членистоногих, так и у позвоночных мышечные ткани целомического происхождения (в средней кишке и сердце у первых, в сердце и легочной вене у вторых) представлены единой сетью балок, анастомозирующих друг с другом. Большинство гистологов до недавнего времени считали «волокна» сердечной мышцы у позвоночных имеющими такое же симпластическое строение, как и волокна соматической мускулатуры. Однако электронная микроскопия однозначно решила давний спор в пользу клеточного строения сердечной мышечной ткани [24, 25]. У всех ли животных мышечная ткань целомического типа имеет клеточное строение — этот вопрос пока остается открытым.

В качестве одного из отличительных признаков мышечной ткани целомического типа от таковой соматического обычно рассматривается наличие анастомозов (перемычек) между ее «волоконнами» (балками). Правда, давно известно существование таких связей и между волокнами соматической мускулатуры, но здесь это встречается скорее в виде исключения, например в мышцах языка [26]. В отличие от этого сердечная мышца позвоночных (а также мускулатура средней кишки насекомых [23]) всегда представляет по существу единую сеть анастомозирующих балок. Из других частных отличий следует отметить менее развитый, чем в соматических мышечных волокнах, миофибриллярный аппарат в кардиомиоцитах позвоночных, а в связи с этим не периферическую, а центральную локализацию ядра, слабее развитую сарколемму и т. д. С вегетативным характером иннервации всех разновидностей целомической мускулатуры связано и совершенно иное, чем в случае моторных бляшек на соматических мионах, строение эффекторных нервных окончаний.

Процесс эмбрионального развития сердечномышечной ткани существенно отличается от гистогенеза скелетномышечных волокон. Как показано Л. Д. Петровой [27] на куриных зародышах, Н. Р. Амосовой и Л. Д. Петровой [28] на зародышах кролика, вопреки традиционным представлениям, сердечная мышца возникает не из единого с эпикардом зачатка — миоэпикардальной пластинки, а из миокардиальной пластинки, тогда как эмбриональный эпикард нарастает на нее вторично со стороны венозного синуса. Этим фактом особенно ярко подчеркивается полная гомология сердечной мышцы целомическому эпителию. По данным Р. А. Дробышевой [29], клетки зачатка сердечной мышцы проходят стадии кардиомиобластов, прокадиомиоцитов и затем, с завершением формирования миофибриллярного аппарата, становятся кардиомиоцитами. В ходе этих превращений происходит падение пролиферативной активности сердечномышечных клеток, пока, наконец, способность к митотическому делению у кардиомиоцитов млекопитающих в желудочках сердца не репрессирована полностью, а в предсердиях — в значительной степени.

По наблюдениям П. П. Румянцева [30], кардиомициты предсердий при переходе в митотическое состояние претерпевают частичную дедифференцировку: происходит разборка значительной части миофибрилярного аппарата на отдельные саркомеры, что удается хорошо проследить с помощью электронного микроскопа. Благодаря такой разборке могут свободно осуществляться расхождение хромосом к противоположным полюсам кардиомицита, формирование дочерних ядер, плазматомия, сопровождаемая временной перетяжкой клеточного тела, после чего в дочерних клетках происходит заново сборка миофибрилл и восстановление исходного уровня дифференцированности.

Р. А. Дробышева проследила динамику цитоплазматических гранул в развивающихся кардиомицитах млекопитающих, показав, что в начале они широко распространены в мышечных клетках не только предсердий, но и желудочков, однако постепенно в миокардиоцитах желудочков они исчезают, сохраняясь лишь в некоторых клетках предсердий. Хотя с точностью функциональное значение этих включений неизвестно (по некоторым данным, в сердце млекопитающих они содержат катехоламины, но у большинства позвоночных их состав неизвестен), наличие их в кардиомицитах с несомненностью свидетельствует о существовании каких-то побочных функций, свойственных этим клеткам, помимо сократительной.

В силу репрессированности пролиферативной активности кардиомицитов желудочка у млекопитающих регенеративные возможности их сердечной мышцы крайне ограничены. По более старым данным П. П. Румянцева [31], повреждения, наносимые иголкой с вдетой в ушко металлической ниткой при прошивании миокарда желудочков прямо через стенку тела (без вскрытия грудной полости) у новорожденных котят, заживляются бесследно. У котят постарше заживляются только мелкие повреждения, а более значительные рубцуются. Налицо отчетливая возрастная динамика регенеративного эффекта после повреждений сердечной мышцы. Однако кусочки сердечной мышцы взрослых крыс, кошек и кроликов, пересаженные в подкожную жировую клетчатку взрослым же животным, имеют поначалу тенденцию к разрастанию; возрастает базофилия волокон, появляются митотические фигуры, несколько возрастает объем трансплантата, после чего, однако, он скоро рассасывается в силу неадекватности условий существования [32]. Следовательно, потенции к регенеративным процессам сохраняются в сердечной мышце взрослых млекопитающих, и вопрос заключается в том, как их выявить и стимулировать.

Большое количество экспериментов по стимуляции регенерации сердечной мышцы разнообразными веществами (нуклеиновыми кислотами, аминокислотами, медиаторами, лекарственными веществами) было проведено в последние два десятилетия Л. В. Полежаевым [33]. Некоторые из них дали позитивные результаты, однако гистологический анализ восстановительных процессов,

проведенный этим автором, недостаточен. Его утверждение о возникновении сердечномышечных клеток из «полибластов» (т. е. по сути дела из измененных лимфоцитов) вызывает сомнения в связи с убедительно показанной школами А. А. Заварзина и Н. Г. Хлопина стойкой детерминированностью свойств клеток и тканей разного происхождения. Эти сомнения высказывает в своей рецензии на одну из книг Л. В. Полежаева и американский исследователь Б. Карсон [34].

Рост сердечномышечной ткани в культуре чрезвычайно сходен с ростом мезотелия: зона роста представлена комплексным пластом плотно сомкнутых клеток с хорошо выявленными клеточными границами [35]. Этот факт полностью вытекает из общего (спланхнотомного) происхождения обеих тканей.

ГЛАДКАЯ МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ ВНУТРЕННОСТЕЙ И СОСУДОВ

Гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов у позвоночных имеет мезенхимное происхождение и в связи с этим обладает некоторым сходством с рыхлой соединительной тканью, в особенности с главной клеточной формой этой ткани — фибробластами. Хотя внешне клетки гладкой мышечной ткани позвоночных весьма сходны с гладкомышечными клетками соматической мускулатуры беспозвоночных (часть медуз, кольчатые черви, моллюски, иглокожие и др.), однако сходство это поверхностное и ограничивается веретеновидной формой клеток, вытянутой (палочковидной) формой единственного ядра, наличием гладких миофибрилл. Наряду с этим обе сравниваемые ткани характеризуются глубокими различиями. В противоположность произвольной, снабженной анимальной иннервацией гладкой соматической мускулатуре беспозвоночных гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов позвоночных обладает непроизвольной сократимостью и вегетативной (нередко двойной «антагонистической» — симпатической и парасимпатической) иннервацией. Клетки ее, подобно фибробластам, способны вырабатывать межклеточное вещество как аморфное [36], так и волокнистый компонент (аргиروفильные и эластические волокна — последние, например, в средней оболочке сосудов).

В противоположность мюбластическому способу регенерации соматической гладкой мышечной ткани беспозвоночных гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов позвоночных характеризуется иными источниками и способами регенерации. Поврежденная гладкомышечная клетка не образует мюбласта и не восстанавливает утраченной части (даже в случае сохранности ядра), а отмирает. Убыль поврежденных гладкомышечных клеток восполняется за счет митотического размножения уцелевших, а также за счет дифференцировки камбиальных клеток соединительной ткани (например, находящихся в интиме кровеносных сосудов [37]). Деафферентация гладкой мышечной ткани ведет к снижению

уровня дифференцированности ее клеток и к их уподоблению фибробластам соединительной ткани [38]. В культурах *in vitro* гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов образует травовидную зону роста, мало отличающуюся от той, которая образуется при культивировании соединительной ткани. Наконец, опухоли, развивающиеся из гладкой мышечной ткани — миосаркомы, близки к саркомам соединительнотканного происхождения и не имеют ничего общего с рабдомиобластами, образующимися в результате опухолевой катаплазии поперечнополосатой мышечной ткани скелетного типа.

Все сказанное делает достаточно обоснованным отнесение гладкой мышечной ткани внутренностей и сосудов позвоночных вместе с соединительной и скелетными тканями к единому «мезенхимальному» тканевому типу (по генетической классификации Н. Г. Хлопина [4, 5]). Мышечная ткань этого типа появилась в филогенезе только у позвоночных и, следовательно, филогенетически значительно моложе не только мышечных тканей соматического, но и целомического типа.

МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ НЕЙРАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Мышечные элементы нейрального происхождения также представлены только у позвоночных и, следовательно, являются их эволюционным новоприобретением. К этому типу сократительных элементов относятся мышцы, суживающие и расширяющие зрачок, также, возможно, цилиарная мышца глаза. У амфибий и млекопитающих этих мышцы образованы одноядерными гладкомышечными клетками, тогда как у рептилий и птиц многоядерными (симпластическими) поперечнополосатыми мышечными волокнами, которые местами разветвляются и анастомозируют друг с другом. В эмбриогенезе элементы сфинктера и дилататора зрачка возникают из клеток, выселяющихся из краев глазного бокала (точнее — его наружного листка) в мезенхимную основу радужины. Клетки дилататора у млекопитающих, включая человека, приобретают форму миоэпителиальных. Их пигментированная ядродержащая часть остается в строю клеток пигментного эпителия, составляющего наружный листок глазного бокала и позднее радужины, а базальная часть, вытягиваясь в форме мышечного волокна, развивает миофибриллярный аппарат. Клетки сфинктера приобретают веретеновидную форму обычных гладкомышечных клеток, почти не отличающихся от таковых мезенхимного происхождения. Однако в цитоплазме тех и других нейральных мышечных элементов нередко гранулы меланина.

В тканевой культуре мышцы нейрального происхождения образуют зону роста глиального типа [39, 40]. В случаях опухолевого роста за счет элементов этих мышц возникают глиобластомы.

МИОЭПИДЕРМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖЕЛЕЗ

Н. Г. Хлопин выделил в качестве еще одного типа мышечных тканей миоэпидермальные клетки слюнных, потовых и молочной желез. Эти клетки образуют в эпителиальном пласте концевых отделов и частично протоков этих желез базальный ряд, свидетельствующий о двурядности (своего рода рудимент многослойности) пласта и, следовательно, о принадлежности эпителия этих желез к эпидермальному тканевому типу. Железы энтеродермального типа никогда не имеют в составе эпителия своих концевых отделов и протоков базального ряда клеток, и в частности миоэпителиальных элементов. Миоэпидермальные клетки в слюнных, потовых и молочной железах образуют отростки, стелющиеся по базальной мембране и проникающие между основаниями железистых клеток. Эти цитоплазматические отростки содержат гладкие миофибриллы, и их сокращение вызывает сжатие концевых отделов и выдавливание секрета из них в протоки. Вместе с секреторными клетками соответствующих желез миоэпидермальные клетки развиваются в онтогенезе из кожной эктодермы (потовые и молочная железы) или из клеточного материала передней кишки (слюнные железы). При повреждении концевых отделов миоэпидермальные клетки способны, дифференцируясь (т. е. теряя отростки и миофибрилярный аппарат), митотически размножаться и давать начало как новым миоэпителиальным, так и секреторным клеткам. Следовательно, наряду с сократительной функцией они выполняют еще и роль камбия в железистом эпителиальном пласте. Иначе говоря, эти клетки, как бы вкрапленные в эпителиальный железистый пласт, по справедливому замечанию С. И. Щелкунова, не составляют какой-либо особой ткани и потому нет оснований выделять их в качестве самостоятельного пятого типа мышечных тканей в генетической системе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор имеющегося материала по мышечным тканям свидетельствует о том, что специализацию на сократительной функции могут претерпевать клеточные элементы самых различных тканей: эпителиальных, соединительной, некоторые элементы нервной системы и т. д. Клетки с сократительной функцией обнаружены в не столь давнее время в составе тимуса, нефронов и т. д. С другой стороны, известны примеры утраты мышечной тканью сократительной функции как ведущей и приобретение иной функции в качестве основной. Так, А. И. Бабухин еще в 1869 г. установил, что у электрических скатов эмбриональные поперечнополосатые мышечные волокна в составе некоторых сомитов теряют поперечную исчерченность, а затем и миофибриллы образуют на одном из своих концов уплощенные расширения и, черепицеобразно налегая друг на друга, формируют ткань железистых органов [41]. Эти

электрические пластинки (электролаксы) сохраняют симпластическое строение — единственный из морфологических признаков, доставшийся им от исходных скелетномышечных волокон, а также мощную анимальную иннервацию. Их специальной функцией становится аккумуляция значительного электрического заряда и осуществление мощных электрических разрядов для оглушения врага или добычи. Эта функция развивалась в результате резкой интенсификации электрической деятельности, свойственной сокращающимся мышечным волокнам (токи действия), тогда как сама сократительная функция в ходе эволюции постепенно исчезла (один из наиболее ярких примеров принципа смены функций по А. Дорну [42]).

Все сказанное свидетельствует о большой эволюционной пластичности тканевых структур, которая, однако, сочетается со стойкой эволюционной детерминированностью их свойств. В основе интенсификации сократительной функции мышечных тканей различного происхождения лежат одни и те же молекулярные, биохимические и физико-химические механизмы, присущие живой протоплазме. Этим обусловлены параллелизм в ходе эволюции мышечных тканей у животных, относящихся к филогенетически удаленным друг от друга стволам животного мира, например к членистоногим и позвоночным, а также конвергентные сходства в строении мышечных тканей, развивающихся из разных эмбриональных зачатков у одного и того же организма. Последнее хорошо иллюстрируется детальным сходством исчерченности миофибрил в поперечнополосатых скелетномышечных волокнах, в клетках сердечной мышечной ткани, а у рептилий и птиц также в сократительных элементах сфинктера и дилататора зрачка. Однако наряду с указанными сходствами мышечные ткани различного происхождения обнаруживают и глубокие различия, которые затрагивают их строение, функционирование, поведение в условиях эксперимента и патологии. Как справедливо указывает А. А. Заварзин [9], в клеточных культурах при смешивании миобластов из микотомов разных животных, например птиц и млекопитающих, удается получить гибридные мышечные волокна, образованные слиянием миобластов от тех и других. Но такие гибридные структуры никогда не возникают в смешанных культурах миобластов целомической и соматической мышечных тканей одного и того же организма. Этот пример особенно убедительно свидетельствует, с одной стороны, о глубоком сходстве мышечной ткани соматического (скелетного) типа у всех позвоночных и, с другой стороны, о глубоких исторически обусловленных различиях между соматической и целомической мышечными тканями у одного и того же организма.

Таким образом, в эволюции мышечных тканей теснейшим образом переплетаются дивергентное возникновение различий, освещаемое теорией дивергентной эволюции тканей Н. Г. Хлопина [5], и появление вторичных сходств (конвергенции, параллелизма),

объясняемое теорией параллелизмов А. А. Заварзина [43, 44]. Наряду с этим многие стороны эволюции мышечных тканей находят свое рациональное отражение в разработанных А. Н. Северцовым [2] морфобиологической теории эволюции и теории филэмбриогенеза. В самом деле, само возникновение клеток и тканей, специализированных на сократительной функции, а позднее связанные с дальнейшей интенсификацией этой функции появление поперечной исчерченности миофибрилл и организация саркомеров представляли собой важные узловые скачки в ходе морфофизиологического прогресса (ароморфозы). Наряду с принципом (модусом) интенсификации функций мы встречаемся в эволюции мышечных тканей и с принципом смены функций (см. выше о превращении мышечных волокон в электроплаксы — тканевые элементы электрических органов у рыб). Возникновение поперечноисчерченных мионов совершалось в ходе филэмбриогенеза членистоногих и позвоночных по способу (модусу) надставок (по А. Н. Северцову — анаболий). Первый шаг в этом направлении заключался в появлении миофибрилл и в интенсификации присутствующего всем клеткам свойства сократимости, второй — в слиянии одноядерных мышечных элементов в симпластические мышечные волокна, появлении поперечной исчерченности миофибрилл и организации саркомеров и в теснейшей связи с этим — в дальнейшей, еще большей интенсификации сократительной функции. Одним из важных доказательств эволюции мышечных волокон именно по способу анаболии является полнота рекапитуляции названных филогенетических этапов в эмбриональном гистогенезе. В ходе миогенеза у зародышей членистоногих и позвоночных воспроизводятся те же этапы и приблизительно в той же последовательности, какие пройдены в ходе эволюции.

Следует обратить также внимание и на различие в ходе гистогенеза провизорных и дефинитивных мышц. П. П. Иванов [45] впервые предположил, что ткани провизорных органов, вероятно, дифференцируются сокращенно и ускоренно по сравнению с одноименными дефинитивными. На примере соматической мышечной ткани это было подтверждено в выполненных под его руководством исследованиях В. А. Цвилленевой [46]. Выяснилось, что у личинок циклопов (низшие ракообразные) и миног (круглоротые) миогенез в отличие от развития дефинитивных мышц у тех же животных происходит не мультицеллюлярным, а сокращенным и ускоренным уницеллюлярным путем. Иначе говоря, симпластическое мышечное волокно возникает не в результате слияния множества одноядерных миобластов, а непосредственно из одного миобласта, ядро которого многократно делится. Аналогичные наблюдения были сделаны ранее над личиночными и дефинитивными мышцами амфибий [47].

Дальнейшая разработка проблемы происхождения и эволюции мышечных тканей сулит открытие новых фактов и закономерностей.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Plate L. Allgemeine Zoologie und Abstammungslehre, 1924, 2 : 163.
- [2] Северцов А. Н. Морфологические закономерности эволюции. М.; Л., Изд-во АН СССР, 1939.
- [3] Хлопни Н. Г. Арх. анат., 1940, 23 : 5.
- [4] Хлопни Н. Г. Культура ткапей. Л., Медгиз, 1940.
- [5] Хлопни Н. Г. Общбиологические и экспериментальные основы гистологии. Л., Изд-во АН СССР, 1946.
- [6] Щелкунов С. И. Арх. анат., 1955, 32 : 48.
- [7] Щелкунов С. И. Основные принципы клеточной дифференцировки. М., Медицина, 1977.
- [8] Атаманова М. В. Морфофункциональные особенности кожного покрова и центральной паренхимы бескишечных турбеллярий, кожного и кишечного эпителиев немертии и кишечнодышащих. Автореф. дис. Л., 1980.
- [9] Заварзин А. А. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л., Наука, 1976.
- [10] Мауго А. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9 : 463.
- [11] Гуляев Д. В. — Арх. анат., 1978, 74 : 8.
- [12] Мавринская Л. Ф., Резвяков Н. П. — Арх. анат., 1978, 75 : 23.
- [13] Schmidt V. — Zschr. mikr.-anat. Forschung, 1927, 8 : 97.
- [14] Кацнельсон З. С. — ДАН СССР, 1935, 11 : 64.
- [15] Борисов И. Н. Источники развития и гистогенез поперечнополосатых мышц у различных классов позвоночных. Автореф. дис. Л., 1971.
- [16] Заварзин А. А. — Арх. анат., 1938, 19 : 342.
- [17] Крюкова З. И. — Арх. анат., 1938, 19 : 382.
- [18] Жинкин Л. Н. — Арх. анат., 1938, 19 : 402.
- [19] Шавлаев З. Ф. — Арх. анат., 1956, 36 : 38.
- [20] Студитский А. Н. — Арх. анат., 1953, 30 : 10.
- [21] Студитский А. Н. Экспериментальная хирургия мышц. М., Изд-во АН СССР, 1959.
- [22] Тимофеевский А. Д. Эксплантация опухолей человека. М., Изд-во АМН СССР, 1947.
- [23] Кочетов Н. Н. — В кн.: Памяти Алексея Алексеевича Заварзина. М.; Л., Изд-во АН СССР, 1948 : 109.
- [24] Sjöstrand F. S., Andersson E. — Experientia, 1954, 10 : 369.
- [25] Kisch V. — Zschr. wiss. Mikr., 1956, 62 : 510.
- [26] Дмитриева Е. В. — ДАН СССР, 1950, 72 : 785.
- [27] Петрова Л. Д. — Тез. VIII Всесоюзн. съезда анатомов, гистологов и эмбриологов. Ташкент, изд-во «Медицина» УзССР, 1974 : 293.
- [28] Амосова Н. Р., Петрова Л. Д. — Тр. VII Всесоюзн. съезда анатомов, гистологов и эмбриологов. Тбилиси; Мецниереба, 1969 : 376.
- [29] Дробышева Р. А. — Арх. анат., 1975, 69 : 23.
- [30] Румянцев П. П. — Арх. анат., 1972, 62 : 115.
- [31] Румянцев П. П. Экспериментально-гистологическое исследование сердечной мышцы кошки в возрастном разрезе. Автореф. дис. Л., 1953.
- [32] Чэнь Ди. Исследование регенеративных возможностей сердечной мышцы некоторых млекопитающих в условиях подкожной трансплантации. Автореф. дис. Л., 1957.
- [33] Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Музлаева Н. А., Явич М. П. Стимуляция регенерации мышцы сердца. М., Наука, 1965.
- [34] Карлсон Б. — Арх. анат., 1979, 77 : 102.
- [35] Цымбал В. Е. — Арх. анат., 1937, 17 : 244.
- [36] Левица М. Я. — ДАН СССР, 1952, 86 : 837.
- [37] Щелкунов С. И. Сосудистая мезенхима и ее роль в постэмбриональном морфогенезе сосудистой стенки. Л., Изд-во ВИЭМ, 1937.
- [38] Григорьева Т. А. — Арх. анат., 1959, 36 : 3.

- [39] В и п н и к о в Я. А. — ДАН СССР, 1938, 13 : 2.
- [40] В и п н и к о в Я. А. — Биол. журн., 1938, 7 : 975.
- [41] Б а б у х и н А. И. Развитие и значение электрического аппарата у Torpedo. — Протоколы заседаний II Съезда русских естествоиспытателей. М., 1869.
- [42] D o h r n А. Der Ursprung der Wilbertiere und das Prinzip des Funktionswechsels. Leipzig, 1875.
- [43] З а в а р з и н А. А. Очерки по эволюционной гистологии нервной системы. М.; Л., Медгиз, 1941.
- [44] З а в а р з и н А. А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М. Медгиз, 1945, вып. 1; 1947, вып. 2.
- [45] И в а н о в П. П. Общая и сравнительная эмбриология. М.; Л., Биомедгиз, 1937.
- [46] Ц в и л е н е в а В. А. В кн.: Памяти академика Алексея Алексеевича Заварзина. М.; Л., Изд-во АН СССР, 1948 : 130.
- [47] G l ü c k s m a n n А. — Zschr. Anat. Entw. Gesch., 1934, 103 : 303.

П. П. Р У М Я Н Ц Е В, И. Л. Е Р О Х И Н А

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ В ГИСТОГЕНЕЗЕ СКЕЛЕТНЫХ, СЕРДЕЧНОЙ И ГЛАДКИХ МЫШЦ ПОЗВОНОЧНЫХ

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

Миогенез привлекает внимание представителей различных областей биологии не только потому, что возникновение сократимых систем представляет собой одно из наиболее удивительных проявлений клеточной дифференцировки. Соотношение последней с пролиферацией миогенных клеток оказалось весьма сложным и неидентичным в различных типах миогенеза. Наиболее полно в этом отношении изучен соматический миогенез, поэтому он обычно служит как бы эталоном, с которым сопоставляется своеобразие дифференцировки других типов мышц — сердечной (кардиомиогенез) и гладких (лейомиогенез).

СОМАТИЧЕСКИЙ МИОГЕНЕЗ

В настоящее время доказано, что многоядерные волокна скелетных мышц образуются «мультицеллюлярно», т. е. путем слияния одноядерных клеток, миобластов, а не «уницеллюлярно» — за счет последовательных митозов ядер без цитокинеза, амитозов или каких-либо других процессов (рис. 1). Историю вопроса о происхождении многоядерных симпластов и разные варианты классификации миогенных элементов можно найти в ряде обзоров [1—3]. Такое представление сложилось на основании изучения развивающихся мышц с помощью микрокинематографии, цитоспектрофотометрии, электронной микроскопии, электронномикроскопической автордиографии, гибридизации миобластов разного генетического происхождения, а также использования ингибиторов митоза и синтеза ДНК (см. обзоры [2—5]).

Миобласты происходят из мезодермальных мезенхимных клеток [1, 4 и др.]. В ряду генераций клеток, дающих начало миобластам (число генераций пока не уточнено), имеется стадия, когда премногочленные клетки, возможно, являются бипотенциальными, т. е. способны при клонировании давать как миобласты, так и фибробласты; клонирование клеток из более поздних зачатков мышц дает колонии, содержащие только миобласты [6]. Миобласты пред-

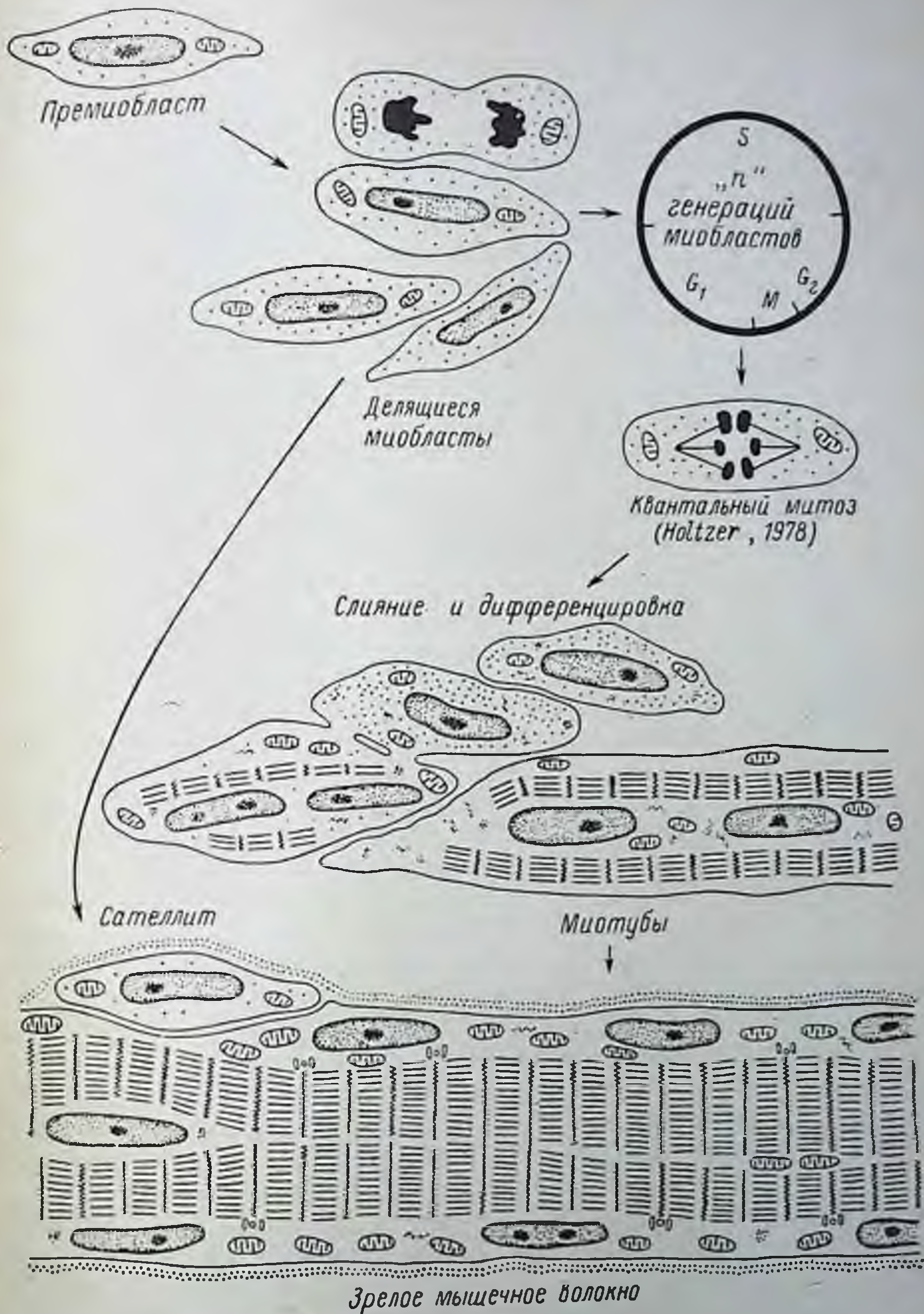


Рис. 1. Схема соматического миеогенеза.

ставляют собой удлинённые одноядерные клетки, имеющие центрально расположенные «эухроматические» ядра с хорошо заметными ядрышками и обильные свободные рибосомы, собранные в розеткообразные или цепочечные полисомы. Короткие каналы гранулярной эндоплазматической сети редки, аппарат Гольджи развит умеренно, митохондрии небольшие, овальные. Обычно в таких областях отсутствуют мюфиламенты, мюфибриллы и саркоплазматическая сеть [7—10].

На развивающихся *in vitro* скелетных мышцах цыпленка в опытах с одновременным применением меченого тритием предшественника ДНК, ^3H -тимидина (^3HT), и флуоресцирующего антимюзина [11] убедительно показано, что синтезируют ДНК и делятся только одноядерные области, не реагирующие с антисывороткой. На основании этих экспериментов сделан вывод о взаимоисключении процессов пролиферации и дифференцировки в соматическом мюгенезе. Через короткие сроки после экспозиции с ^3HT метка обнаружена только над ядрами областей, однако через более длительное время (крайне редко через 10—12 ч и в основном через 24—48 ч) меченые ядра появляются и внутри мютуб [4, 11—13], что трактуется как доказательство слияния областей.

В нашей лаборатории М. С. Бушмариной методом электронно-микроскопической автордиографии четко продемонстрировано, что в развивающихся *in vivo* мышцах языка и конечностей эмбрионов мыши ^3HT «импульсно» (через 1—2 ч после инъекции изотопа) метит исключительно ядра недифференцированных одноядерных клеток, лежащих на поверхности развивающихся мютуб (рис. 2, рис. 3). Напротив, через 48 ч после инъекции ^3HT метятся и ядра внутри мютуб, очевидно, в результате прошедшего слияния (рис. 4). Это согласуется с аналогичными результатами других авторов [14].

По данным цитофотометрии, все ядра внутри многоядерных мютуб имеют количества ДНК, эквивалентные диплоидному (2С), в то время как одноядерные области содержат от 2С до 4С ДНК (см. [2, 3]), что косвенно подтверждает наличие синтеза ДНК только в одноядерных клетках. С этим выводом коррелирует и низкая активность α -ДНК-полимеразы в мютубах по сравнению с активностью в делящихся областях [15, 16].

При электронномикроскопических исследованиях мюгенеза в соответствии с представлением о взаимоисключении процессов пролиферации и дифференцировки митозы отмечали только в одноядерных клетках, лишенных мюфиламентов; ни митозов, ни амитозов в мютубах, содержащих более одного ядра и имеющих мюфиламенты и мюфибриллы, выявлено не было [8, 17—19].

Претерпев ряд делений, области выходят из митотического цикла (рис. 1). Хольцер и его коллеги [4, 6, 12, 13] полагают, что последний митоз, названный «квантальным митозом», — критическое событие, после которого одна или обе дочерние клетки переходят в удлинённый период G_1 , в категорию постмитотических

мнобластов, и приобретают (в результате изменения свойств их мембран) способность к слиянию.

Взаимодействие вышедших из митотического цикла мнобластов рассматривается как один из важных моментов в соматическом мюгенезе (обзор литературы см. [20, 21]). На основании электронно-микроскопических наблюдений считают, что слияние может иметь место между мнобластами, между мнобластами и мюотубами и между возникающими мюотубами [8, 10, 17, 19]. В зоне соприкосновения мембран тесно прилегающих друг к другу мюогенных клеток как *in vitro*, так и *in vivo* обнаружены контакты, подобные щелевым (*gap junctions* [20]), плотным (*tight junctions* [18]), а также структуры типа десмосом [10, 20] или *fasciae adherentes* [19]. Однако специализированные контакты, в частности *gap junctions*, вероятно, непосредственно не связаны с процессом слияния мюогенных элементов [21].

Хотя синтез мюофибриллярных белков происходит, как правило, в многоядерных мюотубах и волокнах, имеются указания на наличие мюофибриллярного мюозина, мюофиламентов и мюофибрилл уже в одноядерных клетках. Так, в мнобластах сомитов куриного эмбриона мюофибриллярные белки обнаружены методом иммунофлуоресценции [22], а при исследовании ультраструктуры клеток отмечено наличие саркомеров [17]. То же характерно и для мнобластов из сомитов рыбы *Brachydanio rerio* [23]. В развивающихся мышцах конечностей эмбрионов мыши в некоторых мнобластах описаны беспорядочно лежащие мюофиламенты и мюофибриллы (1—4 саркомера в длину в тонком срезе) с неотчетливыми Z-дисками и каналы гладкой саркоплазматической сети [10]. Мюофиламенты, а иногда и мюофибриллы присутствуют и в культивируемых мнобластах, слияние которых блокировано [24—27].

Таким образом, слияние и многоядерность не являются обязательными для начала дифференцировки. Однако выход клеток из митотического цикла в соматическом мюгенезе позвоночных является необходимым предварительным условием для слияния и мюофибриллогенеза [24, 28 и многие другие].

Интересную модель для изучения мюогенеза представляет культура мюогенных клеток из регенерирующего хвоста ящериц [28]. Одноядерные мнобласты, вышедшие перед слиянием из митотического цикла, имеют в отличие от пролиферирующих клеток округлую форму. Они не включают ³HT и содержат диплоидное количество ДНК. Эти клетки неоднородны. Те мнобласты, в которых методом иммуноцитохимии не выявляется мюозин, могут вновь вступать в цикл. Напротив, мюозин-положительные мнобласты оказываются необратимо вышедшими из митотического цикла [28]. В подобных экспериментах не выявляется так называемый конститутивный, или общеклеточный, мюозин, присутствующий в самых разных, в том числе мышечных, клетках и биохимически отличный от мюофибриллярного мюозина по составу легких цепей и по другим признакам [29]. Некоторые авторы даже терминологически

противопоставляют миобласты, участвующие в пролиферации, называя их презумптивными миобластами (премиобластами), и собственно миобласты, под которыми подразумевают клетки, прошедшие квантальный митоз и уже не способные к синтезу ДНК и делению [4, 6]. Премиобласты никогда не содержат тяжелых или легких цепей миофибрилярного миозина, ацетилхолиновых рецепторов и креатинфосфокиназы (т. е. белков, которые могут вырабатываться миобластами до их слияния), но синтезируют ДНК, а также тяжелые и легкие цепи конститутивного миозина [6].

Однако в некоторых случаях отрезок времени между блокированием синтеза ДНК и началом слияния и дифференцировки может быть очень коротким, а доля миобластов, находящихся вне цикла, но еще не слившихся, весьма ничтожна. Так, в опытах *in vitro* при «насыщении» ^3HT в период перед слиянием фактически 100% однопядерных миобластов включают предшественник ДНК [30]. В развивающихся *in vivo* мышцах крыла 11-суточных куриных эмбрионов при непрерывном введении ^3HT в течение 21 ч метится 92% однопядерных миобластов [31]. При этом внутри миотуб около 11% ядер имеют метку, что указывает на происходящее на этой стадии активное слияние и образование многоядерных клеток. Предполагается, что до выхода из митотического цикла перед слиянием в многоядерные симпласты по существу все однопядерные миобласты остаются в цикле, но период G_1 становится длиннее (табл. 1) и более вариабельным [30, 31]. Вместе с тем приведенные выше данные о наличии миофиламентов и миофибрилл в некоторых миобластах все же указывают на существование небольшой популяции клеток, прекративших пролиферацию и начавших синтез специфических белков. Слияние миобластов, по-видимому, протекает быстро, поскольку ультраструктурные картины этого процесса *in statu nascendi* публикуются редко [19, 21, 32].

Миотубы, образующиеся в результате слияния миобластов, представляют собой вытянутые многоядерные синцитии с центрально расположенными ядрами. В них интенсивно синтезируются актин и миозин, которые путем полимеризации образуют филаменты, собирающиеся в миофибриллы (для обзора литературы по миофибриллогенезу см. [3, 5, 8]). Толстые филаменты с самого начала своего образования имеют дефинитивную длину (1.5—1.6 мкм) и толщину (15 нм) [4]; их дифференцировку связывают с обилием «миозиновых», нередко спиралеобразных полисом, в состав которых входит до 50—60 рибосом [33]. Конститутивный миозин мышечных клеток никогда не образует толстых филаментов [34]. Важную роль в ориентации пучков миофиламентов, наметке границ будущих саркомеров путем закрепления концов актиновых нитей и в формировании таким образом первичных миофибрилл, по данным ряда авторов, играют зачатки Z-дисков, возникающие часто в виде «пятен» плотного материала (так называемые Z-bodies) вблизи от клеточной поверхности [35, 36]. Однако последовательность событий в ходе саркомерогенеза не может считаться окон-

чательно установленной, поскольку описывается и первичное возникновение миофибрилл с намеченными саркомерами при отсутствии четкого материала Z-дисков [4, 37, 38]. Особенно сложен вопрос о взаимоотношениях тонких (5—6 мкм диаметром) актиновых филаментов, постоянно присутствующих в различных, в том числе несократительных, клетках, и тонких нитей, возникающих в ходе саркомерогенеза [4]. Концы миофибрилл постепенно закрепляются в зонах формирующихся мышечно-сухожильных контактов, где тонкие нити последнего саркомера «заякориваются» в плотном субстрате, который отлагается здесь на внутренней поверхности сарколеммы [39]. Подобные структуры, возможно, следует сопоставлять с аналогично организованными вставочными дисками кардиомиоцитов (см. ниже), также обеспечивающими передачу механического напряжения на зону контакта. Постепенная дифференцировка миотуб, в ходе которой число миофибрилл быстро нарастает, детально описана на примере развития мышц рептилий [7], птиц [8, 9, 17] и млекопитающих [10, 18, 38]. Помимо актиновых и миозиновых филаментов, многочисленны не связанные с ними переходными формами так называемые промежуточные филаменты, 8—11 мкм диаметром [40]. Все филаменты, а также митохондрии, ядра и микротрубочки ориентированы параллельно продольной оси миотубы. В цитоплазме многочисленны гранулы гликогена и полисомы, которые часто тесно связаны с миофиламентами и миофибриллами. Рядом с миофибриллами развиваются саркоплазматическая сеть и T-система; первая из каналов гранулярной эндоплазматической сети, а последняя путем инвагинации плазмалеммы [3, 41]. Количество митохондрий после слияния миобластов возрастает и продолжает увеличиваться в ходе дифференцировки мышечных волокон. При этом митохондрии обогащаются кристами, а в некоторых мышцах образуют у взрослых крыс сложные непрерывные сетевидные структуры вблизи от дисков Z [42].

Дифференцировка волокон скелетных мышц по сравнению с дифференцировкой миокарда характеризуется очень высокими темпами [43], что может определяться полным переключением всех ядер миотуб на гетеросинтетическую (спитез РНК, но не ДНК) активность, а также своего рода синергизмом ядер в составе миосинцития. Большинство волокон приобретает зрелый вид у птиц уже к вылуплению [17], а у млекопитающих к рождению [10, 18], хотя полностью зрелые волокна конечностей можно видеть только у 2-недельных мышей [10].

В сформированном мышечном волокне миофибриллы заполняют большую часть цитоплазмы и регулярно упакованы, ядра занимают периферическое положение, число рибосом уменьшается, саркоплазматическая сеть и T-система образуют триады на уровне дисков Z. В процессе соматического мюгенеза количество миобластов (стволовых клеток) постепенно уменьшается, но некоторые недифференцированные одноядерные клетки сохраняются на поверхности

дифференцирующихся мютоуб и волокон под их базальной мембраной (рис. 1) и принадлежат к реплицирующейся популяции. Эти клетки, имеющие «гетерохроматические» ядра, хорошо различаются к концу эмбрионального периода [10, 18] и являются предшественниками клеток-мюсателлитов взрослых животных [44]. С возрастом количество сателлитов уменьшается [45] и приближается у взрослых животных к 2—8% общего числа ядер волокон [46, 47]. У 15—20-суточных крыс ^3HT «импульсно» метит до 23% общего количества сателлитов [48, 49].

Показано, что число ядер увеличивается с возрастом в скелетной мышце человека [50] и крысы [51]. Природу делящихся ядер позволил определить метод электронномикроскопической автордиографии. В скелетной мышце 17-суточных крыс через 1, 6 и 10 ч после введения ^3HT метит ядра клеток-сателлитов. За митозом следует включение через 24 ч одного или обоих дочерних ядер в соседние мышечные волокна [14], т. е. у растущих животных сателлиты функционируют как мюбласты.

Относительно высокую способность скелетных мышц к тканевой регенерации большинство авторов связывают с сохранением и активацией мюсателлитов, преобразование которых в мюбласты, пролиферация и слияние с последующей дифференцировкой мюфибрилл воссоздают основные этапы нормального мюгенеза (см. [52, 53]). Роль сателлитов в тканевой регенерации мышц особенно рельефно показана Сноу [45] и подтверждается данными электронномикроскопической автордиографии [54, 55].

Динамика пролиферативной активности клеток в процессе соматического мюгенеза исследовалась в ряде работ. По данным светооптической автордиографии, в ходе дифференцировки мышечных волокон постепенно снижаются индексы меченных ^3HT ядер. В развивающейся мышце языка крыс на 14, 17, 19, и 20-е сутки эмбриогенеза индексы «импульсно» меченных ядер равны соответственно 34, 14, 8 и 1.5%; параллельно падению числа ядер в фазе синтеза ДНК в период от 14-х до 19-х суток эмбриогенеза уменьшается и митотический индекс от 3.1 до 0.3% [56]. При трехкратных введениях ^3HT на 15-е и 18-е сутки эмбриогенеза у мышцей индекс меченых ядер снижается в менее дифференцированных участках мышц языка примерно с 77 до 35%, а в более дифференцированных зонах на тех же стадиях — с 20 до 10% [57].

Аналогичное снижение индексов митотически делящихся и меченных ^3HT ядер происходит и при развитии мышц цыпленка [58—61]. На 7, 11, 16, 18 и 20-е сутки эмбриогенеза индексы «импульсно» меченных ^3HT ядер в скелетной мышце равны соответственно 16, 14, 11, 3.3 и 2.4% [59]. По данным Р. К. Данилова [61], в мышце конечностей куриных эмбрионов в период от 11-х до 19-х суток развития индексы меченых ядер снижаются с 12 до 1.2%.

В свете приведенных данных электронномикроскопической автордиографии, падение индексов ядер в фазе синтеза ДНК

Таблица 1

Суммированные данные светооптической автордиографии по индексам меченых ядер после однократных («импульсная» метка, I) и повторных («пролиферативный пул», II) введенный ^3H -тимидин, а также данные по продолжительности митотического цикла (T) и его фаз (G₁, S, G₂, M), вычисленные по кривым меченых митозов [62] в развивающихся in vivo соматических мышцах

Виды животных, стадии развития и исследованные мышцы	I (%)	II (%)	Продолжительность митотического цикла и его фаз (ч)					Литературные источники
			T	G ₁	S	G ₂	M	
Кура:								
9-суточный эмбрион, мышца конечности	21	38	10.5	3.9	5.9	1.8	0.3	[58]
16-суточный эмбрион, мышца конечности	8	23	16.6	8.9	5.9	1.8	0.2	[58]
11-суточный эмбрион, мышца крыла	20	46	15.0	6.6	6.4	2.0	—	[63]
11-суточный эмбрион, скелетная мышца	14	—	12.0	3.0	7.0	2.0	0.2	[59]
16-суточный эмбрион, скелетная мышца	11	37	21.0	13.0	6.0	2.0	0.2	[59]
10-суточный эмбрион, m. complexus	24	36	10.3	1.7	6.6	1.8	0.2	[60]
m. biceps femoris	28	42	10.3	1.5	6.9	1.6	0.3	[60]
m. pectoralis	29	44	10.6	2.0	6.9	1.5	0.3	[60]
12-суточный эмбрион, m. complexus	18	31	11.6	3.6	6.6	1.2	0.2	[60]
m. biceps femoris	23	38	11.5	3.6	6.8	0.9	0.3	[60]
m. pectoralis	23	39	11.6	3.6	6.7	1.1	0.3	[60]
16-суточный эмбрион, m. complexus	11	24	13.9	5.8	6.5	1.5	0.1	[60]
m. biceps femoris	9	20	13.5	5.3	6.1	2.0	0.1	[60]
m. pectoralis	7	15	13.1	5.1	6.3	1.7	0.1	[60]
11-суточный эмбрион, мышца конечности	12	—	17.0	6.5	8.5	2.0	—	[61]
16-суточный эмбрион, мышца конечности	1.3	19	17--18	5--6	9.5	2.0	0.3	[61]
Мышь, 15-суточный эмбрион, мышца языка	—	—	11.0	1.5	7.5	2.0	—	[57]
Крыса, 17-суточный эмбрион, мышца языка	14	43	18--20	8--10	6--7	3.0	2.5--3.0	[56]

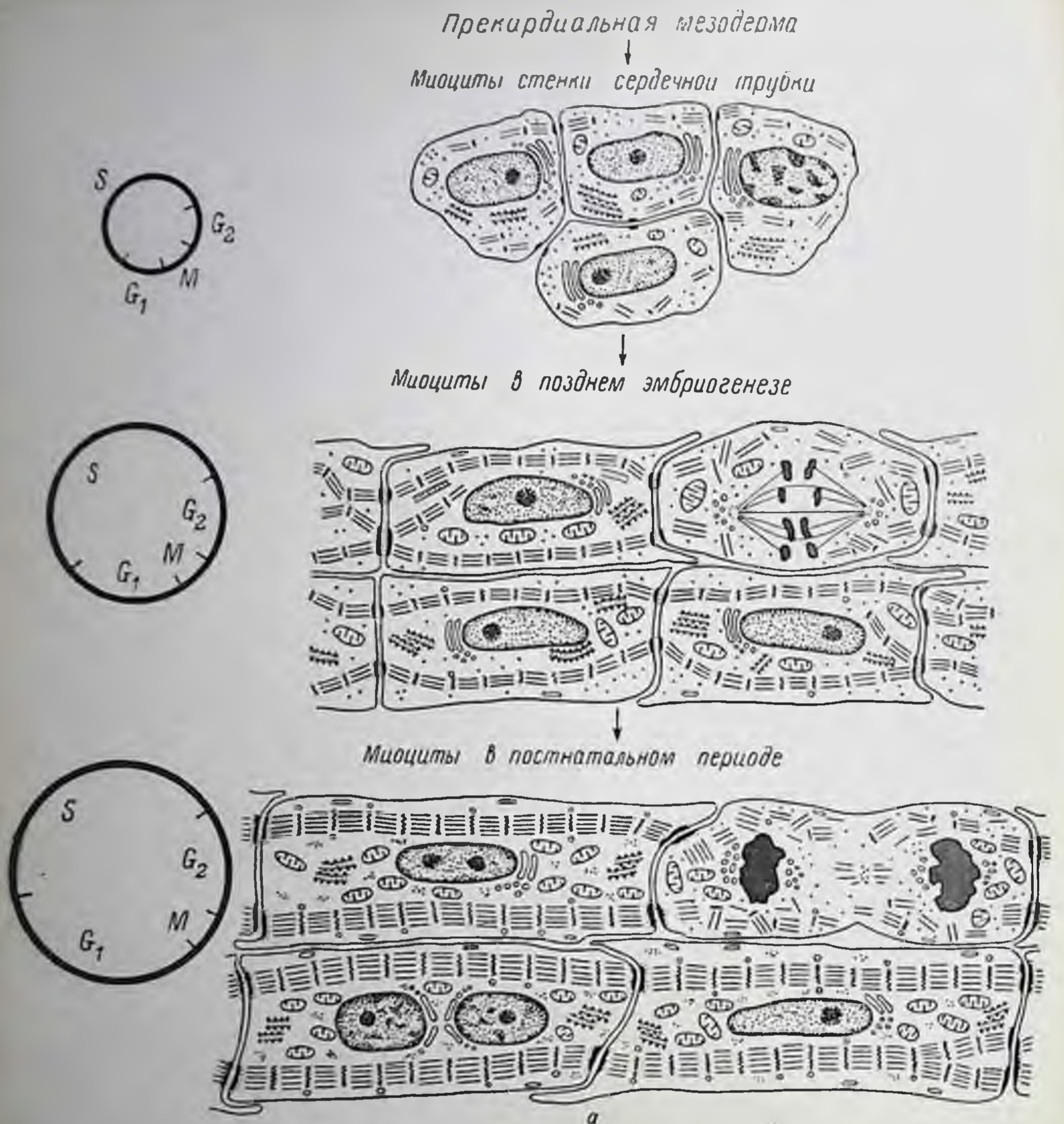


Рис. 6. Схемы кардиомиогенеза (а) и лейомиогенеза (б).

Митозом делятся постепенно дифференцирующиеся миоциты. Кружки отражают изменения длительности митотического цикла и его периодов в процессе дифференцировки.

в ходе миогенеза отражает постепенное снижение числа пролиферирующих клеток (миобластов) на поверхности дифференцирующихся мышечных волокон, связанное с выходом миобластов из митотического цикла перед их слиянием. Основные данные по пролиферативной активности миобластов в развивающихся *in vivo* соматических мышцах приведены в табл. 1.

Как видно из этой таблицы, в процессе дифференцировки мышц у постепенно уменьшающейся популяции пролиферирующих камбальных клеток (миобластов) длительность митотического цикла,

Мезенхимы

↓
Миоциты в раннем эмбриогенезе



↓
Миоциты в позднем эмбриогенезе



↓
Миоциты в постнатальном периоде



б

Рис. 6 (продолжение).

по данным большинства авторов, увеличивается незначительно, а если такое удлинение и отмечается, то в основном за счет периода G_1 [58—60], что соответствует предположению об увеличении длительности этой фазы и ее вариабельности перед активным слиянием миобластов [31]. По данным Кикучи и др. [60], в разных мышцах продолжительность митотического цикла и его фаз примерно одинакова.

Как отмечает А. А. Заварзин [57], картина изменения митотических циклов, имеющая место в процессе соматического митоза, характерна для типичных камбиальных клеточных популяций. Основной особенностью динамики пролиферации в развивающихся мышцах является прогрессирующий выход миобластов из митотического цикла при тенденции к сохранению у пролиферирующих клеток относительно стабильного митотического цикла.

Таким образом, многоядерность волокон соматических мышц позвоночных животных возникает за счет слияния мнобластов, вышедших из митотического цикла. Дифференцировка миофламентов и миофибрилл независимо от того, начинается ли она в еще не слившихся постмитотических мнобластах или в миотубах, необратимо выключает ядра из митотического цикла. Сохраняющаяся в зрелых волокнах фракция миосателлитов, по-видимому, является источником регенерации скелетных мышц.

Следует подчеркнуть, что не рассматриваемый здесь сколько-нибудь подробно соматический миогенез беспозвоночных в плане соотношения пролиферации и дифференцировки может иметь ряд существенных особенностей. Так, при развитии межсегментных мышц у личинок тутового шелкопряда *Bombyx mori* ядра внутри многоядерных волокон способны синтезировать ДНК, несмотря на наличие в саркоплазме хорошо организованного сократительного аппарата [64, рис. 5]. Однако в этих ядрах полностью блокируется способность к митотическому делению, что приводит к их интенсивной полиплоидизации (до 256 C) [65]. В результате в межсегментных мышцах выявляются как диплоидные, так и полиплоидные ядра одновременно, а степень плоидности ядер внутри волокна повышается с возрастом личинок. В то же время соотношение процессов пролиферации и дифференцировки при развитии других мышц беспозвоночных часто полностью отражает закономерности, установленные для соматического миогенеза у позвоночных [66].

КАРДИОМИОГЕНЕЗ

В ходе кардиального миогенеза в клетках, имеющих иное, чем мнобласты скелетных мышц, происхождение (как известно, миокард развивается из эпителия спланхномезодермы) и не способных к слиянию, возникает весьма сходная по ультраструктуре и биохимической организации сократительная система. Многие авторы [4, 67, 68] были склонны видеть принципиальное сходство также в соотношении процессов пролиферации и дифференцировки при развитии скелетных и сердечной мышц, полагая, что в последней синтез ДНК и митоз тоже не совместимы с миофибриллогенезом. Возник вопрос о роли гипотетических клеток-предшественниц, или стволовых миогенных клеток, в кардиальном миогенезе и о возможной гибели дочерних клеток после митоза дифференцированных кардиальных миоцитов [4, 40, 69]. Суммированные в настоящем обзоре данные последних лет свидетельствуют, однако, в пользу того, что клетки миокарда утрачивают способность к синтезу ДНК и митозу лишь после накопления в ходе последовательных генераций значительного числа высокоорганизованных миофибрилл, претерпевающих при каждом делении сложные циклы дезинтеграции и восстановления (рис. 6—13). Наличие обзоров, достаточно полно характеризующих своеобразие дифференцировки кардиальных миоцитов как на светооптическом [70],

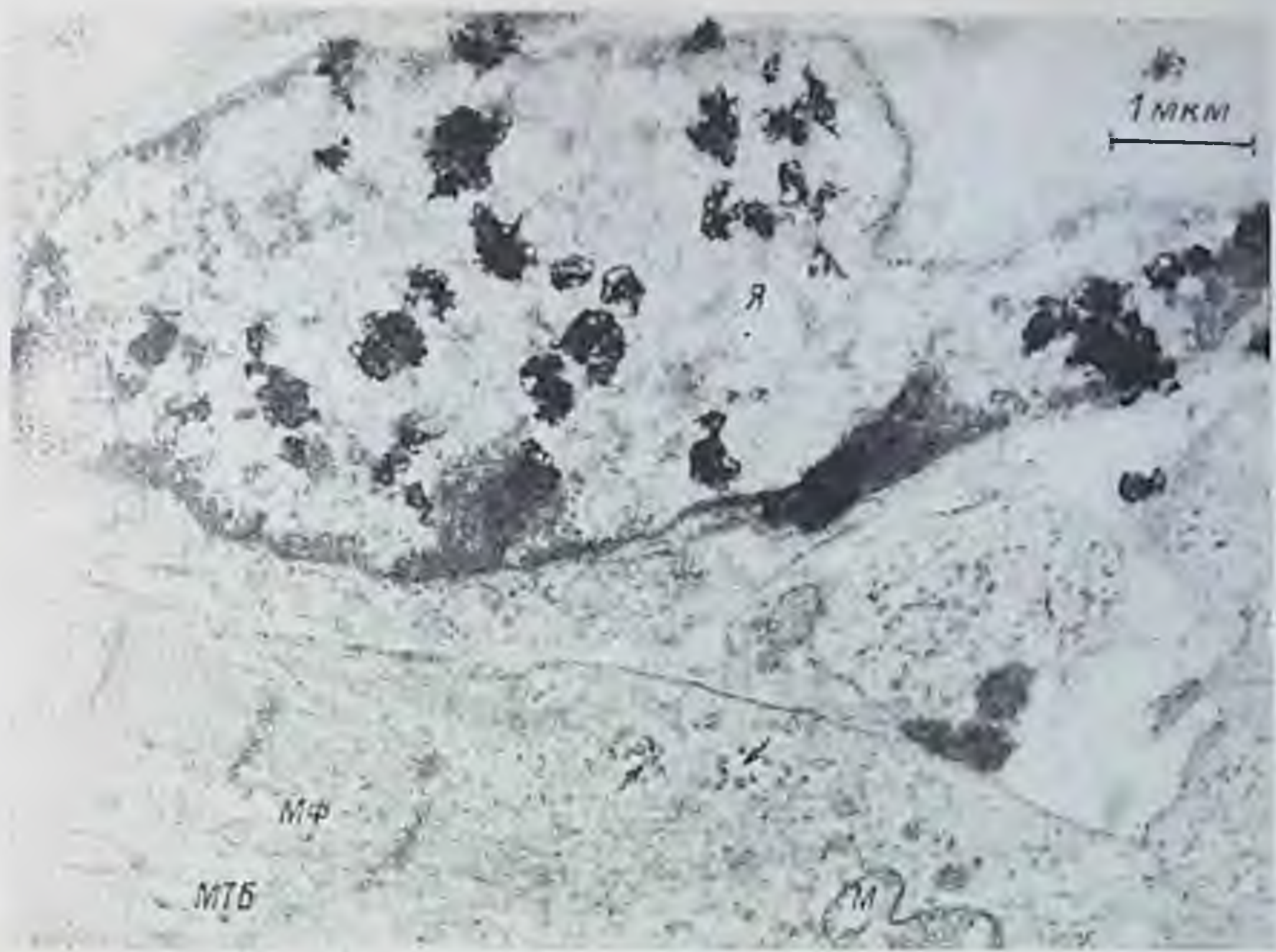


Рис. 2. Продольный срез развивающейся миотубы (мтб) мышцы языка 15-суточного эмбриона мыши.

Через 1 ч после введения ^3HT . На поверхности миотубы, содержащей незрелые миофибриллы (мф), митохондрии (м) и многочисленные розеткообразные полисомы (стрелки), лежит недифференцированная клетка с ядром (я), меченным ^3HT . После «импульсного» введения ^3HT (через 1—4 ч) метятся только ядра недифференцированных клеток.
Фото М. С. Бушариной.

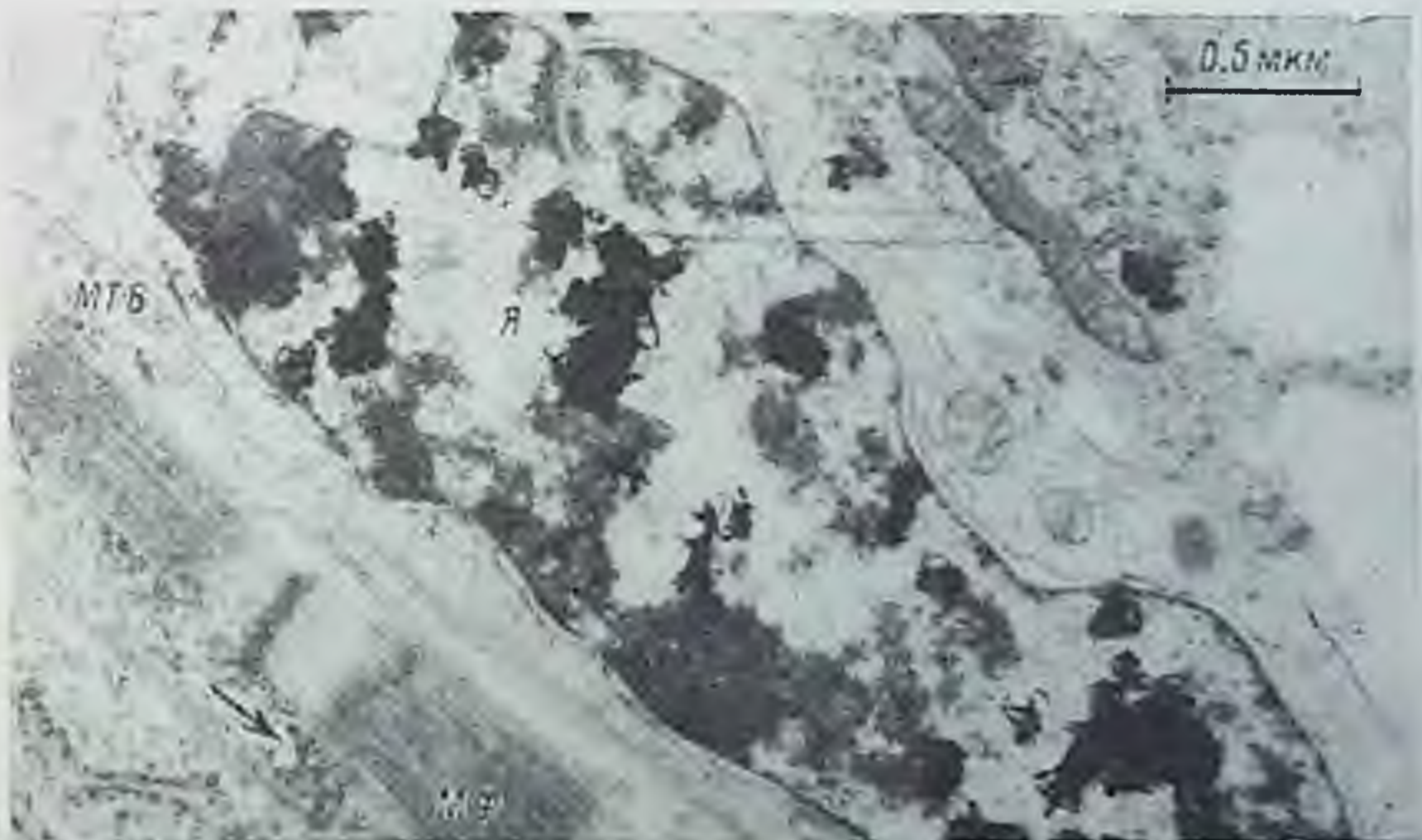


Рис. 3. Продольный срез миотубы m. tibialis 15-суточного мышечного эмбриона более дифференцированной, чем на рис. 2.

Через 1 ч после введения ^3HT . Метятся только ядра недифференцированных клеток, лежащих на поверхности развивающейся миотубы. Мембраны недифференцированной клетки и миотубы находятся в тесном контакте. Обозначения те же, что на рис. 2.
Фото М. С. Бушариной.



Рис. 4. Мышца языка 15-суточного эмбриона мыши.

Через 48 ч после введения ^3HT метка обнаруживается над ядром миотубы, в которой видны миофибриллы с Z-дисками (Z), многочисленные полисомы (стрелка); ПМ — плазматическая мембрана, ограничивающая миотубу, Я — ядро, МФ — миофибриллы, М — митохондрия.

Фото М. С. Бушариной.

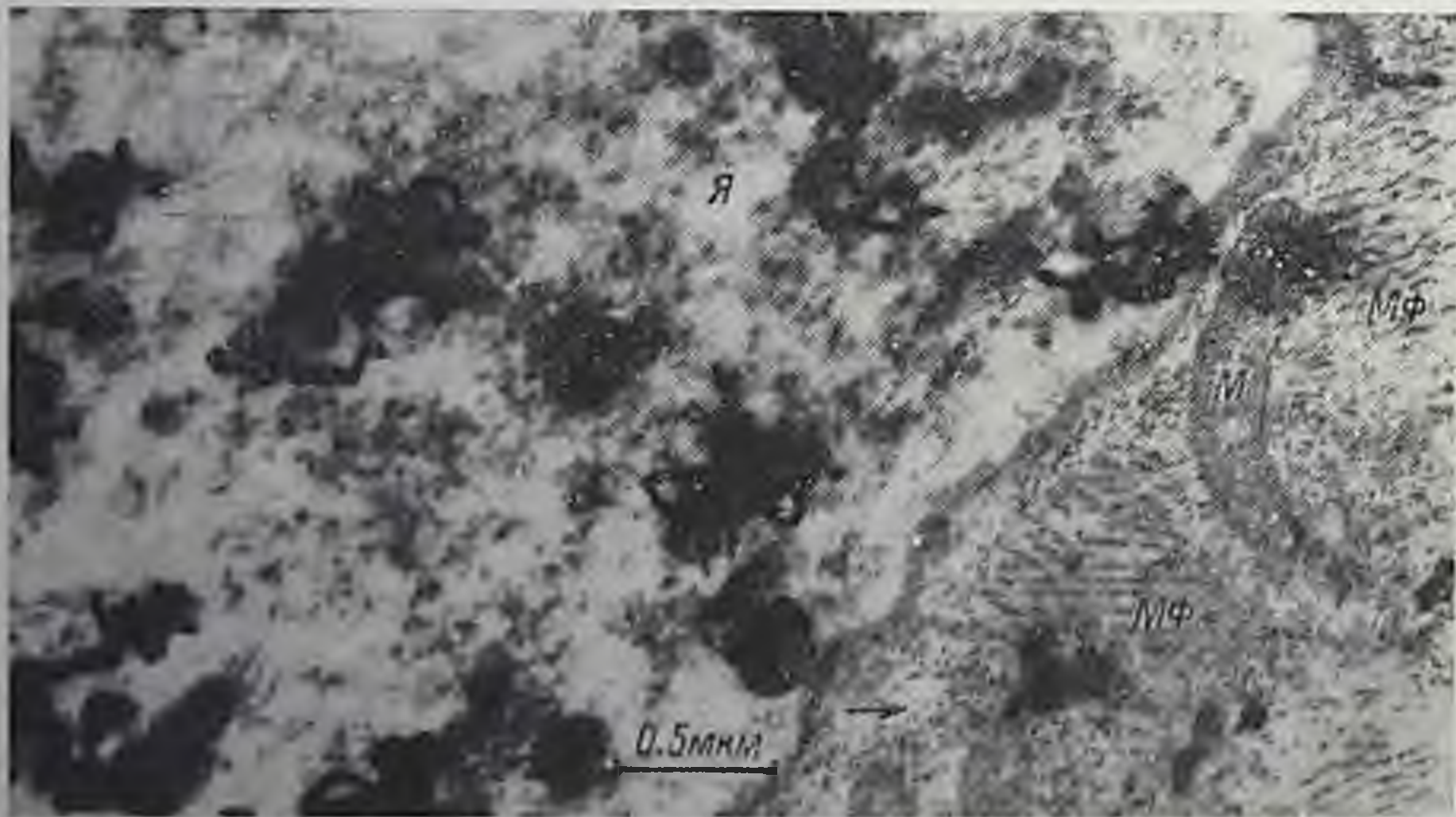


Рис. 5. Межсегментная мышца личинки II возраста тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Через 2 ч после введения ^3HT . В отличие от дифференцирующейся мышцы позвоночных (рис. 2, рис. 3) «импульсно» метятся ядра внутри мышечного волокна. Обозначения те же, что на рис. 4.

Фото С. А. Комарова.



Рис. 7. Общий вид среза миокарда левого желудочка 11-суточного крысенка.

Меченное $^3\text{HТ}$ ядро находится в фазе синтеза ДНК. Меченый и немеченый миоциты содержат сходное количество высокодифференцированных миофибрилл и митохондрий.

Стрелки отмечают аппараты Гольджи.

Обозначения те же, что на рис. 4.



Рис. 8. Миоцит левого желудочка сердца 7-суточного крысенка в интерфазе.

Верхнее ядро находится в интерфазе. Оба миоцита содержат высокодифференцированные миофибриллы. Стрелка отмечает аппарат Гольджи. Обозначения те же, что на рис. 4.

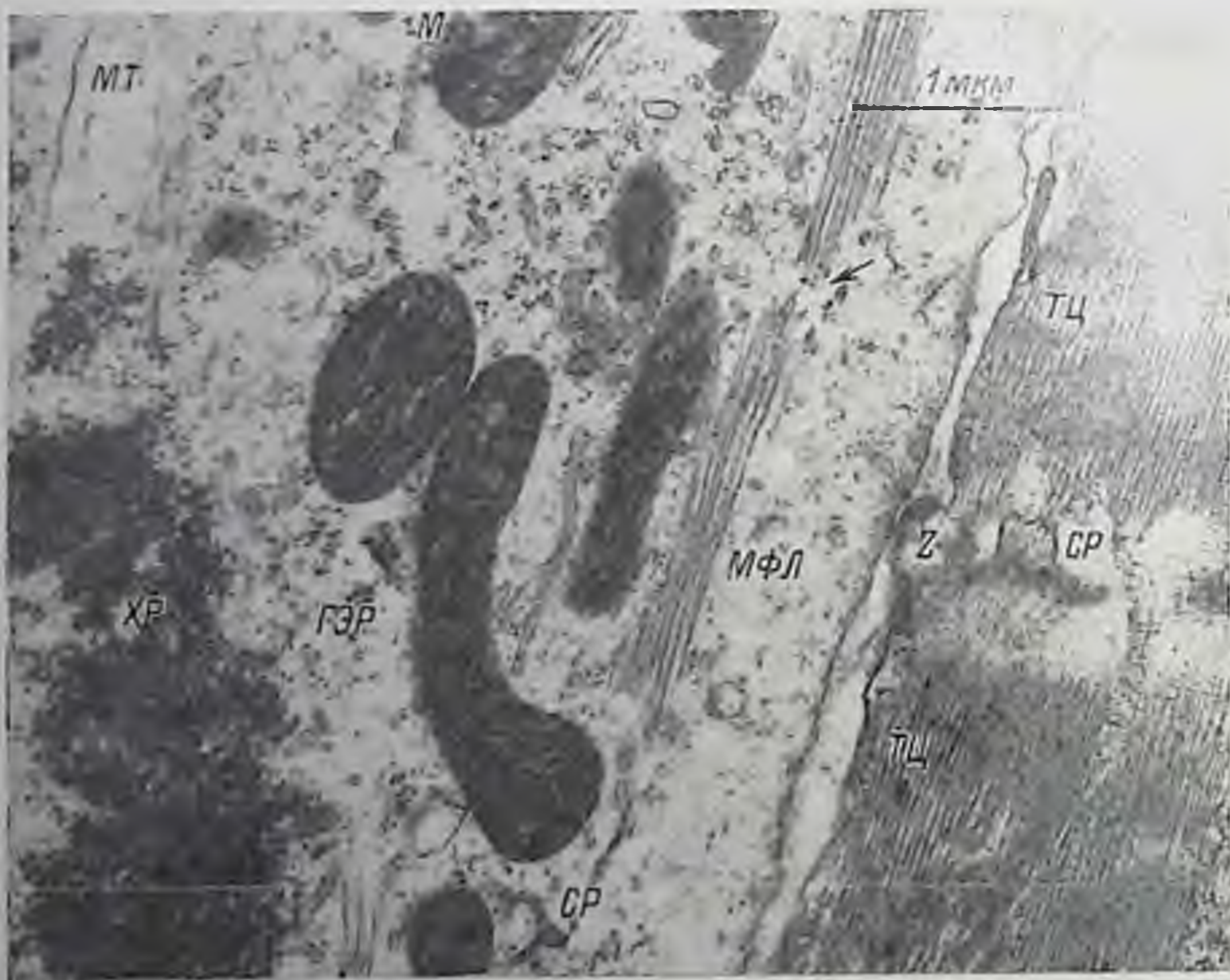


Рис. 9. Ультраструктура миоцитов левого желудочка сердца 7-суточного крысенка.

Один из миоцитов находится в анафазе. В анафазном миоците одиночные пучки миофиламентов (мфл) сохраняют оба типа нитей и плотность упаковки последних. Стрелка отмечает границу соседних саркомеров, где отсутствует контрастный материал диска Z. В миофибриллах соседнего неделящегося миоцита, напротив, четко видны диски Z, мт — микротрубочки веретена, ср — саркоплазматический ретикулум, тц — терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума, гэр — гранулярный эндоплазматический ретикулум, хр — хромосомы. Остальные обозначения те же, что на рис. 4.



Рис. 11. Рапшиї постмитотическїї миоцит левого желудочка сердца 7-су-
точного крысенка.

В миоците отсутствуют признаки цитокинеза. Дочерние ядра (ДЯ) реконструировались из мало разошедшихся в анафазе хромосомных наборов и в процессе роста образуют «амитозоподобную» пару ядер. Против амитотической природы дикариона свидетельствует неполная деконденсация хроматина и сохранение у большинства миофибрилл измененной в митозе структуры. Последнее позволяет практически отвергнуть и вероятность того, что этот миоцит является дикарионом с синхронно делящимися ядрами в профазе. к — окаймленные эндотелием капилляры, эр — эритроцит.

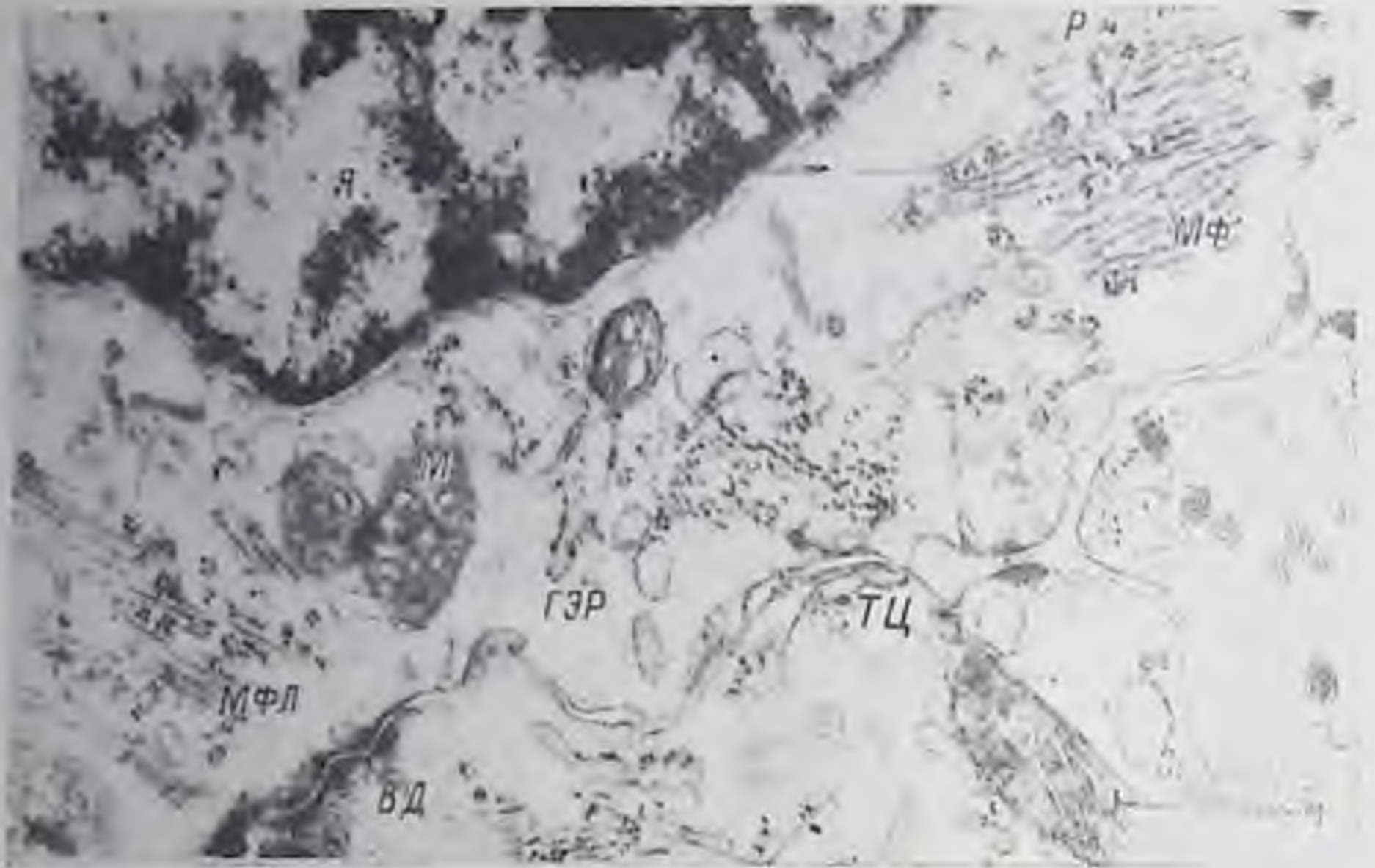


Рис. 12. Миоцит синоатриального узла сердца 16-суточного эмбриона мыши в фазе синтеза ДНК.

³HT введен за 1 ч. Сократительный аппарат развит слабо. *вд* — вставочный диск; *гэр* — гранулярный эндоплазматический ретикулум, *тц* — терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума, *мфл* — миофиламенты, *р* — рибосома. Остальные обозначения те же, что на рис. 4.

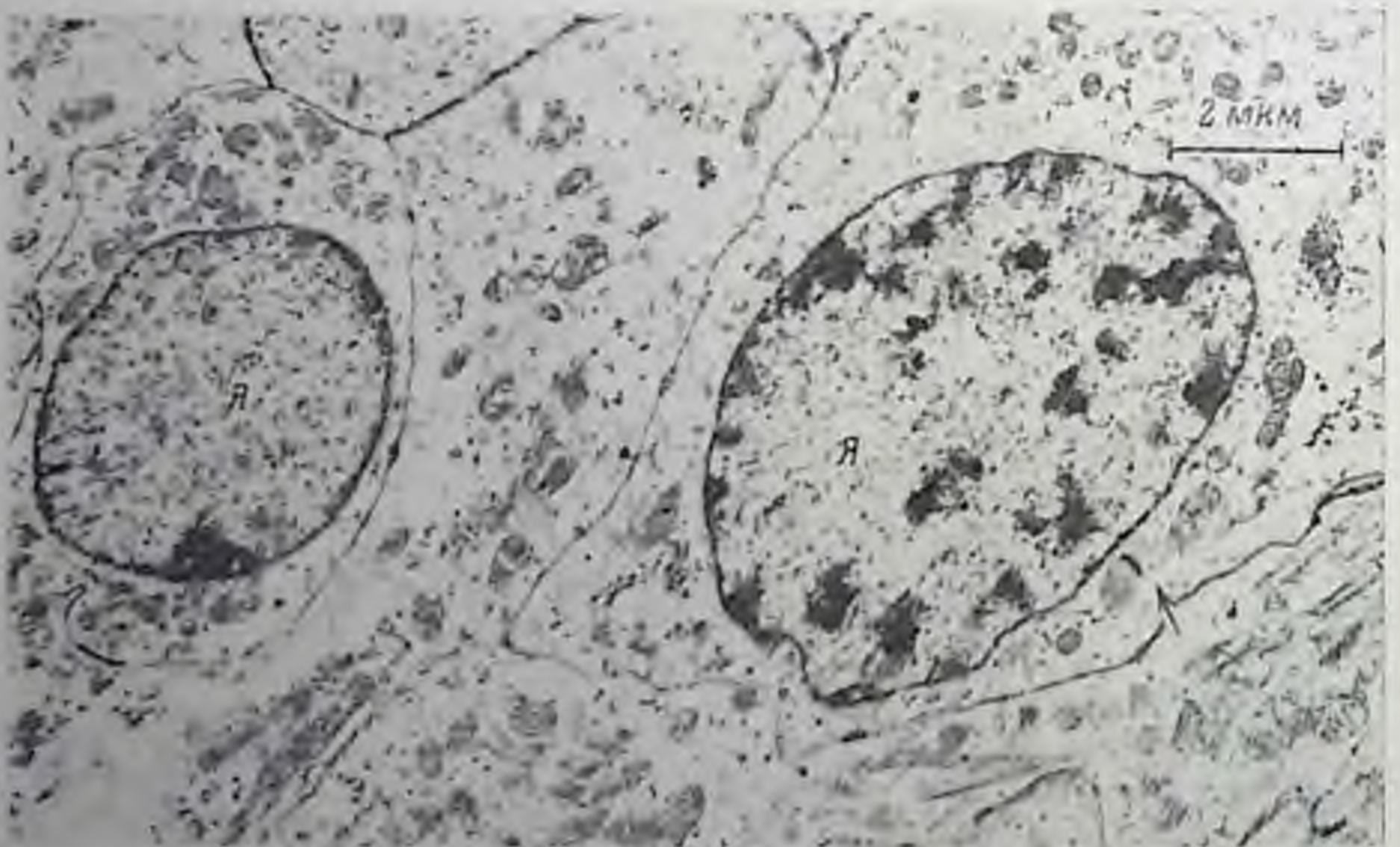


Рис. 13. Миоциты синоатриального узла 16-суточного эмбриона мыши.

Ядро (*я*) *справа* находится в профазе, его объем больше, чем интерфазного. *Стрелка* отмечает материал диска Z. Сократительный аппарат во всех клетках очень плохо развит и представлен лишь пучками миофиламентов.

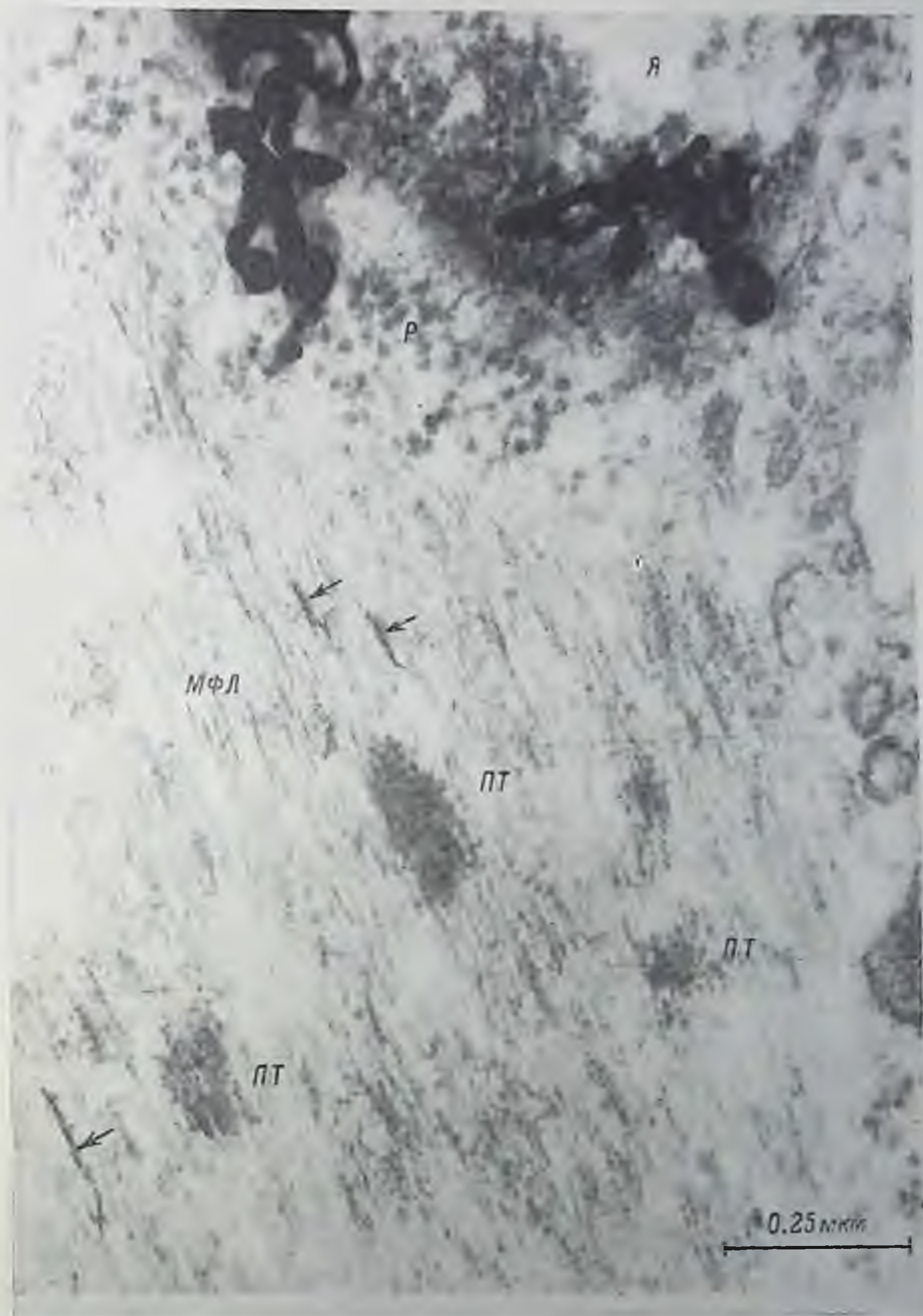


Рис. 14. Синтезирующая ДНК гладкомышечная клетка желудка 1-суточного цыпленка.

Через 2 ч после введения ^3HT . *пт* — плотные (Z-подобные) тельца; стрелки отмечают нити, возможно являющиеся толстыми миофиламентами. *р* — рибосомы, *я* — ядро, *мфл* — миофиламенты.



Рис. 12. Миоцит синоатриального узла сердца 16-суточного эмбриона мыши в фазе синтеза ДНК.

Эмбрион введен за 1 ч. Сократительный аппарат развит слабо. *вд* — вставочный диск; *гэр* — гранулярный эндоплазматический ретикулум, *тц* — терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума, *мфл* — миофиламенты, *р* — рибосомы. Остальные обозначения те же, что на рис. 4.

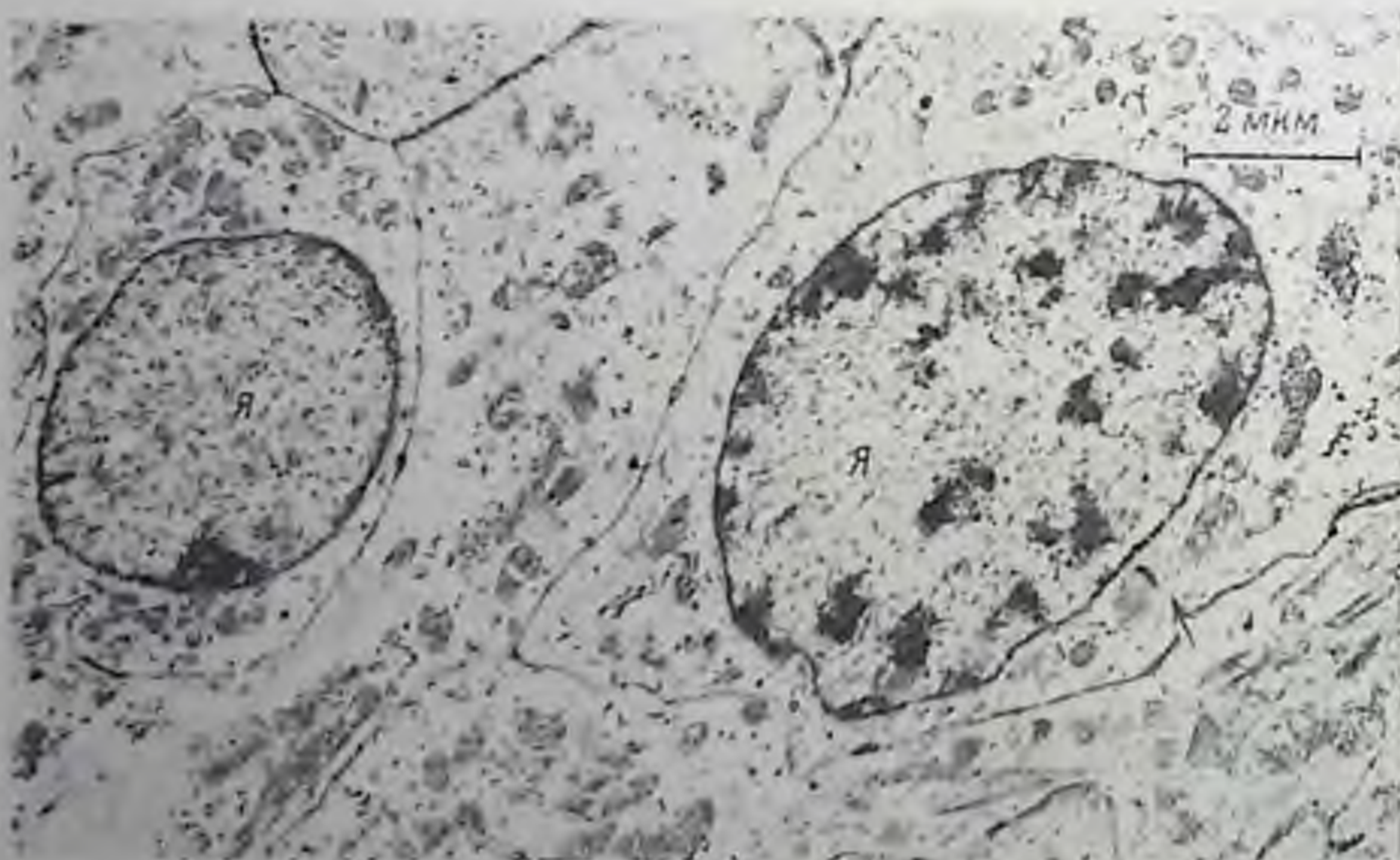


Рис. 13. Миоциты синоатриального узла 16-суточного эмбриона мыши.

Ядро (я) *справа* находится в профазе, его объем больше, чем интерфазного. Стрелка отмечает материал диска Z. Сократительный аппарат во всех клетках очень плохо развит и представлен лишь пучками миофиламентов.

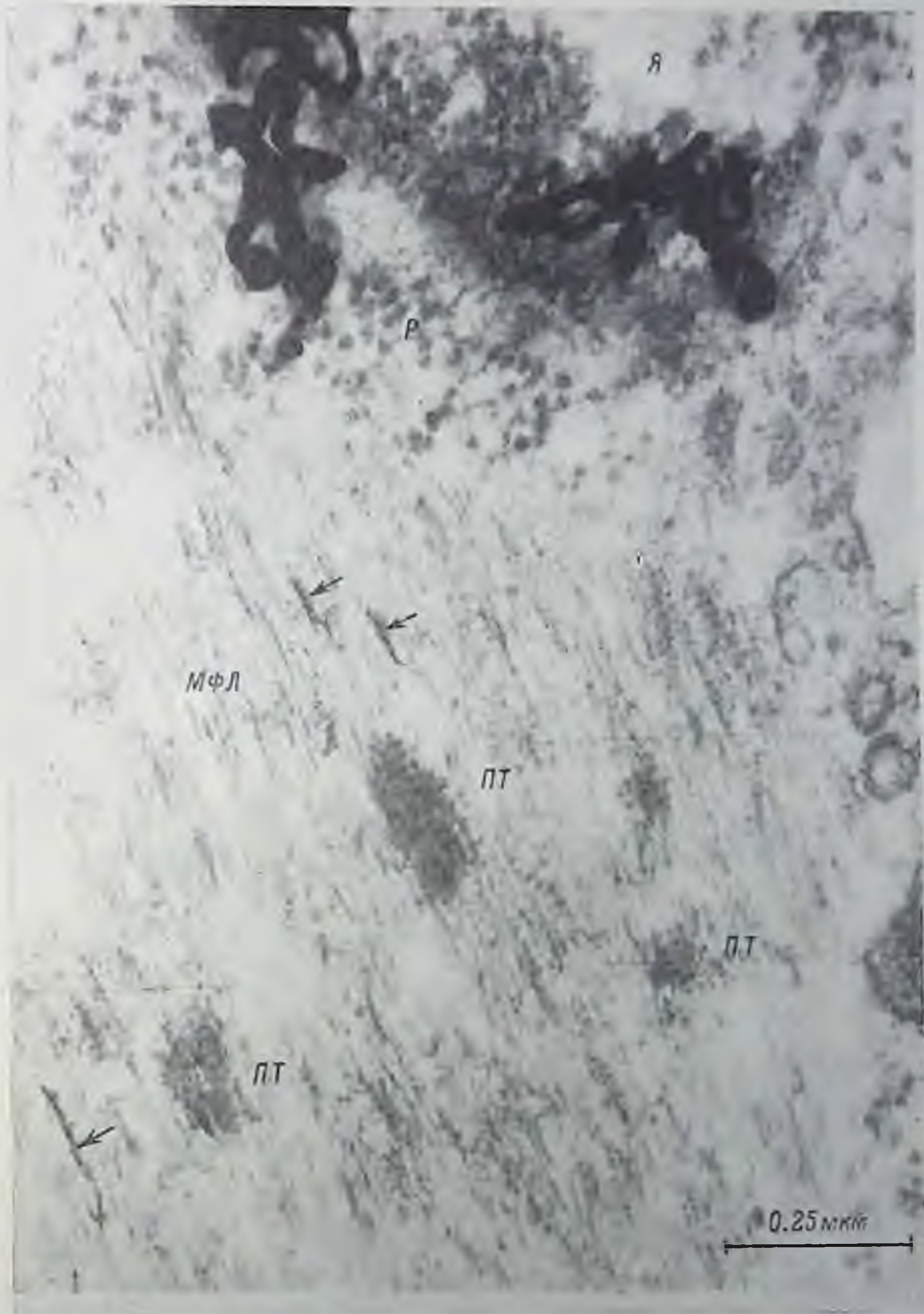


Рис. 14. Синтезирующая ДНК гладкомышечная клетка желудка 1-суточного цыпленка.

Через 2 ч после введения ^3HT . *пт* — плотные (Z-подобные) тельца; стрелки отмечают шти, возможно являющиеся толстыми миофиламентами. *р* — рибосомы, *я* — ядро, *мфл* — миофиламенты.

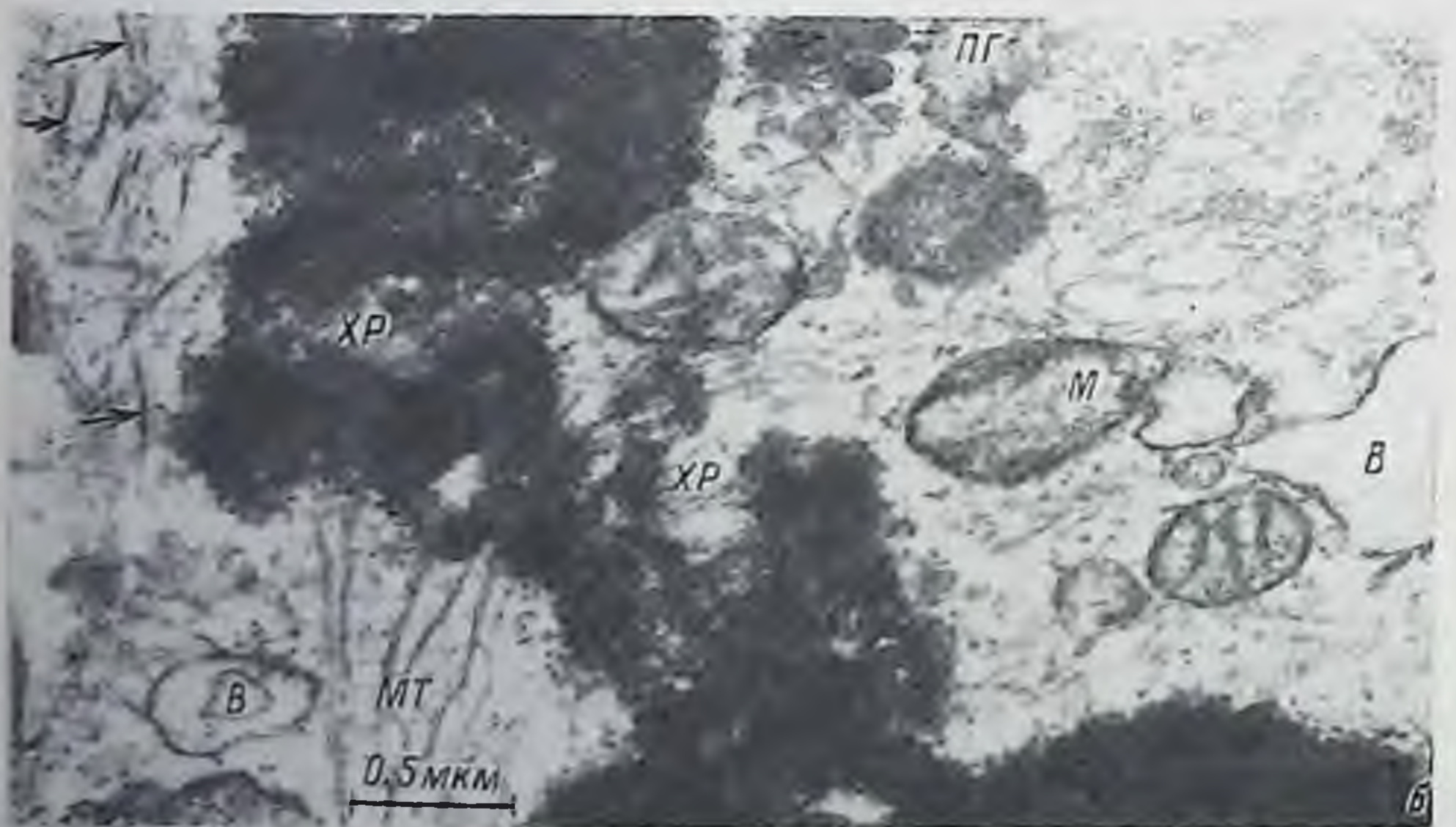
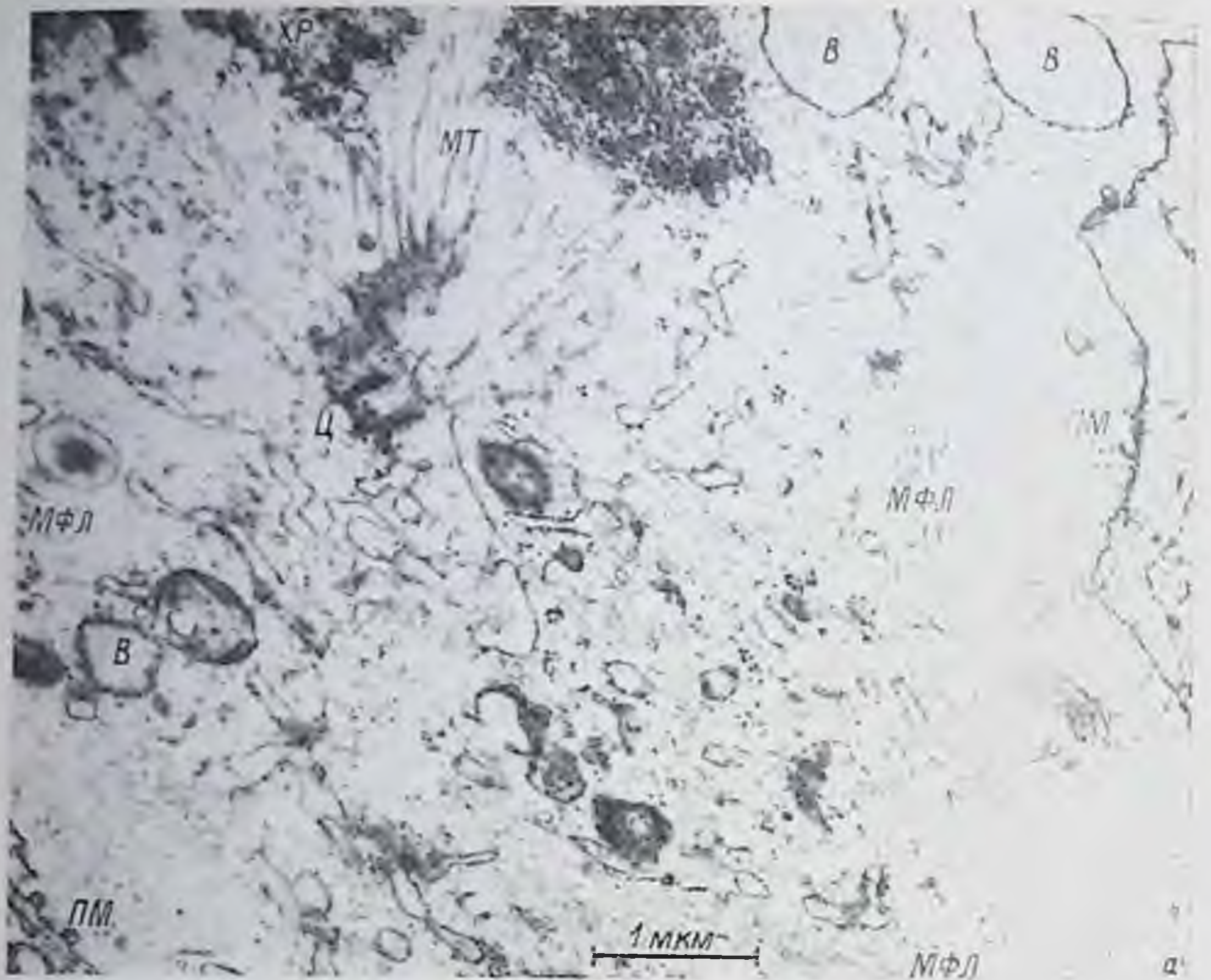


Рис. 15. Участки делящихся митозом (метафаза и анафаза) клеток гладких мышц желудка 19-суточных куриных эмбрионов.

а — косо и поперечно перерезанные пучки миофиламентов расположены в основном на периферии клетки. Плотные тельца (возможные аналоги дисков Z) незаметны. б — недалеко от хромосом видны пяти неопределенной природы, сходные по диаметру с толстыми миофиламентами (стрелки), пг — плотные гранулы неизвестного состава, хр — хромосомы, мт — микротрубочки, мфл — миофиламенты, пм — плазматическая мембрана, в — крупные вакуоли, ц — центриоль, м — митохондрии.

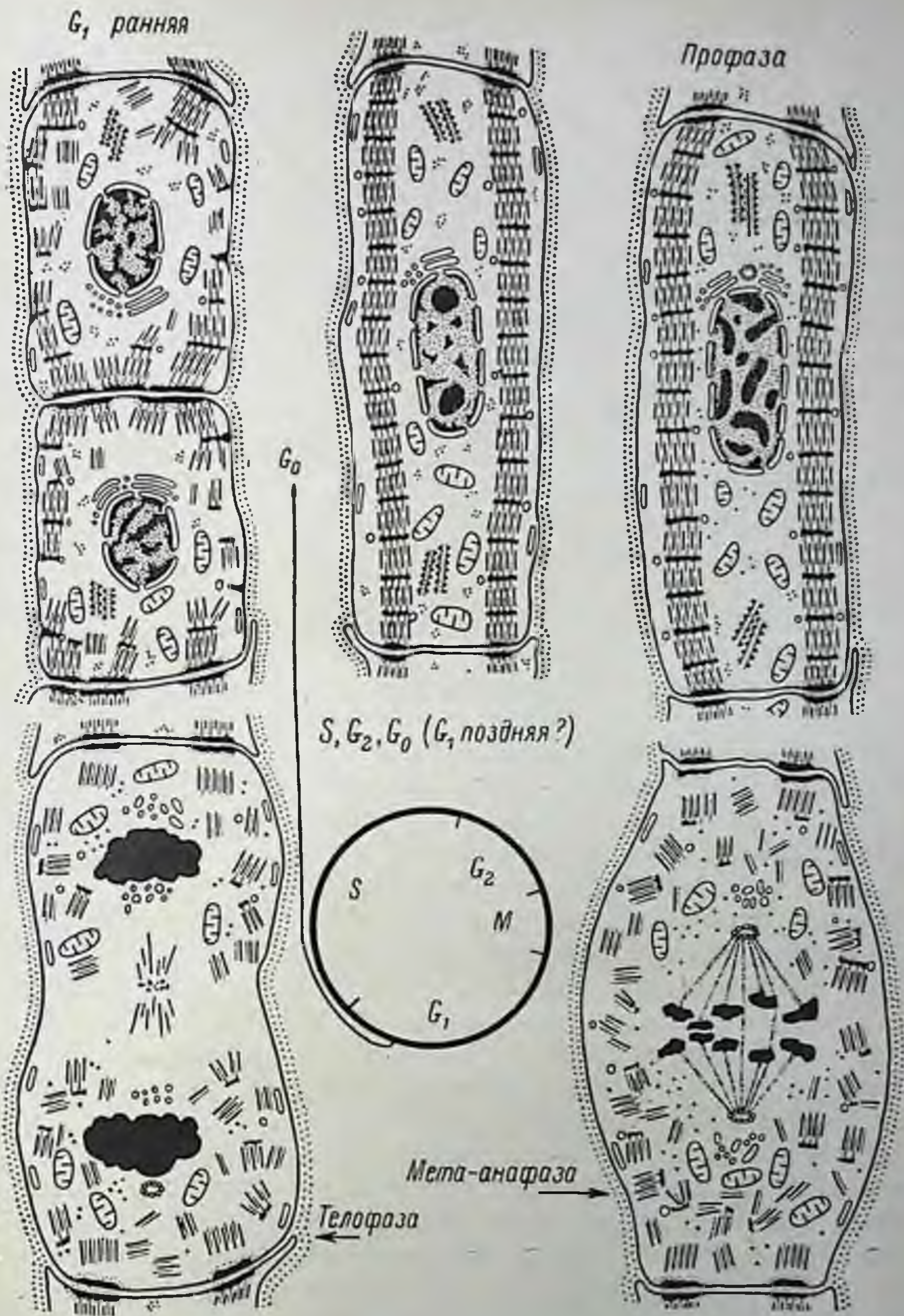


Рис. 10. Схема изменений ультраструктуры миоцитов развивающегося сердца в ходе митотического цикла.

так и на ультраструктурном уровнях [71, 72], позволяет ограничиться самыми общими сведениями в той мере, в какой они необходимы для дальнейшего описания пролиферативных процессов.

На самых ранних стадиях развития зачатка сердца из спланхномезодермы все клетки последней быстро приобретают минималь-

ный уровень дифференцировки, необходимый для начала первых сокращений сердца. При этом популяция образующихся мышечных клеток относительно однородна по содержанию миофибрилл и гликогена, будучи практически лишена примеси клеток, не имеющих типичных миозиновых и актиновых филаментов. Саркомерогенез включает основные этапы, описанные выше на примере дифференцировки миофибрилл в соматическом мезогенезе. На стыках миоцитов дифференцируются десмосомы, что отражает эпителиальное происхождение миокарда (из целомического эпителия). Подобные десмосомы структуры, плотный материал которых закрепляет концы миофибрилл, дифференцируются в примитивные вставочные диски. Эндотелпальные и фибробластические элементы вырастают в миокард позднее [73, 74]. Применительно к клеткам миокарда термин «миоцит» более обоснован, чем «миобласт», поскольку с самого начала трансформации спланхномезодермы клетки имеют четко выраженный фенотип мышечной клетки: в них присутствуют миофибриллы, концы которых крепятся к вставочным дискам.

Набор основных органелл кардиальных миоцитов почти идентичен на протяжении всего эмбрионального и постнатального гистогенеза миокарда, хотя количественные и качественные характеристики степени развития каждого типа органелл при этом резко изменяются. Исключение составляют в основном такие структуры, как каналы Т-системы, дифференцирующиеся почти исключительно после рождения животного, причем лишь в желудочковых миоцитах млекопитающих. На протяжении всего кардиогенеза дифференцировка миоцитов включает постепенное увеличение числа и суммарного объема приобретающих все более правильную и сложную организацию и ориентировку миофибрилл, митохондрий, структур саркоплазматической сети, вставочных дисков, десмосом и щелевых контактов плазматических мембран. Одновременно возрастает плотность взаимного расположения миоцитов, их размеры и совершенство «пригонки» друг к другу, утолщается гликопротеиновый слой сарколеммы.

Параллельно в ходе гистогенеза, особенно после рождения животного, снижается относительный объем саркоплазмы, число свободных и прикрепленных к мембранам эргастоплазматических каналов полисом, число неорганизованных в саркомеры миозиновых и актиновых нитей и их пучков, а также промежуточных филаментов диаметром 8—11 нм, вероятно не связанных с саркомерогенезом [40, 75]. По мере дифференцировки миоцитов желудочка аппарат Гольджи, проходя фазу интенсивного развития (и, судя по обилию связанных с ним пузырьков и гранул, активной функции), начинает редуцироваться. Все реже встречаются микротрубочки и центриоли.

Особенностью дифференцировки предсердных миоцитов в сравнении с желудочковыми является интенсивное развитие в них аппарата Гольджи и каналов эргастоплазмы, что связано с продук-

цией множества так называемых предсердных специфических гранул. Напротив, миофибриллы развиты относительно слабее, каналы Т-системы в значительной части миоцитов не возникают вообще [76].

Миоциты проводящей системы сердца дифференцируются главным образом в направлении приобретения особых свойств их мембраной, чем обеспечивается выработка и проведение импульсов возбуждения. С другой стороны, сократительный аппарат в этой категории миоцитов развивается слабее, так же как и митохондрии.

Особый интерес представляет выявление иммунологических различий между миоцитами из желудочковых, предсердных миоцитов и из клеток проводящей системы [77], что свидетельствует о глубоком полиморфизме в организации сократительных систем этих трех популяций клеток миокарда.

Таким образом, дифференцировка кардиальных миоцитов включает ряд черт, свойственных эпителиальным (обилие десмосом, а позже и щелевых контактов), и в частности железистым клеткам (сильное развитие аппарата Гольджи и эргастоплазмы на ранних стадиях миогенеза), что свидетельствует о своеобразном морфофункциональном дуализме кардиомиоцитов [71] и резко отличает их от волокон скелетных мышц. Важными суммарными характеристиками кардиального миогенеза являются относительная однородность уровня дифференцировки подавляющего большинства миоцитов каждого данного отдела сердца на одной и той же стадии развития, а также градуальный темп прогрессирующей дифференцировки миоцитов по всем вышеперечисленным признакам, на что было обращено внимание уже при светомикроскопических исследованиях гистогенеза миокарда [43]. Существенным отличием кардиального миогенеза следует также считать отсутствие на всех его стадиях резерва потенциальных миобластов в виде клеток типа сателлитов скелетных мышц [44, 78, 79]. Среди не содержащих типичных миофиламентов клеток развивающегося миокарда обычно идентифицируются эндотелиальные клетки и фибробласты, число которых возрастает в ходе кардиогенеза в связи с прогрессирующей васкуляризацией сердца.

В противоположность данным, полученным на развивающейся скелетной мускулатуре [11], методом светооптической автордиографии было показано, что мышечные волокна сердца эмбрионов кур и млекопитающих изобилуют ядрами, включающими $^3\text{HТ}$ через 1—2 ч после его введения [43, 57, 59, 80—86 и др.]. Однако только электронномикроскопическая автордиография могла дать окончательное доказательство способности кардиальных миоцитов к синтезу ДНК после появления в клетке миофибрилл. На автографах ультратонких срезов миокарда эмбрионов кур [87, 88], крыс [89, 90] и мышей [91] метка $^3\text{HТ}$ была обнаружена над ядрами не только эндотелиальных и мезепхимных клеток, но и многочисленных миоцитов. Последние содержали миофибриллы с гексагонально упакованными толстыми и тонкими миофиламентами,

четко оформленные вставочные диски и скопления гликогена. Аналогичные данные получены и на миокарде крысят после рождения (рис. 7). В миокарде эмбрионов «импульсно» меченные миоциты обычно одноядерны. Миокард новорожденных крысят содержит также изредка встречающиеся двуядерные миоциты, оба ядра которых синхронно проходят фазу синтеза ДНК. В отличие от метки ^3H -уридином над наибольшей частью ядрышек и над пери- и интерхроматиновыми территориями метка ^3HT отсутствует. Все синтезирующие ДНК миоциты, в том числе и у самых ранних изученных эмбрионов, например в миокарде 13-суточных эмбрионов мыши, содержат различной толщины миофибриллы с четко выраженными саркомерами. Ультраструктура и число миофибрилл, вставочных дисков, десмосом, элементов саркоплазматической сети, митохондрий и аппарата Гольджи, а также эргастоплазмы, гранул гликогена обычно одинаковы как в меченных ^3HT , так и в несинтезирующих ДНК миоцитах каждой из изученных стадий кардиомиогенеза.

Это же верно и в отношении миоцитов проводящей системы сердца (рис. 12). Последние, в частности миоциты синоатриального узла, во всех фазах митотического цикла отличаются от рабочих миоцитов желудочка значительно более слабым развитием сократительного аппарата [91]. Степень дифференцировки миоцитов синоатриального узла 16-суточного эмбриона мыши заметно ниже, чем миоцитов желудочка даже более ранних, 13-суточных эмбрионов.

В отличие от соматического миогенеза, светооптическое изучение которого часто сопровождалось до 60-х годов описаниями амитозов как важного или основного способа деления ядер мышечных волокон, при развитии миокарда многими авторами наблюдались митотические деления (см. обзоры [72, 92]). Однако уровень дифференцировки делящихся клеток и отношение их к волокну характеризовались весьма различно: наряду с сохранением окружающих миофибрилл [93] описывалось их частичное [94] или полное [95] растворение — своего рода дедифференцировка миоцита в период деления. Некоторые авторы считали сам факт деления ядра миоцита иллюзорным, полагая, что в действительности митозы относятся к морфологически недифференцированным миобластам, расположенным подобно миосателлитам Мауро [44] на поверхности мышечных волокон [67, 68, 96, 97].

Более ранние электрономикроскопические исследования кардиального миогенеза содержали лишь отрывочные и противоречивые сведения об ультраструктуре делящихся митозом клеток, что объяснялось сложностью выявления в электронном микроскопе митотических фигур в ткани с невысоким митотическим индексом.

На каждой исследованной стадии в профазе митоза как рабочих миоцитов (рис. 8), так и миоцитов синоатриального узла (рис. 13) степень организации миофибрилл аналогична наблюдаемой в фазе синтеза ДНК. Дальнейшее описание митоза относится к рабочим

миоцитах. В профазных кардиомиоцитах на постнатальных стадиях развития обычно налицо высокоорганизованные миофибриллы (рис. 8). Прочие органеллы миоцита мало изменены, хотя в поздней профазе плоские цистерны аппарата Гольджи постепенно редуцируются с сохранением в его составе пузырьков. Центриоли располагаются по полюсам ядра, но число микротрубочек незначительно. После завершения профазы, когда ядерная оболочка уже расчленяется и ядрышко исчезает, большинство дисков Z внезапно утрачивает свой контрастный компонент [72, 88, 98, 99].

В метафазе прогрессирующая дезинтеграция дисков Z приводит к высвобождению множества саркомеров, их смещению в обильной светлой саркоплазме и часто к расчленению саркомеров на отдельные пучки миофиламентов. Толстые миофиламенты обычно сохраняются, тогда как тонкие, особенно при делении кардиомиоцитов эмбрионов, могут местами становиться неразличимыми, возможно, в результате деполимеризации. При делении высокодифференцированных крупных миоцитов сердца новорожденных крысят отмеченные изменения иногда ограничиваются в основном миофибриллами, расположенными ближе к ядру, причем актиновые нити при этом обычно не изменяются, сохраняясь в изолированных после резорбции дисков саркомерах. Канальцы саркоплазматической сети часто расположены около пучков миофиламентов. Устойчивыми при митозе оказываются субсарколеммальные цистерны саркоплазматической сети, вставочные диски и десмосомы, а также специфические гранулы миоцитов предсердия. Метафаза характеризуется сильным развитием микротубулярного аппарата.

В анафазе (рис. 9) и телофазе основная масса пучков миофиламентов и фрагментов миофибрилл располагается в полярных частях делящихся кардиомиоцитов, снаружи от обоих дочерних комплексов хромосом. В ранней телофазе прогрессирует реконструкция ядерной оболочки, реассоциация полисом, а в поздней телофазе, при делении малодифференцированных миоцитов сердца эмбрионов, успешно протекает цитокинез. Углубление борозды, по-видимому, связано, как и при делении других видов клеток, с сокращением кортикального слоя цитоплазмы в области экватора вследствие присутствия здесь множественных (возможно, актиновых) филаментов диаметром около 6 нм. Мембраны дочерних миоцитов в зоне прохождения борозды цитокинеза обычно прилегают друг к другу; местами на них отлагается плотный материал, что указывает на дифференцировку десмосом и будущих новых вставочных дисков. В последнем случае к плотному материалу диска как бы притягиваются рассеянные вблизи пучки миофиламентов, которые в результате постепенного восстановления дисков Z входят в состав реконструирующихся после митоза миофибрилл. Концы последнего саркомера оказываются закрепленными во вставочном диске.

Обилие миофибрилл в миоцитах новорожденных крысят приводит к их неполному расчленению на пучки миофиламентов при делении и к недостаточному освобождению от них интерзональной

области в телофазе за счет смещения миофиламентов к полюсам. В результате в постнатальном кардиальном миогенезе цитокинез часто оказывается неполным, так как борозда «застревает», встретив на своем пути массивные скопления миофиламентов. Следствием этого процесса является прогрессирующее накопление в постнатальном кардиомиогенезе двуядерных миоцитов. Иногда дочерние ядра так близко расположены, что создают картины, трактованные в более ранних работах как амитоз (рис. 11). Ядра двуядерных клеток могут синхронно вступать в митотический цикл, о чем можно судить как по их «импульсной» метке ^3HT , так и по наличию в двуядерных миоцитах митотических фигур в одной фазе [98, 100].

Особый интерес представляет ультраструктура миоцитов в раннем периоде G_1 (или G_0 , если клетка покидает генерационный цикл), когда налицо признаки интенсивного восстановления дисков Z и миофибрилл в целом, что сообщает миоцитам характерный «незрелый» вид. Процесс восстановления дисков Z и сборка миофибрилл завершаются к началу фазы S следующего митотического цикла или ранее [72, 98].

В соответствии с приведенными морфологическими данными показано, что ритмические сокращения миоцитов сердца крысят в культуре *in vitro* налицо вплоть до конца профазы, когда они внезапно прекращаются; восстановление спонтанного сокращения наблюдается лишь в постмитотический период, т. е. когда миофибриллы начинают восстанавливаться [101].

Особый интерес представляет обнаружение в поперечнополосатых мышечных волокнах активированной кальцием нейтральной протеазы, способной избирательно резорбировать диски Z [102]. Это, так же как и возможность резорбции дисков Z кардиомиоцитов при воздействии трипсина и ряда других агентов и последующей реконструкции миофибрилл путем самосборки (см. обзор [72]), указывает на вероятные механизмы дезинтеграции и реконструкции миофибрилл в митотическом цикле.

Таким образом, существенной особенностью кардиального миофибриллогенеза является циклическая смена «деструктивной» и «репаративной» фаз (рис. 8—11), имеющая место в каждом митотическом цикле [72, 98, 103]. Сложные изменения сократительного аппарата кардиальных миоцитов при митозе можно рассматривать как своего рода адаптацию, поскольку при этом клетка временно освобождается от ригидных структур в области, где должны затем происходить движение хромосом и цитокинез, не теряя в то же время основного фонда миофиламентов [98, 104].

Кинетике пролиферации ядер в кардиальном миогенезе посвящен ряд работ, выполненных на разных животных методом светооптической автордиографии [43, 59, 81—85, 103 и др.]. Основные данные по продолжительности митотических циклов в развивающемся сердце приведены в табл. 2.

В начале трансформации прекардиальной мезодермы в миокард число включающих ^3HT и делящихся митозом клеток кратковре-

Суммированные данные светооптической автордиографии по индексам меченых ядер после однократных («импульсная» метка, I) и повторных («пролиферативный пул», II) введений ^3H -тимидина, а также данные по продолжительности митотического цикла (T) и его фаз (G₁, S, G₂, M) в развивающихся in vivo желудочковых миоцитах компактного миокарда сердца; параметры митотического цикла вычислялись по кривым меченых митозов [62], кроме случаев, помеченных звездочкой (*)

Виды животных и стадии развития	I (%)	II (%)	Продолжительность митотического цикла и его фаз (ч)					Интересные источники
			T	G ₁	S	G ₂	M	
Кура:								
эмбрион, 15 пар сомитов	19	—	30.9	23.8	6.5	2.5	0.6	[59]
11-суточный эмбрион	16	—	45.0	28.0	13.0	4.0	1.3	[59]
16-суточный эмбрион	8	45	79.0	58.0	15.0	4.0	1.5	[59]
Мышь:								
8-суточный эмбрион (прекардиальная мезодерма)	70	93	6.5	0.5	4.5	1.5	—	[57]
9-суточный эмбрион	22	40	10.0	1.5	5.0	3.5	—	[82]
10-суточный эмбрион	46	82	11.0	2.5	6.5	2.0	—	[82]
15-суточный эмбрион	35	65	14—17	2—5	9.0	3.0	—	[83]
18-суточный эмбрион	15	26	23—24	5—7	13—14	3.5	—	[83]
7-суточная	8	20	>30	>12	13.0	2—5	—	[83]
Крыса:								
15-суточный эмбрион	32	72	18.5	7.0	7.5	3.0	—	[43]
18-суточный эмбрион	30	58	22.0	8.0	8.5	3.5	—	[43]
19 1/5-суточный эмбрион	17	—	42.0	30.0	8.0	1.5—5.7	0.8	[80]
1-суточная	12	50	40.0	20.0	13.0	6.0	—	[43]
1-суточная	13	51	—	—	11—12	4.5—5.5	—	[103]
2-суточная *	8	—	—	—	15—18	—	7—11	[105, 106]
5—7-суточная	6	19	—	—	11—12	4.5—5.5	—	[103]
14-суточная	2	—	—	—	11—14	—	—	[107]
14-суточная	—	—	—	—	9.2	—	—	[108]
3-недельная*	0.15	—	—	—	15—18	—	7—11	[105, 106]

менно и резко падает (табл. 2; см. также [57, 59, 82, 109]), что может отражать как конкуренцию процессов пролиферации и инициации синтеза специфических белков, так и иные моменты (изменение мембран и т. п.). В ходе дальнейшего кардиогенеза количество синтезирующих ДНК ядер и митозов снижается постепенно (табл. 2, а также [85, 110]). У мышей и крыс пролиферативная активность почти полностью затухает к началу 3-й недели после рождения [43, 83, 105 и др.]. Об объеме «пролиферативного пула», или «фракции роста», кардиальных миоцитов на разных стадиях развития миокарда приближенно судят, обеспечивая доступ ^3HT в течение длительного времени путем его повторных инъекций с интервалами, меньшими, чем длительность S-периода (табл. 2, II). Значения «пролиферативного пула» также постепенно снижаются, что отражает прогрессирующий выход клеток из митотического цикла в кардиогенезе. Суммированные в табл. 2 данные по длительности митотического цикла и его фаз позволяют сделать вывод о том, что по мере дифференцировки кардиальных миоцитов удлиняется не только пресинтетический период G_1 , но и период S, а также постсинтетический период G_2 . При развитии миокарда крыс это отчетливо проявляется лишь после рождения, тогда как у мышей и птиц уже в конце эмбриогенеза. Весьма вероятно, что удлинение фазы S связано не с истинным снижением скорости репликации ДНК, а с возрастанием степени асинхронности этого процесса в разных хромосомах по мере дифференцировки миоцитов.

Постепенный выход кардиомиоцитов из цикла репродукции коррелирует со снижением активности α -ДНК-полимеразы и тимидинкиназы, которая приближается к нулю в те же сроки постнатального кардиомиогенеза, что и индексы меченных ^3HT миоцитов и их митозов [111]. Одновременно резко возрастает концентрация катехоламинов и цАМФ в миокарде, которые предположительно угнетают пролиферативную активность кардиомиоцитов [112].

В отличие от скелетных мышц позвоночных, в которых почти все авторы выявляют в составе мышечных волокон лишь ядра с содержанием ДНК, близким к 2 C (см. выше), в миоцитах сердца, в том числе и у взрослых животных, большинство исследователей отмечают как ядра, группирующиеся в области 2 C ДНК, так 4 C и более ДНК (см. обзоры [72, 113]). Миокарду большинства исследованных видов свойственно наличие некоторой фракции полиплоидных ядер (2—16%), тогда как у взрослых людей, обезьян и свиней зарегистрировано намного большее содержание или даже преобладание таких ядер. Вопрос осложняется тем, что у видов с высоким содержанием полиплоидных ядер в миоцитах сердца степень их плоидности значительно растет с возрастом, в то время как достоверные данные о включении ^3HT в ядра мышечных клеток сердца отсутствуют.

Таким образом, миоциты развивающегося сердца ведут себя как «растущая» популяция клеток [114], лишенная обособленного камбия и приспособленных, вопреки концепции «квантального

митоза» [4, 6], к совмещению антагонистических процессов пролиферации и дифференцировки. Это совмещение реализуется вследствие обратимой разборки миофибрилл в каждом митотическом цикле кардиомиоцита. Глубочайшие отличия в соотношении процессов пролиферации и дифференцировки в соматическом и кардинальном митогенезах определяют в корне противоположную характеристику миокарда и скелетных мышц в отношении их способности к регенерации. В результате отсутствия в миокарде резерва миобластов единственным источником регенерации мышечной ткани сердца могут быть сохранившиеся миоциты, которые приспособлены к репродукции только путем митоза, требующего сложнейшей реорганизации сократительного аппарата. Однако последний столь высоко организован в миоцитах желудочков сердца взрослых млекопитающих, что эти клетки практически не могут использовать свойственный их гистогенезу вариант репродукции, особенно если учесть умеренную способность их к дифференцировке в условиях регенерации. Лишь менее специализированные разновидности миоцитов — в предсердиях крыс или в миокарде низших позвоночных — могут «вяло» размножаться при повреждении и гипертрофии [55].

РАЗВИТИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ

В лейомитогенезе, подобно ранее рассмотренному кардиомиогенезу, дифференцирующиеся одноядерные клетки гладких мышц длительно совмещают синтез ДНК и митоз с миофибриллогенезом (рис. 6). Различают две основные категории гладких мышц [115]: *single-unit* и *multi-unit* гладкие мышцы. Первые, включающие мышцы кишечника, матки и мочевого пузыря, обычно спонтанно активны и генерируют потенциалы действия, которые проводятся от клетки к клетке. Мышцы второго типа активируются нервами и спонтанно не активны; к ним относятся гладкие мышцы большинства сосудов, сфинктер радужной оболочки, ресничные мышцы глаза и др. Во всех типах гладких мышц лейомиоциты организованы в пучки, в которых клетки ориентированы вдоль длинной оси.

В отличие от поперечнополосатых мышц в лейомиоцитах отсутствуют упаковка филаментов в саркомы, а также трубочки Т-системы. Основные сведения по ультраструктуре гладкомышечных клеток можно найти в ряде обзоров [115—120]. Лейомиоциты представляют собой удлинённые веретенообразные клетки с одним ядром, содержащим от 2 до 5 ядрышек. Около ядра видны аппарат Гольджи, пара центриолей, лизосомы. Митохондрии разбросаны по всей цитоплазме, образуя скопления у полюсов ядра, где часто встречаются также небольшие сферические липидные гранулы.

Значительную часть цитоплазмы лейомиоцитов занимают миофиламенты. В более ранних работах описывали только тонкие филаменты вследствие того, что толстые, по-видимому, не сохра-

нялись при фиксации (см. обзоры [117, 119]). В настоящее время показано, что в клетках гладких мышц имеются как тонкие (5—8 нм в диаметре), так и толстые (15—20 нм в диаметре) филаменты [115, 117, 120, 121]; отношение количества тонких к толстым приближается к 15 : 1 [117]. Считают, что тонкие филаменты актиновые; в отношении толстых филаментов неизвестно, все ли они состоят из миозина [117]. Поперечные мостики между тонкими и толстыми филаментами видны редко. В клетках как развивающихся, так и зрелых гладких мышц, помимо тонких и толстых нитей, имеются промежуточные (10 нм) филаменты [122—124], хорошо сохраняющиеся при всех фиксациях. Предполагают, что главная составная часть этих филаментов — десмин [125], также как и промежуточных филаментов кардиомиоцитов [126]. Отмечают тесную связь промежуточных филаментов с плотными тельцами лейомиоцитов [122], которые многие считают аналогами Z-дисков поперечно-полосатых мышц [117, 127]. Но функция плотных телец не выяснена. Иммуноцитохимическим методом в них выявляется α -актинин [117].

Поверхностная мембрана большинства волокон гладких мышц несет ряды пузырьков (50—80 нм) [117]. В них проникают лантан и ферритин. Предполагают, во-первых, что эти пузырьки играют роль T-трубочек, во-вторых, что их функция связана с эндоцитозом и, в-третьих, что пузырьки являются местами активного транспорта Ca^{2+} [117]. Часто около них видны митохондрии; допускается функциональная связь между митохондриями, пузырьками и, возможно, саркоплазматической сетью [128]. Объем последней варьирует в различных типах мышц [117]. У молодых животных цистерны гранулярной эндоплазматической сети многочисленны, у взрослых — редки [120].

Другая важная черта мембран лейомиоцитов — наличие щелевых контактов — нексусов [115, 117, 129, 130]. Они обильны в первой категории мышц, где имеет место проведение импульсов от клетки к клетке, но редки или отсутствуют в мышцах второго типа (см. выше). Кроме нексусов, отмечаются и структуры, напоминающие десмосомы [117].

Помимо функции сокращения, гладкомышечные клетки, как и кардиомиоциты, могут выполнять секреторную, вырабатывая коллаген [131, 132].

Обычно принимают, что клетки висцеральных гладких мышц развиваются из клеток мезенхимы [116, 119]. Сведения по ультраструктуре дифференцирующихся лейомиоцитов немногочисленны [122, 129, 133, 134]. На ранних стадиях миогенеза налицо лишь тонкие миофиламенты [122, 133]. Они собираются в пучки, часто ориентированные вдоль длинной оси клеток. Идентифицируются также промежуточные (10 нм) филаменты [122—124], иногда образующие скопления вблизи от плотных (Z-подобных?) телец. Среди них можно видеть везикулярные мембранные структуры и липидные гранулы.

В малодифференцированных лейомиоцитах эмбрионов и новорожденных теплокровных сильно развиты гранулярная эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи. Постепенно размеры клеток увеличиваются, число филаментов и упорядоченность их пучков возрастают, появляются толстые нити (рис. 14). Встречаются микротрубочки и центриоли. Прогрессирующая дифференцировка выражается в накоплении все большего числа миофиламентов, в то время как объем, занимаемый другими органеллами, уменьшается.

В отличие от скелетных мышц в гладкомышечных клетках, как и в кардиомиоцитах (см. выше), наличие миофиламентов не блокирует синтез ДНК и митоз (рис. 6, рис. 14, рис. 15). При светоптическом изучении развивающихся гладких мышц митозы обнаруживаются как на ранних, так и на поздних стадиях гистогенеза [57, 135, 136 и др.]. Методом электронномикроскопической автордиографии выявлен синтез ДНК в дифференцирующихся лейомиоцитах эмбрионов кур и мышей, а также 1-дневных цыплят [66, 137]. На каждой из изученных стадий миогенеза ультраструктура меченных $^3\text{HТ}$ миоцитов (рис. 14) соответствует среднему уровню дифференцировки окружающих немеченых гладкомышечных клеток, что свидетельствует об отсутствии особой фракции менее дифференцированных клеток пролиферативного пула.

В клетках желудка молодых крыс в условиях регенерации [138] метку $^3\text{HТ}$ содержали ядра как типичных дифференцированных мышечных клеток, так и «активированных» с гипертрофированной шероховатой эндоплазматической сетью, увеличенным количеством свободных и связанных рибосом, а также имеющих пучки миофиламентов.

Наряду с этим в условиях *in vitro* в эксплантатах аорты включение $^3\text{HТ}$ методом электронномикроскопической автордиографии обнаружено только в ядра полностью дедифференцированных фибробластоподобных клеток (4-й день культивирования), в которых миофиламенты не идентифицировались [139].

С другой стороны, в культуре клеток из семяпровода новорожденных морских свинок одиночные сокращающиеся, по-видимому, дифференцированные гладкомышечные клетки, как было показано методом микрокинематографии, способны к митозу [140]. Однако сокращения прекращаются к началу профазы и возобновляются после завершения митоза дочерними клетками. Это наблюдение заставляет предполагать частичную дедифференцировку клеток во время митоза.

В развивающихся *in vivo* лейомиоцитах желудка цыпленка на всех стадиях митоза не видели признаков дедифференцировки [134]. В метафазе и анафазе миофиламенты не видны между микротрубочками веретена, но встречаются вблизи от хромосом (ср. рис. 15 а и рис. 15 б). Между митотическими и соседними интерфазными клетками сохраняются нексусы. Согласно данным этих авторов, сократительный аппарат гладкомышечных клеток при митозе почти не

изменяется: в нем представлены, как и в интеркинезе, оба типа миофиламентов и плотные тельца, сопоставляемые некоторыми авторами с материалом Z-дисков [127]. Поскольку такая гомология не является общепризнанной [120, 141], нет достаточных оснований искать сходного с деградацией дисков Z при митозе изменения плотных телец делящихся гладкомышечных клеток. Следует, однако, подчеркнуть, что, согласно нашим данным, содержание пучков миофиламентов и плотных телец при митозе последних явно снижено в сравнении с окружающими интеркинетическими гладкомышечными клетками, особенно в зоне, где располагается делящееся ядро (рис. 15). Снижение числа плотных телец в делящихся лейомиоцитах (аорта поросят) отмечают и другие авторы [142]. Во время митоза гладкомышечных клеток яичника показано исчезновение миофибрилл [143], вследствие чего эти клетки могут напоминать делящиеся мезенхимные клетки [115]. Вопрос о состоянии сократительного аппарата гладкомышечных клеток при митозе требует дальнейшего анализа.

Основные данные по динамике пролиферативной активности в процессе гистогенеза гладких мышц, полученные методом светооптической автордиографии, приведены в табл. 3. Они свидетельствуют о значительном возрастании (более чем в $1\frac{1}{2}$ раза)

Таблица 3

Суммированные данные светооптической автордиографии по индексам меченых ядер после однократных («импульсная» метка, I) и трехкратных (II) введений ^3H -тимидина, а также данные по продолжительности митотического цикла (T) и его фаз (G_1 , S, G_2), вычисленные по кривым меченых митозов [62] в развивающихся *in vivo* гладкомышечных клетках тонкой кишки

Виды животных и стадии развития	I (%)	II (%)	Продолжительность митотического цикла и его фаз (ч)				Литературные источники
			T	G_1	S	G_2	
Мышь:							
11—12-суточные эмбрионы	70	92	10.5	2.5	6.5—7.5	1—2	[57]
15-суточный эмбрион	43	73	—	—	8.0	3.0	[57]
18-суточный эмбрион	30	44	—	—	10—11	3.0	[57]
21-суточный эмбрион	18	32	—	—	—	—	[57]
7-суточная	7	14	—	—	10—11	5.0	[57]
15-суточная	2	4	—	—	—	—	[57]
Крыса:							
15-суточный эмбрион	45	96	20.0	10.0	9.5	1.5—2.0	[136]
18-суточный эмбрион	41	74	25.0	15.0	8.0	1.5—2.0	[136]
20-суточный эмбрион	24	40	—	—	10.0	1.5—2.0	[136]
1-суточная	18	73*	—	—	12—15	1.5—2.0	[136]
1-суточная	—	—	—	—	13.0	3.5	[57]
5-суточная	—	—	—	—	13.0	4.0	[57]

* — 6-кратное введение ^3HT .

длительности периодов S и G₁ в ходе дифференцировки лейомиоцитов, что типично для мышечных клеток, совмещающих антагонистические процессы дифференцировки и пролиферации (см. «Кардиомиогенез»). В процессе лейомиогенеза происходит медленное падение пролиферативной активности за счет выхода клеток из митотического цикла. Параллельно с уменьшением числа синтезирующих ДНК ядер (табл. 3) в процессе лейомиогенеза снижается и митотический индекс. В гладкомышечных клетках тонкой кишки крыс у 15, 18, 20-суточных эмбрионов и новорожденных животных митотический индекс имеет соответственно значения 3.9, 2.4, 1.7 и 1.3% [136]. В гладких мышцах тонкой кишки и сосудов взрослых крыс ³HT метит лишь единичные ядра [136, 144], что находится в согласии с указаниями других авторов [57, 145, 146]. При 5-кратных инъекциях ³HT число меченых лейомиоцитов не превышает 0.3% [120]. Это оправдывает отнесение лейомиоцитов взрослых животных к статическим или очень слабо «расширяющимся» популяциям [114]. Однако под влиянием беременности [57, 147], травмы [138, 148], при экспериментальном атеросклерозе [142] и *in vitro* [139, 149] гладкие миоциты с удивительной легкостью возвращаются в митотический цикл, синтезируют ДНК и делятся митозом. Число меченых ядер может при этом достигать до 10—30% [57, 148]. Световая, и особенно электронномикроскопическая автордиография, однозначно свидетельствуют о вступлении в фазу S содержащих типичные миофиламенты обоюродного рода и Z-подобные плотные тельца гладких мышечных клеток [138, 147, 148]. Специализированные органеллы сохраняются и при митозе лейомиоцитов, участвующих в реактивной пролиферации [142, 148]. Вместе с тем многие авторы подчеркивают, что уровень дифференцировки гладких миоцитов в пререпликативном периоде и во время их активной пролиферации отчетливо снижается, они уподобляются клеткам гладкой мускулатуры эмбрионов. Это позволяет обозначать перестройку миоцитов как их дедифференцировку различных степеней, что выражается в снижении числа миофиламентов, накоплении свободных рибосом и каналов шероховатой эндоплазматической сети, гиперплазии аппарата Гольджи и увеличении ядра и ядрышка [148—150]. Процесс дедифференцировки гладких миоцитов в культуре может быть заторможен при воздействии цАМФ — агента, способствующего дифференцировке ряда типов клеток, — или экстракта из симпатических ганглиев [150]. В культуре наблюдается и выраженная редифференцировка закончивших пролиферировать гладкомышечных клеток с восстановлением фенотипа, близкого к исходному [149].

Некоторые авторы считают, что способность к регенерации в гладких мышцах мала, несмотря на относительно высокую пролиферативную активность лейомиоцитов [116]. Не исключается возможность увеличения массы гладких мышц путем добавления новых клеток, дифференцирующихся из мезодермы [116], а также из фибробластов или фиброцитов [151].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные моменты, характеризующие вышесказанные данные по соматическому, кардиальному миогенезу и развитию гладких мышц, суммированы в табл. 4.

В соматическом миогенезе синтезируют ДНК и делятся митозом только одноядерные миобласты, в которых отсутствуют миофиламенты (премиобласты, по Хольцеру [4, 6]). Выход клеток из митотического цикла является необходимым предварительным условием для начала миофибрилlogenеза, имеющего место иногда уже в одноядерных клетках, и слияния миобластов. В многоядерных симпластах, образующихся путем слияния прошедших последний «квантальный митоз» миобластов [4, 6, 12, 13], активно синтезируются миофибрилярные белки, в то время как ядра не синтезируют ДНК и не делятся митозом.

Кардиомиогенез резко отличается от соматического прежде всего тем, что миоциты сердца способны проходить митотический цикл, несмотря на наличие высокоорганизованных миофибрилл, которые расчленяются при митозе на саркомеры и мелкие пучки миофиламентов в результате резорбции дисков Z; кардиальному миогенезу не свойственно также наличие способных к слиянию миобластов, играющих столь большую роль в гистогенезе скелетных мышц. На протяжении всего кардиомиогенеза миоциты сочетают в серии последовательных митотических циклов процессы пролиферации и дифференцировки, не теряя при этом скрепления друг с другом посредством десмосом и вставочных дисков.

В развивающихся гладких мышцах, как и в сердечной, синтезируют ДНК и делятся митозом одноядерные клетки, содержащие миофиламенты, т. е. синтез мышечных белков и процессы пролиферации совмещаются в одних и тех же клетках.

Таблица 4

Взаимосвязь процессов пролиферации и дифференцировки в различных типах миогенеза

Типы миогенеза	Синтез ДНК	Митоз	Миофибриллы и/или миофиламенты	Слияние
<i>Соматический миогенез</i>				
Одноядерные миобласты:				
премиобласты } (по Хольцеру, [4, 6])	+	+	—	—
миобласты }	—	—	—+	+
Многоядерные симпласты	—	—	++++	+
<i>Кардиомиогенез</i>				
Одноядерные миоциты	+	+	+++	—
<i>Лейомиогенез</i>				
Одноядерные миоциты	+	+	++	—

ЛІТЕРАТУРА

- [1] Boyd J. D. — In: The structure and function of muscle / Ed. by G. H. Bourne. New York, Acad. Press, 1960, 1 : 63.
- [2] Konigsberg I. R. — In: Organogenesis/Ed. by R. L. De Haan and H. Ursprung. New York, Holt, 1965 : 337.
- [3] Fischman D. A. — In: The structure and function of muscle / Ed. by G. H. Bourne. New York, Acad. Press, 1972, 1, part 1 : 75.
- [4] Holtzer H. — In: Cell differentiation. New York, Van Nostrand—Reinhold, 1970 : 476.
- [5] Lentz T. L. — In: Developmental regulation. Aspects of cell differentiation / Ed. by S. J. Coward. New York, Acad. Press, 1973 : 169.
- [6] Holtzer H. — In: Stem cells and tissue homeostasis / Ed. by B. I. Lord et al. London, Cambridge Univ. Press, 1978 : 1.
- [7] Hay E. D. — Z. Zellforsch., 1963, 59 : 6.
- [8] Fischman D. A. — J. Cell Biol., 1967, 32 : 557.
- [9] Hilfer S. R., Searls R. L., Fonte V. G. — Develop. Biol., 1973, 30 : 374.
- [10] Platzer A. C. — Anat. Rec., 1978, 190 : 639.
- [11] Stockdale F. E., Holtzer H. — Exper. Cell Res., 1961, 24 : 508.
- [12] Okazaki K., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56 : 1484.
- [13] Bischoff R., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1969, 41 : 188.
- [14] Moss F. P., Leblond C. P. — J. Cell Biol., 1970, 44 : 459.
- [15] Stockdale F. E. — Develop. Biol., 1970, 21 : 462.
- [16] Yeoh G. C., Greenstein D., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1978, 77 : 99.
- [17] Przybylski R. J., Blumberg J. M. — Lab. Invest., 1966, 15 : 836.
- [18] Kelly A. M., Zacks S. I. — J. Cell Biol., 1969, 42 : 135.
- [19] Shimada Y. — J. Cell Biol., 1971, 48 : 128.
- [20] Kalderon N., Epstein M. L., Gilula N. B. — J. Cell Biol., 1977, 75 : 788.
- [21] Kalderon N., Gilula N. B. — J. Cell Biol., 1979, 81 : 411.
- [22] Holtzer H., Marshall J. M., Finck H. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1957, 3 : 705.
- [23] Waterman R. E. — Amer. J. Anat., 1969, 125 : 457.
- [24] Holtzer H., Strahs K., Biehl J., Somlyo A. P., Ishikawa H. — Science, 1975, 188 : 943.
- [25] Moss P. S., Strohman R. — Develop. Biol., 1976, 48 : 431.
- [26] Trotter J. A., Nameroff M. — Develop. Biol., 1976, 49 : 548.
- [27] Vertel B. M., Fischman D. A. — Develop. Biol., 1976, 48 : 438.
- [28] Simpson S. B., Bayne E. K. — In: Muscle regeneration /Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 189.
- [29] Holtzer H., Fellini S., Rubinstein N., Chi J., Strahs K. In: Cell motility. Book B. Cold Spring Harbor Conf., 1976, 3 : 823.
- [30] Buckley P. A., Konigsberg I. R. — Develop. Biol., 1974, 37 : 193.
- [31] Buckley P. A., Koningsberg I. R. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 2031.
- [32] Lipton H. B., Konigsberg I. R. — J. Cell Biol., 1972, 58 : 348.
- [33] Heywood S. M., Dowben R. M., Rich A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 57 : 1002.
- [34] Weinstein-Orkin R., Pollard T. D., Hay E. D. — Develop. Biol., 1973, 35 : 388.
- [35] Kelly D. E. — Anat. Rec., 1969, 163 : 403.

- [36] Fischman D. A. — In: Research in muscle development and the muscle spindle. Amsterdam, Excerpta Medica, 1970 : 88.
- [37] Allen E. R., Pepe F. A. — Amer. J. Anat., 1965, 116 : 115.
- [38] Schweichel J. U., Seinsch W. — Verh. Anat. Ges., 1973, 67 : 561.
- [39] Nakao T. — Cell Tissue Res., 1976, 116 : 241.
- [40] Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1968, 38 : 538.
- [41] Ezerman E. B., Ishikawa H. — J. Cell Biol., 1967, 35 : 405.
- [42] Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Skulachev V. P. — Biochim. biophys. acta, 1978, 501 : 349.
- [43] Румянцев П. П., Соколовская И. Л. — В кн.: Исследование клеточных циклов и метаболизма нуклеиновых кислот при дифференциации клеток. М.; Л., Наука, 1964 : 71.
- [44] Mauro A. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9 : 493.
- [45] Snow M. H. — Cell Tissue Res., 1977, 185 : 399.
- [46] Trupin G. L. — Develop. Biol., 1976, 50 : 517.
- [47] Schmalbruch H., Hellhammer U. — Anat. Rec., 1977, 189 : 169.
- [48] Kelly A. M. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 167.
- [49] Snow M. H. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 91.
- [50] Montgomery R. D. — Nature, 1962, 195 : 194.
- [51] Enesco M., Puddy D. — Amer. J. Anat., 1964, 114 : 235.
- [52] Carlson B. M. — Amer. J. Anat., 1973, 137 : 119.
- [53] Carlson B. M. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 57.
- [54] Румянцев П. П., Дмитриева Е. В., Сеппа Н. В. — Цитология, 1977, 19 : 1333.
- [55] Rumyantsev P. P. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 335.
- [56] Zhinkin L. N., Andreeva L. F. — J. Embryol. Exper. Morphol. 1963, 11 : 353.
- [57] Заварзин А. А. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих. Л., Наука, 1967.
- [58] Margshok A. S., Negtman H. — Develop. Biol., 1967, 15 : 129.
- [59] Андрос Н. В. О соотношении синтеза ДНК, синтеза специфических и неспецифических белков при дифференциации сердечной и скелетных мышц куриного эмбриона. Автореф. дис. Тбилиси, 1973.
- [60] Kikuchi T., Nagatani T., Tamate H. — Tohoku J. Agr. Res., 1974, 25 : 22.
- [61] Данилов Р. К. — Арх. анат., 1979, 76 : 26.
- [62] Quastler H., Sherman F. G. — Exper. Cell Res., 1959, 17 : 420.
- [63] Varberg M. E. — Anat. Rec., 1971, 169 : 272.
- [64] Живкин Л. Н., Нилова В. К., Комаров С. А. — В кн.: Дифференцировка клеток в гисто- и органогенезах. Киев, Наукова думка, 1975 : 155.
- [65] Комаров С. А. — Цитология, 1976, 18 : 458.
- [66] Бушмарина М. С., Ерохина И. Л., Комарова Н. И., Комаров С. А., Маркозашвили М. И., Нилова В. К., Румянцев П. П., Сеппа Н. В. — Матер. XI Всесоюзн. конф. электр. микроск., 1979, 2 : 201.
- [67] Rumberg R. E., Rieke W. O. — Anat. Rec., 1967, 158 : 501.
- [68] Shafiq S. A., Goguski M. A., Mauro A. — J. Anat., 1968, 103 : 135.
- [69] Masse M., Nagay I. — Biochimie, 1974, 56 : 1581.
- [70] De Haan R. L. — In: Organogenesis / Ed. by R. L. De Haan and H. Ursprung. New York, Holt, 1965 : 377.

- [71] Manasek F. J. — In: Developmental regulation. Aspects of cell differentiation / Ed. by S. J. Coward. New York, Acad. Press, 1973 : 193.
- [72] R u m y a n t s e v P. P. — Intern. Rev. Cytol., 1977, 51 : 187.
- [73] Manasek F. J. — J. Embryol. Exper. Morphol., 1969, 22 : 333.
- [74] Viragh S., Challice C. E. — J. Ultrastr. Res., 1973, 42 : 1.
- [75] Rash J. E., Bieseke J. J., Gey G. O. — J. Ultrastr. Res., 1970, 33 : 408.
- [76] Pager J. Evolution structurale et ultrastructurale du tissu cardiaque en développement chez le foetus de rat. Thèse. Lyon, 1968.
- [77] Schiaffino S., Cantini M., Pierobon Bormioli S., Sartore S. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 357.
- [78] Румянцев П. П. — Арх. анат., 1967, 52 : 67.
- [79] Manasek F. J. — J. Morphol., 1968, 125 : 329.
- [80] Wegener K., Hollweg S., Maurer W. — Z. Zellforsch., 1964, 63 : 309.
- [81] Sissman N. J. — Nature, 1966, 210 : 504.
- [82] Ерохина (Соколовская) И. Л. — Цитология, 1968, 10 : 162.
- [83] Ерохина И. Л. — Цитология, 1968, 10 : 1391.
- [84] Ерохина И. Л. — Онтогенез, 1977, 8 : 451.
- [85] Jeter J. R., Cameron I. L. — J. Embryol. Exper. Morphol., 1971, 25 : 405.
- [86] Polinger I. S. — Exper. Cell Res., 1973, 76 : 253.
- [87] Weinstein R. B., Hay E. D. — J. Cell Biol., 1970, 47 : 310.
- [88] Hay D. A., Low F. N. — Amer. J. Anat., 1972, 134 : 175.
- [89] Румянцев П. П. — Арх. анат., 1973, 65 : 15.
- [90] Goldstein M. A., Claycomb W. C., Schwartz A. — Science, 1974, 183 : 212.
- [91] Ерохина И. Л., Румянцев П. П. — Цитология, 1979, 21 : 1131.
- [92] Zak R. — Amer. J. Cardiol., 1973, 31 : 211.
- [93] Godlewski E. — Arch. mikroskop. Anat., 1902, 60 : 111.
- [94] Schockaert A. — Arch. biol., 1909, 24 : 277.
- [95] Weissenfels N. — Protoplasma, 1962, 55 : 99.
- [96] Wainrach S., Sotelo J. R. — Z. Zellforsch., 1961, 55 : 622.
- [97] Rumberg R. E., Blandau R. J. — Acta anat., 1964, 58 : 116.
- [98] R u m y a n t s e v P. P. — Z. Zellforsch., 1972, 129 : 471.
- [99] R u m y a n t s e v P. P., Snigirevskaya E. S. — Acta morphol. Acad. sci. Hung., 1968, 16 : 271.
- [100] Klinge O. — Virchows Arch. Abt. B, 1970, 6 : 208.
- [101] Kasten F. H. — In vitro, 1972, 8 : 128.
- [102] Reddy M. K., Etlinger J. D., Rabinowitz M., Fischman D. A., Zak R. — J. Biol. Chem., 1975, 250 : 4278.
- [103] Румянцев П. П. — Цитология, 1978, 20 : 132.
- [104] Oberpriller J. O., Oberpriller J. C. — J. Cell Biol., 1971, 49 : 560.
- [105] Sasaki R., Morishita T., Yamagata S. — Tohoku J. Exper. Med., 1970, 100 : 1.
- [106] Sasaki R., Morishita T., Yamagata S. — Tohoku J. Exper. Med., 1970, 100 : 15.
- [107] Kunz J., Keim U., Fuhrmann I. — Exper. Pathol., 1972, 6 : 270.
- [108] Kunz J. — Acta histochem., 1979, 65 : 99.
- [109] Stalsberg H. — Develop. Biol., 1969, 20 : 18.
- [110] Grohmann D. — Z. Zellforsch., 1961, 55 : 104.
- [111] Claycomb W. C. — Exper. Cell Res., 1979, 118 : 111.
- [112] Claycomb W. C. — J. Biol. Chem., 1976, 251 : 6082.
- [113] Pfitzer P. — Virchows Arch. Abt. B, 1972, 10 : 268.
- [114] Leblond C. P. — Nat. Cancer Inst. Monogr., 1964, 14 : 119.

- [115] Garfield R. E. — In: Muscle regeneration / Ed. by A. Mauro et al. New York, Raven Press, 1979 : 383.
- [116] Gould R. P. — In: The structure and function of muscle / Ed. by G. H. Bourne. New York, Acad. Press, 1973, 2, part 2 : 185.
- [117] Prosser C. L. — Ann. Rev. Physiol., 1974, 36 : 503.
- [118] Somlyo A. V., Somlyo A. P. — In: Methods in pharmacology / Ed. by E. E. Daniel and D. M. Paton. New York, Plenum Press, 1975 : 3.
- [119] Заварзин А. А. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л., Наука, 1976.
- [120] Кауфман О. Я. Гипертрофия и регенерация гладких мышц. М., Наука, 1979.
- [121] Small J. V. — J. Cell Sci., 1977, 24 : 327.
- [122] Uehara Y., Campbell G. R., Burnstock G. — J. Cell Biol., 1971, 50 : 484.
- [123] Cooke P. — J. Cell Biol., 1976, 68 : 539.
- [124] Small J. V., Sobieszek A. — J. Cell Sci., 1977, 23 : 243.
- [125] Hubbard B. D., Lazarides E. — J. Cell Biol., 1979, 80 : 166.
- [126] Lazarides E. — Exper. Cell Res., 1978, 112 : 265.
- [127] Burnstock G. — In: Smooth muscle / Ed. by E. Bülbbring et al. London, Arnold, 1970 : 1.
- [128] Wootton G. S., Goodford P. J. — Cell Tissue Res., 1975, 161 : 119.
- [129] Cobb J. L., Bennett T. — Z. Zellforsch., 1969, 100 : 516.
- [130] Griep E. B., Revel J. P. — In: Intercellular communication / Ed. by W. C. De Mello. New York, Plenum Press, 1977 : 1.
- [131] Ross R., Klebanoff S. — J. Cell Biol., 1971, 50 : 159.
- [132] Burke J. M., Ross R. — Exper. Cell Res., 1977, 107 : 387.
- [133] Bennett T., Cobb J. L. — Z. Zellforsch., 1969, 98 : 599.
- [134] Cobb J. L., Bennett T. — Z. Zellforsch., 1970, 108 : 177.
- [135] Гладкий А. П. — В кн.: Реактивность и пластичность тканей. М., Медицина, 1953 : 246.
- [136] Дубинко Г. А. — Арх. анат., 1966, 50 : 47.
- [137] Румянцев Р. Р. — Acta histochem., 1976, Suppl., 17 : 215.
- [138] Флиппова Н. А., Кауфман О. Я., Перов Ю. Л., Райхлин Н. Т., Тимашкевич Т. Б. — Бюлл. экспер. бпол. мед., 1976, 82 : 881.
- [139] Fritz K. E., Jarmolych J., Daoud A. S. — Exper. Mol. Pathol., 1970, 12 : 354.
- [140] Chamley J. H., Campbell G. R. — Exper. Cell Res., 1974, 84 : 105.
- [141] Small J. V., Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1972, 67 : 117.
- [142] Imai H., Lee K., Lee S., Lee K. T., O'Neal R. M., Thomas W. A. — Lab. Invest., 1970, 23 : 401.
- [143] Keller L. — Acta anat., 1965, 61 : 92.
- [144] Yurukova Z., Hadjiisky P., Renais J., Scebat L. — Atherosclerosis, 1976, 23 : 297.
- [145] Messier B., Leblond C. P. — Amer. J. Anat., 1960, 106 : 247.
- [146] Goss R. J. — In: Control of the cellular growth in the adult organisms. New York, Acad. Press, 1967 : 3.
- [147] Defeo V., Kleinfeld R. — Anat. Rec., 1971, 169 : 305.
- [148] McGeachie J. K. — Monogr. Develop. Biol., 1975, 9 : 1.
- [149] Gröschel-Stewart U., Chamley J. H., Campbell G. R., Burnstock G. — Cell Tissue Res., 1975, 165 : 13.
- [150] Chamley J. H., Campbell G. R. — Cell Tissue Res., 1975, 161 : 497.
- [151] Bird C. C., Willis R. A. — Pathol. Bacteriol., 1965, 90 : 75.

З. А. ПОДЛУБНАЯ

ФОРМИРОВАНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ СТРУКТУР В МИОГЕНЕЗЕ

Институт биологической физики АН СССР,
Московская обл., Пущино

ВВЕДЕНИЕ

За последние 10 лет был достигнут существенный прогресс в понимании различных аспектов проблемы миогенеза. Однако нельзя сказать, что решение вопросов, связанных с формированием миофибрилл, продвигается так же успешно, как, например, изучение синтеза сократительных белков. После опубликования последних обширных обзоров по миофибриллогенезу [1—3] не произошло значительных сдвигов в устранении разногласий и неясностей, существовавших до того вокруг большинства структурных явлений в миогенезе. Причина этого заключается прежде всего в том, что основной качественный скачок в наших взглядах на сборку миофибрилл уже произошел до 70-х годов в связи с появлением электронной микроскопии. Исследования явлений фибрилlogenеза во времена световой микроскопии были ограничены низким разрешением метода наблюдения, недостатком знания миофибриллярной структуры, химии белков, а также недостаточным пониманием белкового синтеза. С открытием электронной микроскопии и прогрессом в биохимии и синтезе изучение различных стадий миофибриллогенеза существенно продвинулось.

С тех пор как утвердилось классическое представление о миофибриллах как о жесткой гексагональной решетке толстых и тонких нитей и о локализации миозина в толстых, а актина в тонких нитях, у исследователей появилась надежда, что электронная микроскопия сможет выяснить на основе одной морфологии сборку и упаковку сократительных белков в саркомерах. Это ожидание оправдалось лишь частично. Некоторые стадии образования миофибрилл выяснены прекрасными электронномикроскопическими исследованиями 60-х годов, проведенными *in vivo* и *in vitro*. Однако дальнейший прогресс в этом направлении был затруднен. Это объясняется не только ограниченными возможностями электронной микроскопии как всякого другого метода, но также и тем, что решение проблемы миофибриллогенеза, оказавшейся более сложной, чем ожидалось первоначально, зависит от наших знаний по многим связанным с ней вопросам. В послед-

ние годы открыто и изучено много новых сократительных и регуляторных белков, входящих в состав тех или иных структурных элементов саркомера. Продолжают накапливаться знания по структурно-функциональным свойствам белков из разных мышечных и неммышечных источников. Достигнуты большие успехи в изучении синтеза сократительных белков, а также в культивировании мышечных клеток и т. д. Все это является необходимой основой для дальнейшего прогресса в изучении миофибрилlogenеза.

СТРУКТУРА МИОФИБРИЛЛ

Перед описанием современных взглядов на образование миофибрилл следует остановиться на современных представлениях об их структурной организации (см. обзоры [4—9]).

Миофибриллы скелетных мышц представляют собой нитевидные образования диаметром 1—2 мкм, располагающиеся параллельно и идущие от одного конца мышечной клетки до другого. Каждая миофибрилла разделена Z-структурами * шириной около 0.1—0.3 мкм на множество саркомеров (рис. 1). Соседние миофибриллы расположены по отношению друг к другу так, что их Z-структуры находятся почти на одном уровне. Длина саркомеров мышц позвоночных варьирует, но чаще всего составляет около 3 мкм. В середине саркомера находится анизотропный диск, или А-полоса, шириной около 1.5 мкм. Изотропные диски, или I-полосы, шириной около 0.5 мкм находятся по краям саркомера, примыкая к Z-линиям. Посередине А-диска имеется H-зона. В центре H-зоны находится M-полоса шириной около 0.1 мкм. Следует отметить также наличие N-полос в изотропных дисках саркомера, чаще всего наблюдаемых в виде двух полос N_1 и N_2 и находящихся соответственно на расстояниях около 0.1 и 0.3 мкм от Z-линии.

Каждый саркомер на поперечном срезе состоит из двух перекрывающихся гексагональных решеток толстых, миозиновых (диаметром примерно 15 нм), и тонких, актиновых (диаметром примерно 8 нм), нитей [4, 11] (рис. 1, Г, Д). Толстые нити расположены в А-диске. Тонкие нити, располагаясь в I-дисках, заходят также в промежутки между концами миозиновых нитей в А-диски. В результате в А-диске образуются две зоны перекрытия и H-зона, свободная от тонких нитей (рис. 1, А—В). При сокращении мышцы тонкие нити перемещаются к центру саркомера. При этом уменьшается длина саркомера, а также длина I- и H-зон при сохранении неизменной длины А-диска. Эти электронномикроскопические наблюдения вместе с данными рентгеновских исследований легли в основу гипотезы скользящих нитей [12, 13]. В зоне перекрытия между толстыми и тонкими нитями находятся поперечные мостики [14], которые образованы

* Z-линия, Z-полоса, Z-диск, Z-мембрана.

«головками» миозина, расположенными на поверхности толстых нитей. На продольных срезах летательных мышц насекомых регулярное расположение поперечных мостиков видно наиболее отчетливо [15]. В настоящее время поперечным мостикам приписывается основная роль в генерации силы при сокращении [5].

Длина нитей изучалась детально [16], она является постоянной в большинстве поперечнополосатых мышц позвоночных. Толстые нити имеют длину около 1.5 мкм, тонкие — примерно 1 мкм. Тонкие нити прикреплены одним концом к Z-мембране и имеют противоположную полярность с разных сторон от Z-мембраны. Толстые нити имеют биполярную структуру [14]. Таким образом, создается своеобразная структура саркомера, приспособленная для перемещения тонких нитей с двух сторон к центру саркомера [12, 13].

СТРУКТУРА, КОМПОНЕНТЫ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ТОНКОЙ НИТИ

По сравнению с другими элементами саркомера строение тонкой нити изучено наиболее полно. На рис. 2А представлена упрощенная модель структуры тонкой нити, созданная на основе данных биохимических и электронномикроскопических исследований, а также оптической дифракции и дифракции рентгеновских лучей, проведенных на мышце, изолированных тонких нитях и агрегатах, реконструированных *in vitro*.

Установлено, что тонкая нить скелетных мышц позвоночных состоит из актина в фибриллярной форме, тропомиозина (ТМ) и тропонина (ТН). Соотношение содержания этих белков в тонкой нити составляет $A : ТМ : ТН = 7 : 1 : 1$, т. е. на 7 мономеров актина приходится по 1 молекуле ТМ и ТН [17, 18]. Структура Ф-актина, видимая в электронном микроскопе, представляет собой двухтяжевую спираль, каждый тяж которой образован субъединицами глобулярного актина с диаметром около 5.5 нм. Диаметр всей нити равен примерно 8 нм. Тяжи сдвинуты друг относительно друга вдоль оси Ф-актина на половину диаметра субъединицы (2.75 нм). Расстояние вдоль оси Ф-актина между точками пересечения тяжей составляет 35—39 нм [6, 19, 20]. Исследования дифракции рентгеновских лучей, проведенные на мышце и реконструированных тонких нитях, привели к разным мнениям о структурных параметрах спирали Ф-актина в тонких нитях. Одни авторы представили доказательства существования спирали $^{13}/_6$ (13 субъединиц в 6 оборотах спирали) [21, 22], другие — $^{41}/_{19}$ [23].

Как было первоначально предположено Хэнсон и Леви [19], а затем подтверждено большим количеством других исследований [21—35], тропомиозин расположен в канавках актиновой спирали в виде двух тяжей, составленных из молекул, агрегированных по типу «голова к хвосту». Возможность такой агрегации

тропомиозина подтверждается анализом упаковки его молекул в паракристаллах [36—51]. Осевая периодичность в паракристаллах составляет около 40 нм и соответствует длине молекул тропомиозина (рис. 2, Б). Рисунок тонкой периодичности на микрофотографиях различных паракристаллов тропомиозина позволяет сделать заключение о полярном способе агрегации («голова к хвосту») полярных молекул тропомиозина* (рис. 2, Б). В модели, предложенной Эбаши и сотрудниками [17, 18], тропонин локализован в тонких нитях на тропомиозиновых тяжах с интервалами 38—39 нм. Иммуная электронная микроскопия обнаруживает распределение антител к тропонину вдоль тонких нитей с указанными интервалами [51] (рис. 2, Г, Д). Электронномикроскопические исследования взаимодействия тропонина с паракристаллами тропомиозина выявили участок связывания тропонина на молекуле тропомиозина. Этот участок (или участки) находится на расстоянии примерно 13 нм от С-конца молекулы [36—39, 46, 47, 52, 55, 56]. Периодичность расположения тропонина вдоль тонких нитей диктуется, следовательно, регулярной упаковкой тропомиозина и соответствует периодичности в его паракристаллах.

Таким образом, для современной модели структуры тонкой нити существенны следующие черты. Спираль Ф-актина состоит из полярных субъединиц актина, агрегированных полярно в двух одинаково направленных тяжах. Тропомиозин находится в канавках спирали Ф-актина в виде двух полярных тяжей диаметром примерно 2 нм, образованных агрегацией полярных тропомиозиновых молекул по типу «голова к хвосту». На тяжах тропомиозина с регулярными интервалами около 38.5 нм располагается глобулярный тропониновый комплекс. Так формируется полярная структура тонкой нити, в которой каждая молекула тропомиозина взаимодействует с 7 мономерами актина и 1 тропониновым комплексом, создавая функциональную единицу. Полярность структуры тонкой нити выявляется в экспериментах по декорации ее тяжелым меромиозином или миозином. Присоединение миозина или тяжелого меромиозина к глобулам актина в нитях образует своеобразную структуру «наконечников стрел», направленных в одну сторону (рис. 3). Если миозином обработать суспензию так называемых Z-щеток (изолированные I-диски), то «наконечники стрел», образуемые миозином, присоединившимся к актину, будут направлены в разные стороны от Z-мембраны, так как тонкие нити с каждой стороны от Z-мембраны имеют разную полярность.

* Палочкообразные молекулы тропомиозина (40×2 нм) состоят из двух α -спиральных одинаково направленных субъединиц, образующих конфигурацию coiled-coil [49]. Агрегация тропомиозина в нити и его взаимодействие с Ф-актином исследовались с учетом уже известной аминокислотной последовательности в субъединицах тропомиозина [37—39, 50, 52—54].

Тонкая нить легко может быть реконструирована *in vitro* из составляющих ее белков. Актиновую спираль, идентичную по своим параметрам двойной спирали тонкой нити, можно получить полимеризацией глобулярного актина в присутствии разных катионов [6]. Комплексообразование полученного Ф-актина с тропомиозином, а последнего с тропонином приводит к формированию *in vitro* структуры тонкой нити, аналогичной наблюдаемой в мышце. Об этом свидетельствуют данные дифракции рентгеновских лучей, электронной микроскопии, оптической дифракции и данные по реконструкции трехмерной структуры нативных и реконструированных нитей [25—27, 31—34, 40, 46, 47, 57—63].

Изучение взаимодействия Ф-актина, тропомиозина и компонентов тропонина * в структурах, собранных *in vitro*, имело большое значение не только для установления строения тонкой нити, но и для выяснения функциональной роли этих белков (см. [46, 47]). Результаты этих экспериментов вместе с данными, полученными при исследовании мышц, легли в основу современных рабочих моделей регуляции взаимодействия толстых и тонких нитей (стерическая и аллостерическая модели регуляции) [25—27, 34, 35, 46, 47, 66, 67].

Как следует из вышеизложенного, современные модели строения тонкой нити и модели регуляции, связанные с актиновой нитью, учитывают присутствие в ее составе лишь 3 белков: актина, тропомиозина и тропонина. Однако в саркомере тонкая нить содержит и другие (минорные) белки. Вполне возможно также, что тонкая нить в мышце вдоль своей длины имеет неоднородный состав. В районе N-линий, например, обнаружены адениннуклеотиды [68, 69], ионы Ca [70, 71], гликолитические ферменты [72]. Экспериментами *in vitro* была показана способность гликолитических ферментов связываться с Ф-актином, тропомиозином, тропонином и реконструированными тонкими нитями, а также выявлена зависимость этих взаимодействий от уровня Ca^{2+} [73, 74]. Альдолаза связывается с реконструированными тонкими нитями с периодом, равным периоду распределения тропонина, т. е. 38 нм. Возможность связывания альдолазы с тонкими нитями в мышце подтверждена рентгеновскими исследованиями [75].**

С помощью иммунной электронной микроскопии показано присутствие β -актинина в центре A-полосы на свободных концах тонких нитей [77]. Эксперименты *in vitro* по изучению влияния β -актинина на полимеризацию актина позволили предположить, что β -актинин действительно связывается с концом растущей нити Ф-актина, противоположным направлению роста [77—79]. Изучено влияние β -актинина на длину актиновых нитей, форми-

* Тропонин состоит из трех структурно и функционально различных компонентов, названных тропонином Т, тропонином И и тропонином С. Подробности об их свойствах приведены в ряде обзоров [8, 46, 47, 64, 65].

** При электрической стимуляции мышцы связывание гликолитических ферментов возрастает [75, 76].

рующихся *in vitro*. Здесь следует отметить, что длина реконструированных тонких нитей варьирует в широких пределах в отличие от постоянной длины тонких нитей в мышце [16]. Многочисленные поиски факторов, лимитирующих длину тонких нитей *in vitro*, были unsuccessfulными.

СТРУКТУРА, КОМПОНЕНТЫ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ТОЛСТОЙ НИТИ

Толстая миозиновая нить скелетных мышц у позвоночных является более сложным и менее изученным структурным элементом саркомера, чем тонкая нить. Неизвестна упаковка молекул миозина внутри толстой нити, нет окончательных данных о симметрии расположения головок миозина на ее поверхности, не решен вопрос о наличии белка, отличающегося от миозина, в стволе нити, неизвестен полный белковый состав толстой нити, а также нет сведений об упаковке и функции минорных белков, связанных с толстой нитью.

К настоящему времени предполагается наличие в толстой нити по крайней мере 7 белков [80]. Миозин — основной белковый компонент толстой нити — достаточно хорошо изучен. Его молекула состоит из двух тяжелых цепей с м. в. около 200 000 и четырех легких с м. в. около 20 000 [81]. * Многочисленные исследования формы и размеров молекулы миозина показали, что она представляет собой палочку (хвост) длиной 150—160 нм с утолщением на одном конце (головка). Электронная микроскопия (рис. 4) выявила двухдолевое строение головки миозиновой молекулы. Грушевидные доли головок имеют длину 19—21 нм. Головка соединена с хвостом шарниром. Другой шарнир находится примерно в середине хвоста. Изгибы молекул в этих участках, наблюдаемые на снимках, подтверждают наличие шарниров.

По всей длине хвоста (кроме шарниров) две α -спиральные цепи миозина, скручиваясь вместе, образуют конфигурацию *coiled-coil*. В районе головки две цепи скручиваются отдельно, образуя глобулярные доли. Предполагается, что щелочные цепи, существенные для проявления АТФазной активности миозина, локализованы в районе головки. Локализация ДТНБ-цепей предполагается или в районе головки, или в области шарнира рядом с головкой [89].

Часть хвоста длиной 40—50 нм, расположенную между двумя шарнирами, принято называть субфрагментом 2 (С-2), а двух-

*. Вопрос об идентичности тяжелых цепей в молекуле миозина не решен окончательно. Состав и молекулярный вес легких цепей миозина зависит от типа мышц [8]. В миозине из белой скелетной мышцы кролика содержится 4 легкие цепи: 2 ЛЦ2, или так называемые ДТНБ-цепи, с м. в. 18 000 и щелочные цепи ЛЦ1 и ЛЦ3 соответственно 25 000 и 15 000. Предполагается, что препараты миозина содержат популяции миозина с составами легких цепей 2 (ЛЦ2, ЛЦ1) и 2 (ЛЦ2, ЛЦ3) в неравных количествах [82].

долевую головку — субфрагментом 1 (С-1). Область молекулы, состоящую из С-2 и С-1, называют тяжелым меромиозином (ТММ), оставшуюся часть хвоста длиной 70—90 нм — легким меромиозином (ЛММ). Указанные фрагменты молекулы можно получить, действуя на миозин различными протеолитическими ферментами. При этом АТФазная активность и свойство соединяться с актином остаются в области головки, т. е. у ТММ и С-1, тогда как ЛММ наследует способность миозина к агрегации при физиологических значениях ионной силы. В отличие от ЛММ субфрагменты 1 и 2, а также ТММ растворимы при низких ионных силах [8, 81]. Молекулы миозина при снижении ионной силы до 0.15—0.1 способны к самопроизвольной ассоциации с образованием нитей, внешнее сходство которых с толстыми нитями в мышце впервые было отмечено Хаксли [14].

Толстая нить поперечнополосатых мышц позвоночных представляет собой веретенообразный агрегат диаметром около 15 нм и длиной около 1.6 мкм (рис. 5, А, Б). Нить имеет выступы вдоль всей длины, кроме центральной части (так называемой «голой зоны») длиной 130—160 нм [14, 80, 83—86]. Своеобразный вид толстой нити обусловлен особенностями строения миозиновых молекул и их упаковки в нити [14]. Спиральные хвосты миозиновых молекул (ЛММ-части) упакованы внутри нити, образуя ствол, тогда как головки выходят наружу, располагаясь на поверхности в виде выступов. Последние отождествляются с поперечными мостиками между толстыми и тонкими нитями в мышце [14]. Молекулы миозина в центре нити агрегированы биполярно, т. е. по типу «хвост к хвосту», в результате чего образуется «голая зона». По обеим сторонам от центра нити молекулы ассоциированы полярно по типу «хвост к голове». Сочетание двух типов агрегации обеспечивает биполярную структуру толстой нити [7, 14]. Возможность биполярной и полярной упаковки молекул миозина подтверждается экспериментами *in vitro* по агрегации миозина и его спиральных фрагментов (рис. 6) [7, 46, 47, 90—95]. Расположение головок и С-2 на поверхности толстых нитей также подтверждается прямыми наблюдениями (рис. 5, А).

Основные сведения о симметрии головок миозина на поверхности и о порядке расположения хвостов внутри толстой нити получены из электронномикроскопических исследований, проведенных на мышце, А-сегментах (изолированных А-дисках), нативных нитях и агрегатах спиральных фрагментов миозина [4, 14, 46, 47, 80, 84—86, 95—99], а также из исследования дифракции рентгеновских лучей, проведенном на мышце [21, 22]. Результаты этих исследований свидетельствуют о регулярной упаковке молекул миозина внутри нити с периодами 43 и 14.3 нм, а также о спиральном расположении головок на поверхности нити с субъединичным и осевым периодами, равными соответственно 14.3 и 43 нм. Число молекул миозина, приходящееся на каждый период 14.3 нм, полученное из биохимических исследований, со-

ставляет 2, 3 или 4 [100—104]. Исходя из этого, Хаксли и Сквайер предложили несколько моделей спирального расположения головок миозина на поверхности нити с двумя [21], тремя [9, 105—107] и четырьмя [9] головками на каждом 14.3 нм-уровне (рис. 7). В соответствии с разной симметрией головок миозина на поверхности толстой нити Пепе и Сквайер предложили модели строения толстой нити с разными способами упаковки молекул миозина внутри нити [4, 9, 84, 85, 105—107]. Модели строения толстой нити широко обсуждаются в литературе [8, 80, 84—86, 97, 100, 101, 104, 108—113], но, к сожалению, нельзя пока отдать предпочтение ни одной из них. Они должны быть пересмотрены с учетом новых, не согласующихся с ними экспериментальных данных [80, 86], а также с учетом присутствия других белков в толстых нитях.

Биохимические, электронномикроскопические и иммуно-электронномикроскопические исследования, проведенные на мышце, изолированных А-дисках и отдельных нативных нитях, а также на агрегатах миозина и его спиральных фрагментов, представили доказательства присутствия в толстых нитях белка с м. в. 140 000, названного С-белком [80, 86, 95, 114—122]. Молекула этого белка представляет собой гибкую палочку длиной 20—30 нм [115]. С-белок взаимодействует с миозином, ЛММ и С-2 [95, 115, 116], изменяет структуру реконструированных миозиновых нитей [122], располагается на толстых нитях в мышце и паракристаллах ЛММ с периодом 43 [80, 96, 117, 118] или 44 нм [86, 95, 111]. Вопрос о соответствии периодичности расположения С-белка и миозина в толстых нитях не решен окончательно. Он тесно связан с решением вопроса о способе упаковки С-белка. Высказаны предположения, что С-белок локализован на поверхности, окружая кольцом ствол толстой нити [118], но есть также основания полагать, что часть молекулы С-белка упакована вдоль толстой нити в канавках между хвостами соседних миозиновых молекул [122].

Из других белков, относящихся к толстой нити, следует упомянуть Х- и Н-белки с м. в. соответственно 133 000 и 64 000. Эти белки открыты недавно и еще мало изучены. По предварительным данным, они могут быть локализованы в районе первых 4 полос А-диска, считая от М-полосы (см. рис. 1, А, В и рис. 8, А, В) [80, 123]. Недавно также был открыт новый белок с м. в. около 50 000, взаимодействующий с миозином, но не с актином, названный I-белком за его способность ингибировать Mg-АТФазу актомиозина в отсутствие Ca^{2+} [124]. Антитела к I-белку окрашивают весь А-диск, за исключением М-полосы. Исследования белкового состава М-полосы привели к открытию двух белков с м. в. 165 000 и 80 000 (креатинкиназа) [125—128]. Иммуноэлектронная микроскопия подтвердила их локализацию в районе М-области. *In vitro* креатинкиназа и М-белок с м. в. 165 000 взаимодействуют с миозином, причем первый белок собирает миозиновые нити в пучки. С другой стороны, эксперименты на мышце показали, что после

экстракции вещества М-полосы оба белка независимо друг от друга могут связываться с толстыми нитями в центре А-диска, восстанавливая исходную структуру этой зоны [125].

Из всего сказанного выше следует, что толстая нить скелетных мышц у позвоночных является сложной структурой, компоненты которой, за исключением миозина, еще мало изучены. Вполне вероятно, что состав толстой нити не ограничивается упомянутыми здесь белками. Изучение структурно-функциональных свойств всех белков, составляющих толстую нить, поможет выяснить ее структуру и понять механизм ее функционирования в мышце. Исследования влияния минорных белков толстой нити на агрегацию миозина *in vitro* позволят выявить их роль в филаментогенезе *in vivo*. Как показывают эксперименты *in vitro*, многие известные характерные черты строения толстой нити (биполярность, размеры диаметра, периодичность в полярных частях нити) могут быть воспроизведены в реконструированных нитях миозина при условиях, близких к физиологическим, и без присутствия миорных белков. Следовательно, эти черты строения толстой нити обусловлены свойствами самого миозина. В результате многочисленных исследований агрегации миозина и его спиральных фрагментов выяснены факторы, влияющие на форму, размеры, биполярность реконструированных миозиновых нитей [14, 46, 47, 90—95, 113, 115, 116, 121, 122, 129—139]. К ним можно отнести: ионную силу [14, 46, 47, 132—134, 139], скорость снижения ионной силы [14, 91, 129—131], состав одновалентных катионов [134], рН [93, 132—134], присутствие Ca^{2+} и Mg^{2+} [46, 47, 90, 92, 138], АТФ [94, 138], неорганических фосфатов [138], а также присутствие ДТНБ-цепей, миозина [136, 138] и С-белка [95, 115, 116, 121, 122, 139]. Найдены условия, благоприятствующие формированию *in vitro* нитей, наиболее соответствующих по указанным параметрам толстым нитям в мышце. Однако не все из известных черт строения толстых нитей могут быть воспроизведены *in vitro*. Например, получить миозиновые нити с постоянной длиной около 1.5 мкм, характерной для толстых нитей в мышце, не удавалось еще ни в одном эксперименте. Обычно длина реконструированных миозиновых нитей варьирует в широких пределах в разных опытах, и ее среднее значение зависит от условий формирования нитей [46, 47, 138]. Кроме того, нити, полученные в одном опыте, также не гомогенны по длине. Высказаны разные предположения о механизмах, лимитирующих длину толстых нитей *in vivo* [4, 14, 21, 84—86, 111]. Некоторые авторы предполагают, что ограничение длины растущей нити происходит в результате совместной полимеризации двух белков с разными периодами упаковки. Предполагается, что роль второго белка может исполнять С-белок [86, 111]. Однако, как отмечено выше, вопрос о периоде распределения С-белка в толстой нити не решен окончательно. Другая возможность ограничения длины нитей возникает из предположения о наличии стержня (ствола)

внутри нити, состоящего из белка, отличающегося от миозина. Предположения о существовании стержня внутри толстой нити и о его возможной роли в морфогенезе толстой нити высказывались неоднократно [9, 105, 133], и в модели трехмерной структуры толстой нити, предложенной Сквайером [9, 105], отводится место для подобного стержня. Некоторые прямые наблюдения подтвердили наличие стержня внутри толстой нити поперечнополосатых мышц [46, 47, 140, 141]. Однако в этом вопросе пока нет согласия между данными структурных и биохимических исследований [120].

В заключение этого раздела следует отметить, что неуспешные попытки получить агрегаты миозина с длиной, характерной для природных ансамблей, могут объясняться многими причинами. Понятно, что условия формирования миозиновых нитей *in vitro* лишь отдаленно напоминают внутриклеточный процесс сборки. Попытки воссоздать эти условия *in vitro* встречают много трудностей. Выбор ионных компонентов не может быть точным, так как концентрация свободных ионов в цитоплазме мышечной клетки неизвестна. Среда эмбриональной клетки отличается от среды взрослой клетки [142]. Кроме того, одновременно с миозином в клетке присутствуют другие белки. Влияние большинства из них в экспериментах *in vitro* вообще не учитывалось. Эти и другие не известные пока факторы могут иметь важное значение в механизме ограничения длины толстой нити в миогенезе.

СТРУКТУРА М-, Z- И N-ПОЛОС

На микрофотографиях продольных срезов скелетных мышц в середине саркомера видна поперечная полоса шириной 0.08—0.1 мкм, называемая М-полосой. Методикой срезов была выявлена ультраструктурная организация этой области саркомера [86, 141, 143, 144]. Показано, что М-полоса состоит в свою очередь из 3, 4 или 5 узких полосок (в зависимости от типа волокна и мышцы), расположенных на расстоянии 20—22 нм друг от друга (рис. 9). Микрофотографии поперечных срезов М-полосы обнаружили на уровнях указанных полосок гексагональную сетку из поперечных мостиков диаметром 4 нм, соединяющих толстые нити [4, 141, 143, 144]. Эти мостики принято называть М-мостиками. М-мостики пересекаются тонкими продольными М-нитеями (диаметром 5 нм), идущими параллельно толстым нитям саркомера [141]. На поперечных срезах М-нити выглядят как утолщения в середине М-мостиков [141, 143, 144]. Кроме М-мостиков и М-нитей, на снимках криосрезов мышцы в районе М-полосы были обнаружены дополнительные так называемые вторичные поперечные мостики, расположенные на расстоянии 15 нм от центра М-полосы и соединяющие М-нити [141] (рис. 9).

Исследования белкового состава М-полосы показали присутствие двух белков в этой зоне [125—128]: креатинкиназы — димера с м. в. цепи 40 000 и белка с м. в. 165 000 (М-белок). Их лока-

лизация в М-полосе подтверждена с помощью иммунной электронной микроскопии и экспериментами по реконструкции М-линии [125, 127, 128]. Предполагается, что креатинкиназа локализована в поперечных М-мостиках между толстыми и М-нитеми [125], тогда как последние образованы М-белком [128]. Эти предположения основаны на результатах *in vitro* экспериментов, согласно которым креатинкиназа собирает миозиновые нити в пучки, подобные А-сегментам, а М-белок в растворах с низкой ионной силой агрегирует с образованием нитей. В пользу этого предположения свидетельствует также факт, что антитела к М-белку связываются с Н-зоной в сердечной мышце цыпленка, в которой отсутствует М-полоса [145]. С другой стороны, реконструкция структуры М-полосы показала [125], что свойством формировать поперечные М-мостики обладает и М-белок (см. раздел «Толстая нить»). Есть также доказательства связывания М-белка с миозином, точнее с С-2 миозина. Функциональный смысл этой связи обсуждается в ряде работ [146, 147].

Белком, создающим вторичные мостики, по предположению некоторых авторов [141], является гликоген фосфоорилаза b. Однако, несмотря на то что этот белок (димер) с м. в. цепи 90—100 000 присутствует в «экстрактах М-полосы», предположения о его локализации в структуре М-зоны подвергаются сомнению [127, 148]. Иммунофлуоресценция показывает присутствие фосфоорилазы b в основном в области I-дисков саркомера и меньше в районе Н-зоны [149].

Ультраструктурные исследования Z-полосы скелетных мышц привели к разным точкам зрения относительно ее строения. Это прежде всего объясняется разнообразием картин, наблюдаемых на продольных и поперечных срезах. Наиболее часто на микрофотографиях поперечных срезов мышцы в Z-полосе обнаруживаются квадратные решетки — малая (с периодом около 11 нм), большая (с периодом около 22 нм) и решетка типа плетеной ткани. На продольных срезах мышцы также нет единообразия картин в Z-области. Предложенные модели трехмерного строения Z-полосы пытаются связать наблюдаемые картины с пространственным расположением тонких нитей внутри Z-полосы, но не учитывают других компонентов этой зоны.

Модели структуры Z-полосы [150] можно условно разделить на две группы. Одни авторы полагают, что концы тонких нитей соседних саркомеров связываются так называемыми Z-нитеми, находящимися в Z-диске. Модели другой группы авторов основаны на предположении, что тонкие нити соседних саркомеров, расщепляясь на несколько (2, 3, 4) субнитей, образуют внутри Z-полосы структуры типа «шпилек», переплетающихся между собой. Как расположены тонкие нити в Z-мембране и каким образом они связываются между собой, по-прежнему остается загадкой. Биохимические исследования, пытающиеся помочь решению этого вопроса, привели к открытию нескольких белков

в Z-полосе: α -актинина [151—155], филамина [156—158], десмина (скелетина) [159—160], с м. в. соответственно 180 000, 240 000, 50 000, а также белка с м. в. около 55 000 [161] *. Присутствие всех трех белков в Z-полосе подтверждено методом иммунофлуоресценции. Способность взаимодействовать с актином для всех белков показана *in vitro*. α -Актинин формирует поперечные мостики между актиновыми нитями, собирая последние в пучки [152]. На этом основано предположение о структурной роли α -актинина в Z-полосе. Филамин, подобно α -актинину и независимо от него, взаимодействует с Ф-актином, образуя пучки или сетки из актиновых нитей [158]. Оба белка локализируются внутри Z-дисков. Десмин в отличие от них локализован по периферии Z-дисков. Это отчетливо показано на изолированных Z-дисках [159]. Десмин найден также в местах, где Z-диски примыкают к плазматической мембране. *In vitro* десмин может агрегировать в нити диаметром около 10 нм, очень похожие на так называемые промежуточные филаменты, обнаруживаемые в мышечных клетках. Подобные филаменты иногда удается увидеть в мышце на уровне Z-дисков в промежутках между соседними миофибриллами. Эти интересные данные позволили предположить, что десмин выполняет несколько функций в районе Z-полосы [159]. Во-первых, окружая кольцом Z-диски по периферии, он объединяет тонкие нити одной миофибриллы. Во-вторых, связывая Z-полосы соседних миофибрилл, он держит их в регистре. Наконец, обладая гидрофобными свойствами, десмин, вероятно, связывается и с мембраной поперечных трубочек (рис. 10). Авторы этой работы высказывают предположение о важной роли десмина в фибрилlogenезе (см. ниже).

О белке с м. в. около 55 000 известно только то, что *in vitro* он способен формировать структуры, напоминающие малые решетки, видимые в Z-дисках на поперечных срезах мышцы [161]. Требуется дополнительное исследование взаимодействия указанных белков друг с другом, а также с актином, чтобы выяснить вклад каждого белка в формирование структуры Z-полосы.

Наконец, следует коротко остановиться на новых данных, касающихся структуры N-полос саркомера. Несмотря на то что N-полосы были обнаружены очень давно [163], сведения об их структуре весьма ограничены. Интерес к N-линиям возродился недавно в связи с обнаружением в них адениннуклеотидов, ионов Са, гликолитических ферментов [68—72]. Сами по себе эти факты являются очень интересными, и требуются дальнейшие исследования для уточнения локализации указанных веществ и выяснения природы N-полос. До сих пор большинство исследователей придерживались точки зрения, что N-линии создаются материалом, декорирующим тонкие нити. Однако при исследовании срезов

* Недавно в летательных мышцах насекомых открыт белок с м. в. 35 000, имеющий высокое содержание пролина в молекуле. Предполагается, что он локализован в Z-диске [162].

скелетной мышцы быка было показано, что материал N-линии расположен скорее всего на эластичных нитях, отличающихся от актиновых [164]. Эти нити, по мнению авторов, проходят внутри толстых нитей в A-диске, выходят из них в I-полосе, соединяя концы толстых нитей соседних саркомеров (т. е. проходят через Z-мембраны). Наличие в миофибриллах скелетных мышц эластичных нитей предполагалось давно. Сейчас присутствие их в разных участках саркомера подтверждено прямыми наблюдениями [164—167]. Природа этих нитей стала более понятной после того, как в скелетных мышцах были открыты и охарактеризованы новые белки, подобные эластину, с очень большими молекулярными весами, названные коннектином [168, 169] и титином [170, 171]. *In vitro* эти белки агрегируют, образуя эластичные гели, состоящие из тонких нитей диаметром 2—5 нм. Подобные нити, идущие через все саркомеры, наблюдаются в «тенях» миофибрилл, т. е. после экстракции из них всех основных сократительных белков. Антитела выявляют присутствие коннектина в «тенях» миофибрилл [168]. Не исключена возможность, что тонкие продольные нити, обнаруживаемые на срезах мышц [164, 167, 172] являются коннектиновыми (или титиновыми) эластичными нитями. N-линии, возможно служат дисковыми структурами, скрепляющими и упорядочивающими эластичные нити. С другой стороны, N-диски могут быть достаточно перфорированными для свободного прохождения актиновых нитей. Известно, что тонкие нити, расположенные гексагонально в A-диске, образуют квадратную решетку около Z-мембраны. N₂-диск (ближний к A-полосе) и N₁-диск (ближний к Z-мембране), вероятно, служат для поддержания соответствующего порядка тонких нитей. Связь между эластичными нитями и N-линиями [164] несомненно заслуживает более внимательного изучения.

Сейчас пока неясно, где проходят эластичные нити. Присоединяют ли они концы толстых нитей к Z-мембранам или концы тонких нитей к M-полосе? Или они проходят непрерывно между актиновыми и миозиновыми нитями через все саркомеры, обуславливая структурную непрерывность миофибрилл? Мнения по этому вопросу разные. Может ли коннектин (или титин) являться белком ствола толстых нитей? Какова роль эластичных нитей при сборке сократительных белков в саркомеры и миофибриллы? Для ответа на эти вопросы необходимы специальные исследования *in vitro* и *in vivo*.

Заканчивая обзор данных о структуре сократительных элементов саркомера и их реконструкции в экспериментах *in vitro*, следует отметить, что последние внесли огромный вклад в наши представления о миофибриллогенезе. Можно с достаточной убежденностью сказать, что информация об организации сократительных белков в саркомере уже заложена в их химическом строении, а совокупность факторов клеточной среды способствует реализации этой информации.

Морфогенез поперечнополосатых миофибрилл был изучен в скелетных мышцах эмбрионов различных классов животных, а также *in vitro* в тканевых и клеточных культурах [1—3, 173—195]. Ультраструктурная картина развития миофибриллярного аппарата почти в точности (за исключением временных характеристик) повторяется у всех исследованных классов животных.

Одоядерные миобласты наряду с большим количеством рибосом, полисом, гранул гликогена и рибонуклеопротеидов, липидных капель и лизосом содержат разнообразные филаменты или небольшие пучки филаментов разных типов: миозиновые (диаметр 15 нм), актиновые (диаметр 6 нм), промежуточные (диаметр 10 нм), а также микротрубочки (диаметр 25 нм) (рис. 12—17).

В миобластах отмечается также присутствие больших пучков нитей под плазмалеммой (рис. 16), расположенных по продольной оси клетки. Плотные тела, подобные Z-тельцам в гладких мышцах, в них отсутствуют. Большинство авторов приходят к заключению, что миозиновые и актиновые нити в клетке появляются одновременно [1, 2, 184]. Длина нитей соответствует их длине в саркомере.

Миобласты постепенно принимают более вытянутую форму [193] и сливаются друг с другом, образуя многоядерные миотубы (рис. 13, рис. 15, рис. 18). В последних отмечается сборка разрозненных миофиламентов в структуры сначала несовершенных миофибрилл. Первый признак образования саркомеров — это появление плотного материала, напоминающего Z-тела в гладких мышцах и связанного с линейно расположенными филаментами актина и миозина (рис. 15, рис. 18, рис. 19). Образование примитивных миофибрилл наступает под сарколеммой (рис. 15, рис. 18). Даже на ранних стадиях образования миофибрилл, когда нет еще четких M- и Z-полос, на поперечных срезах видна правильная гексагональная упаковка актиновых и миозиновых нитей в пучках. Последние далее упорядочиваются в миофибрилле с образованием отчетливо видимых A- и I-полос. При этом Z-тела преобразуются в четкие поперечные Z-полосы (рис. 17, рис. 19). Затем появляются сначала не отчетливо выраженные M-полосы. Образованные саркомеры еще очень несовершенны. Длина их бывает неодинакова, I-полосы часто укорочены. Z-полосы соседних миофибрилл находятся не на одном уровне (рис. 18). Постепенно поперечная полосатость совершенствуется. Z-, M-линии, A-, I-, H-зоны соседних миофибрилл выстраиваются в регистр. Появляются совершенные миофибриллы. Их рост в диаметре и в длину происходит посредством прибавления образующихся филаментов с боков и на концах миофибрилл [1]. Об этом свидетельствуют многочисленные филаменты и их небольшие пучки, находящиеся вдоль формирующихся миофибрилл (рис. 17—19). Постепенно увеличиваясь в размерах и количестве, миофибриллы

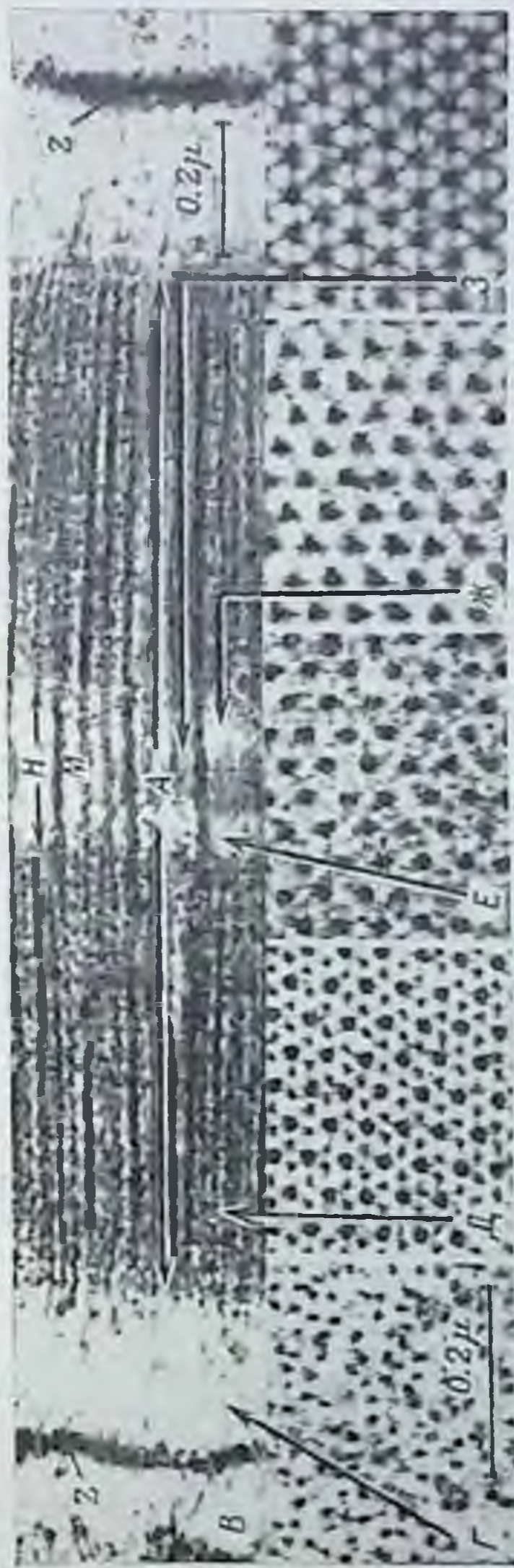


Рис. 1. Строение саркомера поперечнополосатых мышц позвоночных.

А, В — отмечены структурные элементы саркомера (S) в миофибрилле: А, I-, H-зоны и Z-, M-, N-линии. Видны отчетливо зоны перекрытия актиновых и миозиновых нитей. В H-зоне, ближе к M-линии, видна поперечная полоса, образуемая незначительным белком (оттенение металлом) [10]; В — структурные элементы саркомера на продольном срезе мышцы; Г—З — поперечные срезы мышц через различные зоны саркомера. Г — вид тонких нитей в I-зоне, Д — гексагональная упаковка толстых и тонких нитей в зоне перекрытия. Е — гексагональная упаковка толстых нитей в той части H-зоны, где толстые нити имеют проекции. Ж — толстые нити в M-полосе, где нет проекций. З — толстые нити в M-полосе, соединенные поперечными M-мостиками [4].

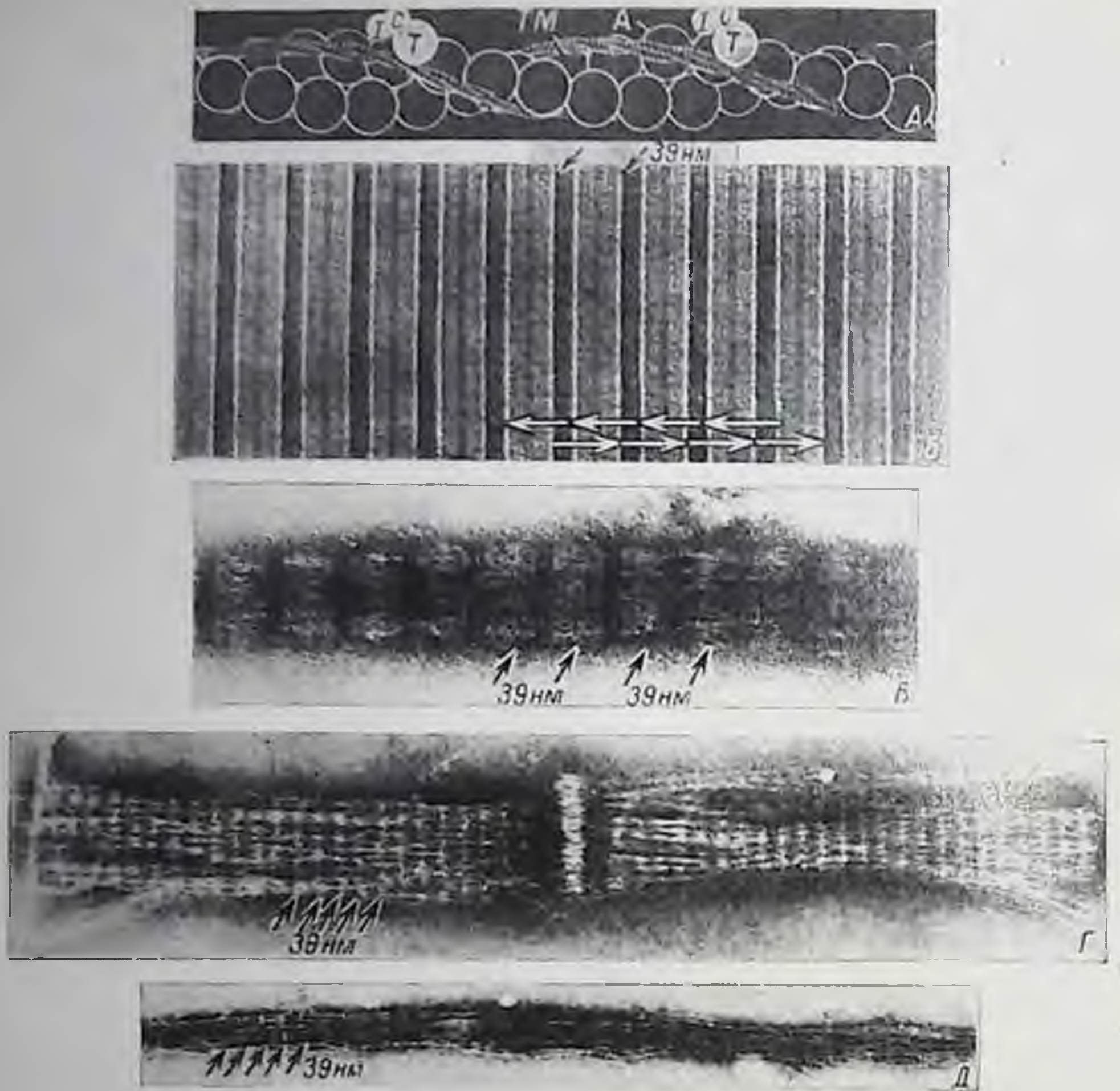


Рис. 2. Тонкая нить поперечнополосатых мышц позвоночных.

А — модель строения тонкой нити; Б — паракристалл тропомозина с периодичностью около 39 нм. Схема упаковки молекул в паракристалле; В — паракристалл тропомозина после его обработки тропонином. Распределение ТН с интервалами около 39 нм вдоль паракристалла; Г — изолированный I-диск (Z-щетки), обработанный антителами к тропонину. Период расположения антител около 39 нм [51]; Д — реконструированные тонкие нити (А+ТМ+ТН), обработанные антителами к тропонину. Период расположения антител около 39 нм [51].

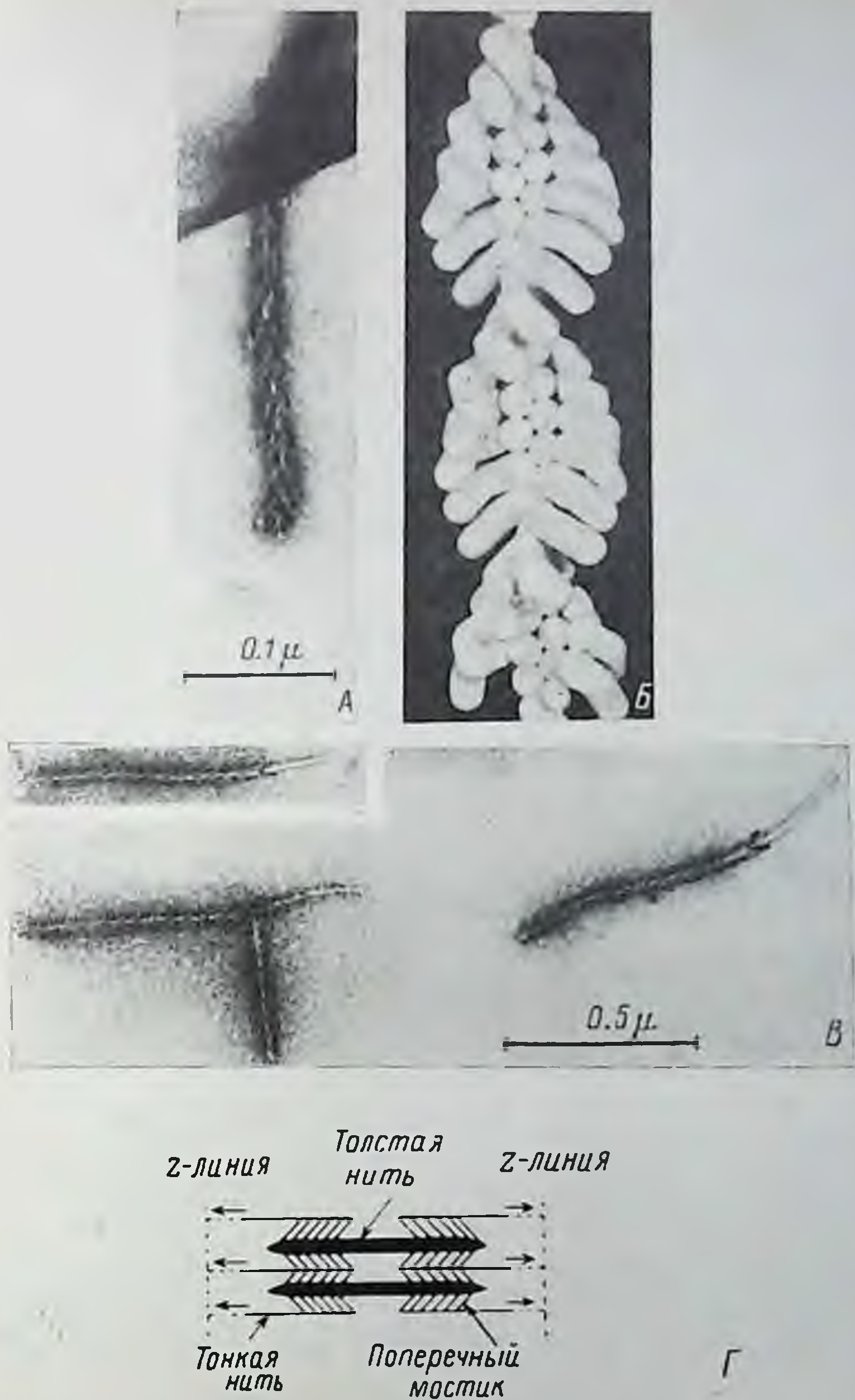
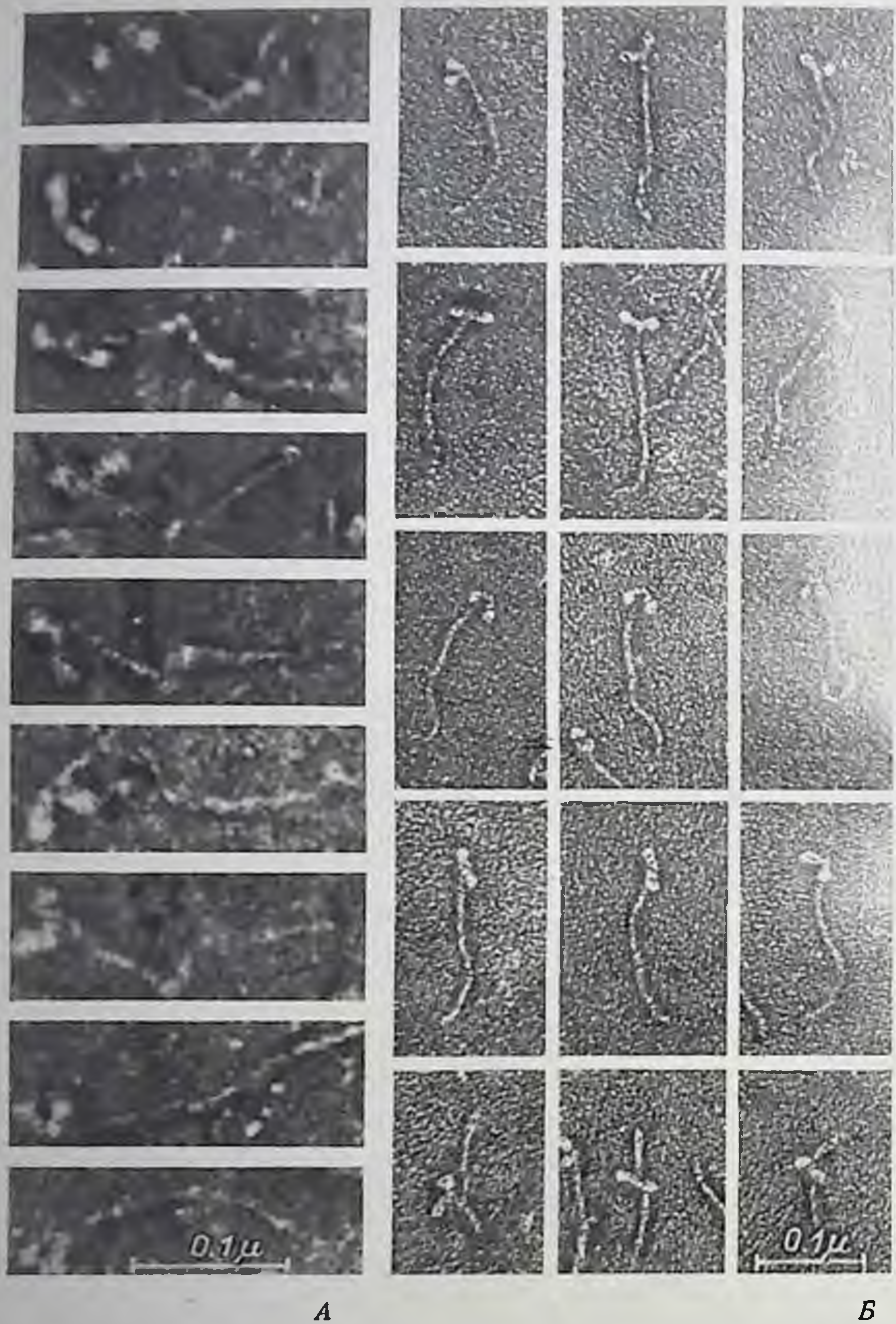


Рис. 3. Тонкая нить скелетных мышц, декорированная тяжелым меромиозном.

А — негативное окрашивание выявляет полярную структуру тонкой нити; Б — модель строения тонкой нити, декорированной тяжелым меромиозном, созданная на основе данных метода реконструкции трехмерной структуры по микрофотографии А [29]; В — актиновая нить, реконструированная из глобулярного актина и декорированная тяжелым меромиозном (А—ТММ). Короткие фрагменты А—ТММ получены обработкой исходной суспензии нитей ультразвуком. Фрагменты А—ТММ добавлены в раствор Г-актина. Видно, что дальнейший рост актиновой нити происходит преимущественно с конца, где расположены «хвосты наконечников стрел». Г — схема, иллюстрирующая предполагаемое направление роста тонкой нити и *in vivo* [79].



А
Б
 Рис. 4. Строение молекулы миозина.

А — вид молекул миозина при негативном окрашивании уранилацетатом [88]; Б — вид молекул миозина при оттенении металлом [87]. Доли головки миозина длиной 19—21 нм располагаются под разными углами к хвосту, что свидетельствует о наличии шарнира в этом участке молекулы. Наличие второго шарнира в молекуле подтверждается изгибами хвоста на расстоянии около 43 нм от первого шарнира.

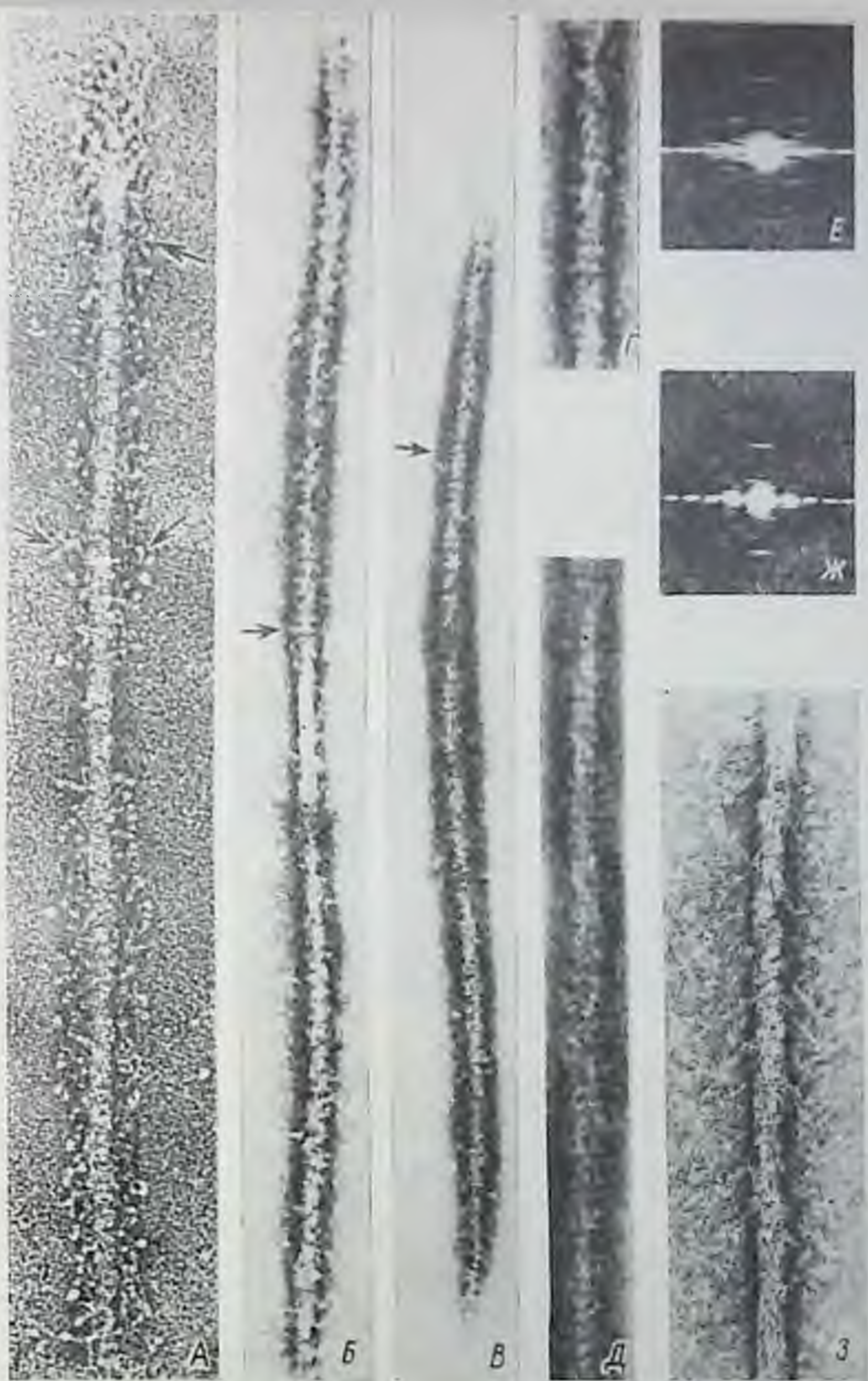


Рис. 5. Толстая нить поперечнополосатых мышц позвоночных.

А — толстая нить, оттененная металлом [83]. Видны двухдолевые головки миозина, расположенные на поверхности нити. Головки способны отходить от ствола на расстояние до 50 нм, что подтверждает локализацию С-2 на поверхности нити, а также предположение [21, 85] о наличии шарнира между С-2 и ЛММ; Б — толстая нить, окрашенная уранилацетатом [97]. Головки миозина расположены на поверхности нити с периодом 14.4 нм; В — миозиновая нить, реконструированная из молекул миозина в растворе, содержащем 0.15 М КСl, 0.002 Мг АТФ [97]; Г — увеличенное изображение участка на рис. Б. Видна периодичность 14.4 нм; Д — увеличенное изображение участка на рис. В. Видна периодичность 14.4 нм; Е, Ж — картины оптической дифракции от участков микрофотографий на рис. Г и Д отражают сходство строения нативных и реконструированных нитей миозина; З — миозиновая нить, реконструированная из молекул миозина в растворе, содержащем 0.12 М КСl, 0.001 М МгСl₂, рН 6.8 [137]. В нитях видна периодичность проекций 43 нм. Проекция миозина наклонены к продольной оси нити под углом 45°.

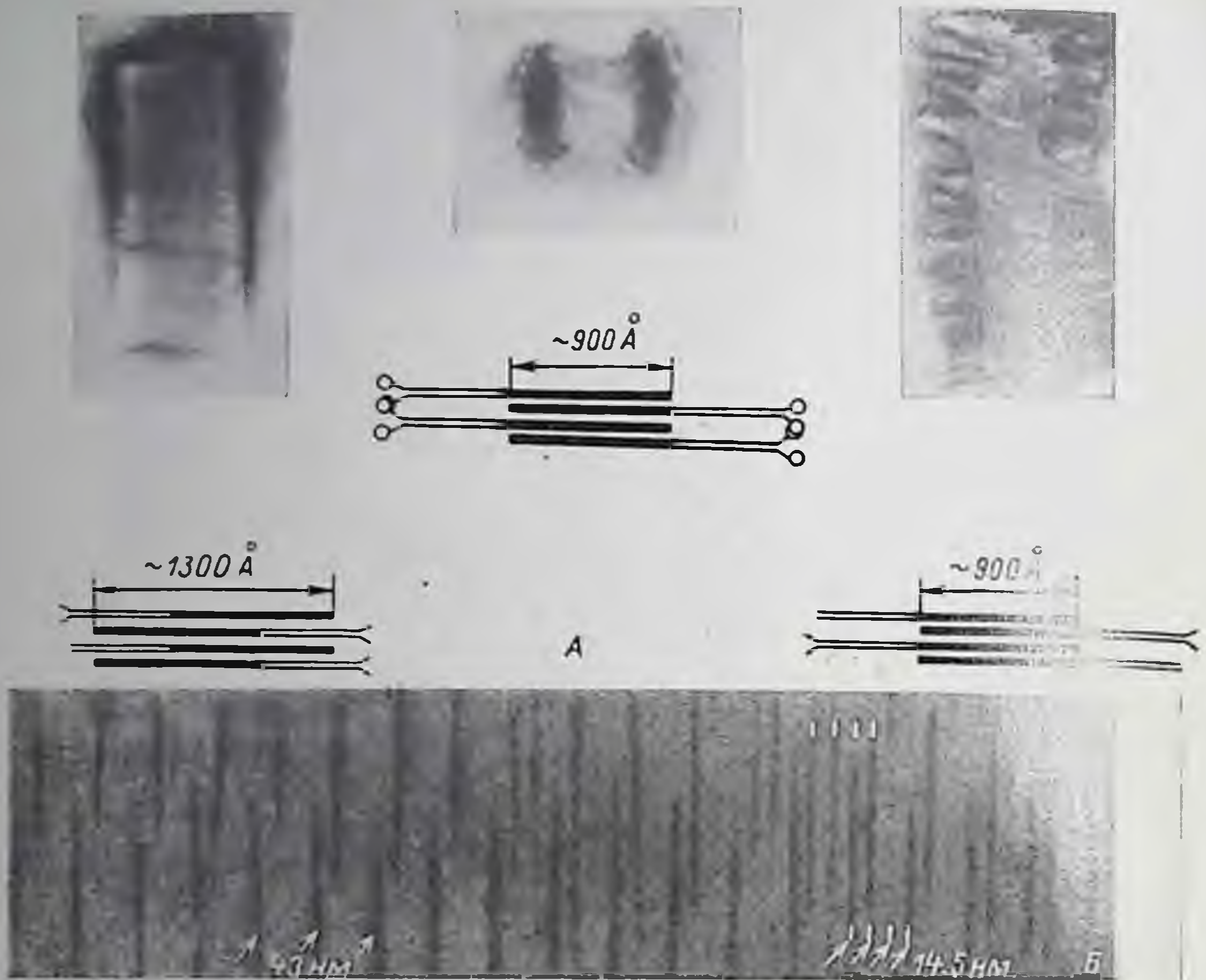


Рис. 6. Биполярная и полярная агрегация фрагментов миозина *in vitro*.
 А — биполярные сегменты, образующиеся в растворах, содержащих Ca^{2+} или Mg^{2+} [7]. Сегменты, образованные хвостами миозина (слева и справа), с перекрытиями между ними, равными 90 нм и 130 нм. Сегмент, образованный молекулами миозина (в центре). Размеры сегментов соответствуют размерам «голой зоны» в нативных нитях. При добавлении одновалентных катионов сегменты растут в длину за счет присоединения с двух сторон молекул, агрегирующих полярным способом. В результате образуется периодическая картина, показанная на рис. Б; Б — паракристаллы ЛММ с осевыми периодами 43 нм и 14,5 нм, образующиеся в растворах 0,15 М КСl, рН 7. Осевая периодичность в паракристалле соответствует периодичности в полярных частях толстых нитей в мышце (негативное окрашивание).

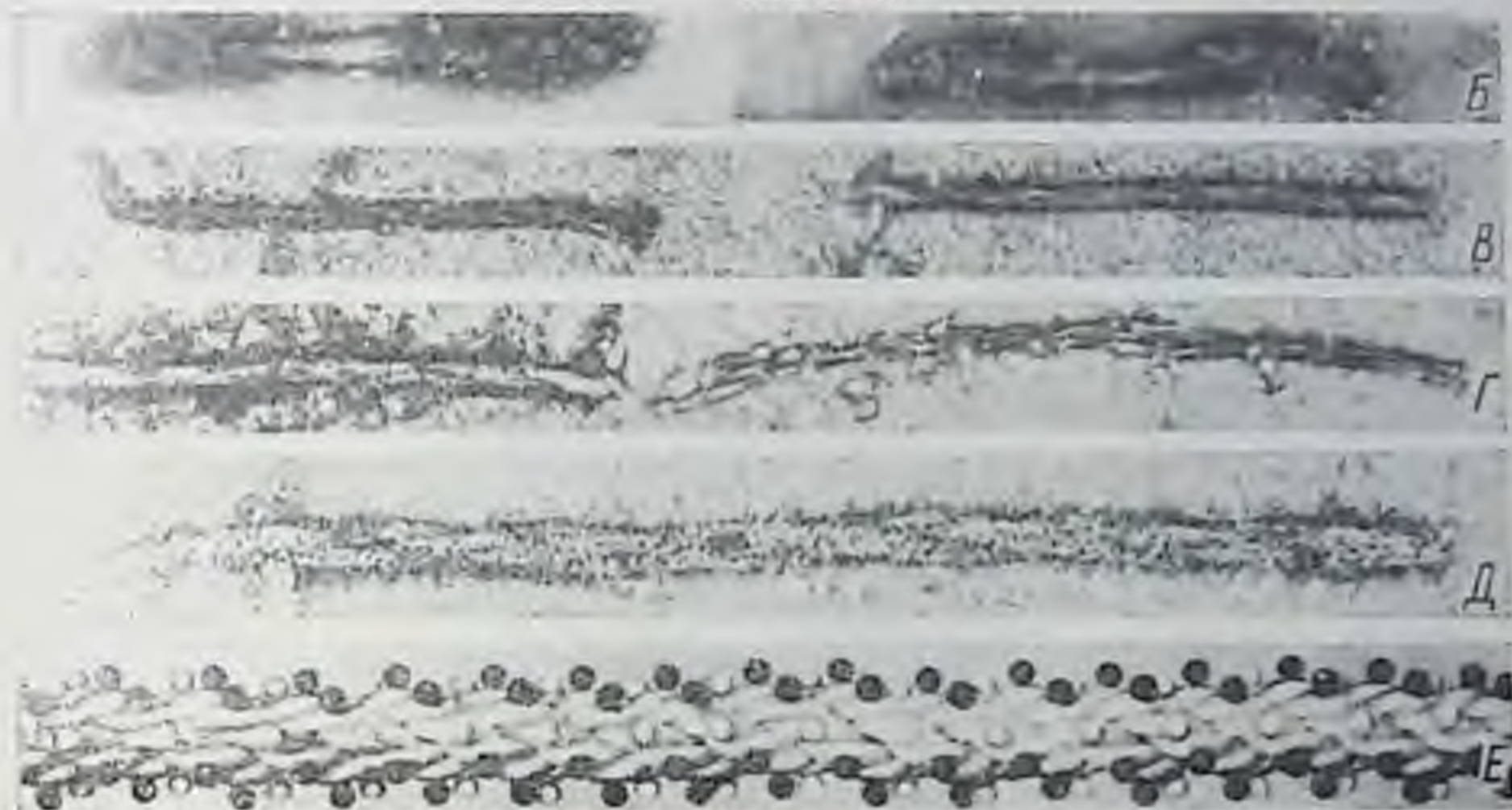
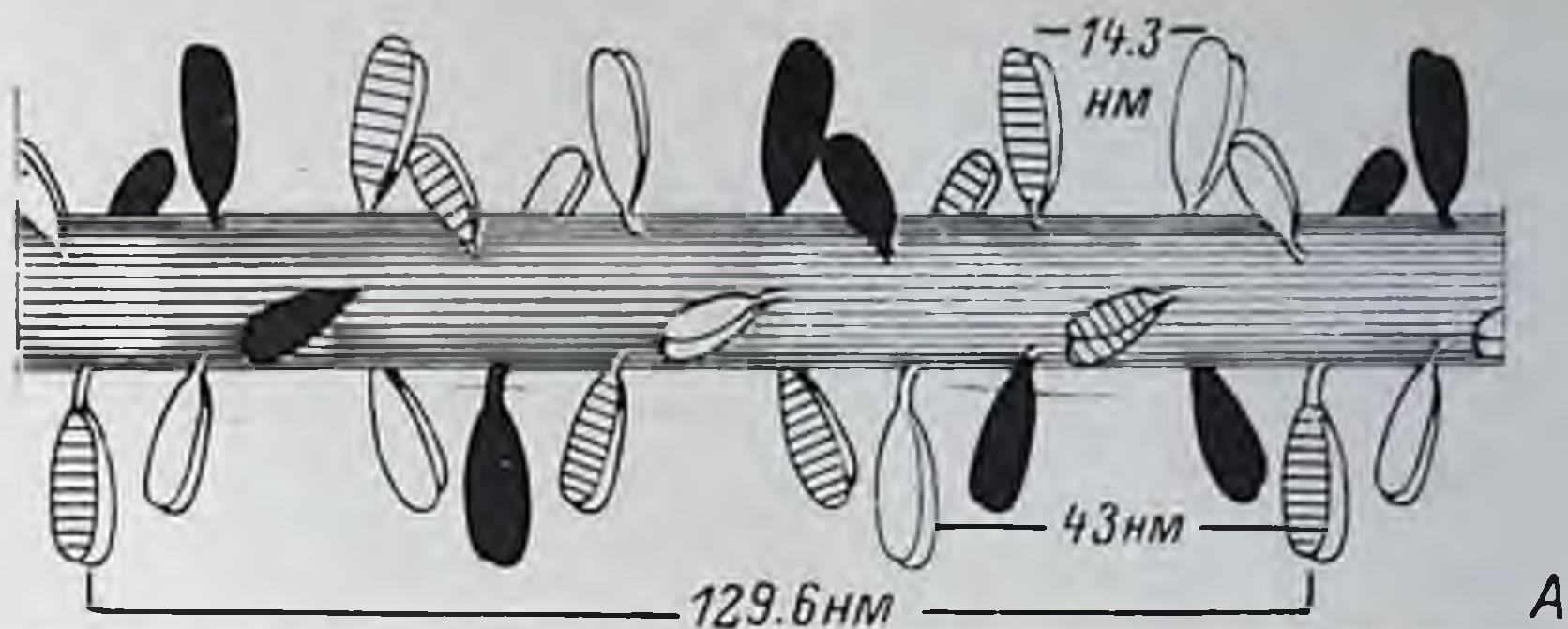


Рис. 7. Расположение головок миозина в полярных участках нативных и реконструированных миозиновых нитей.

А — модель Сквайера [9, 105—107]. Согласно этой модели, головки миозина расположены на трехтяжевой спирали (по 3 головки на каждом 14.3 нм-уровне) с субъединичным периодом, равным 14.3 нм. Спираль 9/1, т. е. 9 головок на 1 оборот спирали каждого тяжа головки одного тяжа одинаково заштрихованы), с осевым периодом повторения 129.6 нм. (Кажущийся осевой период (расстояние между одинаково направленными головками разных тяжей) 43 нм; В — реконструированные биполярные миозиновые нити [113]; В, Г — фрагменты стволов нативных (В) и реконструированных (Г) миозиновых нитей после отщепления головок миозина трипсином. Ствол обнаруживает многотяжевое строение. Осевой период спирали каждого тяжа 130 нм [113]; Д — увеличенное изображение рис. В. Отчетливо видны 3 спиральных тяжа, состоящие в свою очередь из 3 субнитей [113]; Е — предполагаемая модель строения наблюдаемых в В—Д участков стволов нативных и реконструированных миозиновых нитей [113]. Модель соответствует схеме спирального расположения головок на поверхности, предложенной Сквайером (рис. 7, А).

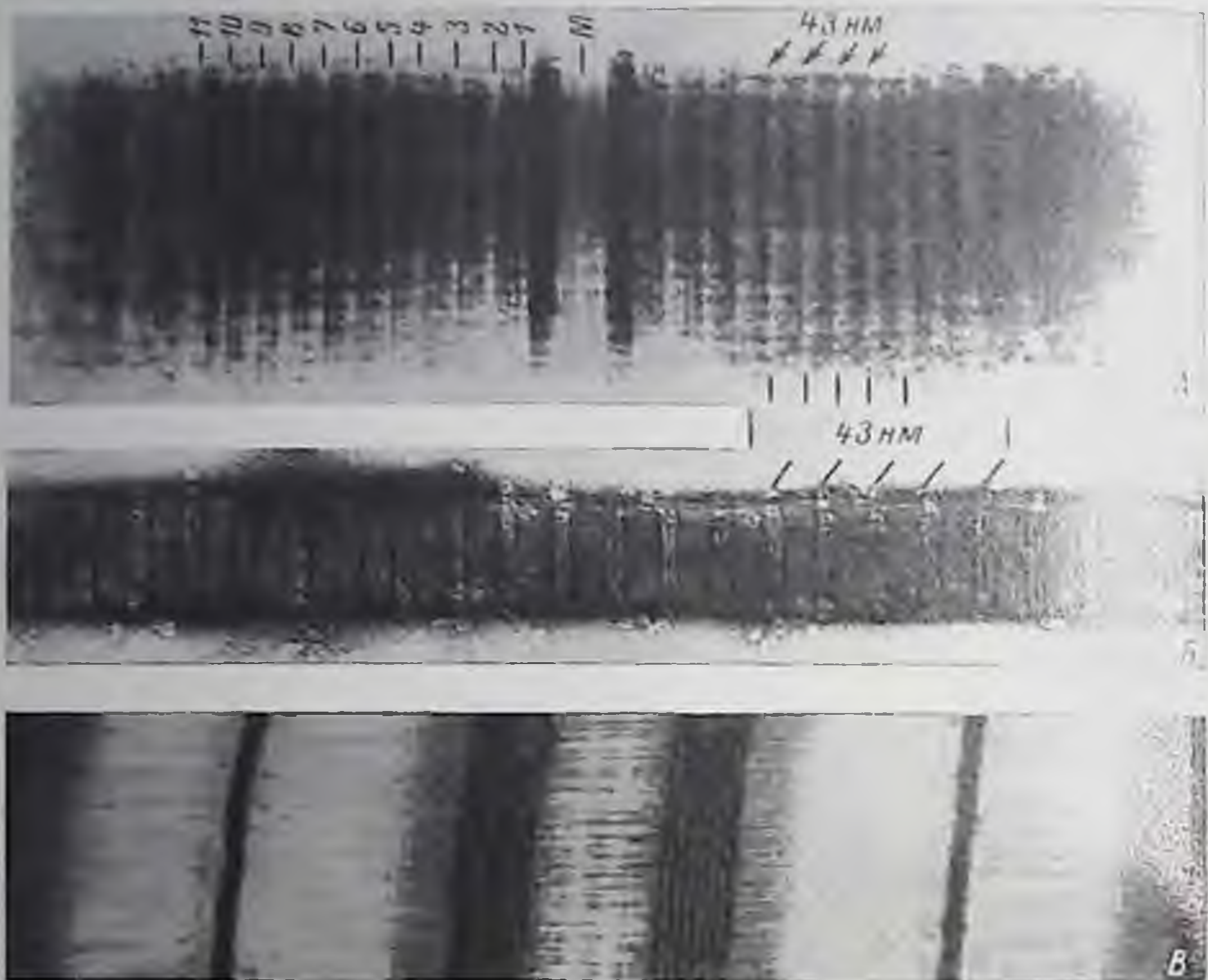
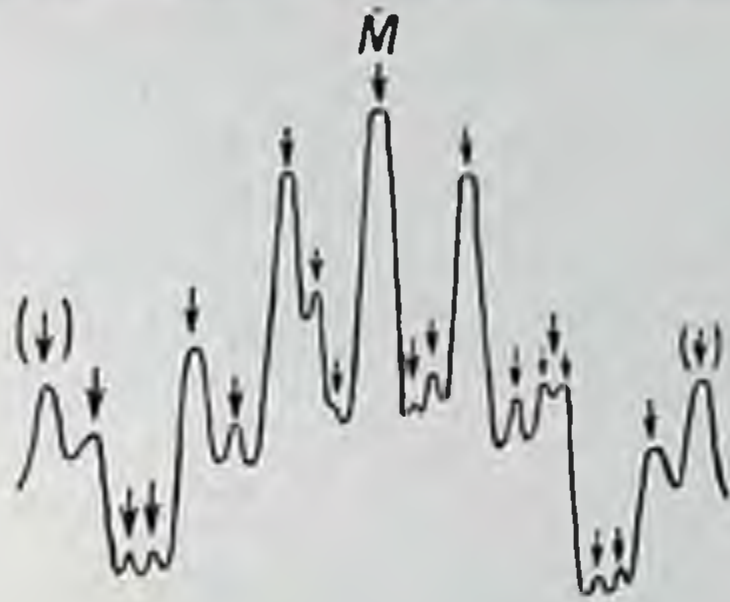


Рис. 8. Локализация С-белка в толстых втях.

А — изолированный А-диск (А-сегмент). Отчетливо видны 11 поперечных полос с интервалами 43 нм. По рисунку тонкой периодичности первые три 43 нм-периода (считая от М-полосы) отличаются от последующих [80]; Б — паракристалл ЛММ с осевой периодичностью 43 нм, обработанный С-белком, связанным с ферритином. Период присоединения С-белка повторяет период упаковки ЛММ в паракристалле; В — антитела к С-белку располагаются в 7 полосах (от 5-й до 11-й) в каждой половине А-диска с интервалами 43 нм [118].

Рис. 9. Структура М-полосы. →

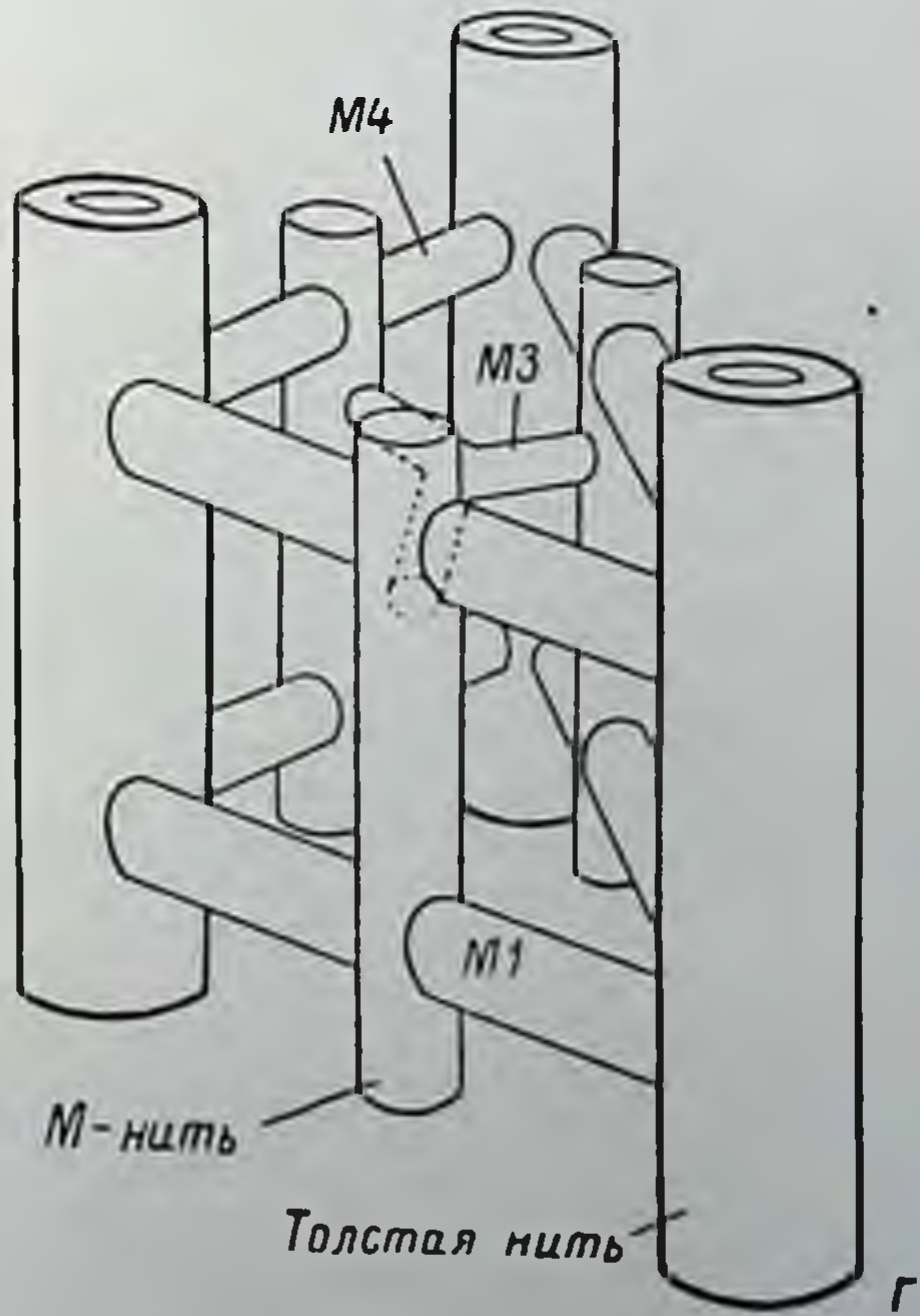
А — детали тонкой структуры М-полосы, обнаруживаемые на негативно окрашенных продольных криосрезах [86]. Б, В — денситограммы М-области и схема обозначений поперечных линий в М-полосе [86]. Видны 5 сильных линий—мостиков, обозначенных М1, М4, М6 справа от центральной (М1)-линии. С другой стороны они обозначаются М4', М6'. Эти линии расположены на расстоянии около 22 нм друг от друга. Кроме них, в М-полосе присутствуют другие, более слабые линии и среди них М3, М3', которые отождествляются с вторичными мостичными структурами в модели (Г). Г — модель строения М-полосы. Обозначения соответствуют (В) [141] (см. текст).



Б



В



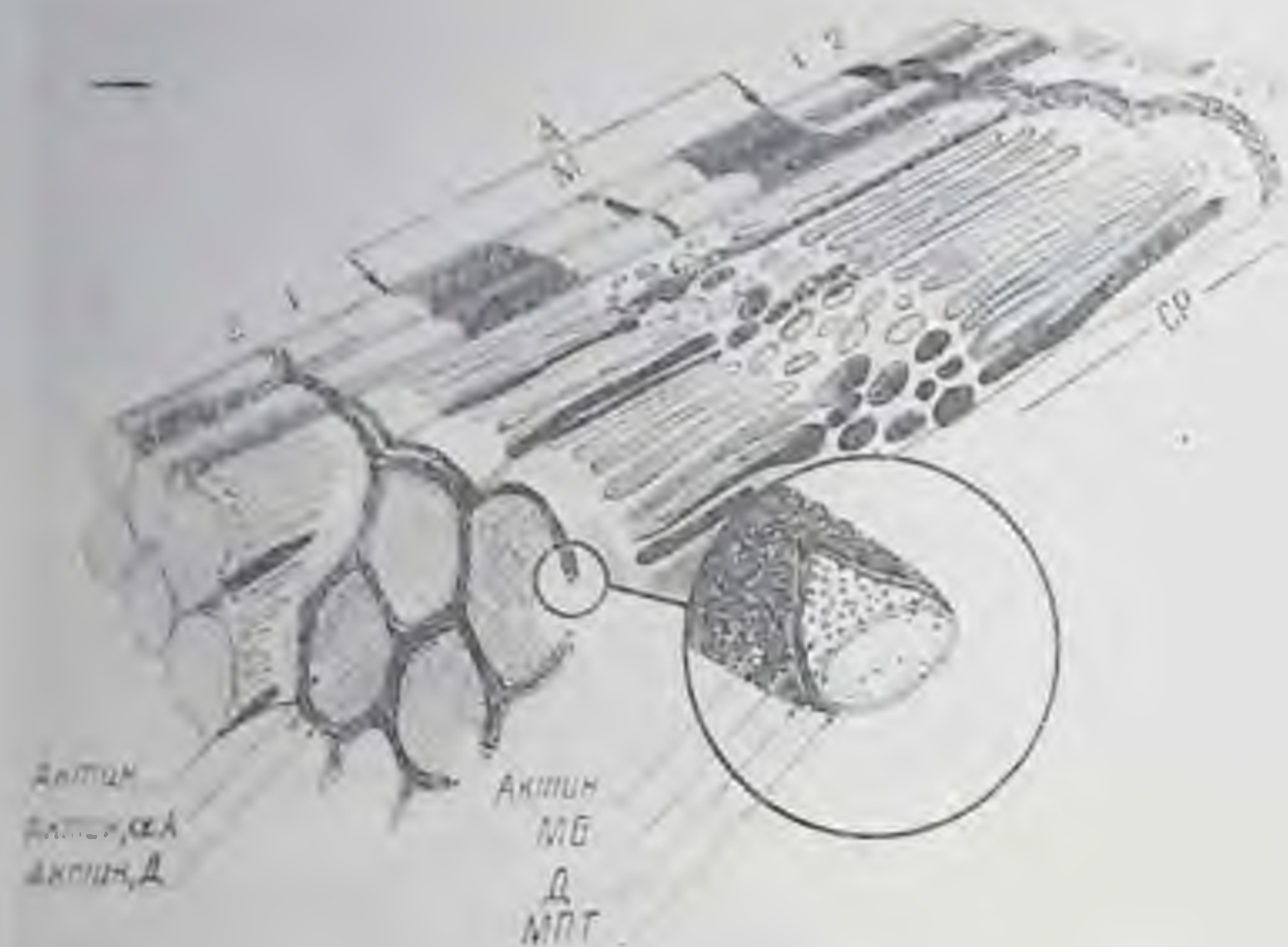


Рис. 10. Схематическое изображение распределения десмина (Д), α -актинина (αA), актина и мембраны поперечных трубочек (МПТ), в Z-дисках скелетных мышц [159]. СР — саркоплазматический ретикулум. МБ — мембранный белок. Обозначены также А- и I-зоны, Z-мембраны. М-линии.

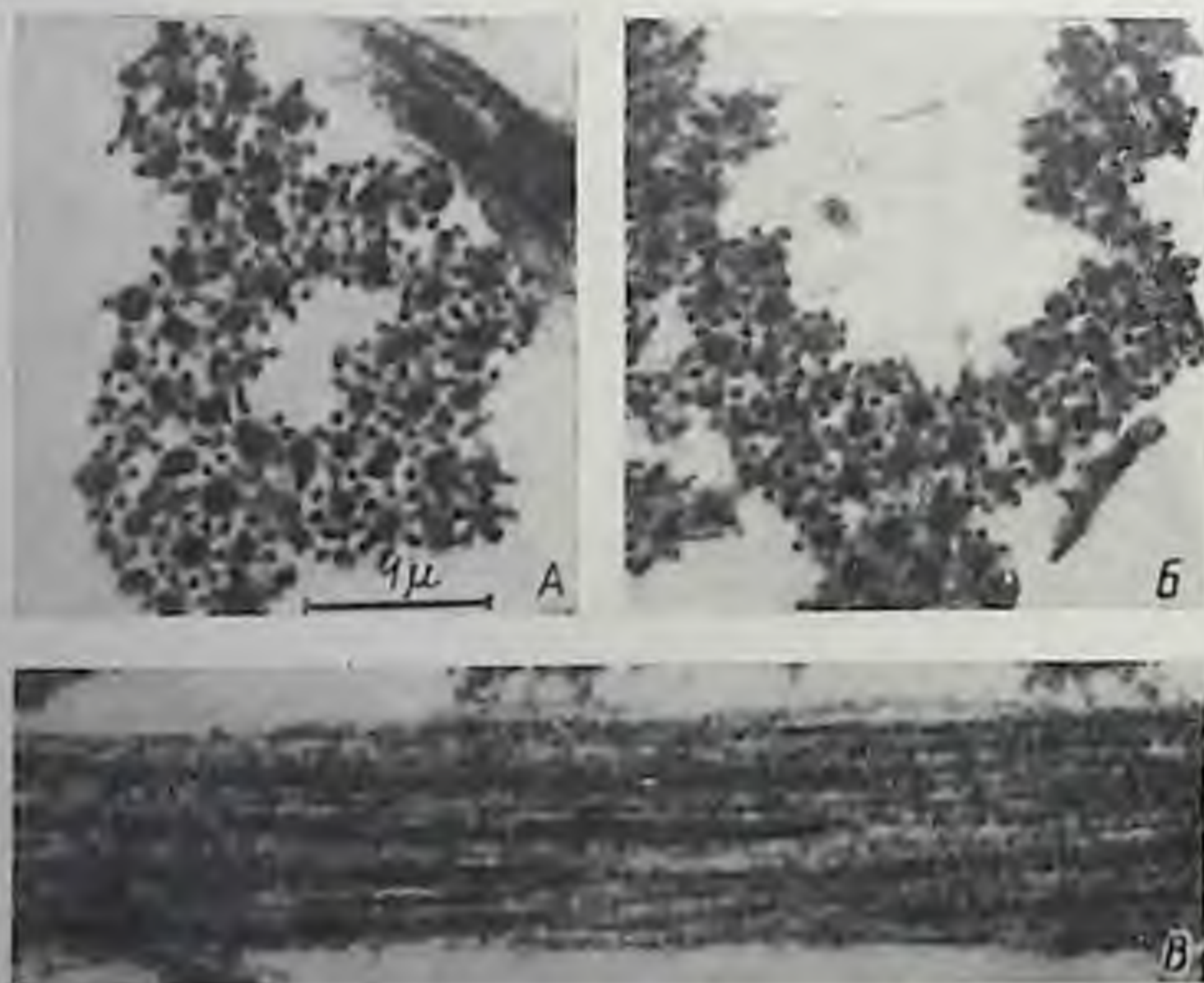


Рис. 11. Образование упорядоченных ансамблей миозиновых и актиновых нитей в растворах нативного актомиозина [200].

А, Б — поперечный срез через пучки актиновых и миозиновых нитей; В — продольный срез пучков. 6 мМ АТФ, 6 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭГТА, 0.01 М имидазола, 0.15 М KCl, pH 7.

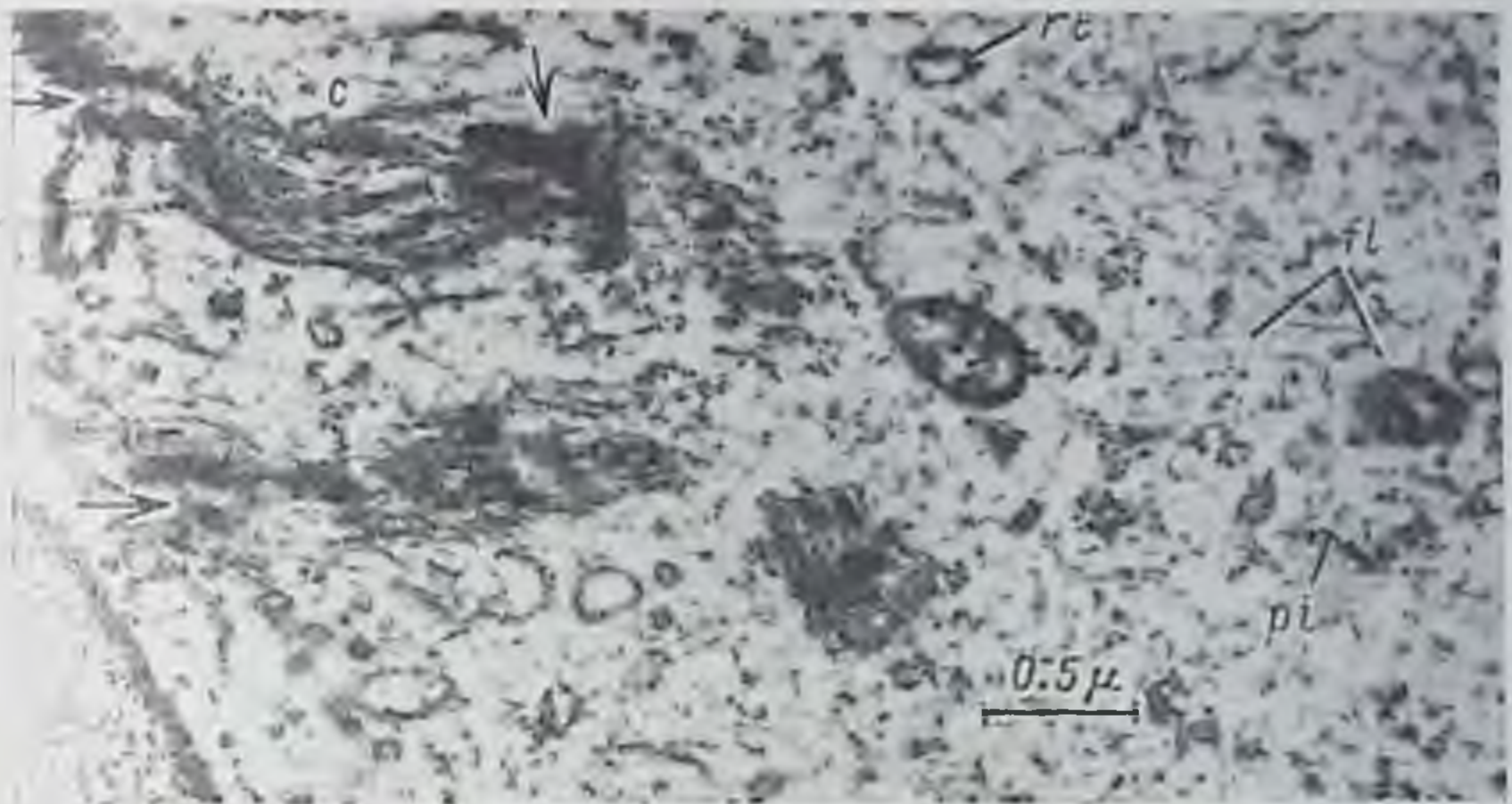


Рис. 12. Мышечная клетка 17-дневного курпного эмбриона [178].

Показан участок цитоплазмы мышечной клетки. В центральной части видны миофиламенты (*fl*), свободные и присоединенные к многочисленным рибосомам и полисомам (*pi*). В периферической области появляются центры миофибриллярной организации — фрагменты миофибрилл (*c*); *re* — эндоплазматический ретикулум.

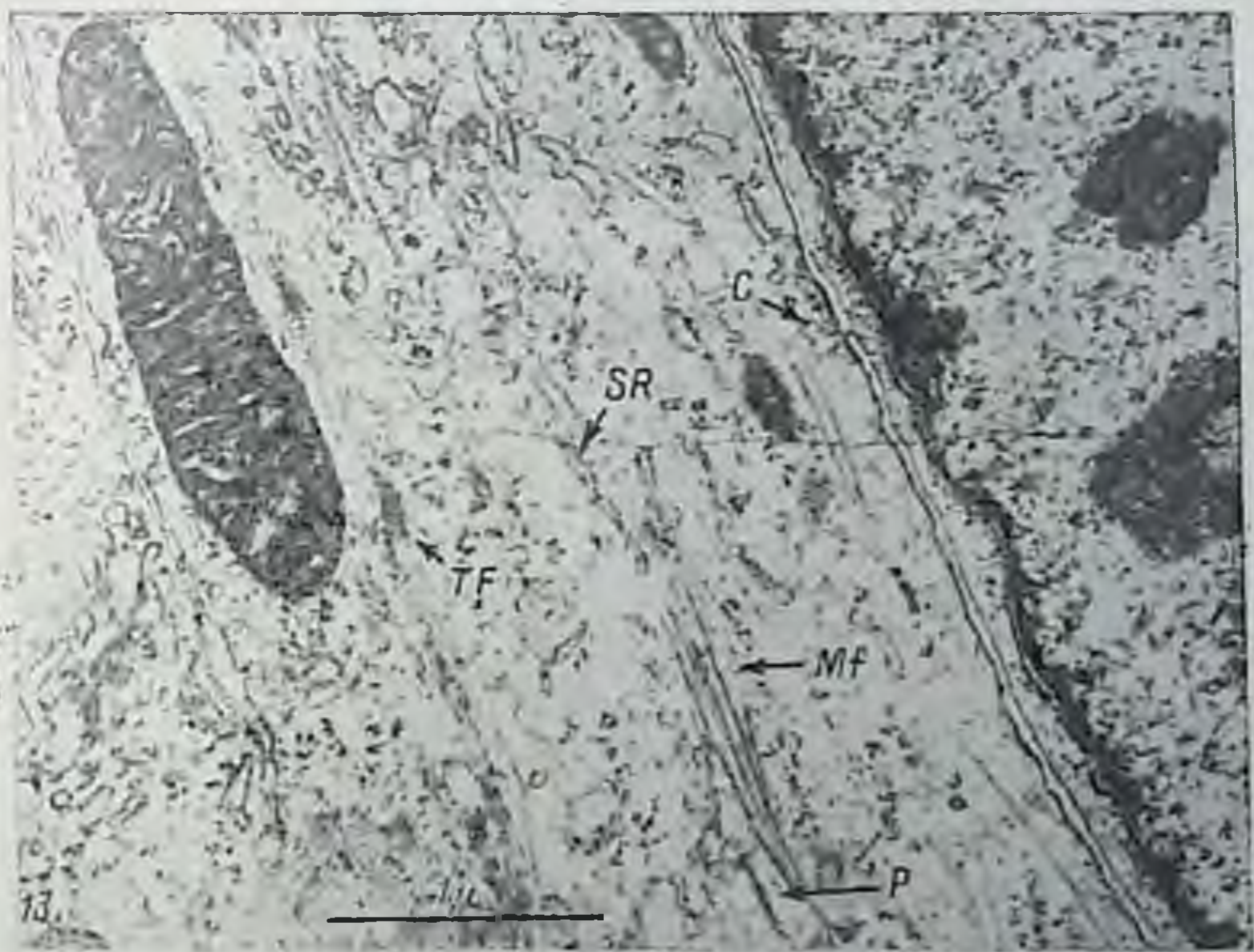


Рис. 13. Миотуба в 3-дневной монослойной культуре [1].

Видны ранние черты миофибриллогенеза. В некоторых ансамблях толстых и тонких нитей (*Mf*) присутствует плотный материал, который затем организуется в Z-полосу. Хорошо выражена продольная ориентация и свободных, и агрегированных цитофиламентов. Толстые нити не всегда находятся в контакте с большими полисомами (*P*). Видны многочисленные мембранные образования с гладкой поверхностью, которые представляют собой развивающуюся саркотубулярную систему (*SR*). Видны также инвагинации плазматической мембраны, предшествующие появлению структур поперечных трубочек (*C*); *TF* — Z-тела.

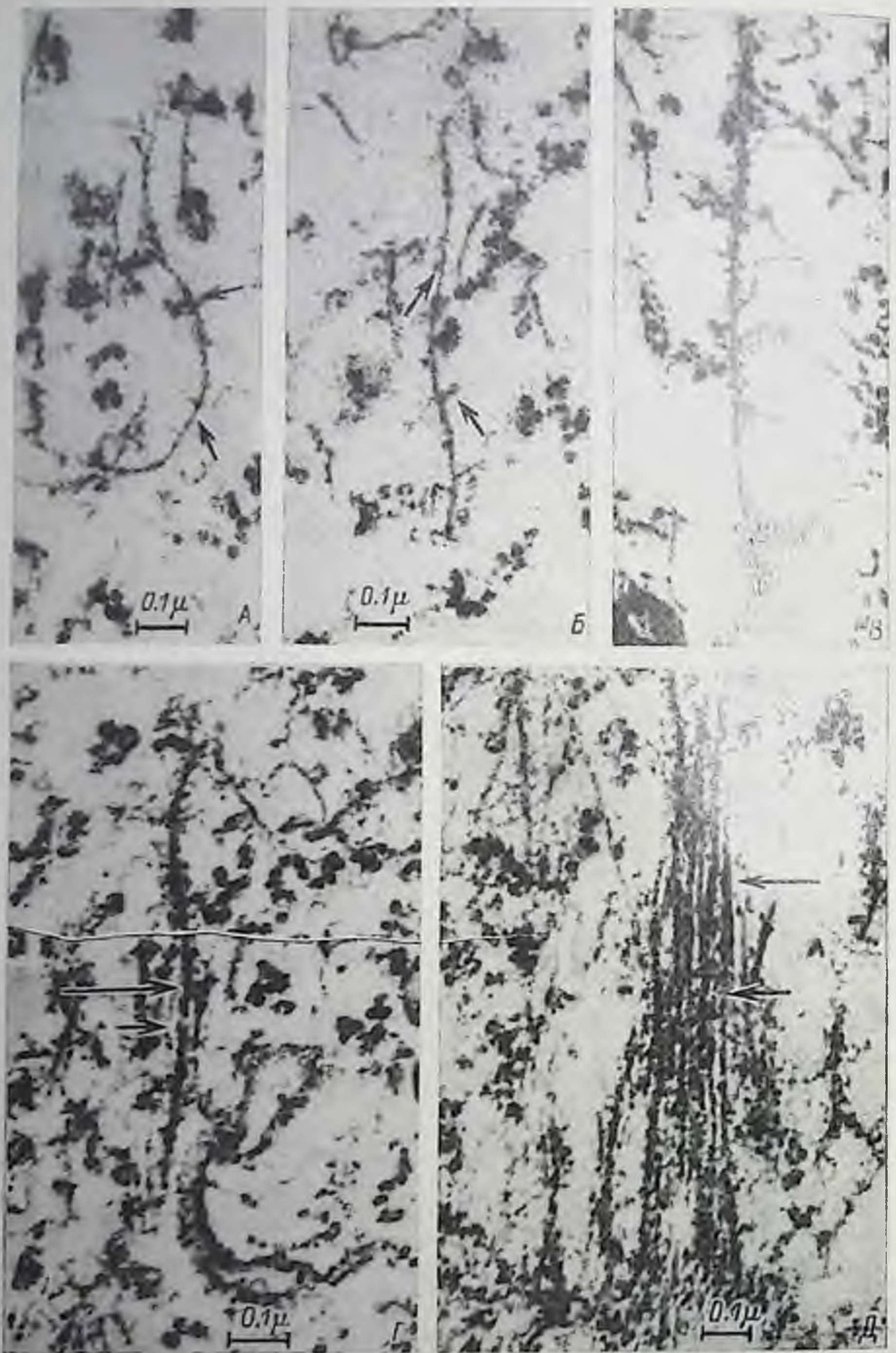


Рис. 14. Филаменты в эмбриональных миогенных клетках [178].

А — филамент диаметром 7—8 нм (вероятно, актиновый) гибкий, однородный по толщине; Б — диаметром 11 нм, (вероятно, промежуточный); В — диаметром 14 нм, имеющий выступы по всей длине (вероятно, миозиновый); Г, Д — разная степень организации толстых и тонких миофиламентов.



Рис. 15. Мышца 12-дневного куриного эмбриона [1].

Около базальной мембраны (BL) видны параллельные ряды толстых и тонких нитей на ранней стадии миофибриллярной сборки (F). Фрагменты более совершенных миофибрилл видны рядом с плазмалеммой (PM). Видны также многочисленные свободные промежуточные филаменты (IF); N_1 — N_4 — ядра; GZ — зона Гольджи.

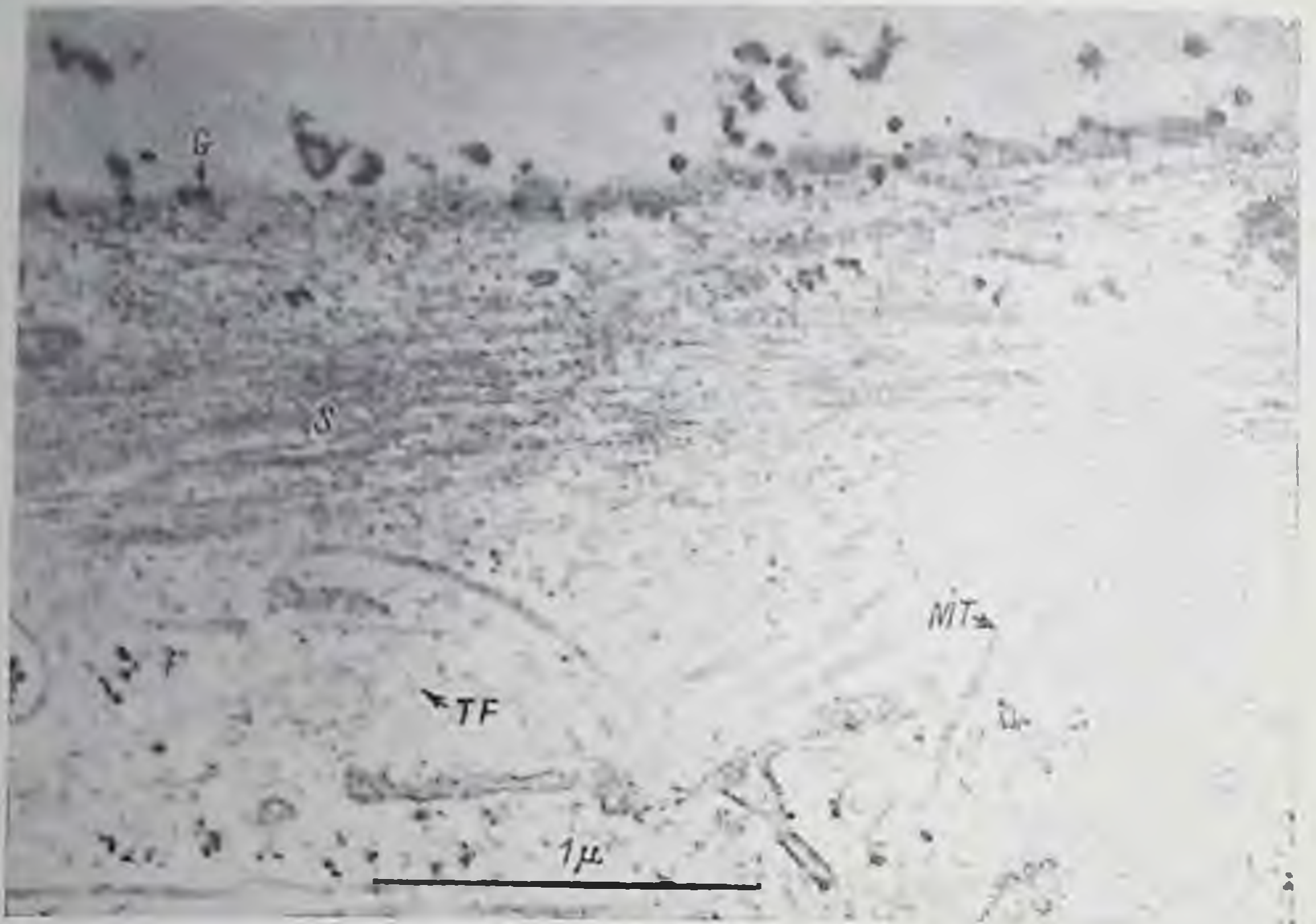


Рис. 16. Тонкий срез через кортикальную область мпотубы (2-дневная культура) [1].

Видны плотные пучки тонких нитей (S), но в них не отмечается Z-материала. Свободные нити такого же диаметра наблюдаются в цитоплазме (TF): G — гранулы; MT — микротрубочки.

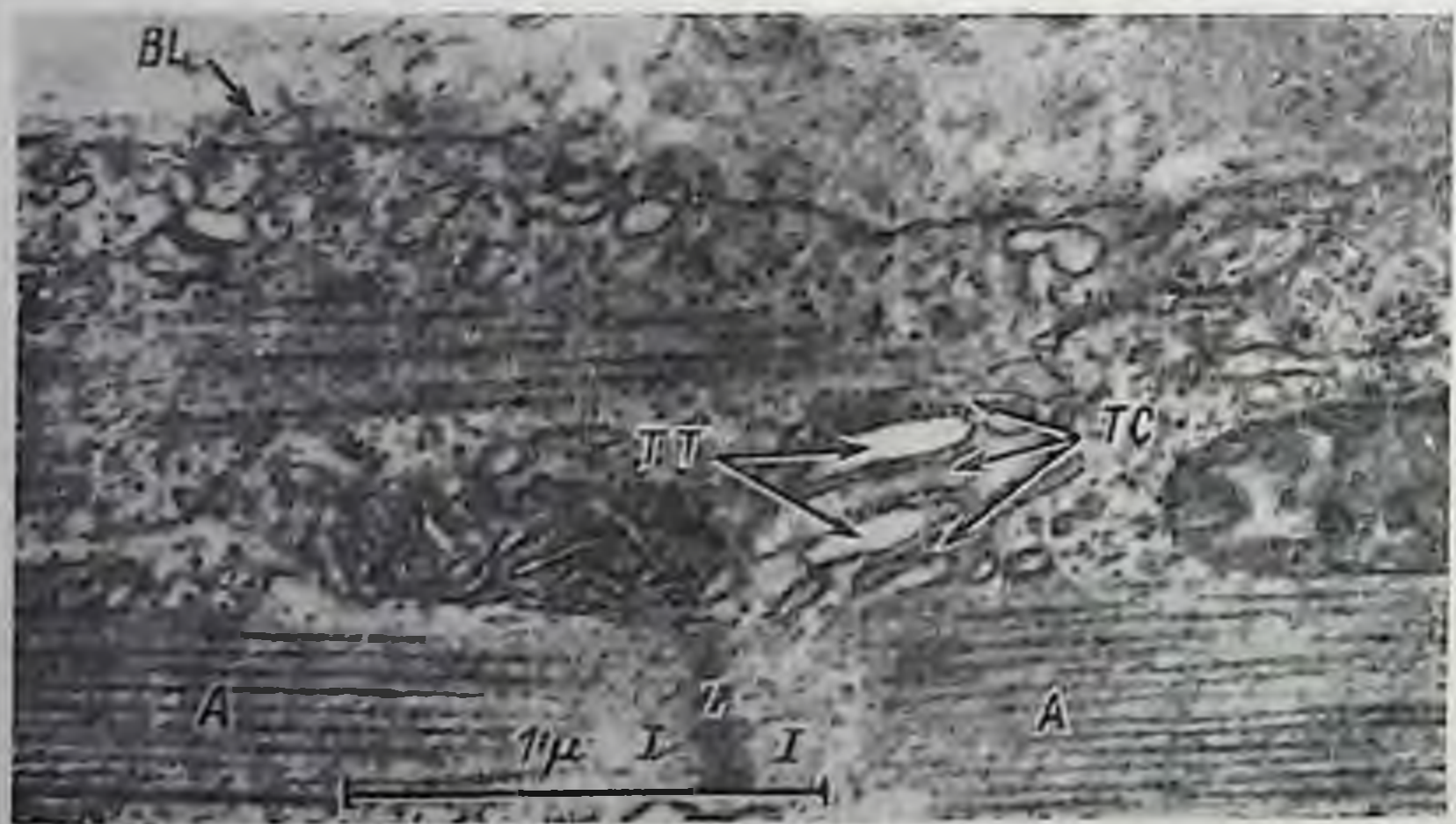


Рис. 17. Мпотуба в 10-дневной мышечной культуре [1].

Базальная мембрана (BL) достаточно хорошо выражена. Пентады, состоящие из 3 терминальных цистерн (TC) и 2 поперечных трубочек (TT), часто видны в этих мпотубах. В миофибрилле видны I-, A-зоны и Z-мембрана.



Рис. 18. Общий вид части цитоплазмы 6 мышечных клеток на разных стадиях развития [178].

По всей длине клеточных мембран, иногда с регулярными интервалами, видны уплотнения (стрелки), которые в виде пузырьков выпячиваются в цитоплазму (*v*). Предполагается, что эти уплотнения — зародыши Z-дисков. *t₂* — Z-тела; *mfб* — миофибриллы; *fl* — свободные миофиламенты; *re* — пузырьки эндоплазматического ретикулума; *P* — рибосомы, не связанные с мембранами и образующие небольшие агрегаты.



Рис. 19. Сборка миофибрилл в мышечной клетке куриного эмбриона [178].

А — примитивная миофибрилла. Пределы А-полос неотчетливы. I-полосы малозаметны и укорочены. Z-мембраны скорее напоминают Z-тела. Видны многочисленные свободные филаменты и небольшие пучки толстых и тонких нитей (*fb*) вдоль формирующейся миофибриллы. Гладкие пузырьки (*ue*) и многочисленные свободные рибосомы (*pi*) также присутствуют возле миофиламентов. Б и В — более поздние стадии развития миофибриллярного аппарата. Миофибриллы увеличиваются в диаметре. Четче обозначаются А-, I-, Z-, H-полосы. Рядом с этими миофибриллами находятся отдельные миофиламенты (*fl*) и фрагменты миофибрилл (*fb*).

начинают перемещаться от сарколеммы к центру мышечного волокна. При этом часто можно наблюдать сосуществование несовершенных (на периферических участках саркоплазмы) и развитых миофибрилл (ближе к центру). Кроме того, одна и та же фибрилла, в средней части поперечнополосатая, на растущих концах может проявлять лишь слабо выраженную исчерченность. По мере созревания четкое деление на саркомеры устанавливается по всей длине миофибрилл.

Одновременно с формированием миофибриллярного сократительного аппарата наблюдается возникновение зачатков системы поперечных трубочек и саркоплазматического ретикулула (рис. 12, рис. 13, рис. 17—19). Первые являются производными поверхностной мембраны мышечных клеток, а цистерны и каналы СР возникают из эндоплазматического ретикулула [1, 184, 188]. Вначале они развиваются независимо друг от друга и лишь позднее вступают в морфологическую и функциональную связь. Окончательное развитие конструкции Т-системы и СР заканчивается уже в постнатальный период [1, 3, 196].

Таким образом, в общей картине развития миофибриллярного аппарата можно выделить три стадии: 1) сборка белков в миофламенты; 2) сборка структурных элементов в миофибриллы; 3) организация миофибрилл в волокне. Исследованию механизмов этих процессов посвящено множество работ [1—3, 174]. Основная гипотеза, которая была высказана очень давно [197], подтверждается большим количеством исследований. Согласно этой гипотезе, структурные элементы саркомера образуются путем самопроизвольной ассоциации белковых молекул под влиянием физико-химических сил, т. е. путем так называемой «самосборки». Этот механизм может действовать не только на уровне молекул, но и на уровне четвертичных структур (нитей).

Как показывают эксперименты, синтез сократительных белков происходит в митохондриях независимо от слияния [195, 198, 199]. После слияния белковый синтез активизируется. Электронная микроскопия выявляет большое количество полисом (ансамбли из 50—65 рибосом), не связанных с мембраной и хаотически распределенных в цитоплазме митохондрий. На таких больших полисомах, как сейчас известно, происходит синтез миозина [176]. На одиночных рибосомах и небольших скоплениях, в изобилии присутствующих в митохондриях, синтезируются другие сократительные белки [1].

Синтезированные белки самопроизвольно собираются в нити. Многочисленные эксперименты *in vitro* свидетельствуют о возможности полимеризации и сополимеризации белков в нити, сходные по структурным параметрам с нативными ансамблями [6, 7, 46, 47, 57, 97, 122, 137]. Однако механизмы, лимитирующие длину толстых и тонких нитей, пока еще не выяснены. В экспериментах *in vitro* остаются неучтенными многие факторы клеточной среды. При формировании миозиновых нитей, например, не изу-

чено влияние других белков и среди них неизвестна роль коннектина. Высказываются предположения, что миозиновые нити в свою очередь могут регулировать длину актиновых нитей. Известно, например, что изменение длины тонких нитей в мышцах беспозвоночных коррелирует с изменением длины толстых нитей [173]. Это может происходить в том случае, если актиновая нить сопрягается в тесной связи с миозиновой. Иными словами, головки миозина в нитях могут быть организующими центрами, на которых происходит полимеризация глобулярного актина. Недавно Хаяши и сотрудники [135] продемонстрировали эту возможность *in vitro*. Им удалось собрать молекулы миозина и актина в биполярные «сократительные единицы», т. е. биполярные ансамбли толстых и тонких нитей, подобные имеющимся в саркомерах (рис. 3, Г). В этом эксперименте на предварительно сформированных биполярных толстых нитях собирались нити Ф-актина из субъединиц Г-актина, находящегося в растворе. Противоположная полярность актиновых нитей, находящихся с разных сторон от «голой зоны» толстой нити, проверялась декорированием их свободно торчащих концов тяжелым меромиозином. «Елочки», или «наконечники стрел», на актиновых нитях с двух сторон были направлены к центру ансамбля. Подобная картина наблюдается в саркомере (рис. 3, Г). На фотографиях поперечных срезов ансамблей наблюдалось гексагональное расположение тонких нитей вокруг толстой. Эта работа еще раз подтверждает, что механизм самосборки может действовать не только на уровне молекул, но и на уровне нитей. На основании экспериментов *in vitro* авторы полагают, что актиновые нити в мышце также собираются на миозиновых нитях с двух сторон от «голой зоны». Способность к однонаправленному росту у актиновых нитей *in vitro* была продемонстрирована ранее [79] (см. рис. 3, В, Г). Если в раствор Г-актина добавить короткие цепочки Ф-актина, декорированного тяжелым меромиозином, то рост нитей в длину происходит преимущественно в одном направлении, а именно у «хвостов наконечников стрел». Если сравнить эту картину с направлением «наконечников стрел» в изолированных I-сегментах, декорированных тяжелым меромиозином, то можно сделать вывод, что рост тонкой нити происходит от центра саркомера. Если еще учесть, что β -актинин в экспериментах *in vitro* связывается с концом, противоположным направлению роста нити [77], то можно себе представить, что и в мышце он препятствует росту актиновой нити в сторону «псевдо-Н-зоны». Белки М-линии также могут препятствовать росту тонких нитей в этом направлении. Хотя в миогенезе М-полоса появляется позднее Z-полос, это не означает, что в этой области саркомера на ранних стадиях развития нет М-белков. Эксперименты по иммунофлуоресценции выявляют локализацию М-белка в зрелой сердечной мышце цыпленка в районе «псевдо-Н-зоны», в то время как видимая структура М-полосы в них вообще отсутствует [145]. Следовательно,

можно себе представить, что некоторые белки М-полосы уже на ранних стадиях миогенеза выполняют свою функцию — собирают миозиновые нити вместе. По данным Хаяши и др. [135], реконструированные биполярные ансамбли состоят из 1 толстой и 6 тонких нитей, а более крупные ансамбли отсутствуют, очевидно, вследствие отсутствия М-белков. С другой стороны, продемонстрирована возможность [200] образования более крупных ансамблей толстых и тонких нитей в растворах нативного (Ca^{2+} -чувствительного) актомозина при снижении ионной силы от 0.5 до 0.15 (рис. 11). Образующиеся ансамбли на поперечных срезах выявляют примерно гексагональную упаковку нитей. Результаты этого эксперимента согласуются с общепринятым предположением о том, что гексагональная решетка толстых нитей образуется без участия М-белков, так как она видна на поперечных срезах уже на тех этапах сборки миофибрилл, когда отсутствуют М-полосы. Однако эти выводы должны быть вновь проанализированы с учетом данных, представленных другими авторами [135, 145]. Например, описанные выше результаты можно объяснить присутствием примесей некоторых М-белков в препаратах нативного актомозина. Для окончательного решения этого вопроса необходимы специальные эксперименты по изучению влияния М-белков на сборку сократительных нитей в ансамбли.

Следует упомянуть также недавние данные [201], вновь показавшие роль толстых нитей при сборке Ф-актина. В этой работе Г-актин, модифицированный взаимодействием с плазматической мембраной *in vitro*, утрачивал способность к полимеризации при добавлении двухвалентных и одновалентных катионов. Однако в присутствии миозиновых нитей (но не С-1) актин вновь приобретал эту способность.

Таким образом, имеющиеся экспериментальные факты дают основание полагать, что сборка актиновых нитей происходит при участии миозиновых.

Белки Z-полос *in vitro* связываются с актином. α -Актинин и филамин способны собирать актиновые нити в пучки за счет образования поперечных мостиков. Тропомиозин — основной белок, конкурирующий с α -актининем (а также с филамином) за связь с актином по всей длине тонких нитей, — вытесняет *in vitro* α -актинин в конец тонкой нити. Можно представить себе, что в процессе сборки саркомеров α -актинин и филамин (и, возможно, другие белки) связывают концы тонких нитей, образуя Z-дисковую структуру, а десмин скрепляет эту структуру, располагаясь по окружности Z-диска.

Как отмечено выше, А-, I-диски и Z-мембраны соседних миофибрилл на ранних этапах развития находятся на разных уровнях. Механизм, приводящий в соответствие поперечную исчерченность соседних миофибрилл, мало изучен. До настоящего времени считалось, что «выравнивание» миофибрилл достигается с помощью трубочек T-системы, которые проходят в попереч-

ном направлении и поэтому могут играть некоторую роль в «привязке» саркомеров соседних миофибрилл [184, 188]. Однако, если учесть, что Т-система приобретает совершенную структуру лишь в постнатальный период, то представить себе организующую роль этой системы в упорядочении трудно. Скорее следует предположить, что для Т-системы, а также для организации ее контактов с СР необходим упорядочивающий механизм. Исследования свойств недавно открытого белка — десмина [159] привели к заключению, что последний может играть важную роль в сборке. Десмин присутствует в клетке на всех стадиях митоза в виде промежуточных нитей с диаметром 10 нм. Как уже было отмечено выше, десмин может связывать Z-диски соседних миофибрилл, т. е. приводить последние в регистр. Таким образом, при развитии мышечных волокон десмин может играть важную роль в появлении поперечной полосатости и, следовательно, в механической унификации сократительного действия отдельных миофибрилл. Кроме того, десмин, очевидно, играет определенную роль в возникновении Т-системы. Действительно, требуется какой-то механизм, чтобы направить инвагинации плазматической мембраны к границе Z-дисков. Белок, подобный десмину, имеющий сродство и к Z-дискам, и к плазмалемме, мог бы играть решающую роль в этом процессе. Предварительные данные по аминокислотной последовательности десмина указывают, что на одном конце его молекула имеет избыток гидрофобных аминокислотных остатков. Эта часть молекулы могла бы быть ответственной за взаимодействие с плазматической мембраной.

Заканчивая обзор по изучению миофибрилlogenеза, следует подчеркнуть, что, несмотря на достигнутый за последнее время значительный прогресс в наших знаниях о формировании сократительного аппарата, многие детали этого процесса остаются еще неясными. Однако можно сказать, что образование такой сложной и совершенной структуры, какой является сократительный аппарат мышечных клеток, на ряде стадий происходит по принципу самосборки. С другой стороны, имеются данные, свидетельствующие о необходимости дополнительной регуляции некоторых этапов миофибриллярной сборки [57, 193, 198, 199, 201]. В связи с этим ряд авторов, например, считает, что в клетке должны действовать механизмы, регулирующие последовательность синтеза миофибриллярных белков [57, 184, 192] и тем самым последовательность их организации в надмолекулярные ансамбли. Другие авторы придерживаются той точки зрения, что регулировать сборку белков их последовательным синтезом нет необходимости [199]. Например, сократительный аппарат немускульных клеток постоянно «собирается» и «разбирается» при одновременном присутствии всех необходимых для этого белков. В этом случае скорее всего действуют механизмы, регулирующие агрегационное состояние белков. Каковы реальные механизмы регуляции сборки

в мышечных клетках и на каких этапах миофибриллогенеза они действуют, пока еще не известно. Дальнейшие исследования формирования сократительного аппарата мышц *in vivo* и *in vitro*, а также изучение поведения немышечных сократительных систем и существующих в них механизмов, контролирующих агрегационное состояние белков, должны внести ясность в этот вопрос.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Fishman D. A. — *Curr. Topics in Develop. Biol.*, 1970, 5 : 235.
- [2] Holtzer H. — In: *Cell Differentiation*/Ed. by O. A. Scheide, J. de Vellis. Princeton, Van Nostrand—Reinhold, 1970 : 476.
- [3] Жуков Е. К., Птица Н. А., Магазаник А. Г., Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А., Свидерский В. Л., Скоробовичук Н. Ф., Ушаков В. Б. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. Л., Наука, 1974.
- [4] Пере Ф. А. — *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1971, 22 : 77.
- [5] Huxley H. E. — *Science*, 1969, 164 : 1356.
- [6] Hanson J. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1968, 1 : 177.
- [7] Lowey S. — In: *Polymerisation in biological systems*. Ciba foundation symp. 1972. Amsterdam, ASP (Elsevier, Excerpta Medica, North—Holland), 1972 : 217.
- [8] Mannherg H. G., Goody R. S. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, 45 : 428.
- [9] Squire J. M. — *Ann. Rev. Biophys. Bioengineering*, 1975, 4 : 137.
- [10] Draper M. H., Hodge A. J. — *Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci.*, 1949, 27 : 405.
- [11] Huxley H. E. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, 3 : 631.
- [12] Huxley H. E., Hanson J. — *Nature*, 1954, 173 : 973.
- [13] Huxley A. F., Niedergengerke R. — *Nature*, 1954, 173 : 971.
- [14] Huxley H. E. — *J. Mol. Biol.*, 1963, 7 : 281.
- [15] Reedy M. K. — *J. Mol. Biol.*, 1968, 31 : 155.
- [16] Page S. G., Huxley H. E. — *J. Cell Biol.*, 1963, 19 : 369.
- [17] Ebashi S., Endo M. — *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1968, 18 : 123.
- [18] Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1969, 2 : 351.
- [19] Hanson J., Lowy J. — *J. Mol. Biol.*, 1963, 6 : 46.
- [20] Hanson J. — *Nature*, 1967, 213 : 353.
- [21] Huxley H. E., Brown W. — *J. Mol. Biol.*, 1967, 30 : 383.
- [22] Haselgrove J. C. — Ph. D. Thesis. Cambridge, 1970.
- [23] Леднев В. В. — В кн.: Молекулярная и клеточная биофизика. М., Наука, 1977 : 164.
- [24] O'Brien E. J., Bennett P. M., Hanson J. — *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B*, 1971, 261 : 201.
- [25] Huxley H. E. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1972, 37 : 361.
- [26] Haselgrove J. C. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1972, 37 : 341.
- [27] Hanson J., Lednev V., O'Brien E. J., Bennett P. M. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1972, 37 : 34.
- [28] Wakabayashi T., Huxley H. E., Amos L. A., Klug A. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 93 : 477.
- [29] Moore P. B., Huxley H. E., De Rosier D. — *J. Mol. Biol.*, 1970, 50 : 279.
- [30] Spudich J. A., Huxley H. E., Finch J. T. — *J. Mol. Biol.*, 1972, 72 : 619.
- [31] Gillis J. M., O'Brien E. J. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 99 : 445.

- [32] O'Brien E. J., Gillis J. M., Couch J. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 99 : 461.
- [33] Takayuki H., Wakabayashi T. — In: *Abstr. 6th Intern. biophys. congr. Kyoto, 1978, VII-1-(j)*.
- [34] Seymour Y., O'Brien E. — *Nature*, 1980, 283 : 680.
- [35] Леднев В. В., Франк Г. М. — *Биофизика*, 1977, 22 : 376.
- [36] Nonomura Y., Drabikowski W., Ebashi S. — *J. Biochem.*, 1968, 64 : 419.
- [37] McLachlan A. D., Stewart M. — *J. Mol. Biol.*, 1976, 103 : 251.
- [38] McLachlan A. D., Stewart M. — *J. Mol. Biol.*, 1976, 103 : 271
- [39] McLachlan A. D., Stewart M. — *J. Mol. Biol.*, 1976, 106 : 1017.
- [40] Parry D. A. D., Squire J. M. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 75 : 33.
- [41] Caspar D. L. D., Cohen C. — In: *Nobel Symp. / Ed. by A. Engstrom, R. Strandberg. New York, Wiley, 1975, 2 : 393.*
- [42] Longley W. — *Nature*, 1975, 253 : 126.
- [43] Леднев В. В. — В кн.: *Матер. Всесоюзн. симп. по биофизике и биохимии мышц. Тбилиси, 1974 : 40.*
- [44] Higashi-Fujime H. F. S., Ooi T. — *J. microscopie*, 1969, 8 : 535.
- [45] Dabrowska R., Podlubnaya Z., Nowak E., Drabikowski W. — *J. Biochem.*, 1976, 80 : 89.
- [46] Подлубная З. А., Фрейдина Н. А., Шпагина М. Д., Орлова А. А. — В кн.: *Молекулярная и клеточная биофизика. М., Наука, 1977 : 124.*
- [47] Подлубная З. А. — В кн.: *Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л., Наука, 1978 : 237.*
- [48] Greaser M. D., Yamaguchi M., Wanderkooi G. — *J. Mol. Biol.*, 1977, 116 : 883.
- [49] Caspar D. L. D., Cohen C., Longley W. — *J. Mol. Biol.*, 1969, 41 : 87.
- [50] Katagawa E., Nonomura Y. — *J. Biochem.*, 1979, 86 : 1511.
- [51] Ohtsuki I. — *J. Biochem.*, 1974, 75 : 753.
- [52] Smillie L. B. — *Trends Biochem. Sci.*, 1979, 4 : 151.
- [53] Stone D., Sodek J., Johnson P., Smillie L. B. — In: *Proc. IX FEBS meeting. Budapest, 1975, 31 : 125.*
- [54] Parry D. A. D. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 57 : 216.
- [55] Hitchcock S., Huxley H. E., Szent-Györgyi A. G. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 80 : 825.
- [56] Margossian S. S., Cohen C. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 81 : 409.
- [57] Ishiwata S., Kondo H. — *Biochim. biophys. acta*, 1978, 534 : 341.
- [58] Maruyama K., Fujii T., Kuroda M., Kikuchi M. — *J. Biochem.*, 1975, 77 : 769.
- [59] Dabrowska R., Nowak E., Podlubnaya Z., Drabikowski W. — *Biochim. biophys. acta*, 1975, 400 : 54.
- [60] Ohtsuki I. — *J. Biochem.*, 1975, 77 : 633.
- [61] Kuroda M., Maruyama K. — *J. Biochem.*, 1976, 79 : 249.
- [62] Gray J. — *J. Mol. Biol.*, 1978, 124 : 501.
- [63] Ohtsuki I., Wakabayashi T. — *J. Biochem.*, 1972, 72 : 369.
- [64] Weber A., Murray J. M. — *Physiol. Rev.*, 1973, 53 : 612.
- [65] Parry S. V. — *Soc. Exptl. Biol. Symp.*, 1973, 27 : 531.
- [66] Леднев В. В. — *Биофизика*, 1979, 24 : 501.
- [67] Леднев В. В. — В кн.: *Структурные основы и регуляция подвижности. М., Наука, 1979 : 221.*
- [68] Hill D. K. — *J. Cell Biol.*, 1964, 20 : 435.
- [69] Ogievetskaya M. M., Podgorodnichenko V. K., Samosudova N. V. — *Immunochemistry*, 1977, 14 : 661.

- [70] Draper M. H., Hodge A. J. — Nature, 1949, 163 : 576.
- [71] Самосудова И. В., Людковская Р. Г. — Цитология, 1979, 21 : 391.
- [72] Dolken G., Leisner E., Pette D. — Histochemistry, 1975, 43 : 113.
- [73] Stewart M., Morton D. J., Clarke F. M. — Biochem. J., 1980, 186 : 99.
- [74] Walsh T. P., Winzord J., Clarke F. M., Masters C. J. — Biochem. J., 1980, 186 : 89.
- [75] Stewart M., Morton D. J., Clarke F. M. — Biochem. J., 1979, 183 : 663.
- [76] Clarke F. M., Shaw F. D., Morton D. J. — Biochem. J., 1980, 186 : 105.
- [77] Maruyama K., Kimura S., Ishii T., Kuroda M., Ohashi K., Muramatus S. — J. Biochem., 1977, 81 : 215.
- [78] Kawamura M., Maruyama K. — J. Biochem., 1970, 67 : 437.
- [79] Kondo H., Ishiwata S. — J. Biochem., 1976, 79 : 159.
- [80] Craig R. — J. Biol., 1977, 109 : 69.
- [81] Sutoh K., Sutoh K., Karr T., Harrington W. F. — J. Mol. Biol., 1978, 126 : 1.
- [82] Syrový I. — Int. J. Biochem., 1979, 10 : 383.
- [83] Trinick J., Elliott A. — J. Mol. Biol., 1979, 131 : 133.
- [84] Pepe F. A. — J. Mol. Biol., 1967, 27 : 203.
- [85] Pepe F. A. — J. Mol. Biol., 1967, 27 : 227.
- [86] Sjöström M., Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1977, 109 : 49.
- [87] Elliott A., Offer G. — J. Mol. Biol., 1978, 123 : 505.
- [88] Takahashi K. — J. Biochem., 1978, 83 : 905.
- [89] Kendrick-Jones J., Jakes J. — Trends Biochem. Sci., 1976, 1 : 281.
- [90] Harrison R. G., Lowey S., Cohen C. — J. Mol. Biol., 1971, 59 : 531.
- [91] King M. V., Young M. — J. Mol. Biol., 1972, 63 : 539.
- [92] Подлубная З. А. — Биофизика, 1973, 18 : 359.
- [93] Katsura J., Noda H. — J. Biochem., 1973, 73 : 257.
- [94] Chowrashi P. K., Pepe F. A. — J. Cell Biol., 1977, 74 : 136.
- [95] Safer D., Pepe F. A. — J. Mol. Biol., 1980, 136 : 343.
- [96] Hanson J., O'Brien E. J., Bennett P. M. — J. Mol. Biol., 1971, 58 : 865.
- [97] Hinssen H., D'Haese J., Small J. V., Sobieszek A. — J. Ultrastr. Res., 1978, 64 : 282.
- [98] Craig R., Offer G. — J. Mol. Biol., 1976, 102 : 325.
- [99] Pepe F. A., Drucker B. — J. Cell Biol., 1972, 52 : 255.
- [100] Tregear R. T., Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1973, 77 : 279.
- [101] Morimoto K., Harrington W. F. — J. Mol. Biol., 1974, 83 : 83.
- [102] Hanson J., Huxley H. E. — Biochim. biophys. acta, 1957, 23 : 229.
- [103] Potter J. D. — Arch. Biochem. Biophys., 1974, 162 : 436.
- [104] Pepe F. A., Drucker B. — J. Mol. Biol., 1979, 130 : 379.
- [105] Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1973, 77 : 291.
- [106] Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1972, 72 : 125.
- [107] Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1974, 90 : 153.
- [108] Pepe F. A., Dowben P. — J. Mol. Biol., 1977, 113 : 199.
- [109] Lamvik M. K. — J. Mol. Biol., 1978, 122 : 55.
- [110] Wray J. S. — Nature, 1979, 277 : 37.
- [111] Rome E., Offer G., Pepe F. A. — Nature New Biol., 1973, 244 : 152.
- [112] Haselgrove J. C. — J. Mol. Biol., 1975, 92 : 113.
- [113] Davey C. L., Graafhuis A. E. — Experientia, 1976, 32 : 32.
- [114] Offer R., Moos C., Starr R. — J. Mol. Biol., 1973, 74 : 653.

- [115] Фрейдина Н. А., Орлова А. А., Подлубная З. А. — В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности. М., Наука, 1979 : 160.
- [116] Moos C., Offer R., Starr R., Bennett P. — J. Mol. Biol., 1975, 97 : 1.
- [117] Pepe F. A., Drucker B. — J. Mol. Biol., 1975, 99 : 609.
- [118] Craig R., Offer G. — Proc. Roy. Soc. London. B., 1976, 192 : 451.
- [119] Starr R., Offer G. — Biochem. J., 1978, 171 : 813.
- [120] Morimoto K., Harrington W. F. — J. Mol. Biol., 1973, 77 : 165.
- [121] Koretz J. F. — Biophys. J., 1979, 27 : 423.
- [122] Koretz J. F. — Biophys. J., 1979, 27 : 433.
- [123] Starr R., Bennett F., Offer G. — In: Proc. 8th Europ. conf. muscle and motility. Heidelberg, 1979 : 29.
- [124] Maruyama K., Kunitomo S., Kimura S., Ohashi K. J. Biochem., 1977, 81 : 243.
- [125] Herasymowych O. S., Mani R. S., Kay C. M., Bradley R. D., Scraba D. G. — J. Mol. Biol., 1980, 136 : 193.
- [126] Masaki T., Takaiti O. — J. Biochem., 1974, 75 : 368.
- [127] Walliman T., Turner D. C., Eppenberger H. M. — J. Cell Biol., 1977, 75 : 297.
- [128] Trinick J., Lowey S. — J. Mol. Biol., 1977, 113 : 343.
- [129] Katsura I., Noda H. — J. Biochem., 1971, 69 : 219.
- [130] Katsura I., Noda H. — Adv. Biophys., 1973, 5 : 177.
- [131] Miyahara M., Noda H. — J. Biochem., 1977, 81 : 285.
- [132] Kaminer B., Bell A. L. — J. Mol. Biol., 1966, 20 : 391.
- [133] Josephs R., Harrington W. F. — Biochemistry, 1966, 5 : 347.
- [134] Sanger J. W. — Cytobiologie, 1971, 4 : 450.
- [135] Hayashi T., Silver Wallage I. R. B., Cayer M. L., Smith D. S. — J. Mol. Biol., 1977, 111 : 159.
- [136] Schoby J., Taylor K., Kendrick-Jones J. — Nature, 1980, 287 : 233.
- [137] Morel J. E., Pinset-Härström I., Bardin A. M. — Biol. cellulaire, 1979, 34 : 9.
- [138] Pinset-Härström I., Truffly J. — J. Mol. Biol., 1979, 134 : 173.
- [139] Eaton B. L., Pepe F. A. — J. Mol. Biol., 1974, 82 : 421.
- [140] Achatz I. — Acta biochim. biophys. Acad. sci. Hung., 1968, 3 : 183.
- [141] Luther P., Squire J. — J. Mol. Biol., 1978, 125 : 313.
- [142] Ritchie A. K., Fambrough D. M. — J. Gen. Physiol., 1975, 66 : 327.
- [143] Knappeis G. G., Carlsen F. — J. Cell Biol., 1968, 38 : 202.
- [144] Pepe F. A. — J. Histochem. Cytochem., 1975, 23 : 543.
- [145] Strehler E. E., Eppenberger H. M. — In: Proc. 8th Europ. conf. muscle and motility. Heidelberg, 1979 : 30.
- [146] Mani R. S., Kay C. M. — J. Biochem. 1979, 86 : 1817.
- [147] Mani R. S., Kay C. M. — Biochim. biophys. acta, 1978, 536 : 134.
- [148] Trinick J. A. — Fed. Proc., 1974, 33 : 540.
- [149] Heizmann C. W., Eppenberger H. M. — J. Biol. Chem., 1978, 253 : 270.
- [150] Ullrick W. C., Toselli P. A., Saide J. D., Phear W. P. C. — J. Mol. Biol., 1977, 115 : 61.
- [151] Masaki T., Endo M., Ebashi S. — J. Biochem., 1967, 62 : 630.
- [152] Podlubnaya Z. A., Tskhovrebova L. A., Stefanenko G. A., Zaalishvili M. M. — J. Mol. Biol., 1975, 92 : 357.

- [153] Robson R. M., Goll D. E., Arakawa N., Stromer M. H. — *Biochim. biophys. acta*, 1970, 200 : 296.
- [154] Lane B. P., Elias J., Drummond E. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, 25 : 69.
- [155] Stromer M. H., Goll D. E. — *J. Mol. Biol.*, 1972, 67 : 489.
- [156] Beehtal P. J. — *J. Biol. Chem.*, 1979, 254 : 1755.
- [157] Wang K., Singer S. J. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74 : 2021.
- [158] Zeece M. G., Robson R. M., Beehtal R. J. — *Biochim. biophys. acta*, 1979, 581 : 365.
- [159] Lazarides E., Hubbard B. D., Granger B. L. — In: *Cell motility: molecule and organization*/Ed by S. Hatano, H. Ishikawa, H. Sato. Tokyo, Univ. Press, 1979 : 521.
- [160] O'Shea, Robson R. M., Huiatt T. W., Hartzler M. K., Stromer M. H. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 89 : 972.
- [161] Ohashi K., Maruyama K. — *J. Biochem.*, 1979, 85 : 1103.
- [162] Sainsbury G. M. — In: *Proc. 8th Europ. conf. muscle and motility*. Heidelberg, 1979 : 26.
- [163] Engelmann T. W. — *Pflüg. Arch. Physiol.*, 1978, 18 : 1.
- [164] Locker R. H., Leet N. G. — *J. Ultrastr. Res.*, 1976, 56 : 31.
- [165] Dos Remedios C. G., Gilmour D. — *J. Biochem.*, 1978, 84 : 835.
- [166] Trombitas K., Tigyi-Sebes A. — *Nature*, 1979, 281 : 319.
- [167] McNeill P. A., Hoyle G. — *Amer. Zool.*, 1967, 7 : 483.
- [168] Maruyama K., Matsubara S., Natori R., Nonomura Y., Kimura S., Ohashi K., Murakami F., Handa S., Eguchi G. — *J. Biochem.*, 1977, 82 : 316.
- [169] Maruyama K., Kimura S., Kuroda M., Handa S. — *J. Biochem.*, 1977, 82 : 347.
- [170] Wang K., McClure J., Tu A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 3698.
- [171] Wang K., Ramirez-Mitchell R. — *J. Cell Biol.*, 1979, 83 : 389a.
- [172] Sjöstrand F. — *J. Ultrastr. Res.*, 1962, 7 : 225.
- [173] Franzini-Armstrong C. — *Tissue and Cell*, 1970, 2 : 327.
- [174] Romyantsev P. — *Intern. Rev. Cytol.*, 1977, 51 : 187.
- [175] Galey F. — In: *Cell differentiation* / Ed. by O. A. Schjeide, J. de Vellis. Amsterdam, Van Nostrand Reinhold Company, 1970 : 352.
- [176] Allen E. R., Pepe F. A. — *Amer. J. Anat.*, 1965, 116 : 115.
- [177] Allen E. R. — *Z. Zellforsch.*, 1973, 145 : 167.
- [178] Heuson-Stiennon J. A. — *J. Microscop.*, 1965, 4 : 657.
- [179] Chlebowski J. S., Przybylski R. J., Cox G. — *Develop. Biol.*, 1973, 33 : 80.
- [180] Kelly A. M., Zacks S. J. — *J. Cell Biol.*, 1969, 42 : 135.
- [181] Schattenberg P. J. — *Z. Zellforsch.*, 1973, 143 : 569.
- [182] Waterman E. R. — *Amer. J. Anat.*, 1969, 125 : 457.
- [183] Nag A. G., Nursal J. R. — *Cytobios*, 1972, 6 : 227.
- [184] Kilarski W., Jakubowska M. — *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* (Leipzig), 1979, 6 : 1159.
- [185] Larson P. F., Fulthorpe J. J., Hungzon P. — *J. Anat.*, 1973, 116 : 327.
- [186] Franzini-Armstrong C., Porter K. R. — *J. Cell Biol.*, 1964, 22 : 675.
- [187] Page S. G. — *J. Cell Biol.*, 1965, 26 : 477.
- [188] Walker S. M., Schrodtt G. R., Carrier G. J., Turner E. V. — *J. Morphol.*, 1975, 146 : 97.
- [189] Kelly D. E. — *Anat. Rec.*, 1969, 163 : 403.
- [190] Etlinger J. D., Fischman D. A. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1972, 37 : 511.

- [191] Manazek F. J. — In: Developmental regulation aspects of cell differentiation / Ed. by S. J. Coward, New York, Acad. Press, 1973 : 193.
- [192] Dabrowska R., Sosinski J., Drabikowski W. — FEBS Letters, 1977, 79 : 295.
- [193] Moos M., Asch R., Schwartz R. — Exper. Cell Res., 1979, 121 : 167.
- [194] Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1968, 38 : 538.
- [195] Holtzer H., Strahs K., Biehl J., Somlyo A. P., Ishikawa H. — Science, 1975, 188 : 943.
- [196] Ezerman E. B., Ishikawa H. — J. Cell Biol., 1967, 35 : 405.
- [197] Van Breeman V. L. — Anat. Rec., 1952, 113 : 172.
- [198] Allen R. E., Stromer M. H., Gold D. E., Robson R. M. — J. Cell Biol., 1978, 76 : 98.
- [199] Sanwal B. D. — Trends Biochem., 1979, 4 : 155.
- [200] Davey C. L., Graafhuis A. E. — Experientia, 1975, 31 : 441.
- [201] Grazi E., Ferri A., Lanzara V., Magri E., Zaccarini M. — FEBS Letters, 1980, 112 : 67.

Г. П. ПИНАЕВ

СИНТЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ КАК БИОХИМИЧЕСКАЯ ОСНОВА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОГЕННЫХ КЛЕТОК

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

В процессе дифференцировки миогенные клетки приобретают структурную и функциональную специализацию. Она выражается в образовании специфичных для этих клеток фибриллярных структур, состоящих из тонких и толстых филаментов и обеспечивающих проявление главного фенотипического признака мышечной ткани — способности к сокращению. Как известно, биохимической основой дифференцировки любых типов клеток является синтез в них тканеспецифических белков. Что касается мышечных клеток, то вопрос о синтезе в них тканеспецифических белков в последнее время значительно усложнился, поскольку сократительные белки — актин, миозин, тропомиозин и α -актинин — обнаружены в самых разнообразных немышечных клетках [1—3]. Они появляются в зародыше задолго до начала формирования мышечной ткани. Их находят уже в яйцеклетке во время первого деления [4].

Следовательно, синтез сократительных белков как таковых нельзя считать признаком дифференцировки мышечных клеток. Таким признаком может быть только появление особых форм сократительных белков, специфичных именно для мышечной ткани.

К настоящему времени накоплено большое количество фактов, свидетельствующих о том, что сократительные белки зрелых мышечных клеток действительно отличаются по структуре и физико-химическим свойствам от немышечных сократительных белков. На ранних стадиях развития мышечные и немышечные клетки имеют сходный состав сократительных белков, а в ходе миогенеза одни изоформы белков заменяются на аналогичные другие.

Задача данного обзора — дать представление о том, когда и в какой последовательности начинается синтез специфических сократительных белков в процессе дифференцировки мышечных клеток, как он осуществляется и какие формы его контроля известны в настоящее время.

В ходе изложения нам придется неоднократно относить время появления тех или других белков и кодирующих их информационных РНК к определенным стадиям развития мышечной ткани.

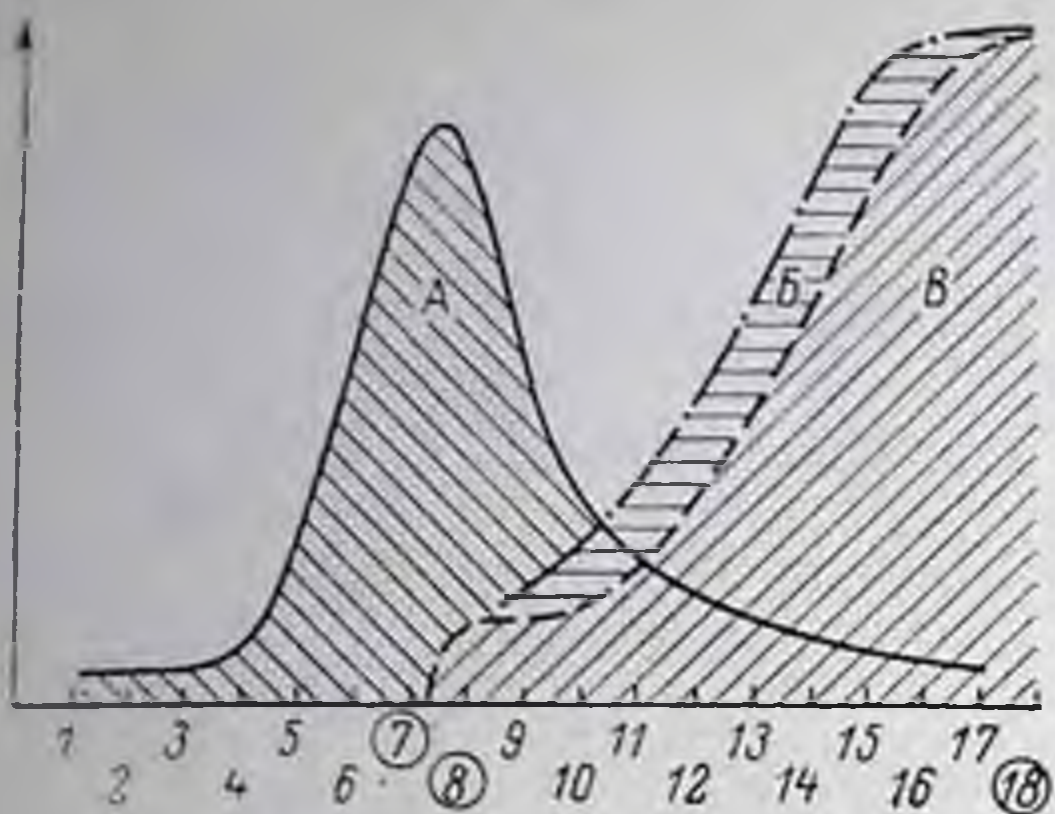


Рис. 1. Схематическое изображение последовательности основных событий в ходе миогенеза.

А — пролиферация; В — синтез миозина; В — слияние миобластов. По оси абсцисс — дни развития зачатка ноги куриного эмбриона; кружками отмечены критические периоды развития.

Поэтому на примере куриного эмбриона — классического объекта для изучения миогенеза — необходимо дать краткое описание последовательности этапов дифференцировки скелетной мышцы.

У других видов животных сроки развития, приведенные ниже, меняются в зависимости от типа эмбриогенеза, но последовательность событий остается той же самой.

В зачатке мышцы ноги (рис. 1) на 4-й день инкубации зародыша наступает стадия высокой пролиферативной активности миогенных клеток. К 7-му дню около 70% клеток находится в состоянии деления. Далее с 8-го по 11-й день уровень пролиферации снижается до 20%. Одновременно начинается слияние миобластов в многоядерные клетки, или миотубы. На 18-й день большинство миобластов входит в состав многоядерных клеток [5]. Параллельно наблюдается резкое возрастание синтеза сократительных белков в миотубах.

В этот период в эмбриональной мышечной ткани одновременно находятся мезенхимные клетки, фибробласты, реплицирующиеся миобласты (презумптивные миобласты), постмитотические миобласты (клетки, готовые к слиянию) и, наконец, незрелые многоядерные миотубы. Поэтому соотносить стадии синтеза сократительных белков с определенными фазами морфогенеза и тем более с появлением сократительных структур оказалось невозможным. В связи с этим все основные исследования дифференцировки мышечных клеток и синтеза специфических белков проведены почти исключительно на культурах миогенных клеток, полученных из эмбриональной ткани. Работа с культурами позволяет одновременно наблюдать за поведением клеток различных типов, воздействовать на них разнообразными агентами, селективно выделять те или иные клеточные линии и проводить эксперименты на клонах [6, 7].

СМЕНА ИЗОФОРМ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В МИОГЕНЕЗЕ

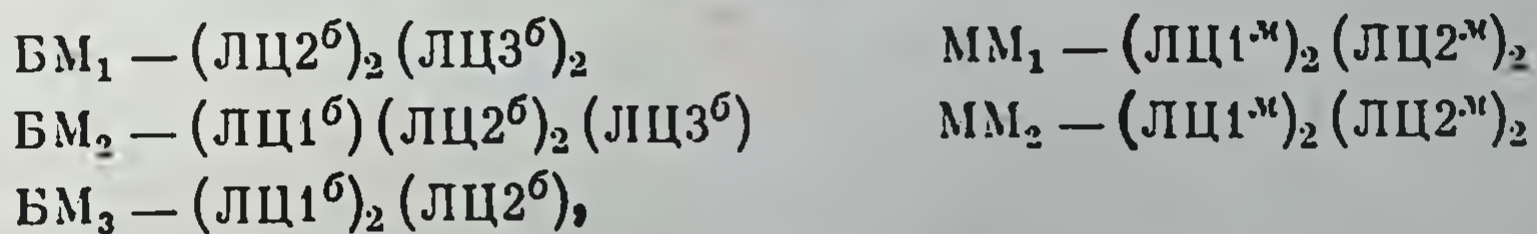
Гипотеза о замене одних сократительных белков другими или замене белков проактомиозинового комплекса на функционально зрелый актомиозин в ходе миогенеза впервые была выдвинута

более 20 лет назад И. И. Ивановым [8, 9]. В поддержку этой гипотезы были приведены убедительные данные о последовательном изменении физико-химических свойств актомиозина и актина в процессе развития мышечной ткани [10—12]. Различия между миозинами из скелетных мышц эмбрионов и взрослых животных выявлены с помощью флуоресцирующих антител. Миофибриллы грудных мышц куриного эмбриона окрашиваются антителами как к сердечному, так и к скелетному миозинам. По мере развития мышцы способность реагировать с антителами к сердечному миозину пропадает [13]. Антитела к легкому меромиозину из скелетной мышцы взрослых животных хорошо связываются с миотубами, но совершенно не окрашивают презумптивные миобласты [14]. Легкие цепи миозинов немышечных клеток и миобластов отличаются также по антигенным свойствам и по электрофоретической подвижности от легких цепей миозина миотуб [14, 15]. Пептидный анализ фрагментов эмбрионального миозина и миозина скелетной и сердечной мышц взрослого животного показывает, что эти белки имеют различия в первичной структуре и, следовательно, являются продуктами работы различных генов [16, 17]. Из сравнения пептидных карт миозинов разнообразных тканей выяснилось, что существует по крайней мере 5 типов ТЦ миозина: три мышечных (скелетной, гладкой и сердечной мышц) и две немышечных (из мозга и тромбоцитов) [18].

Рассмотрим, как происходит смена изоформ отдельных сократительных белков в процессе дифференцировки скелетных мышц.

Миозин

Определить наличие изоформ миозина удастся с помощью специального вида электрофореза, который позволяет разделять целые молекулы без расщепления их на субъединицы. Этим методом установлено, что в быстрых мышцах цыпленка содержатся три изоформы миозина BM_1 , BM_2 и BM_3 , а в медленных две — MM_1 и MM_2 [19]. Состав легких цепей у этих изоформ миозина можно изобразить в виде следующих формул



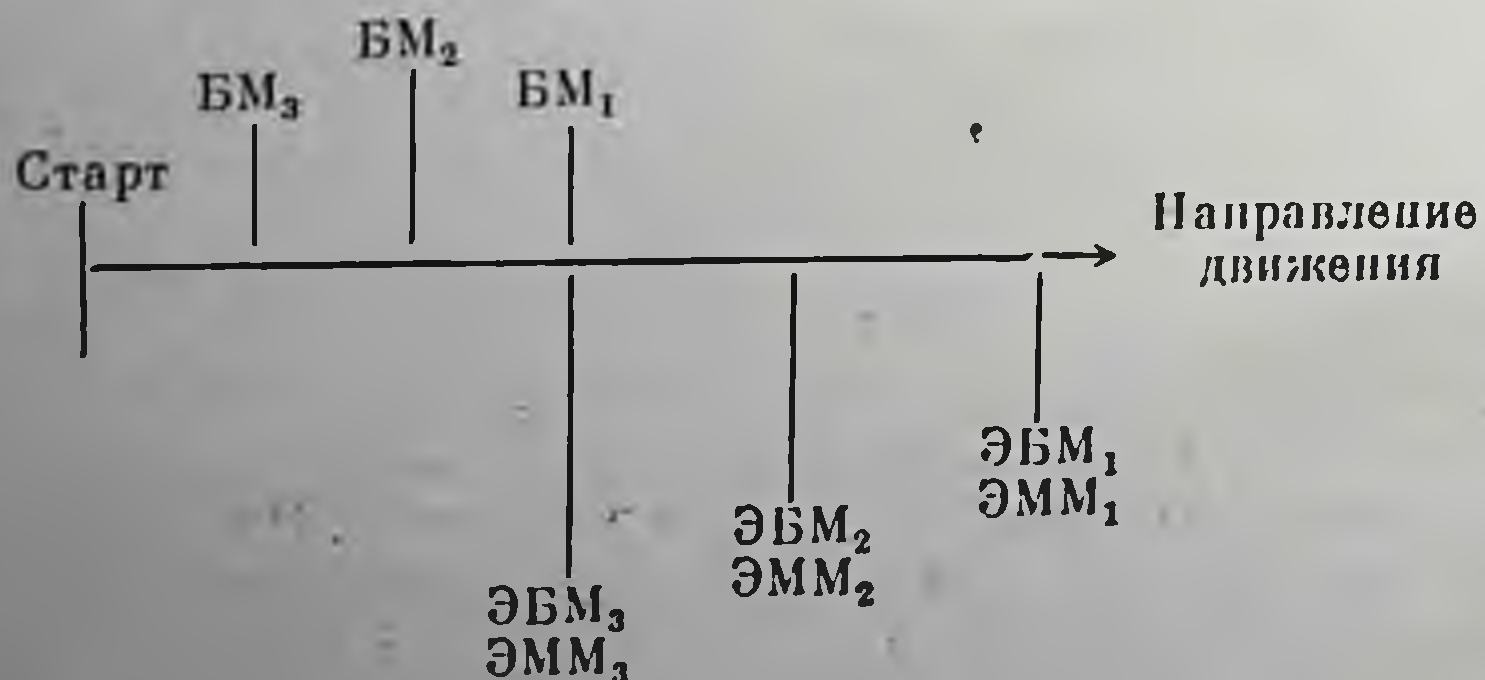
где *b* и *m* означают — «быстрый» и «медленный», а цифры за скобками выражают количественное соотношение между цепями.

Из приведенных формул видно, что изоформы миозина медленных мышц, несмотря на различия в подвижности, не различаются ни по набору легких цепей, ни по их количеству. Это, по-видимому, означает, что наличие этих изоформ определяется различиями в структуре тяжелых цепей.

Итак, в скелетных мышцах имеется 5 изоформ миозина. Какие же из них появляются первыми на смену немускульному миозину? По этому поводу развернулась горячая дискуссия, которая до сих пор еще не завершилась.

Одни авторы считают, что эмбриональный миозин идентичен миозину быстрых мышц взрослых животных [20, 21]. Другие полагают, что он является смесью миозинов, характерных для быстрых и медленных мышц [13, 22]. И, наконец, третьи придерживаются точки зрения, что фетальная форма миозина вообще отличается по первичной структуре от миозина взрослых животных [16, 17]. Действительно, факты, приводимые в литературе, весьма противоречивы. По одним данным, флуоресцирующие антитела к миозинам из быстрых и медленных мышц одинаково хорошо связываются с эмбриональными миофибриллами [13, 22]; по другим данным, миотубы окрашиваются антителами только к быстрому миозину [21]. Результаты анализа состава легких цепей миозина показывают, что в одних случаях в эмбриональной мышце содержатся ЛЦ медленного миозина [23], в других — все три типа ЛЦ, характерных для миозина из быстрых мышц [24, 25]. Вместе с тем в мышечной ткани эмбрионов крыс, в миогенных клетках, в очищенном миозине и в субфрагменте С1 открыта новая ЛЦ, которая отличается от ЛЦ1 миозина взрослых животных по подвижности, но может заменять ее в стехиометрических отношениях. Поэтому она названа ЛЦ1_{эмб.} [26].

Эти противоречия удалось разрешить путем анализа миозинов из эмбриональных мышц и из быстрых и медленных мышц взрослого кролика различными методами электрофореза и пептидных карт [27]. Оказалось, что в эмбриональной быстрой мышце (так же, как и в быстрой мышце взрослых животных) содержатся 3 изоформы миозина: ЭБМ₁, ЭБМ₂ и ЭБМ₃, но они имеют большую подвижность при электрофорезе в пирофосфатном буфере. В эмбриональной медленной мышце тоже имеются 3 изоформы миозина: ЭММ₁, ЭММ₂ и ЭММ₃, не отличающиеся по подвижности от соответствующих форм миозина быстрой эмбриональной мышцы. Схематически это можно изобразить следующим образом:



Как видно из этой схемы, BM_1 и $ЭBM_3$ имеют одну и ту же электрофоретическую подвижность и, следовательно, можно было ожидать, что оба типа миозина имеют одинаковый состав легких цепей. Оказалось, однако, что это не так. Гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия показал, что эмбриональные изоформы миозина имеют состав легких цепей, идентичный соответствующим изоформам миозина быстрых мышц взрослых кроликов. Выражая это аналогичными формулами, мы получим, что

$$\begin{aligned} ЭBM_1 &= (ЛЦ2) (ЛЦ3) \\ ЭBM_2 &= (ЛЦ1) (ЛЦ2) (ЛЦ3) \\ ЭBM_3 &= (ЛЦ1) (ЛЦ2), \end{aligned}$$

тогда по составу легких цепей $BM_1 = ЭBM_1$, $BM_2 = ЭBM_2$ и $BM_3 = ЭBM_3$. Так как легкие цепи составляют лишь небольшую часть массы молекулы миозина (10—12%), можно предположить, что различия в электрофоретической подвижности изоформ миозина взрослых и эмбрионов должны определяться различиями в структуре тяжелых цепей. Действительно, по результатам пептидного анализа тяжелые цепи миозинов быстрых и медленных мышц взрослых животных и быстрых мышц эмбрионов различаются между собой [27, 28], причем пептиды тяжелых цепей эмбрионального миозина занимают положение в более кислой области геля, чем оба типа пептидов миозина взрослых животных [27]. Таким образом, в эмбриональных мышцах синтезируется новый класс изоформ миозина, отличающийся как от изоформ быстрой, так и от изоформ медленной скелетных мышц и, наконец, от немышечных форм миозина. При этом их легкие цепи очень сходны с легкими цепями миозина быстрых мышц и, наоборот, тяжелые цепи отличны.

Теперь становится ясно, почему разные авторы приводят столь противоречивые данные. Антитела к целому миозину быстрых мышц должны связываться с легкими цепями эмбриональных изоформ и создавать впечатление, что на ранних стадиях развития синтезируется миозин, идентичный миозину быстрых мышц взрослых животных. При дальнейшем развитии мышц происходит вторая смена изоформ миозина на изоформы, специфичные для каждого типа мышечной ткани.

Актин

Методом изоэлектрического фокусирования удалось разделить актин из мышц млекопитающих на три изоформы: α -, β - и γ -актины. Последние две изоформы найдены и в немышечных клетках. В млекопитающих находят все три формы, но α -актин содержится в минимальных количествах. После образования миотуб α -актин становится доминирующим, а содержание β - и γ -актинов резко снижается [29, 30].

Тропомозины

В скелетных мышцах кролика найдены две изоформы тропомозины — α и β . Соотношение между ними зависит от типа мышцы: в быстрых мышцах $\alpha : \beta = 4 : 1$, а в медленных — $11 : 9$. В эмбриональных мышцах кур и кроликов преобладающей формой является β -тропомозины. По мере развития синтез α -формы усиливается и соотношение между ними постепенно меняется до соотношения, типичного для взрослых животных [31, 32]. На мюгенной линии L_{84} крыс получены несколько иные результаты. При изоэлектрическом фокусировании β -тропомозины разделяется дополнительно на 2 изоформы — β_1 и β_2 . В процессе дифференцировки синтез α - и β_2 -тропомозины увеличивается, а синтез β_1 -формы остается на одном уровне. Особенно заметно синтез β_2 -тропомозины увеличивается в период слияния мюбластов [33]. В мюкарде как взрослых животных, так и эмбрионов найдена только одна α -форма тропомозины. Таким образом, у тропомозинов не наблюдается такой четкой смены изоформ в ходе мюгенеза, как у актина или мюзина. В данном случае следует говорить скорее о смене соотношений между изоформами.

Тропонины

Судя по аминокислотному составу, электрофоретической подвижности и по особенностям первичной структуры, все тропонины находятся в мышцах взрослых животных в виде изоформ.

Различные формы тропонина И найдены в быстрой, медленной и сердечной мышцах [34, 35]. Два вида тропонина С выделены из скелетной мышцы [36]. Изоформа сердечного тропонина С отличается от изоформ, найденных в скелетных мышцах [37].

Все виды тропонинов обнаружены и в эмбриональных мышцах [30]. Из экспериментов по связыванию флуоресцирующих антител к тропонину И из быстрой мышцы следует, что на ранних стадиях развития во всех мышцах синтезируется тропонин И быстрого типа. По мере специализации клеток подавляется синтез ненужных изоформ и, наоборот, усиливается синтез специфичных. Аналогичные результаты получены и для тропонинов Т и С [38].

КОГДА НАЧИНАЕТСЯ СИНТЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ?

Интенсивный синтез мюзина начинается на 9—11-й день развития куриного эмбриона и достигает максимальной величины к 18-му дню. Так как в это же время происходит массовое слияние мюбластов в мютубы, был сделан вывод о зависимости синтеза мюзина от процесса слияния клеток [39]. Совпадение во времени начала синтеза мюзина с определенными фазами мюрогенеза наиболее отчетливо прослеживается на культурах эмбриональ-

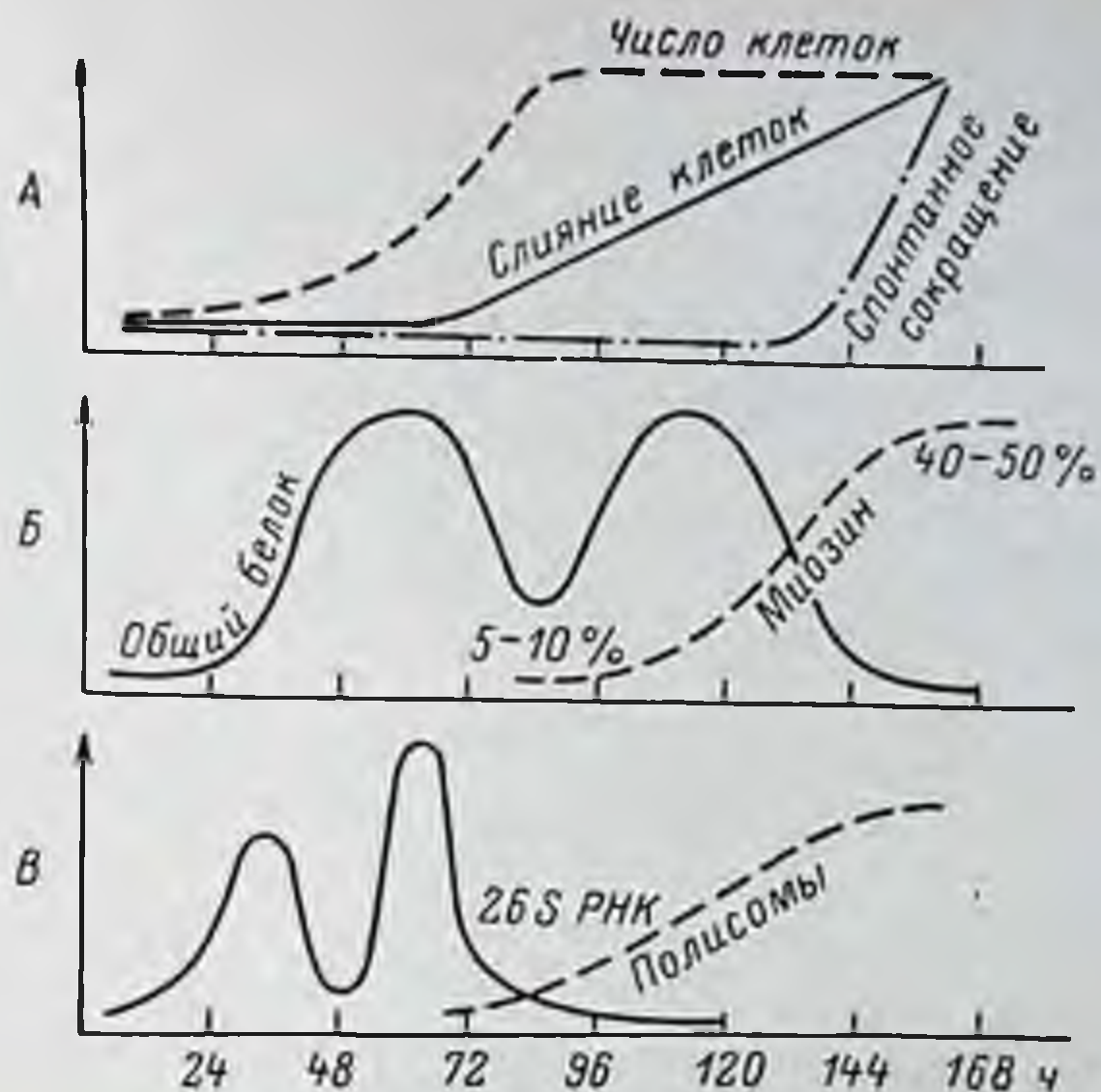


Рис. 2. Схема изменений синтеза РНК, белков и образования полисом в процессе дифференцировки миогенных клеток.

А — последовательность событий в ходе развития миогенных клеток в культуре; Б — синтез белков; В — синтез РНК и образование полисом. По оси абсцисс — возраст культуры.

ных клеток (рис. 2, А). После посева миобласты в течение 24 ч проходят через латентный период, во время которого не наблюдается никаких изменений. Затем, после смены среды (это время принято за 0), клетки начинают интенсивно делиться, и культура растет логарифмически в течение следующих 40 ч. Затем начинается переходный период, занимающий около 12 ч, во время которого клетки прекращают деление и выстраиваются в линии. Слияние клеток происходит в течение следующих 10—15 ч. К 150-му развитию культура состоит из сети больших поперечно-исчерченных миотуб, в которых наблюдаются спонтанные сокращения [40].

Синтез цитоплазматических белков высок в период логарифмического роста, низок в переходный период и начинает снова возрастать после слияния клеток (рис. 2, Б). Синтез полипептидных цепей с м. в. ниже 50 000 дальтон предшествует появлению тяжелых цепей миозина. Начало заметного синтеза миозина приходится на 80-й ч развития клеток в культуре. В это время он составляет только 5—10% всего синтезируемого белка. Значительно увеличивается синтез миозина примерно через 58 ч после слияния. К 150-му ч развития синтез общего белка падает, а синтез миозина остается на постоянном уровне [40]. Скорость синтеза миозина после слияния возрастает во много раз. Если до слияния в тяжелые цепи включается только 0.2% аккумулярованного в клетках ^3H -лейцина, то после слияния миобластов включение меченого предшественника возрастает до 10%. Это означает,

что синтез миозина в культуре, содержащей до 85% слившихся клеток, увеличивается примерно в 60 раз [41, 42]. Синтез актина увеличивается в период слияния, но не столь значительно, как синтез миозина. По ориентировочным оценкам, количество его в мнотубах возрастает всего в 9 раз [43]. По всей вероятности, для нормального формирования миофибриллярных структур клетке необходимо изменить количественное соотношение между актином и миозином в пользу последнего. Согласно ряду данных, в зрелых поперечнополосатых мышцах разных животных миозина содержится приблизительно в $1\frac{1}{2}$ раза больше, чем актина [44—46]. В немышечных клетках и миобластах актина больше в 7—8 раз, чем миозина [47].

Из данных по смене изоформ сократительных белков следует, что синтез специфических для мышечной ткани или переходных форм этих белков действительно приурочен к моменту слияния миобластов. В этот период, как мы видели, синтезируются эмбриональная форма миозина, α -актин, быстрые формы тропоминов, увеличивается синтез β -тропомиозина. Таким образом, есть все основания считать, что интенсивный синтез специфических форм сократительных белков начинается в мнотубах после слияния миобластов.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СМЕНУ СИНТЕЗА ИЗОФОРМ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

К сожалению, пока еще нет достаточно убедительных экспериментальных фактов, которые позволили бы установить, какие из протекающих в миогенных клетках событий в период образования мнотуб являются решающими для запуска синтеза изоформ сократительных белков, специфичных для мышечной ткани.

В течение долгого времени считалось, что синтез миозина и слияние миобластов — процессы взаимосвязанные и что слияние является пусковым механизмом синтеза тканеспецифических сократительных белков [48—52]. Оказалось, однако, что с помощью некоторых химических агентов можно блокировать один из этих процессов, не нарушая нормального хода другого. Например, при подавлении синтеза миозина добавлением в среду актиномицина *Д* или ЭГТА удается сохранить процесс слияния миобластов [41, 53] или, наоборот, можно с помощью цитохалазина *В* остановить слияние миобластов, не затронув при этом синтез сократительных белков и формирование саркомероподобных структур [54]. Эти факты свидетельствуют о том, что синтез тканеспецифических сократительных белков и слияние миобластов — процессы параллельные, но независимые.

Существует ряд косвенных данных, на основании которых можно предположить, что решающую роль в индукции синтеза мышечных сократительных белков могут играть или изменение структуры поверхностной мембраны [55], или влияние гормо-

нов [56], или действие некоторых белков, продуцируемых окружающими немышечными клетками [7, 57]. Нельзя, конечно, исключить и такой возможности, что запуск синтеза белка осуществляется в результате сочетанного действия ряда факторов. Более подробно эти вопросы рассмотрены В. Б. Ушаковым [58].

Хотя последовательность смены синтеза изоформ еще мало изучена и требуется гораздо большее количество экспериментальных фактов, для того чтобы составить полное представление о «расписании» синтезов сократительных белков в ходе миогенеза, сейчас уже становится ясно, что «оснащение» мышечных волокон каждого типа специфическими изоформами белков — процесс многоступенчатый.

Создается впечатление, что непосредственно после слияния мюбластов во всех образовавшихся миотубах независимо от их дальнейшей специализации синтезируются одни и те же изоформы сократительных белков, соответствующих некоему обобщенному мышечному типу. Окончательная «подгонка» набора специфических белков под определенный тип мышечных волокон осуществляется уже после иннервации мышечных клеток соответствующими мотонейронами.

С началом иннервации эмбриональный миозин заменяется изоформами миозина, характерными для быстрых или медленных мышц [27]. Эта замена заключается в вовлечении в работу новых генов для тяжелых цепей миозина. В этот же период происходит смена быстрых форм тропонинов на медленные [38]. Изменение синтеза миозина под влиянием иннервации было неоднократно показано и прямыми экспериментами [59, 60]. Так, например, под действием хронического раздражения нерва, иннервирующего быстрые мышцы, с частотой, характерной для работы медленных мышц, в них начинает синтезироваться миозин, специфичный для медленных мышц. Антитела к миозину из быстрых мышц хорошо связываются с миофибриллами до раздражения. После начала трансформации часть миофибрилл начинает связывать антитела к миозину из медленных мышц. Затем окрашивание на быстрый миозин постепенно исчезает, а на медленный увеличивается [60].

Таким образом, главным фактором, определяющим окончательный набор изоформ сократительных белков в специализированных мышечных волокнах, является, по-видимому, нервный контроль.

ПРОБЛЕМА КООРДИНИРОВАННОГО СИНТЕЗА СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ХОДЕ МИОГЕНЕЗА

Итак, на определенных стадиях миогенеза, из которых можно выделить сейчас по крайней мере две (стадия образования многоядерных клеток и стадия начала иннервации мышечных волокон), происходят существенные изменения в синтезе тканеспецифиче-

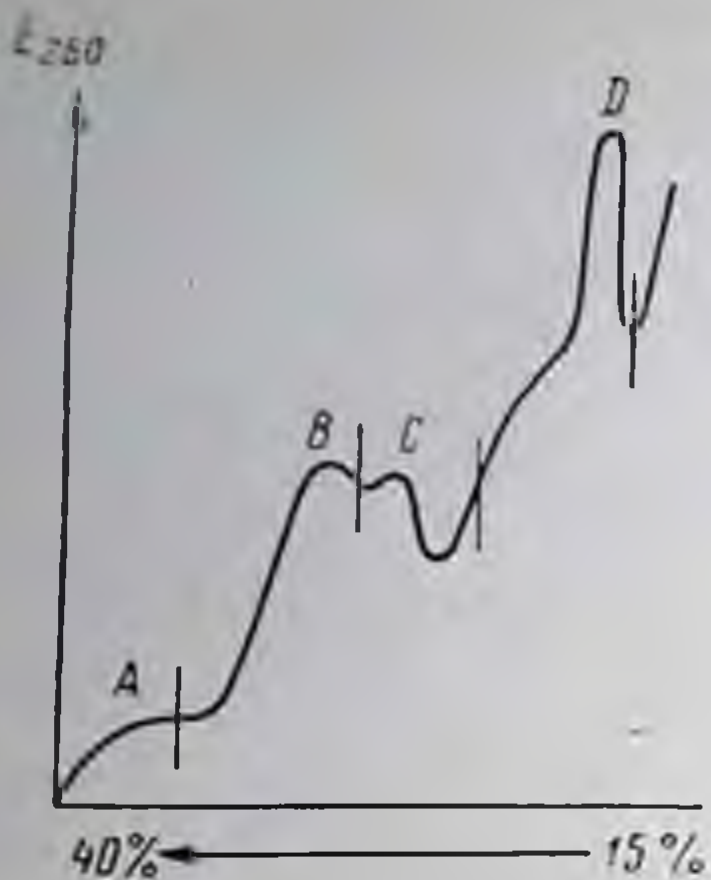


Рис. 3. Фракционирование полисом центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (по данным Хейвуда и др. [68]).

A, B, C, D — фракции полисом; вертикальными линиями отмечены границы фракций. По оси ординат — экстинкция при длине волны 260 мμ; по оси абсцисс — концентрация сахарозы.

ских сократительных белков, выражающиеся в смене одной изоформы на другие или в изменении соотношения между существующими изоформами.

Эти факты принципиально возникновение идеи координированного синтеза сократительных белков и одновременной смены изоформ всех

основных сократительных белков. Результаты ряда экспериментальных работ, специально посвященных выяснению этого вопроса, как-будто поддерживают эту идею. Методом изотопного разведения определяли накопление актина, миозина, тропомиозина и α -актинина на разных стадиях дифференцировки мюгенных клеток в культуре. Показано, что накопление всех 4 белков происходит одновременно через 72 ч роста клеток в культуре [61]. Установлено также, что синтез тяжелых и легких цепей миозина, двух субъединиц тропомиозина, тропонинов T и C идет в одинаковых молярных соотношениях [62]. При изучении скорости обмена актина и миозина в презумптивных миобластах и миотубах найдено, что отношение синтеза миозина к синтезу актина в процессе развития не меняется [63].

Вместе с тем существуют не менее убедительные факты, которые противоречат представлению об одновременном синтезе набора изоформ сократительных белков. Напротив, они свидетельствуют о том, что синтез отдельных белков сократительного аппарата и даже отдельных субъединиц молекулы миозина может идти независимо. С помощью специфического мечения легких и тяжелых цепей показано, например, что в мышечной клетке существует пул легких цепей, не связанных с тяжелыми цепями миозина [64, 65]. При индукции дифференцировки тератокарциномы избирательно увеличивается синтез тропомиозина, количество которого в клетке возрастает примерно в 20 раз [66]. Под влиянием интенсивной нагрузки в сердечной мышце изменяется соотношение в синтезе ТЦ и ЛЦ миозина (для предсердий оно равно 2 : 1, а желудочков 3 : 1), т. е. нарушается пропорциональность синтеза субъединиц [67].

Кроме того, если у миозина и тропонинов наблюдается отчетливая смена изоформ, то у тропомиозина только изменяется соотношение в синтезе уже существовавших изоформ. Что касается актина, то в мышечных клетках всех типов и на всех этапах дифференцировки синтезируется только одна α -форма. Следовательно,

в зависимости от условий и физиологического состояния мышечной клетки изоформы различных сократительных белков могут в ней синтезироваться как одновременно, так и избирательно. Смысл же координированного синтеза, по-видимому, заключается в том, что на каждом этапе развития мышечной клетки некоторые пока нам не известные регуляторные механизмы активируют или подавляют одновременно работу групп генов, ответственных за синтез многочисленных клеточных белков, в том числе и сократительных.

Обратимся теперь к вопросу о том, как осуществляется синтез сократительных белков в мышечной клетке.

ПОЛИСОМЫ И СИНТЕЗ НА НИХ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

В эмбриональной мышечной ткани содержится большое количество свободных, т. е. не связанных с мембранами полисом. Центрифугированием в градиенте плотности сахарозы их удалось разделить на 4 фракции согласно размерам, как это показано на рис. 3. Фракция А наиболее тяжелая и содержит большие полисомы, состоящие из 50—60 рибосом. На этих полисомах осуществляется синтез ТЦ миозина. На полисомах фракции В (15—25 рибосом) синтезируется актин, а фракции С (5—9 рибосом) — тропомиозин и ЛЦ миозина [69, 70]. Таким образом, тяжелые и легкие субъединицы миозина синтезируются независимо на разных информационных РНК и, вероятно, являются продуктами разных генов.

Полисомы, на которых синтезируются сократительные белки, можно называть свободными только условно. В действительности эти полисомы тесно связаны со структурами сократительного аппарата [71—73]. Судя по морфологическим данным, в период интенсивного синтеза сократительных белков на тонких и толстых филаментах, а также на Z-линии располагается большое количество полисом, синтезирующих соответствующие белки. Их тесная связь с сократительными структурами доказана экспериментально. На выделенных из мышечных клеток миофибриллах в бесклеточной системе синтезируется миозин, как на свободных полисомах [74].

МИОЗИНОВАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ РНК

Миозиновая информационная РНК (РНК, на которой происходит синтез ТЦ миозина) выделена из фракции тяжелых полисом. Она способна соединяться с рибосомами и синтезировать в бесклеточной системе полипептидные цепи, идентичные ТЦ миозина [75]. При ультрацентрифугировании она имеет характерную скорость седиментации, равную 26S. Из данных седиментации вычислен ее молекулярный вес, который равен $2.0 \cdot 10^6$ дальтон [76]. Миозиновая РНК имеет, по-видимому, более рыхлую вторичную структуру, чем, например, рибосомные 28S и 18S РНК, так как

при электрофорезе она мигрирует со скоростью, характерной для частиц большего размера, имеющей константу седиментации порядка 32S [77].

Белок, который синтезируется на 26S РНК в бесклеточной системе, по данным пептидного анализа, полностью совпадает по первичной структуре с тяжелым субъединицам миозина [78].

На миозиновой информационной 26S РНК с помощью обратной транскриптазы осуществлен синтез ДНК, которая в бесклеточной системе направляет синтез РНК, не отличающейся по своим свойствам от 26S РНК [40].

Выделение 26S РНК-зависимой ДНК в препаративных количествах оказало существенное влияние на развитие исследований механизма контроля за синтезом миозина. Проведение опытов по ДНК/РНК гибридизации дает возможность следить за малейшими изменениями в структуре информационной РНК без выделения ее из популяции общей цитоплазматической РНК.

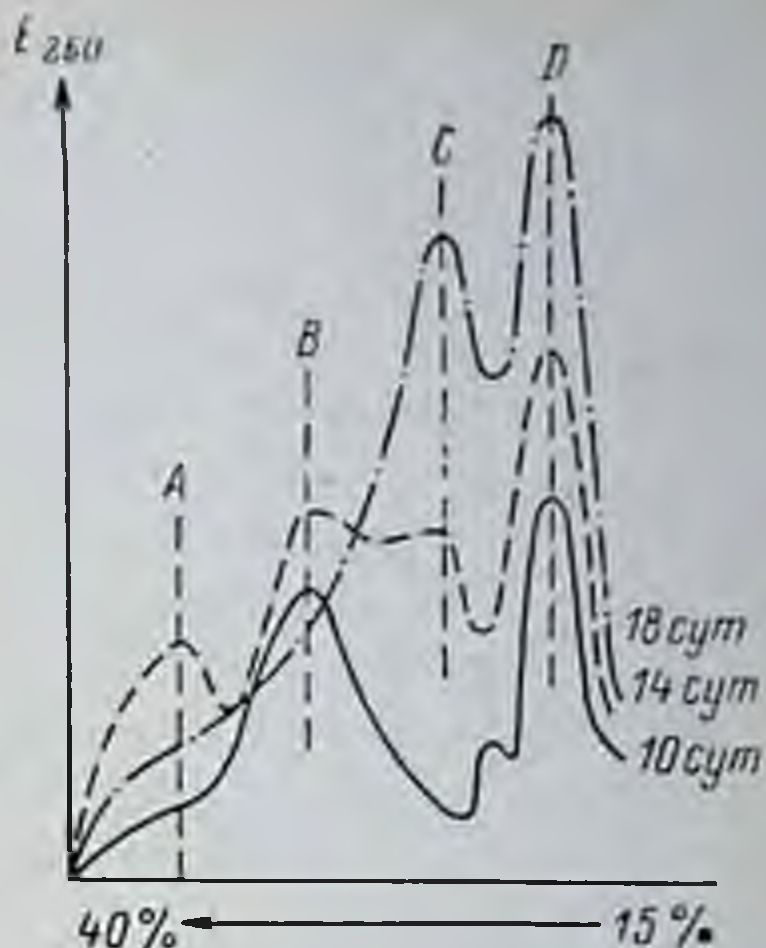
Контроль за синтезом тканеспецифических белков может осуществляться на разных этапах. Он может происходить на этапе транскрипции, т. е. синтеза информационной РНК, на этапе ядерного или цитоплазматического процессинга (посттранскрипционных модификаций РНК) и, наконец, на этапе трансляции, т. е. синтеза полипептидной цепи белка. Рассмотрим, что известно в настоящее время о всех трех этапах контроля за синтезом сократительных белков.

ПОЯВЛЕНИЕ ПОЛИСОМ И СИНТЕЗ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Соотношение между различными фракциями полисом меняется с возрастом куриного эмбриона (рис. 4). Так, на 10-й день развития преобладают актиновые полисомы (фракция В), на 14-й день появляются миозиновые (фракция А), а на 18-й день — тропомиозиновые полисомы (фракция С). Конечно, не следует думать, что полисомы фракций В и С синтезируют исключительно упомянутые белки. В бесклеточной системе образуется значительно больше меченого белкового материала, но в процессе ее совместной очистки с белком-носителем (например, с миозином) удается удалить значительную часть примесей. Попытки найти корреляцию между появлением полисом и образованием толстых и тонких филаментов не дали удовлетворительных результатов [79—81]. На ранних стадиях миогенеза до слияния миобластов их цитоплазма очень богата одиночными рибосомами. Первое отчетливое изменение морфологии клеток перед или во время образования филаментов — это резкое падение содержания одиночных рибосом [80]. Вероятно, трудности обнаружения полисом на этой стадии развития связаны с тем, что полисомы находятся в непосредственном контакте с формирующимися филаментами и их трудно заметить на электронных микрофотографиях.

Рис. 4. Фракционирование полисом из скелетных мышц куриных эмбрионов в возрасте 10, 14 и 18 сут (по данным Хейвуда и др., [69]).

Обозначения те же, что на рис. 3.



Подавление синтеза РНК добавлением актиномицина *D* в первичные культуры непосредственно перед слиянием миобластов не останавливает ни слияния, ни синтеза миозина. Отмечается лишь снижение скорости синтеза белка. Образование мютоуб идет нормально даже при остановке синтеза РНК за 8 ч до слияния миобластов [82, 83]. Из этих экспериментов следует, что транскрипция не является необходимой непосредственно перед или во время экспрессии мышечного фенотипа.

Вся используемая для этого РНК запасается заранее.

При последовательном анализе синтеза миозиновой РНК на всех этапах дифференцировки миогенных клеток скелетной мышцы теленка в культуре оказалось, что синтез 26S РНК, как это ни неожиданно, значителен в период логарифмической фазы роста культуры, т. е. когда миобласты интенсивно делятся (рис. 2, *B*). В переходный период общий синтез РНК снижается, чтобы снова возрасти непосредственно перед слиянием клеток. Особенно высок уровень синтеза миозиновой РНК за 4—8 ч до слияния, а затем постепенно снижается к 75-му ч развития, когда появляются длинные многоядерные клетки [40].

Таким образом, 26S РНК синтезируется двумя порциями. Эти два вида РНК различаются по времени жизни. Время полураспада для 26S РНК, синтезированной в период логарифмического роста, составляет около 10 ч, а для 26S РНК, которая появляется непосредственно перед слиянием, значительно больше — около 50 ч. Следовательно, миозиновая РНК, синтезирующаяся в период образования сократительных структур, отличается высокой стабильностью. Причина такой высокой стабильности пока не ясна. Это не результат образования полисом, так как 26S РНК появляется в клетке примерно за 16 ч до того, как можно обнаружить полисомы и начинается белковый синтез.

СМЕНА ПОПУЛЯЦИЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК

Данные о наличии определенной гетерогенности в популяции синтезирующихся 26S РНК и о существовании изозимных форм миозина дают основания предполагать, что в ходе миогенеза должны синтезироваться различающиеся по последовательности

информационные мРНК, кодирующие синтез соответствующих изоформ белка [40, 55, 84].

Один из способов выявления изменений в популяции РНК на разных стадиях развития заключается в определении способности к трансляции в бесклеточной системе выделенных РНК [85, 86]. С помощью такого подхода обнаружено, что транслируемая РНК, кодирующая синтез специфических мышечных легких цепей миозина, накапливается в клетках после их слияния [87]. В то же время не удалось обнаружить предсуществующей неактивной РНК для тяжелых цепей миозина [88]. Последний результат нельзя считать достоверным, потому что в бесклеточной системе может быть выявлена только транслируемая РНК.

Другой, более эффективный подход — это изучение изменений в структуре РНК методом ДНК/РНК гибридизации. Этот метод основан на получении ДНК, комплементарной к определенной фракции информационной РНК, и на выявлении степени гибридизуемости полученной ДНК с популяциями РНК из клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Ввиду гетерогенности популяции миозиновой информационной РНК без специальной очистки исходного материала не удастся получить с этим методом однозначных результатов [89, 90].

Только после тщательного фракционирования информационной РНК и очистки синтезированной на ней комплементарной ДНК удалось показать, что основная часть информационной РНК, специфичной для митохондрий, накапливается в митохондриях за несколько часов до слияния. Качественные различия между 26S РНК митохондрий и митохондрий определяются появлением новых последовательностей [91, 92]. Таким образом, появлению новых изоформ сократительных белков предшествует смена популяций информационных РНК. Эти исследования только начинаются, поэтому на сегодня они еще недостаточно информативны.

ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РНК

РНК, синтезированная в ядре, еще не является информационной. Это так называемая РНК-предшественник информационной РНК, которая содержит довольно большие дополнительные участки. Для того чтобы превратиться в информационную, РНК-предшественник проходит стадию процессинга, когда под действием ферментов удаляется весь дополнительный материал и достраивается полиадениловая последовательность — Поли (А).

Большинство информационных РНК эукариот содержат Поли (А) за исключением гистоновых и РНК для некоторых других белков [93]. Информационные РНК, находящиеся в составе полисом из митохондрий, тоже содержат Поли (А) участки [94]. Что касается миозиновой 26S РНК, то до настоящего времени не существует единого мнения о наличии и размере ее Поли (А) последовательности. По одним данным, миозиновая РНК не содержит

достаточно длинных Поли (А) участков [95], по другим, — она имеет большую последовательность, равную около 200 нуклеотидов [81, 96].

На популяции информационных РНК из миогенных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, показано, что величина Поли (А) последовательности может варьировать в пределах от 40 до 170 нуклеотидов [55]. Следовательно, разноречивые данные о длине Поли (А) участка мюзиновой РНК могут объясняться изменением его размеров в ходе мюгенеза.

Одна из последних работ подтверждает это предположение. Оказалось, что 89% информационной РНК из мютуб, кодирующей тяжелые цепи мюзина, практически не содержит Поли (А) последовательности. Ее Поли (А) участок состоит всего лишь из 13 адениловых остатков. Напротив, в мюблестах содержится всего 16% такой РНК, большая же часть 26S РНК имеет нормальную Поли (А) последовательность, насчитывающую 231 нуклеотид [97]. Это означает, что в процессе дифференцировки идет накопление Поли (А)-РНК. Показано также, что информационные ДНК, кодирующие синтез актина [98, 99] и легких цепей мюзина [100], либо имеют короткую Поли (А) последовательность, либо не имеют ее вовсе. Высказывается предположение, что в процессе дифференцировки идет постепенное укорочение Поли (А) участка РНК, кодирующих синтез сократительных белков [97]. Такое постепенное укорочение Поли (А) последовательности обнаружено у глобулиновых информационных РНК [101, 102].

Таким образом, различия в длине Поли (А) последовательности, возникающие в результате ядерного или цитоплазматического процессинга, могут оказаться одним из факторов, влияющих на дифференцировку мышечных клеток посредством изменения степени стабильности или транслируемости информационных РНК. К этому вопросу мы еще вернемся в следующем разделе.

КОНТРОЛЬ НА ЭТАПЕ ТРАНСЛЯЦИИ

Образование рибонуклеопротеидных частиц

Известно, что информационная РНК транспортируется из ядра в цитоплазму в виде рибонуклеопротеидных частиц (РНП), получивших название информсом [103]. Информационная РНК в этом комплексе остается, с одной стороны, устойчивой к внешним воздействиям, а с другой — накапливается в клетке в неактивном состоянии, т. е. не взаимодействует с рибосомами и не осуществляет синтеза белка.

Первая порция 26S РНК, которая синтезируется в период интенсивного деления мюблестов, не входит в состав полисом. Она найдена в форме РНП-частиц, соосаждающихся с рибосомами, и имеет скорость седиментации около 70—100S [40, 104]. В делящихся мюблестах в состав РНП-частиц входит 90—95% 26S

РНК, а в митохондриях эта величина снижается до 40—50% [40]. Подобные РНП-частицы, но меньшего размера найдены и для активной информационной РНК [105]. По способности к трансляции в бесклеточной системе такая запасная форма РНК не отличается от полисомной [104, 105]. Белки, которые входят в состав РНП-частиц и подавляют ее способность к трансляции, связаны с Поли (А) последовательностью [106]. Большинство из них крупнее, чем белки рибосом [95, 105]. Из 9 белков, входящих в состав РНП-частиц с активной информационной РНК, большинство имеет м. в. около 44 000 дальтон [105].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что как степень стабильности информационной РНК, так и ее способность к трансляции зависят от Поли (А) последовательности, с которой взаимодействуют белки. Отсюда следует, что уменьшение Поли (А) участка или «созревание» информационной РНК в процессе дифференцировки должно приводить к снижению содержания белков, препятствующих трансляции в РНП-частицах, и тем самым переводить РНК в активное состояние. Если же РНК с коротким Поли (А) участком не вступает по какой-либо причине во взаимодействие с рибосомами, она может быть элиминирована ввиду низкой устойчивости к внешним воздействиям. Таким образом, мы еще раз убеждаемся в том, что изменение длины Поли (А) последовательности должно играть важную роль в регуляции синтеза тканеспецифических белков.

Факторы инициации трансляции

Во время перехода в активное состояние информационная РНК освобождается от белков РНП-комплекса и соединяется с малой субъединицей рибосомы при помощи специальных белковых факторов инициации синтеза.

Если использовать для синтеза миозина в бесклеточной системе рибосомы из ретикулоцитов, то синтез начинается только при добавлении иницирующих факторов, отмытых от мышечных рибосом. Таких факторов в мышечной клетке, как и в бактериальной, содержится 3. Они названы IF_1 , IF_2 и IF_3 (initiation factor). Из этих факторов только IF_3 определяет специфичность связывания информационной РНК с рибосомами [107]. Бесспорное доказательство специфичности фактора IF_3 получено в опытах по перекрестному связыванию глобиновой РНК с мышечными рибосомами, а миозиновой РНК с рибосомами из ретикулоцитов. Обе РНК связываются и с теми, и с другими рибосомами, но только в присутствии своего специфического фактора [108, 109]. На куриных эмбрионах показано, что рибосомы из белых мышц (в которых, как известно, миоглобин отсутствует) не способны соединяться с миоглобиновой РНК без иницирующих факторов из красной мышцы. Миозиновая же РНК может связываться и с теми, и с другими рибосомами [110]. Приведенные данные говорят о наличии

тканевой специфичности рибосом, но остается неясным, существуют ли факторы IF_3 , специфичные для индивидуальных информационных РНК.

Регуляторный механизм синтеза белка, построенный на селекции индивидуальных информационных РНК, может не только контролировать фракционный состав синтезируемых белков, но и определять уровень синтеза данного белка на разных стадиях дифференцировки. Трудно себе представить, однако, возможность существования специфических факторов инициации для всех индивидуальных РНК, синтезируемых в клетке. Скорее следует предположить, что существуют иницирующие факторы, специфичные для группы белков, например гистонов, митохондриальных белков, митохондриальных, рибосомных и т. д. Вместе с тем возможно, что эти факторы требуются только для синтеза ограниченного числа белков. Обнаружено, например, что синтез актина осуществляется без добавления специфического иницирующего фактора [77].

Специфические РНК, блокирующие трансляцию

Об этом типе контроля на этапе трансляции известно еще очень мало. В днализате, содержащем факторы инициации мышечных рибосом, обнаружена РНК с небольшим молекулярным весом [111]. Она, по-видимому, подавляет связывание информационной и формил-метионил-тРНК с малой субъединицей рибосомы [112]. Эта РНК содержится в РНП-частицах и обогащена уридинловыми остатками (около 50%) [113]. Аналогичная контролирующая трансляцию РНК из полисом значительно короче и содержит меньше уридинловых остатков. Эти РНК благодаря наличию больших полиуридиловых последовательностей образуют гибриды с Поли (А) участками информационной РНК и подавляют таким путем трансляцию последней. Таким образом, обнаружен еще один тип регуляции белкового синтеза на этапе трансляции. Хотя по конечному результату все три типа контроля (факторы инициации, белки, взаимодействующие с Поли (А) последовательностью и контролирующие трансляцию РНК) мало различаются между собой, ясно, что такой многократный контроль должен отличаться повышенной избирательностью и надежностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в процессе дифференцировки мышечной ткани на стадии слияния мюбластов и образования мютуб прекращается синтез цемических сократительных белков и начинается синтез сократительных белков, специфичных для мышечной ткани. Под влиянием иннервации на более поздних стадиях развития осуществляется окончательная «подгонка» изоформ сократительных белков под соответствующий тип мышечных волокон.

Синтез специфических сократительных белков контролируется на всех этапах их создания. На этапе транскрипции включаются новые гены и резко изменяется количество синтезируемых информационных РНК, отличающихся по последовательности от аналогичных РНК немышечного типа. На этапе процессинга вновь синтезируемые РНК достраиваются Поли (А) последовательностями разной величины, от которой, вероятно, зависит их способность к осуществлению синтеза белка. На этапе трансляции включается целая серия факторов, обеспечивающих высокую избирательность и надежность белкового синтеза. Не все этапы синтеза специфических сократительных белков еще достаточно хорошо изучены, и требуется сделать еще очень много, чтобы получить полное представление о молекулярных механизмах синтеза этих белков.

При анализе имеющихся данных возникает весьма важный вопрос о биологическом смысле смены изоформ сократительных белков. Почему появляется необходимость при формировании мышечной ткани несколько видоизменить белки, выполняющие по сути дела ту же самую функцию?

Известно, что в ходе миогенеза изменяются структура и функциональные свойства мышечной клетки. Если, например, в процессе развития возрастает скорость сокращения мышечного волокна, вполне возможно, что для этого необходимо более эффективно расщеплять АТФ и иметь изоформы миозина, обладающие большей АТФазной активностью. Однако при этом строение сократительного аппарата у медленных и быстрых мышц остается неизменным. Если же по характеру организации сократительного аппарата мышцы значительно различаются (как, например, гладкая и поперечнополосатая мышцы), это вовсе не означает, что степень различия в свойствах изоформ соответствующих сократительных белков будет также более значительной.

Следует подчеркнуть, что различия между изоформами отдельных белков в большинстве случаев настолько незначительны, что их можно выявить только с помощью таких чувствительных современных методов, как изоэлектрическое фокусирование или пептидный анализ. Как правило, немышечные или эмбриональные формы этих белков «умеют» делать все то, что делают белки взрослых животных. Если сопоставить изоформы миозина, то все они обладают АТФазной активностью, способны *in vitro* образовывать толстые филаменты и реагировать с актином. Сравнение разных форм актина показывает, что все они способны к полимеризации, могут активировать АТФазу миозина и образовывать комплексы с миозином, тропомиозином и α -актинином.

Следовательно, мы должны сделать вывод, что те изменения, которые наблюдаются в строении изоформ сократительных белков, вероятно, могут модулировать некоторые функциональные свойства этих белков, но недостаточны для того, чтобы привести к существенным изменениям в устройстве сократительного аппарата.

Несмотря на то что в литературе принято говорить о смене одних изоформ сократительных белков другими, во многих случаях полной замены не наблюдается. Происходит лишь изменение соотношения между изоформами на разных стадиях развития. Например, при интенсивном синтезе α -актина происходит существенное снижение содержания β - и γ -актинов, но не полное их исчезновение [62]. При возрастании синтеза β_2 -тропомозина не исчезают другие изоформы этого белка [33]. Это означает, что в мышечной клетке одновременно присутствуют разные изоформы основных сократительных белков, несколько отличающихся по свойствам друг от друга и выполняющие предположительно разные функции.

Необходимо отметить также, что в настоящее время почти все исследования посвящены изучению синтеза основных сократительных белков. Вместе с тем существуют пока еще не многочисленные данные о том, что в процессе дифференцировки в миогенных клетках появляется много других (минорных) белков, функция которых нередко совершенно неясна [29, 30, 62].

Двумерным электрофорезом показано на культуре миогенных клеток дрозофилы, что в процессе миогенеза синтезируется около 150—200 новых белков [30]. В культуре миогенных клеток теленка белок с м. в. 55.000 синтезируется только после слияния мюблестов. Полоса этого белка обогащается на электрофореграммах после глицеринизации клеток. Это, по-видимому, означает, что белок локализован не в цитоплазме, а в сократительных структурах. Наблюдается изменение в синтезе и другого минорного белка с м. в. 40 000 [29]. Интересно, что скорость синтеза некоторых минорных белков сократительного аппарата отличается от скорости синтеза основных белков. Можно предположить, что синтез этих минорных белков необходим именно для формирования специфического для данной клетки сократительного аппарата, а упомянутые выше незначительные изменения в структуре основных сократительных белков, нужны для узнавания их минорными. Ввиду того что основные сократительные белки всегда есть в любой из клеток организма, но используются в разных клетках для построения сократительных структур разных типов, на определенных стадиях дифференцировки необходимо появление регуляторных минорных белков, которые до этого момента не синтезировались в данной клетке. Только наличие разных изоформ основных сократительных белков позволяет минорным белкам отобрать для формирования специфического сократительного аппарата нужный строительный материал. С этой точки зрения, минорные белки сократительного аппарата, пожалуй, с большим основанием можно назвать тканеспецифическими сократительными белками мышечных клеток.

Существует ряд явлений, которые могут быть объяснены только направляющей функцией минорных белков в формировании структуры сократительного аппарата. В денервированной мышце тон-

кие и толстые филаменты сохраняются прежними, однако происходят существенные изменения в организации миофибрилл, и особенно в области Z-линии [114]. При сравнении миофибриллярных белков из запираательных мышц моллюсков, значительно различающихся по устройству сократительного аппарата, оказывается, что основные сократительные белки у всех 26 исследованных видов практически не отличаются друг от друга, но зато наблюдаются большие расхождения в составе минорных белков [115]. Число подобных примеров может быть увеличено.

Таким образом, проблема биохимической дифференцировки мышечных волокон может быть решена только путем сочетанного изучения синтеза как основных, так и минорных сократительных белков.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Korn E. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75 : 588.
- [2] Weber K., Groeschel-Stewart U. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 4561.
- [3] Lazarides E. — J. Cell Biol., 1976, 68 : 202.
- [4] Schroeder T. E. — In: Cell motility / Ed. by R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum. Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, book A : 265.
- [5] Marchok A., Herrmann H. — Develop. Biol., 1967, 15 : 129.
- [6] Yaffe D. — Curr. Topics in Develop. Biol., 1970, 5 : 235.
- [7] Abbot I., Schultz I., Dienstman S., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 1506.
- [8] Иванов И. И., Юрьев В. А., Кадыков В. В. — Биохимия, 1956, 21 : 591.
- [9] Иванов И. И., Юрьев В. А. — В кн.: Биохимия и патобиохимия мышц. Л., Медицина, 1961.
- [10] Пинаев Г. П. — Биохимия, 1965, 30 : 20.
- [11] Хайтлина С. Ю., Пинаев Г. П. — Биохимия, 1976, 41 : 787.
- [12] Хайтлина С. Ю., Пинаев Г. П. — Биофизика, 1976, 21 : 495.
- [13] Masaki T., Yoshizaki C. — J. Biochem., 1974, 76 : 123.
- [14] Chi J. C., Fellini A., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72 : 4999.
- [15] Chi J. C., Rubinstein N., Strahs K., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1975, 67 : 523.
- [16] Huszar G. — Nature New Biol., 1972, 240 : 260.
- [17] Sreter F. A., Balint M., Gergely J. — Develop. Biol., 1975, 46 : 317.
- [18] Burrige K., Bray D. — J. Mol. Biol., 1975, 99 : 1.
- [19] Hoh J. F. Y. — FEBS Letters, 1978, 90 : 297.
- [20] Rubinstein N. A., Kelly A. M. — Develop. Biol., 1978, 62 : 473.
- [21] Rubinstein N. A., Holtzer H. — Nature, 1979, 280 : 323.
- [22] Gauthier G. F., Lowey S., Hobbs A. W. — Nature, 1978, 274 : 25.
- [23] Syrový I. — Physiol. Bohemoslov., 1978, 27 : 445.
- [24] Roy R. K., Sreter F. A., Sargar S., — Develop. Biol., 1979, 69 : 15.
- [25] Obinata T., Masaki T., Takano H. — In: 6th Intern. biophys. Congr., Tokyo, 1978 : 157.
- [26] Whalen R. C., Butler-Browne G. S., Gros F. — J. Mol. Biol., 1978, 126 : 415.
- [27] Hoh J. F. Y., Yeoh G. P. S. — Nature, 1979, 280 : 321.
- [28] Whalen R. C., Schwartz K., Bouveret P., Sell S. M., Gros F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 5197.

- [29] Whalen R. C., Butler-Browne G. S., Gros F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 2018.
- [30] Storti R. V., Horovith S. J., Scott M. P., Rich A., Pardue M. L. — Cell, 1978, 13 : 589.
- [31] Roy R. K., Potter J. D., Sarcas S. — Biochem. Biophys. Res. Com., 1976, 70 : 28.
- [32] Roy R. K., Sreter F. A., Sarcas S. — Develop. Biol., 1979, 69 : 15.
- [33] Carmon Y., Neuman S., Yaffe D. — Cell, 1978, 14 : 393.
- [34] Wilkinsson J. M., Grand R. Y. A. — Nature, 1978, 271 : 31.
- [35] Syska H., Perry S. V., Trayer I. P. — FEBS Letters, 1974, 40 : 253.
- [36] Romero-Herrera A. E., Castillo O., Lehmann H. — J. Mol. Biol., 1976, 8 : 251.
- [37] van Eerd J. P., Takahashi K. — Biochem. Biophys. Res. Com., 1975, 84 : 122.
- [38] Dhoot G. K., Perry S. V. — Nature, 1979, 278 : 714.
- [39] Fishman D. A. — Curr. Topics in Develop. Biol., 1970, 5 : 235.
- [40] Buckingham M. E., Caput O., Cohen A., Whalen R. C., Gros F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 1466.
- [41] Paterson B., Strohman R. C. — Develop. Biol., 1972, 29 : 113.
- [42] Emerson C. P. Jr., Beckner S. K. — J. Mol. Biol., 1975, 93 : 431.
- [43] Paterson B., Roberts B. E., Yaffe D. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 4467.
- [44] Margulis B. A., Bobrova I. F., Mashanski V. F., Pinaev G. P. — Comp. Biochem. Physiol., 1979, 64A : 291.
- [45] Potter J. D. — Arch. Biochem. Biophys., 1974, 162 : 436.
- [46] Treager R. T., Squire J. M. — J. Mol. Biol., 1973, 77 : 279.
- [47] Bray D., Thomas C. — In: Cell motility / Ed. by R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum. Cold Spring Harbor Laboratory. 1976, Book B : 475.
- [48] Okazaki K., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 56 : 1484.
- [49] Coleman J. R., Coleman A. W. — J. Cell Physiol., 1968, 72 : 19.
- [50] Stockdale E. E., Holtzer H. — Exper. Cell Res., 1961, 24 : 508.
- [51] Bishoff R., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1969, 41 : 188.
- [52] Holtzer H. — In: Gene expression in somatic cells. / Ed. by H. A. Padykyla. New York, Acad. Press, 1970 : 69.
- [53] Molinaro M., Martonozzi M. — Exper. Cell Res., 1973, 78 : 329.
- [54] Holtzer H., Croop I., Dienstman S., Ishikawa H., Somlyo A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72 : 513.
- [55] Merlie J. P., Buckingham M. E., Whalen R. G. — Curr. Topics in Develop. Biol., 1977, 11 : 61.
- [56] De la Haba G., Cooper G. W., Elting V. — J. Cell Physiol., 1968, 72 : 21.
- [57] Hauschka S. D. — In: Growth, nutrition and metabolism of cells in culture / Ed. by G. H. Rohtblat, V. J. Cristofalo. New York; London, Acad. Press, 1972, 2 : 67.
- [58] Жуков Е. К., Итина Н. А., Магазаник Л. Г., Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А., Свидерский В. Л., Скоробовичук Н. Ф., Ушаков В. Б. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. Л., Наука, 1974.
- [59] Sreter F. A., Sarcas S., Gergely J. — Nature New Biol., 1972, 239 : 124.

- [60] Rubinstein N., Mabuchi K., Pepe F., Salmons S., Gergely J., Sreter F. — *J. Cell Biol.*, 1978, 79 : 252.
- [61] Allen R. E., Stromer M. H., Goll D. E., Robson R. M. — *Develop. Biol.*, 1979, 69 : 1655.
- [62] Devlin B. H., Emerson C. P. — *Cell*, 1972, 13 : 599.
- [63] Rubinstein N. A., Chi J. C. H., Holtzer H. — *Exper. Cell Res.*, 1976, 97 : 387.
- [64] Morkin E., Yazaki Y., Katagari T., Laraiia P. Y. — *Biochim. biophys. acta*, 1973, 324 : 420.
- [65] Zak R., Martin A. F., Prior Cr., Rabinowitz M. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252 : 3430.
- [66] Paulin D., Perreau J., Jacob H., Jacob F., Yaniv M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 1891.
- [67] Evans C., Schreiber S. S., Oratz M., Rothschild M. — *Cardiovasc. Res.*, 1978, 12 : 731.
- [68] Heywood S. M., Dowben R. M., Rich A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 57 : 1002.
- [69] Heywood S. M., Rich A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 59 : 590.
- [70] Sarcar S., Cook P. H. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1970, 41 : 918.
- [71] Andersson-Cedergren E., Karlson U. — *J. Ultrastr. Res.*, 1967, 19 : 409.
- [72] Larson P. E., Hudgson P., Walton I. N. — *Nature*, 1969, 222 : 1168.
- [73] Galavazi G. — *Z. Zellforsch.*, 1971, 121 : 531.
- [74] Narayanan N., Eapen I. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, 55 : 568.
- [75] Heywood S. M., Nwagwu M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 60 : 229.
- [76] Heywood S. M., Nwagwu M. — *Biochemistry*, 1969, 8 : 3839.
- [77] Morris G. E., Buzash E., Rourke A., Tepperman K., Thompson W., Heywood S. M. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37 : 535.
- [78] Rourke A. W., Heywood S. M. — *Biochemistry*, 1972, 11 : 2061.
- [79] Allen E. R., Pepe F. A. — *Amer. J. Anat.*, 1965, 116 : 115.
- [80] Przybylski R. I., Blumberg I. M. — *Lab. Invest.*, 1966, 15 : 836.
- [81] Przybyla A., Strohman R. S. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71 : 662.
- [82] Yaffe D., Dym H. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37 : 543.
- [83] Molinaro M., Zani B., Martinozzi M., Monesi V. — *Exper. Cell Res.*, 1974, 88 : 402.
- [84] Buckingham M. E., Cohen A., Gros F. — *J. Mol. Biol.*, 1976, 90 : 649.
- [85] Paterson B. M., Roberts B. E., Yaffe D. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71 : 4467.
- [86] Yablodka Z., Yaffe D. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, 73 : 4599.
- [87] Yablodka Z., Yaffe D. — *Differentiation*, 1977, 8 : 133.
- [88] Strohman R. C., Moss P. S., Micou-Eastwood J., Spector D., Przybyla A., Paterson B. M. — *Cell*, 1977, 10 : 265.
- [89] Robbins J., Heywood S. M. — *Eur. J. Biochem.*, 1978, 82 : 601.
- [90] John H. A., Partinou-Georgoulas M., Jones K. W. — *Cell*, 1977, 12 : 501.
- [91] Paterson B. M., Bishop J. D. — *Cell*, 1977, 12 : 751.

- [92] Zevin-Sonkin D., Yaffe D. — *Develop. Biol.*, 1980, 74 : 326.
- [93] Brawerman G. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1974, 43 : 621.
- [94] Kaufman S. J., Gross K. W. — *Biochim. biophys. acta*, 1974, 353 : 133.
- [95] Buckingham M. E., Gross K. W. — In: *The use of iodinated density gradient media for biological separation / Ed. by D. Rickwood. Inform. Retrieval*, 1975 : 71.
- [96] Mondal H., Sutton A., Chen V. J., Sargar S. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1974, 56 : 988.
- [97] Benoff S., Nadel-Gihard B. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 1853.
- [98] Hunter T., Garrels Y. I. — *Cell*, 1978, 12 : 767.
- [99] Kaufman Y., Milcarek C., Berissi H., Penman S. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74 : 4801.
- [100] Yaffe D., Yablunka Z., Kessler G. — In: *Pathogenesis of human muscular dystrophy / Ed. by L. P. Rosland. Amsterdam. Excerpta Medica*, 1977 : 483.
- [101] Perry R. P., Kelley D. E. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 79 : 681.
- [102] Sheiness, D. Darnell J. E. — *Nature New Biol.*, 1973, 241 : 265.
- [103] Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М., Наука, 1971.
- [104] Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J. — *FEBS Letters*, 1975, 53 : 64.
- [105] Bag J., Sargar S. — *Biochemistry*, 1975, 14 : 3800.
- [106] Kwan S. W., Brawerman G. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69 : 3247.
- [107] Heywood S. M. — *Nature*, 1970, 225 : 696.
- [108] Heywood S. M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67 : 1782.
- [109] Heywood S. M., Thompson M. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1971, 43 : 470.
- [110] Thompson M., Buzash A. E., Heywood S. M. — *Biochemistry*, 1973, 12 : 4559.
- [111] Kennedy D. S., Bester A. J., Heywood S. M. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1974, 61 : 415.
- [112] Bogdanovsky D., Herrman W., Schapira G. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, 54 : 25.
- [113] Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J. — *Eur. J. Biochem.*, 1975, 58 : 587.
- [114] Jekubiес-Рукa А., Kulesza-Lipka D. — *Proc. 7th Europ. conf. muscle and motility. Warsaw*, 1978 : 126.
- [115] Маргулис Б. А., Пинаев Г. П. — *Бюл. моря*, 1977, 1 : 63.

С. Ю. ХАЙТЛИНА

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ХОДЕ МИОГЕНЕЗА

Институт биологии моря,
Дальневосточный научный центр АН СССР,
Владивосток

ВВЕДЕНИЕ

Изучение сократительных белков на разных стадиях развития скелетных мышц впервые было предпринято И. И. Ивановым с сотрудниками. Имми было установлено, что развитии скелетной мускулатуры сопровождается увеличением сократительной способности актомиозиновых нитей [1—5] и увеличением АТФазной активности актомиозина [6, 7]. Сопоставление этих фактов с данными об изменении фракционного состава сократительных белков в онтогенезе [8—11] привело И. И. Иванова к предположению о том, что в ходе онтогенеза происходит замена белков «проактомиозинового» комплекса на зрелый актомиозин [5, 9].

Хотя аналогичные результаты были получены впоследствии многими авторами [12—15], экспериментальное подтверждение гипотезы И. И. Иванова получила только в работах последних лет, выполненных на очищенных белках и более тонкими методами. Эти работы показали, что в ходе миогенеза действительно происходит замена одного класса сократительных белков на другой, а именно замена немышечных, или цитоплазматических, сократительных белков на белки мышечного типа, или «саркомерные».*

Первая часть обзора будет посвящена изложению данных, на которых основано это положение. Однако, прежде чем перейти к этим данным, следует коротко остановиться на свойствах мышечных и немышечных сократительных белков.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА «САРКОМЕРНЫХ» И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Миофибриллы скелетных мышц позвоночных содержат около полутора десятков белков. Некоторые из них открыты совсем недавно и еще недостаточно изучены. На их свойствах мы остано-

* Термин «саркомерные» белки употребляется в настоящее время в литературе для обозначения сократительных белков поперечнополосатых мышц, т. е. тех белков, которые входят в состав саркомеров. Термин этот достаточно условный, так как структуры, похожие на саркомеры скелетных мышц, обнаружены в некоторых немышечных сократительных системах [16].

Основные свойства актинов из помышечных сократительных систем

Источник актина	М. в.	S_w^0	Содержание 3-метилгистидина (остатки/моль)	Изоиммерная форма (по изоэлектрическому фокусированию) [29, 30]	Критическая концентрация при полимеризации в 0.1 M KCl (мг/мл) [20]	Степень активирования миеозиновой АТФазы скелетных мышц	Концентрация Ф-актина, необходимая для полумаксимального активирования Mg-АТФазы (мМ) [20]	Характеристическая вязкость Ф-актина (дл/г)
<i>Physarum polycephalum</i> [21]	37000—44000	3.0		α'		2—9		2—7
<i>Acanthamoeba castellanii</i> [22]	39500—42000	2.8	0.75	δ	0.09	5	21.7	3—4
<i>Dictyostelium discoideum</i> [23, 24]	42000	3.7	0.85	α'		3—5		3.5
Лейкоциты морской свинки [25]	45000	3.2				2—4		1.0
Мозг крысы [26]	47000—50000	3.2	0.33					
Яйца морского ожа [27]				β, γ	0.07	4—5	9.6	2.1
Кровяные пластинки человека [28]	44000—46000	3.1	0.9	β, γ	0.09	2—3	9.6	1.3
Печень крысы				β, γ	0.08		9.6	
Скелетные мышцы кролика [17, 18]	42000	3.2—3.5	1.0	α	0.03	20	7.1	7—10

Основные свойства миозинов из немышечных сократительных систем
(по данным [20, 34])

Источники миозина	М. в.	S_w^0	Субъединичный состав	Ca^{2+} — АТФаза μ моль \times \times мин ⁻¹ · мг ⁻¹	Степень активирования АТФазы активом скелетных мышц кролика
<i>Physarum polycephalum</i>	460000	6.0	225000 21000 17000	2.0	40
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	180000		170000 17500 17000	0.83	20—100 (в присутствии кофактора) 9
Фибробласты мышц		6.3	200000		
Лейкоциты морской свинки		6.0	200000	0.1	3—4
Кровяные пластинки	542000— 450000	6.8—6.0	200000 19000 16000	0.4	3.5
Мозг крысы		6.0			3
Яйца морской звезды			210000 20000 17000	0.4	Нет активации
Скелетные мышцы кролика	510000	6.4	200000 25000 19000 16000		до 200

ливаться не будем. В настоящем обзоре речь пойдет об изменении в ходе миогенеза основных сократительных белков — миозина, актина, тропомиозина, тропонина. Важнейшие свойства этих белков приведены в табл. 1 и 2 (подробные обзоры см. [17, 18]).

В работах последнего десятилетия установлено, что с деятельностью основных сократительных белков связаны не только сокращение мышц и разнообразные движения клеток, но и секреция, передача медиаторов, деление клетки, некоторые стадии оплодотворения и т. д. [19, 20]. Из многих клеток и тканей актин и миозин выделены в достаточно чистом виде, что позволяет судить об их физико-химических свойствах.

Как следует из табл. 1, актины из немышечных сократительных систем сходны с актином скелетных мышц позвоночных по молекулярному весу, константе седиментации и наличию 3-метилгистидина. Существуют, однако, различия в первичной структуре актинов, выделенных из разных сократительных систем [31, 32]. Эти различия проявляются также при изоэлектрическом фокусировании (табл. 1). Кроме того, степень полимеризации этих белков и их способность активировать АТФазу миозина кролика ниже, чем у актина скелетной мускулатуры (табл. 1).

То же самое относится и к миозинам из немышечных сократительных систем (табл. 2). Эти миозины сходны с миозином скелетных мышц по молекулярному весу, константе седиментации, наличию АТФазной активности, способности к образованию биполярных агрегатов и взаимодействию с актином. Однако они отличаются от миозина скелетных мышц по субъединичному составу и величине АТФазной активности.

Таким образом, при очевидном качественном сходстве существует ряд различий между основными сократительными белками из мышц и немышечных двигательных систем, что позволяет рассматривать эти белки как два разных класса сократительных белков. При этом различия в аминокислотной последовательности указывают на то, что цитоплазматические и «саркомерные» белки являются продуктами разных генов [32, 33].

ИЗМЕНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ И СУБЪЕДИНИЧНОГО СОСТАВА СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ХОДЕ МИОГЕНЕЗА

Миобласты, одноядерные клетки-предшественники мышечных волокон, способны к синтезу ДНК и митотическому делению. Так же как все клетки, миобласты содержат значительное количество актина, миозина и тропомиозина [35, 36], которые относятся к классу немышечных сократительных белков. Синтез мышечных форм сократительных белков начинается после слияния миобластов в многоядерные миотубы. Наиболее четко это прослеживается при сравнении актинов на разных стадиях развития мышечной ткани.

Методом изоэлектрического фокусирования показано, что делящиеся миобласты до слияния содержат β - и γ -формы актина [35, 37, 38], характерные для актина немышечных сократительных систем (табл. 1). α -Форма актина, соответствующая актину зрелой скелетной мускулатуры, появляется в культуре клеток после слияния миобластов и ее количество увеличивается по мере созревания культуры [35, 38]. В эмбриональной мышечной ткани теленка β - и γ -формы актина содержатся уже только в следовых количествах, основная же масса актина представляет собой α -форму.

Аналогичные данные были получены при сравнении актинов из эмбриона цыпленка на разных стадиях развития. Слияние миобластов в скелетных мышцах эмбриона цыпленка происходит между 11-м и 18-м днями развития [39]. В соответствии с этим экстракты из мышц до 10-го дня развития содержат актин, подвижность которого при электрофорезе в градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и мочевиной выше, чем подвижность мышечного актина, но совпадает с подвижностью актина мозга [40]. По мере развития происходит накопление белка с подвижностью «взрослого» актина: экстракты из 14—16-дневного

эмбриона содержат две зоны, к 20-му дню развития — только «взрослый» актин.

Различия между α -, β - и γ -формам актина объясняются различиями в аминокислотной последовательности их N-концевых пептидов. N-концевой пептид актина скелетной мускулатуры кролика содержит 4 кислых аминокислотных остатка, в то время как в β - и γ -актинах их только 3 [31]:

α -актин: Асп-Глю-Асп-Глю-
 β -актин: Асп-Асп-Асп-
 γ -актин: Глю-Глю-Глю-

Замены аминокислот обнаружены не только в N-концевом, но и в других пептидах актина. Общее их количество достигает по крайней мере 25 [32].

Т а б л и ц а 3

Содержание 3-метилгистидина в актине скелетных мышц на разных сроках эмбриогенеза

Животные	Возраст (дни)	Количество 3-метилгистидина (остатки/моль)	Литературные источники
Кролик	28	0.75	[45]
Овца	130	0.7—0.8	[46]
Цыпленок	9	0.06	[43]
»	14	0.27	[43]
»	18	0.8	[43]

Различия в аминокислотной последовательности цитоплазматического и мышечного актинов указывают на то, что эти белки являются продуктами разных генов. Для подтверждения этого предположения был осуществлен синтез актина *in vitro* [41]. Оказалось, что на РНК из мозга синтезируется цитоплазматическая форма актина, на РНК из мышц 18-дневного эмбриона цып-

пленка — мышечный актин, а на РНК из мышц 13—16-дневного цыпленка — смесь обеих форм. Следовательно, при дифференцировке мышц функционируют по крайней мере 2 актиновых гена.

Вместе с тем существуют данные о посттрансляционных модификациях молекулы актина. Известно, в частности, что 3-метилгистидин-73 образуется в результате ферментативного процесса, при котором метильная группа S-аденозилметионина переносится на гистидин, уже встроенный в полипептидную цепь [42, 43]. Выделена специфическая метилаза, участвующая в этом процессе [44]. Содержание 3-метилгистидина в цитоплазматическом актине ниже, чем в актине скелетных мышц (табл. 1). По мере развития скелетных мышц содержание в них 3-метилгистидина повышается (табл. 3). Следовательно, возникновение по крайней мере некоторых изозимных форм актина может быть связано с модификациями его первичной структуры.

Миозин быстрых скелетных мышц содержит, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, 3 легких цепи (ЛЦ1, ЛЦ2 и ЛЦ3) с м. в. 25 000, 18 000 и 16 000 дальтон соответственно [47]. Этот миозин представляет собой смесь изозимов, каждый из которых содержит ЛЦ1 или ЛЦ3 и ЛЦ2 [48, 49].

Миозин миобластов содержит 2 легких цепи, совпадающие по м. в. с легкими цепями цитоплазматических миозинов (20 000 и 17 000 дальтон [20]), но отличающиеся от легких цепей миозина быстрых скелетных мышц [50]. Миозин мотуб также содержит две легких цепи, однако их м. в. равен 25 000 и 18 000 дальтон, т. е. соответствует м. в. ЛЦ1 и ЛЦ2 в одном из изомеров миозина быстрых скелетных мышц [50, 51]. Изомер, содержащий ЛЦ3, не синтезируется при дифференцировке мышечных клеток в культуре [51—53]. Однако он появляется после введения в миогенную культуру нейронов спинного мозга [53].

Мышечную форму миозина можно обнаружить уже в мышцах 11-дневного эмбриона цыпленка [54, 55]. На 14-й день развития в эмбриональной мышце цыпленка методом электрофореза в пирофосфатном буфере без детергентов обнаружен изомер миозина, в состав которого входят ЛЦ1, ЛЦ2 и ЛЦ3 [55]. Изомер миозина, содержащий ЛЦ2 и ЛЦ3, появляется за несколько дней до вылупления цыпленка [55—57], а в мышцах кроликов и крыс — уже после рождения [56]. По мере развития животных количество этого изомера возрастает [55—58], а количество изомера с ЛЦ1—ЛЦ2 уменьшается (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Корреляция между увеличением АТФазной активности миозина, содержанием ЛЦ3 [56] и ЗМеГис [46, 62]

Возраст	Ca ²⁺ -АТФаза миозина (%) *	ЛЦ3 (%) **	ЛЦ1 (%)	ЛЦ2 (%)	Содержание ЗМеГис (остатки/моль)
Кролик:					
20-дневный эмбрион	28	—	56	44	—
26-дневный эмбрион	45	1	46	53	—
30-дневный эмбрион	51	7	38	55	нет
10 дней					0.4
21 день					0.5
взрослый	100	19	26	55	1.8
Крысы:					
новорожденные	80	5	39	56	—
взрослые	100	16	30	54	—

* Ca²⁺-АТФаза миозина рассчитана по отношению к Ca²⁺-АТФазе «взрослого» миозина, принятой за 100%.

** Содержание каждой из ЛЦ рассчитано по отношению к суммарному содержанию ЛЦ в данном препарате миозина, принятому за 100%.

При электрофорезе в пирофосфатном буфере без детергентов эмбриональные формы миозина движутся с большей скоростью, чем взрослые. Так как легкие цепи этих изомеров идентичны, разница в подвижности связана, по-видимому, с различием тяжелых цепей, что подтверждается анализом их пептидных карт. Пептиды,

образующиеся при обработке тяжелых цепей «эмбрионального» миозина цианогенбромидом, отличаются по подвижности в двумерном электрофорезе от пептидов «взрослого» миозина [59].

К аналогичным результатам приводит обработка миозина протеазамп: фрагменты «эмбрионального» миозина отличаются по молекулярному весу от полученных в тех же условиях фрагментов «взрослого» миозина, что указывает на различия в расположении чувствительных к действию протеаз аминокислотных остатков [60, 61]. Различны также картины тонкой перподпичности паракристаллов легкого меромиозина, полученного из «взрослого» и «эмбрионального» миозинов кролика [60].

Кроме того, известно, что аминокислотная последовательность 3-метилгистидин-содержащего пептида эмбрионального миозина отличается от аминокислотной последовательности аналогичного пептида, выделенного из субфрагмента-1 тяжелого меромиозина быстрых скелетных мышц кролика [62]:

взрослый:	Лей-Лей-Гли-Сер-...-Вал-3МеГис-Гли-
эмбриональный:	Лей-Лей-Ала-Сер-...-Илей-Гис-Гли-

Различия в структуре тяжелых цепей миозина являются, по-видимому, причиной того, что ЛЦЗ «взрослого» миозина не связываются с «эмбриональным» миозином, содержащим ЛЦ1 и ЛЦ2 [63], в то время как обмен легкими цепями между миозинами «взрослого» миозина вполне возможен [64].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что во время дифференцировки быстрых скелетных мышц существуют по крайней мере три изоформа миозина — цитоплазматический и два «саркомерных». Кроме того, ряд фактов указывает на наличие специфической эмбриональной формы миозина, обнаруживаемой на очень ранних стадиях развития.

Миозин, выделенный из первичной культуры мышечных клеток крысы или миогенных клеток линии L₆, содержит не только ЛЦ1 и ЛЦ2, но и дополнительный белковый компонент, сходный с ЛЦ1, но обладающий по сравнению с ним меньшей подвижностью при диск-электрофорезе в присутствии додецилсульфата патрия и более низкой изоэлектрической точкой [65]. Синтез этого белка (ЛЦ1_{эмбр.}) начинается только после слияния миобластов в миотубы и снижается через несколько дней после слияния. ЛЦ1_{эмбр.} содержится также в мышечной ткани 20-дневного эмбриона крысы. По мере развития крыс количество ЛЦ1_{эмбр.} уменьшается, и к 12-му дню постнатальной жизни они полностью исчезают [66]. В первичной культуре мышечной ткани крыс обнаружена также специфическая эмбриональная форма тяжелых цепей миозина, отличная от тяжелых цепей «взрослого» типа по чувствительности к протеолизу и иммунохимическим свойствам [67].

Обиата разделил миозин эмбриона цыпленка на два компонента с константами седиментации 3.4S и 6.7S [68, 69]. Оба компо-

лента неразличимы при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия и при седиментации в гуанидингидрохлориде, т. е. в условиях, в которых белок диссоциирует на субъединицы. Наблюдение 3.4S-компонента под электронным микроскопом показало, что он представляет собой «одноголовую» молекулу миозина — фрагмент, получающийся при расщеплении миозина вдоль длинной оси [70]. По-видимому, 3S-компонент — это форма миозина, функционирующая на очень ранних стадиях развития. Интересно, что «одноголовый» миозин обнаружен также в немышечной сократительной системе, а именно в цитоплазме амебы *Acanthamoeba castellanii*. Этот белок состоит из одной тяжелой цепи и двух легких и имеет м. в. 18 000 дальтон [71, 72].

Немышечный миозин, эмбриональная форма миозина и изозим, содержащий набор легких цепей ЛЦ1—ЛЦ2, синтезируются, по-видимому, на разных генах. Возможно, существует также структурный ген, направляющий синтез изозима, содержащего ЛЦ2—ЛЦ3 [73, 74]. Однако этому предположению противоречат данные о том, что 3-метилгистидин образуется в результате метилирования гистидина, после того как синтез полипептидной цепи завершен [46, 62]. Кроме того, ЛЦ3 миозина гомологична ЛЦ1 по аминокислотной последовательности и отличается от нее только концевым пептидом, состоящим из 41 аминокислотного остатка [75]. Поэтому можно предположить, что последняя смена изозимных форм миозина происходит путем посттрансляционных модификаций.

Тропомиозин миобластов, так же как тропомиозин миотуб, содержит α - и β -субъединицы. Оказалось, однако, что при изоэлектрическом фокусировании β -цепи тропомиозина разделяются по крайней мере на два компонента — β_1 и β_2 [76]. Компонент β_1 присутствует в клонированной культуре миогенных клеток на всех стадиях развития. Обладающий более высокой изоэлектрической точкой компонент β_2 специфичен для дифференцирующейся культуры клеток, его синтез усиливается после слияния миобластов. РНК, выделенная до и после слияния миобластов, направляет соответственно синтез β_1 - и β_2 -компонентов тропомиозина, т. е. эти компоненты, по-видимому, кодируются разными генами [76].

В эмбриональной мышечной ткани кролика содержание β -тропомиозина примерно в 2 раза выше, чем содержание α -тропомиозина. В течение нескольких дней до рождения относительное количество α -тропомиозина быстро увеличивается, а затем изменяется довольно медленно, достигая соотношения $\alpha : \beta = 4 : 1$, характерного для зрелых скелетных мышц, к 30-му дню после рождения [77]. Известно, что быстрые скелетные волокна позвоночных содержат α -тропомиозин, в то время как β -тропомиозин локализован в медленных волокнах [78, 79]. Наличие обеих форм тропомиозина в эмбриональных мышечных клетках свидетельствует о том, что соотношение между α - и β -тропомиозинами,

характерное для «зрелой» мускулатуры, устанавливается на более поздних стадиях развития.

Таким образом, переход от миобластов к миотубам представляет собой тот этап дифференцировки, на котором начинается синтез сократительных белков мышечного типа. Хотя ряд имеющихся в литературе данных свидетельствует о том, что новые формы сократительных белков могут возникать в результате посттрансляционных модификаций, более вероятным является представление о включении на этом этапе дифференцировки новой группы генов. Возможно, слияние миобластов сопровождается активированием хромосомной единицы высшего порядка, в результате чего запускается координированный синтез новых форм не только актина, миозина и тропомиозина, но и таких белков, как креатинфосфокиназа или миоглобин [51, 80].

Следующий этап дифференцировки, также приводящий к появлению новых форм сократительных белков, и в частности к появлению новых изоформ миозина, связан с иннервацией мышечной ткани. Как уже упоминалось, исследования на культуре тканей показали, что после добавления клеток спинного мозга в миогенную культуру препараты миозина содержат ЛЦЗ, не обнаруживаемую в миозине из миотуб, выращенных *in vitro* без добавления нервных клеток [63]. Следствием иннервации может быть и изменение в соотношении между α - и β -цепями тропомиозина [77, 79]. Новые формы сократительных белков на этом этапе дифференцировки появляются, по-видимому, не только в результате изменения активности генов, но и путем посттрансляционных модификаций. Подробнее механизмы трофического влияния нервной системы на развитие скелетной мускулатуры рассматриваются в других статьях настоящего сборника.

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ХОДЕ МИОГЕНЕЗА

В первой части обзора было показано, что сократительные белки, выделенные на разных стадиях развития, различаются по первичной структуре и субъединичному составу. Параллельно происходит изменение функциональных свойств актина, миозина и тропомиозина. Во второй части мы остановимся на этих свойствах, сопоставляя их с различиями в первичной структуре сравниваемых белков, с одной стороны, и с физиологическими и ультраструктурными особенностями мышц — с другой.

Миозин

К основным функциональным свойствам миозина относятся его способность расщеплять АТФ, взаимодействовать с актином и образовывать *in vitro* биполярные агрегаты. Как изменяются эти свойства в ходе миогенеза?

Данные об изменении АТФазной активности миозина очень противоречивы. В большинстве работ показано, что АТФазная активность миозина на ранних стадиях развития ниже АТФазной активности «взрослого» миозина [56, 68, 81—86]. Уровень АТФазы, характерный для миозина зрелой мускулатуры, достигается у разных животных в разные сроки развития: у зрелорождающихся цыпленка и морской свинки перед рождением или при рождении, у незрелорождающихся кроликов и крыс значительно позже. В ходе онтогенеза возрастает также АТФазная активность натурального актомиозина [7, 15, 85, 87] и синтетического актомиозина, реконструированного из «взрослого» актина и миозина, выделенного на разных стадиях развития [85]. По-видимому, по мере дифференцировки мышц увеличивается скорость стимулированного Ф-актином расщепления комплекса миозин—АДФ—неорганический фосфат, что приводит к увеличению общей скорости реакции гидролиза АТФ [85].

Известно, что на ранних стадиях развития все мышцы являются медленными. С возрастом животного уменьшается время укорочения мышц, полупериод расслабления и интервал между импульсами, необходимый для получения гладкого тетануса [88, 89]. Таким образом, увеличение АТФазной активности миозина и актомиозина (увеличение скорости расщепления АТФ) коррелирует с увеличением скорости сокращения мышц в ходе онтогенеза и, возможно, является одним из критических факторов в этом процессе. Такая корреляция, в частности, обнаружена между скоростью сокращения мышц разных типов и АТФазной активностью выделенных из них миозинов [90].

Два изменения в структуре молекулы могут быть причиной увеличения АТФазной активности миозина: увеличение содержания 3-метилгистидина и появление третьей легкой субъединицы—ЛЦ3 (табл. 4). Возможно, изоэнзим миозина, содержащий 3-МеГис и (или) набор легких цепей ЛЦ2—ЛЦ3, обладает большей АТФазной активностью, чем изоэнзим, содержащий гистидин и ЛЦ1—ЛЦ2. Однако в настоящее время нет достаточно убедительных данных, подтверждающих это предположение.

Субфрагменты-1 тяжелого меромиозина, содержащие ЛЦ1 и ЛЦ3, в отсутствие актина имеют одинаковую АТФазную активность [64, 91]. Нет также различий в зависимости Ca^{2+} -АТФазы этих субфрагментов от рН и температуры [91]. Вместе с тем некоторые эксперименты указывают на то, что изоэнзимы миозина, содержащие ЛЦ1—ЛЦ2 и ЛЦ3—ЛЦ2, по-разному взаимодействуют с актином. Так, константа связывания актина субфрагментом-1 тяжелого меромиозина, содержащим ЛЦ1, выше, чем аналогичная константа для субфрагмента-1, содержащего ЛЦ3 [91]. Кроме того, актин-активируемая АТФаза субфрагмента-1, содержащего ЛЦ3, имеет большую максимальную скорость и более высокую величину K_m , чем АТФаза субфрагмента-1, содержащего ЛЦ1 [64]. В реакции взаимодействия актина с субфрагментом-1 тяжелого

меромозиона, в которой актин рассматривается как субстрат, описанные константы характеризуют скорость отсоединения актина от субфрагмента-1. Большие значения констант свидетельствуют о том, что актин-активируемое расщепление АТФ происходит быстрее, если в реакции участвует изозим, содержащий ЛЦЗ.

Относительно изменения способности миозина к структурообразованию известно очень мало. Уже упоминавшиеся различия в картине исчерченности паракристаллов легких меромозионов, полученных из «эмбрионального» и «взрослого» миозинов, могут быть отражением изменений в первичной структуре миозина. Однако неясно, существует ли связь между этими особенностями структуры миозина и морфологией толстых нитей.

Известно, что миозины из немусечных сократительных систем образуют *in vitro* биполярные агрегаты, но не способны к формированию длинных нитей, характерных для миозина зрелой скелетной мускулатуры [20]; для получения таких нитей нужны специальные условия [92]. Возможно, изменения первичной структуры и субъединичного состава молекулы миозина в ходе миеогенеза идут в направлении «усиления» способности к образованию структур. Не исключено, однако, что существование длинных агрегатов миозина в скелетной мускулатуре связано с появлением дополнительных белковых компонентов.

Актин

Все актины — и цитоплазматические, и «саркомерный» — полимеризуются при соответствующей ионной силе раствора, а образовавшийся фибриллярный актин специфически взаимодействует с миозином, активируя его Mg^{2+} -зависимую АТФазу.

Полимеризация актина представляет собой трехступенчатый процесс, первая стадия которого — образование зародышей полимеризации — зависит от концентрации белка в растворе и начинается только при концентрации актина, превышающей определенный критический уровень [93, 94]. На следующих стадиях полимеризации происходит рост зародышей и рекомбинация образовавшихся фрагментов [95]. Степень полимеризации актина зависит от условий в растворе и от свойств самого актина. Таким образом, о способности актина к полимеризации в данных условиях можно судить по двум параметрам — критической концентрации и степени полимеризации, которую определяют по величинам характеристической вязкости или двойного лучепреломления в потоке.

Оказалось, что критическая концентрация для полимеризации β - и γ -актинов выше, чем критическая концентрация α -актина (табл. 1). Как уже упоминалось, β - и γ -формы актина обладают меньшей величиной характеристической вязкости, чем α -актин (табл. 1). Эти различия проявляются и на более поздних стадиях развития. Актин из мышц новорожденного кролика отличается

от «взрослого» актина по степени полимеризации: вязкость растворов актина новорожденного кролика ниже, а угол ориентации молекул в потоке выше, чем в аналогичных препаратах актина взрослого кролика. По-видимому, в ходе мюгенеза способность актина к полимеризации увеличивается [96].

Сократительные аппараты многих мышечных клеток являются временными; они возникают в определенные моменты жизнедеятельности клетки, а затем исчезают [19, 97]. Необходимое условие существования таких систем — быстрая сборка и разборка актиновых микрофиламентов, т. е. легкость $G \rightleftharpoons F$ переходов. Многофибриллы мышечных волокон представляют собой постоянную сократительную систему, а тонкие (актиновые) нити многофибрилл в отличие от микрофиламентов деполимеризуются с трудом [98]. Увеличение полимеризуемости α -актина по сравнению с β - и γ -актинами может затруднить деполимеризацию и способствовать закреплению стабильной полимерной формы актина — той формы, в которой актин находится в многофибриллах.

Возможно, на ранних этапах развития существуют более короткие нити актина. Так, тонкие нити, выделенные из мышц 14-дневного эмбриона цыпленка, короче тонких нитей из многофибрилл взрослого животного [99]. Было также показано, что терминальные саркомеры растущих мышц рыбы и тонкие нити в этих саркомерах короче обычных. По мере удлинения саркомера происходит удлинение тонких нитей [100].

Центр полимеризации актина близок к N-концу, и, по-видимому, включает участок полипептидной цепи от Гис-40 до Три-74 [101, 102]. Различия в N-концевой последовательности α -, β - и γ -актинов и метилирование Гис-73 изменяют общий заряд молекулы актина и степень гидрофобности активного центра, связанного с полимеризацией, и могут, таким образом, приводить к изменениям в способности актина к полимеризации.

Нужно, однако, учитывать, что различия в критической концентрации и характеристической вязкости растворов актина могут быть связаны с присутствием в препаратах минорных белков, препятствующих полимеризации актина. Так, дополнительная очистка актина плазмодия миксоциета *Physarum polycephalum* привела к удалению из препарата минорного белка актинина. При этом актин плазмодия перестал отличаться от мышечного актина по физико-химическим свойствам [103, 104]. Аналогичные данные получены для актина из амебы *Dictyostelium discoideum* [30].

Усиление способности актина взаимодействовать с мюзином, активируя его АТФазу, не связано с увеличением степени полимеризации актина. Тем не менее эти свойства изменяются параллельно. И β - и γ -актины из мышечных сократительных систем в меньшей степени активируют АТФазу мюзина кролика, чем α -актин (табл. 1). То же самое относится и к γ -актину гладких мышц, который напоминает по физико-химическим свойствам актин новорожденного кролика [105].

Тропомозин-тропоинновый комплекс

Тонкие нити в мышечных волокнах 14-дневного эмбриона цыпленка содержат тропомозин и тропоинн в соотношении $TN : T : TN : C : TM = 1 : 1 : 1 : 2$ [99]. Судя по величине АТФазной активности синтетического актомозина, к которому добавлен этот комплекс, он так же чувствителен к ионам Ca , как тропомозин—тропоинновый комплекс из мышц взрослого животного [106].

С другой стороны, при исследовании натурального актомозина цыпленка было показано, что как связывание Ca^{2+} , так и чувствительность его к Ca^{2+} низки вплоть до 11-го дня инкубации и быстро достигают «взрослого» уровня между 12-м и 16-м днями развития [107]. В актомозине из мышц крысы период формирования Ca^{2+} -чувствительной системы продолжается не только в течение раннего постнатального развития, но и значительно позднее [108]. Связаны ли эти изменения со сменой форм сократительных белков в ходе миогенеза, остается неясным.

В литературе нет также данных о свойствах миорных сократительных белков на разных стадиях миогенеза.

Таким образом, сократительные белки, синтез которых начинается после слияния миобластов, отличаются от цитоплазматических сократительных белков не только по химическим, но и по функциональным свойствам. Существует ли корреляция между этой «эволюцией» сократительных белков и функциональными изменениями сократительного аппарата в ходе миогенеза? Данные, приведенные выше, могут свидетельствовать о том, что такая корреляция есть. Так, замена временных сократительных аппаратов, собирающихся и разбирающихся в зависимости от нужд клетки, на постоянный упорядоченный миофибриллярный сократительный аппарат, возможно, основана на усилении способности актина и миозина к образованию нитей.

Увеличению скорости сокращения мышц в ходе миогенеза способствуют увеличение АТФазной активности миозина, усиление способности миозина взаимодействовать с актином и способности актина активировать АТФазу миозина.

Однако можно рассмотреть эти данные с другой точки зрения. Различия в АТФазной активности миозинов и в степени полимеризации актинов могут быть следствием меньшей устойчивости «эмбриональных» белков к повреждающим воздействиям. В ряде работ показано, что эмбриональный миозин не отличается от миозина зрелых скелетных мышц по величине АТФазной активности [109—111]. Противоречие между разными данными может быть обусловлено частичной потерей «эмбриональным» миозином АТФазной активности из-за более быстрого окисления SH-групп [112], т. е. меньшей стабильностью миозина, выделенного на ранних стадиях развития.

Существенно также, что меньшая вязкость растворов актина

может быть результатом не только меньшей степени полимеризации, но и большего количества инактивированного актина в препаратах, выделенных на ранних стадиях развития. Действительно, актин новорожденного кролика менее устойчив к перевариванию трипсином, а при хранении инактивируется быстрее, чем актин взрослого кролика [113]. Может вызывать возражение и интерпретация результатов экспериментов по активированию актином АТФазы миозина. Невысокая степень активирования получается в опытах, в которых АТФаза цитоплазматического или «эмбрионального» миозина активируется актином кролика или, наоборот, цитоплазматический актин активирует АТФазу мышечного миозина. Слабый эффект, достигаемый в этих случаях (табл. 2), может быть связан не столько со свойствами актина и миозина, сколько с плохой совместимостью белков в гибридных комплексах. В пользу этого предположения можно привести данные о том, что тропомиозин мозга взаимодействует с актином скелетных мышц слабее, чем мышечный тропомиозин [114].

Следовательно, имеющиеся в настоящее время данные позволяют выдвинуть два предположения. Либо сократительные белки в ходе миогенеза изменяются в направлении, способствующем большей эффективности работы сократительного аппарата, либо изменения структуры основных сократительных белков скоординированы в пределах группы, характерной для каждого сократительного аппарата, но не носят адаптивного характера. Хотя первое из этих предположений кажется более обоснованным, для его подтверждения нужны дополнительные эксперименты.

В заключение следует коротко остановиться еще на одной гипотезе. Функциональные свойства мышц в ходе миогенеза могут изменяться не только в результате изменения свойств основных сократительных белков, но и из-за появления новых белков, играющих регуляторную роль [115]. Существует несколько работ, в которых исследовался состав сократительных белков в дифференцирующихся мышечных клетках в культуре [35, 36, 116, 117]. Качественно состав белков после слияния миобластов меняется слабо [35]. Отмечают, однако, появление новых полипептидных цепей, в частности белка с м. в. 55 000 дальтон [35, 116]. По-видимому, необходимо специальное исследование сократительных белков на разных стадиях миогенеза, направленное на изучение не столько основных, сколько минорных белков миофибрилл.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Иванов И. И., Касавина Б. С. — ДАН СССР, 1948, 60 : 417.
- [2] Касавина Б. С. — Вопр. мед. химии, 1950, 2 : 165.
- [3] Касавина Б. С. — Вопр. мед. химии, 1952, 4 : 189.
- [4] Касавина Б. С. — Тр. Всесоюз. общ-ва физиол., биол. и фармакол., 1954, 2 : 151.
- [5] Иванов И. И., Юрьев В. А. Биохимия и патобиохимия мышц. Л., Медгиз, 1961.
- [6] Иванов И. И., Жахова З. Н., Зиновьев И. П., Ми-

- рович Н. П., Моисеева В. П., Паршина Э. А., Тукачинский С. Е., Юрьев В. А. — Биохимия, 1959, 24 : 451.
- [7] Пинаев Г. П. — Биохимия, 1965, 30 : 20.
- [8] Иванов И. И., Юрьев В. А., Кадыков В. В., Крымская Б. М., Моисеева В. П., Тукачинский С. Е. — Биохимия, 1956, 21 : 591.
- [9] Иванов И. И., Юрьев В. А., Кадыков В. В., Крымская Б. М., Моисеева В. П., Тукачинский С. Е. — ДАН СССР, 1956, 111 : 649.
- [10] Кадыков В. В. — Укр. биохим. журн., 1960, 32 : 849.
- [11] Кадыков В. В. Изменение фракционного состава белков скелетной мускулатуры в онтогенезе. Автореф. дис. Л., 1961.
- [12] Сгерах Р. — Biochim. biophys. acta, 1952, 9 : 385.
- [13] Robinson D. S. — Biochem. J., 1952, 52 : 628.
- [14] Robinson D. S. — Biochem. J. 1952, 52 : 621.
- [15] Ohshima V., Maruyama K., Noda H. — In: Molecular biology of muscle contraction. Tokyo, 1965 : 132.
- [16] Mooseker M. S., Tilney L. G. — J. Cell Biol., 1975, 67 : 725.
- [17] Заалишвили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности. Тбилиси, Мецниереба, 1971.
- [18] Taylor E. W. — Crit. Rev. Biochem., 1979, 6 : 103.
- [19] Clarke M., Spudich J. A. — Ann. Rev. Biochem., 1977, 46 : 797.
- [20] Korn E. D. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75 : 588.
- [21] Hatano S., Totsuka F., Oosawa F. — Biochim. biophys. acta, 1967, 140 : 109.
- [22] Wehning R. R., Korn E. D. — Biochemistry, 1971, 10 : 590.
- [23] Wooley D. E. — Arch. Biochem. Biophys., 1972, 150 : 519.
- [24] Spudich J. A. — J. Biol. Chem., 1974, 249 : 6013.
- [25] Tatsumi N., Shibata N., Okamura V., Takachi K., Senda M. — Biochim. biophys. acta, 1973, 305 : 433.
- [26] Puszkin S., Berl S. — Biochim. biophys. acta, 1972, 256 : 695.
- [27] Miki-Nomura T., Kondo H. — Exper. Cell Res., 1970, 61 : 31.
- [28] Boose F. R., Hoverer T. P., Rafelson M. E. — J. Biol. Chem., 1973, 248 : 4083.
- [29] Zechel K., Weber K. — Eur. J. Biochem., 1978, 89 : 105.
- [30] Uyemura D. E., Brown S. S., Spudich J. A. — J. Biol. Chem., 1978, 253 : 9088.
- [31] Vandekerckhove J., Weber K. — Eur. J. Biochem., 1978, 90 : 451.
- [32] Vandekerckhove J., Weber K. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75 : 1106.
- [33] Elzinga M., Maron B. J., Adelstein R. S. — Science, 1976, 191 : 194.
- [34] Красовская И. Е. — В кн.: Движение немышечных клеток и их компонентов. Л., Наука, 1977 : 22.
- [35] Whalen R. G., Butler-Brown G. S., Geros F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 2018.
- [36] Ha D. B., Boland R., Martonosi A. — Biochim. biophys. acta, 1979, 585 : 165.
- [37] Garrels J. I., Gibson W. — Cell, 1976, 9 : 793.
- [38] Rubinstein P. A., Spudich J. A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 120.
- [39] Marchock A. C., Herrmann H. — Develop. Biol., 1967, 15 : 129.
- [40] Storti R. V., Coen D. M., Rich A. — Cell, 1976, 8 : 512.
- [41] Storti R. V., Rich A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 7 : 2346.
- [42] Asatoor A. M., Armstrong M. D. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 26 : 168.

- [43] Krzysik B., Vergnes J. O., McManus I. R. — Arch. Biochem. Biophys., 1971, 146 : 34.
- [44] Hardy M., Harris C. J., Stone D. — Biochem. Soc. Transact., 1973, 1 : 861.
- [45] Johnson P., Harris C. I., Perry S. V. — Biochem. J., 1967, 105 : 361.
- [46] Kuehl W. M., Adelstein R. S. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 39 : 959.
- [47] Weeds A. G., Lowey S. — J. Mol. Biol., 1971, 61 : 701.
- [48] Weeds A. G., Hall R., Spurway N. C. — FEBS Letters, 1975, 49 : 320.
- [49] Halt I. C., Lowey S. — Biochemistry, 1977, 16 : 4398.
- [50] Jen Chi C. H., Rubinstein N. A., Strahs K., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1975, 67 : 523.
- [51] Devlin R. B., Emerson C. P. — Cell, 1978, 13 : 599.
- [52] Rubinstein N. A., Holtzer H. — Nature, 1979, 280 : 323.
- [53] John H. A., Jones K. W. — III Intern. congress on muscle diseases. Excerpta Medica. Intern. Congress Series, No. 334; Amsterdam, 1974 : 112.
- [54] Rubinstein N. A., Pepe F. A., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1977, 74 : 4524.
- [55] Hoh J. F. Y. — In: Abstr. 6th Intern. biophys. congress. Kyoto, 1978 : 157.
- [56] Syrov I. — Intern. J. Biochem., 1979, 10 : 223.
- [57] Obinata T., Masaki T., Takanoh H. — In: Abstr. 6th Intern. biophys. congress. Kyoto, 1978 : 157.
- [58] Perzanowska A. — Compar. Biochem. Physiol., 1979, 63B : 189.
- [59] Hoh J. F. Y., Yeon G. P. S. — Nature, 1979, 280 : 321.
- [60] Sreter F. A., Balint M., Gergely J. — Develop. Biol., 1975, 46 : 317.
- [61] Rushbrook J. I., Srtacher A. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 4331.
- [62] Huszar G. — Nature New Biology, 1972, 240 : 260.
- [63] Takahashi M. — J. Biochem., 1972, 80 : 621.
- [64] Wagner P. D., Weeds A. G. — J. Mol. Biol., 1977, 109 : 455.
- [65] Whalen R. G., Butler-Browne G. S., Gros F. — J. Mol. Biol., 1978, 126 : 415.
- [66] Whalen R. G., Butler-Browne G. S., Sell S., Gros F. — Biochimie, 1979, 61 : 625.
- [67] Whalen R. G., Schwarz K., Bouveret P., Sell S., Gros F. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 5197.
- [68] Obinata T., Maruyama K. — In: Abstr. 7th Intern. congress Biochem., Tokyo, 1967, 1-14 : 916.
- [69] Obinata T. — Arch. Biochem. Biophys., 1969, 132 : 184.
- [70] Obinata T., Takahashi M. — J. Biochem., 1974, 75 : 1183.
- [71] Polard T. D., Korn E. D. — J. Biol. Chem., 1973, 248 : 4682.
- [72] Maruta H., Gadashi H., Collins J. H., Korn E. D. — J. Biol. Chem., 1978, 253 : 6297.
- [73] Jablonska Z., Yaffe D. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 4599.
- [74] Jablonska Z., Yaffe D. — Differentiation, 1977, 8 : 133.
- [75] Frank G., Weeds A. G. — Eur. J. Biochem., 1974, 44 : 317.
- [76] Carmon Y., Neuman S., Yaffe D. — Cell, 1978, 14 : 393.
- [77] Amphlett G. W., Suska H., Perry S. V. — FEBS Letters, 1976, 63 : 22.
- [78] Cummins P., Perry S. V. — Biochem. J., 1974, 141 : 251.
- [79] Dhoot G. K., Perry S. V. — Nature, 1979, 278 : 714.
- [80] Holtzer S. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 37 : 527.
- [81] Barany M., Tucci A. F., Barany R., Volpe A., Richard T. — Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111 : 727.

- [82] Trayer I. P., Perry S. V. — *Biochem. Z.*, 1966, 345 : 87.
- [83] Jablęcki C., Kaufman S. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248 : 1056.
- [84] John H. A. — *FEBS Letters*, 1974, 39 : 278.
- [85] Takahashi T., Tonomura Y. — *J. Biochem.*, 1975, 78 : 1123.
- [86] Syrový J. — *Intern. J. Biochem.*, 1979, 10 : 383.
- [87] Drachman D. B., Johnston D. M. — *J. Physiol.*, 1973, 234 : 29.
- [88] Buller A. J., Eccles J. C., Eccles R. M. — *J. Physiol.*, 1960, 150 : 399.
- [89] Close R. — *J. Physiol.*, 1964, 173 : 74.
- [90] Barany M. — *J. Gen. Physiol.*, 1967, 6, part 2 : 197.
- [91] Matsuda S., Yoshimura M., Yagi K. — In: *Abstr. 6th Intern. biophys. congress. Kyoto, 1978*, 156.
- [92] Hissen H., D'Haese J., Small J. V., Sobieszek A. — *J. Ultrastr. Res.*, 1978, 64 : 282.
- [93] Kasai M., Asakura S., Oosawa F. — *Biochim. biophys. acta*, 1962, 57 : 13.
- [94] Kasai M., Asakura S., Oosawa F. — *Biochim. biophys. acta*, 1962, 57 : 22.
- [95] Oosawa F. — *J. Theor. Biol.*, 1970, 27 : 69.
- [96] Хайтлина С. Ю., Пинаев Г. П. — *Биохимия*, 1976, 41 : 787.
- [97] Hitchcock S. E. — *J. Cell Biol.*, 1977, 74 : 1.
- [98] Hama H., Maruyama R., Noda H. — *Biochim. biophys. acta*, 1965, 102 : 249.
- [99] Obinata T., Hayashi I., Fischman D. A. — *Develop. Growth, Different.*, 1974, 2 : 105.
- [100] Schattenberg P. J. — *Z. Zellforsch.*, 1973, 143 : 587.
- [101] Hegyi G., Premecz G., Sain B., Wuhlrad A. — *Eur. J. Biochem.*, 1974, 44 : 7.
- [102] Elzinga M., Collins J. H., Kuchl W. M., Adelstein R. S. — *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1973, 70 : 2687.
- [103] Hatano S., Owaribe K. — In: *Cell Motility. Cold Spring Harbor Conf.*, 1976 : 499.
- [104] Hatano S., Owaribe K. — *Biochim. biophys. acta*, 1979, 579 : 200.
- [105] Strzelecka-Golaszewska H., Novak E., Smorzynski S., Drabikowsky W. — In: *Proc. 7th Europ. conf. muscle and motility. Warsaw, 1978* : 105.
- [106] Roy R. K., Potter J. D., Sarcar S. — *Biophys. J.*, 1975, 15 : 37a.
- [107] Hitchcock S. — *Develop. Biol.*, 1970, 23 : 399.
- [108] Ermini M., Schaub M. C. — *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1968, 349 : 1266.
- [109] Baril E. F., Herrmann H. — *Develop. Biol.*, 1967, 15 : 318.
- [110] Dow J., Stracher A. — *Biochemistry*, 1971, 10 : 1316.
- [111] Sreter F., Holtzer S., Gergely J., Holtzer H. — *J. Cell Biol.*, 1972, 55 : 586.
- [112] Dow J., Stracher A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68 : 1107.
- [113] Хайтлина С. Ю., Пинаев Г. П. — *Биофизика*, 1976, 21 : 495.
- [114] Novak E., Drabikowsky W. — In: *Proc. 7th europ. conf. muscle and motility. Warsaw, 1978* : 109.
- [115] Пинаев Г. П. — В кн.: *Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981* : 75.
- [116] Storti R. V., Horovitch S. J., Scott M. P., Rich A., Pardue M. L. — *Cell*, 1978, 13 : 589.
- [117] Allen R. E., Stromer M. H., Goll D. E., Robson R. M. — *Develop. Biol.*, 1979, 69 : 655.

С. Н. ЛЫЗЛОВА

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ РАЗВИВАЮЩИХСЯ МЫШЦ

Кафедра биохимии
Ленинградского государственного университета им. А. А. Жданова

ВВЕДЕНИЕ

Развитие энергетического обеспечения мышц — это становление тех процессов, в ходе которых накапливается АТФ. Хорошо известно, что такими процессами являются гликолиз (гликогенолиз), превращение лимонной кислоты, окислительное фосфорилирование. Химическая энергия, необходимая для функционирования мышц, освобождается непосредственно при гидролизе АТФ. Потенциальная химическая энергия в мышцах хранится в виде гуанидинфосфатов (аргининфосфата и креатинфосфата у беспозвоночных * и только креатинфосфата у позвоночных). Восполнение растрчиваемого при мышечной деятельности запаса АТФ может происходить в результате легко обратимых гуанидинкиназной и аденилаткиназной реакций.

В настоящее время не всегда представляется возможным установить, какая часть энергии тратится на деление, рост и жизнедеятельность развивающихся клеток, а какая на синтез тканеспецифических белков и других веществ. Вместе с тем имеются данные о том, что между делением клеток и синтезом тканеспецифических белков существует определенный антагонизм. Например, образование дефинитивных сократительных белков, в частности актина и миозина, становится возможным лишь после прекращения деления миобластов и их слияния в миотубы.

Становление реакций энергетического обмена в мышечной ткани при ее развитии может быть прослежено как *in vivo* (на разных стадиях эмбриогенеза), так и *in vitro* (на разных стадиях развития однослойной культуры мышечных клеток). Следует заметить, что в литературе имеется много противоречий, касающихся сроков появления отдельных ферментов и их субстратов в ходе эмбрионального развития разных животных. Эти противоречия могут быть объяснены рядом причин. Одна из них

* У ряда беспозвоночных имеются гуанидинфосфаты специфической химической природы [1].

заключается в разнóй чувствительности используемых авторами методов для установления содержания одного и того же вещества. По меткому выражению Муга [2], не ферменты отсутствуют на отдельных стадиях эмбрионального развития животных, а чувствительные методы их определения. Другая причина — различная скорость образования мышечной ткани в разных отделах эмбрионов. Так, например, на 5-е сут развития куриного зародыша в зачатках туловищной мускулатуры уже происходит формирование мышечных трубок; мышечная же ткань конечностей в этот период еще только начинает дифференцироваться; следовательно, биохимическая характеристика туловищной области зародыша и конечностей на 5-е сут его развития будет различной.

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК IN VIVO

Большинство данных получено на курином эмбрионе — классическом объекте исследований процессов морфологической и биохимической дифференцировки. Ранние этапы эмбриогенеза характеризуются анаэробным типом расщепления углеводов; причем в мышечной ткани эмбрионов птиц используется главным образом глюкоза и в меньшей степени — гликоген [3, 4].

У куриного зародыша интенсивность утилизации мышцами гликогена возрастает к 17—21-м сут развития [5]. У эмбрионов млекопитающих скелетные мышцы также усиленно потребляют глюкозу; гликогенолиз у них активизируется лишь в постнатальный период [6]. Содержание глюкозы в скелетных мышцах куриных зародышей велико на протяжении всего эмбриогенеза [7]. Содержание же гликогена постепенно увеличивается, небольшие его количества обнаруживаются уже на 4-е сут.

Содержание молочной кислоты в ножных и шейных мышцах куриного зародыша почти не меняется в течение 16—17 сут развития [8], с 17-х сут происходит его увеличение, и максимальное содержание молочной кислоты наблюдается в период вылупления [8, 9]. Представляют интерес данные и об активности ферментов, участвующих в анаэробном распаде углеводов в скелетных мышцах эмбрионов. Активность гексокиназы куриных зародышей значительно превышает активность фермента в мышцах взрослых животных. Особенно высокая активность наблюдается в период 15—18 сут развития [10, 11]. Фосфоорилаза *b* (неактивная форма фермента) обнаруживается на 9-е сут, а фосфоорилаза *a* на 12-е [12]; их активность становится высокой лишь к 17-ым сут развития. Фосфоглюкомутаза также начинает функционировать во второй половине эмбриогенеза, ее активность становится значительной на 21-е сут инкубации [13]. В скелетных мышцах эмбрионов млекопитающих ферменты двух первых реакций гликогенолиза отсутствуют вовсе [6].

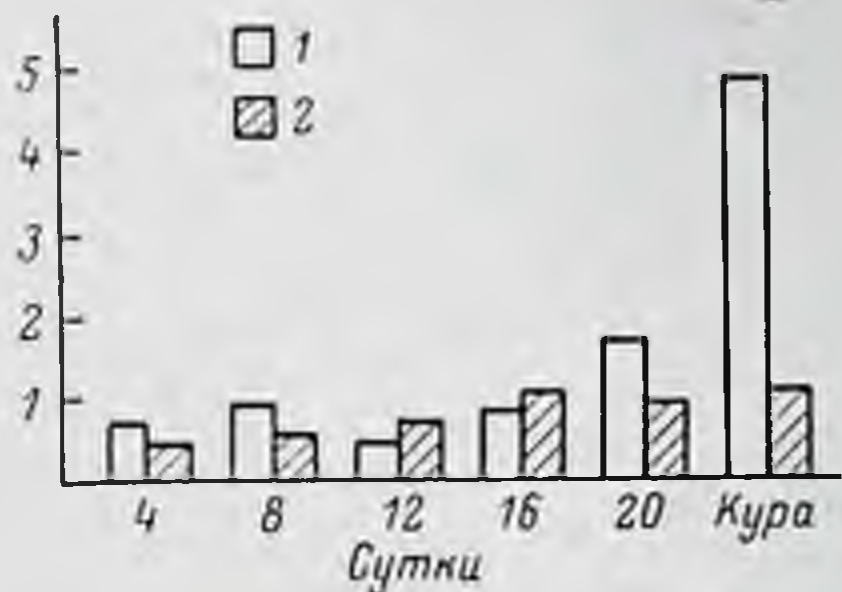


Рис. 1. Содержание АТФ (1) и АДФ (2) в скелетных мышцах куриных эмбрионов и взрослых кур (мкмоль/г влажного веса) [14].

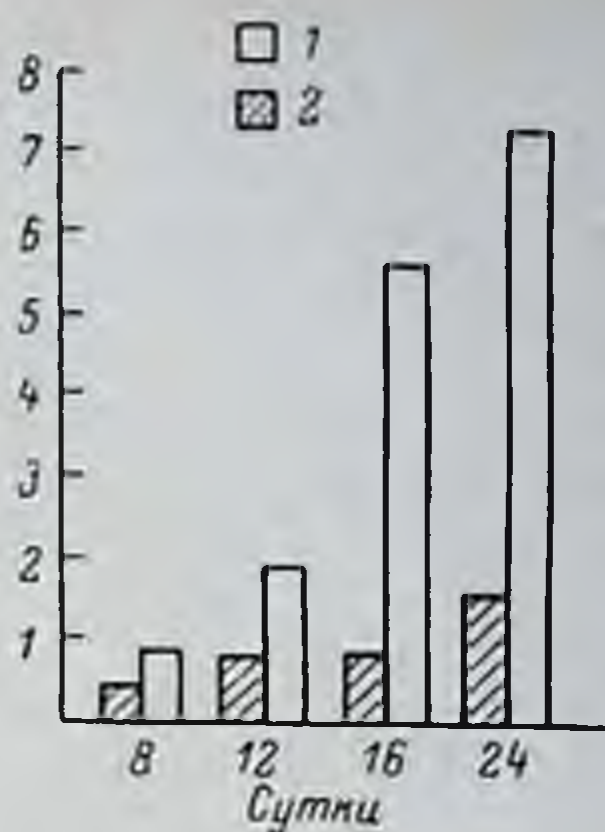


Рис. 2. Содержание креатина (1) и креатинфосфата (2) в скелетных мышцах куриных эмбрионов разных сроков развития (мкмоль/г влажного веса) [1].

Содержание макроэргических фосфорных соединений (АТФ, АДФ и КФ) в скелетных мышцах куриного эмбриона в ходе его развития возрастает [14]. Однако уровень АТФ на 12-е сут развития ниже, чем на 4-е и 8-е, а после 12-х сут неуклонно повышается (рис. 1). Содержание этого нуклеотида у взрослой куры в скелетных мышцах примерно в 3 раза выше, чем у эмбриона в период вылупления. Содержание АДФ постепенно увеличивается и достигает дефинитивного уровня уже к 16-ым сут эмбрионального развития (рис. 1).

Содержание КФ увеличивается скачкообразно: на 12-е сут оно в 2 раза выше, чем на 8-е, а в период 12—16 сут развития находится на постоянном уровне; затем опять увеличивается примерно в 2 раза (к вылуплению). Представляет интерес тот факт, что уровень свободного креатина на всех этапах развития зародыша значительно превосходит уровень КФ (рис. 2), однако на 8—12-е сут фосфорилированный креатин составляет лишь 30—36% общего количества креатина. Содержание АТФ повышается параллельно с образованием митохондрий, в которых локализованы ферменты дыхания.

Как же формируется активность специфических для мышц ферментов, использующих в качестве субстратов АТФ и КФ? По некоторым данным, миозин обнаруживается на 4-е сут развития эмбрионов куры [17], а Ca^{2+} -активируемая АТФаза открывается в сомитах куриного эмбриона уже через 40 ч инкубации [18]. Однако А. М. Пахомов [19] установил гистохимическим путем наличие Ca^{2+} -активируемой АТФазы в туловищной мышечной ткани лишь на 5-е сут, в ткани конечностей — на 7-е сут; затем, по его данным, происходит рост АТФазной активности.

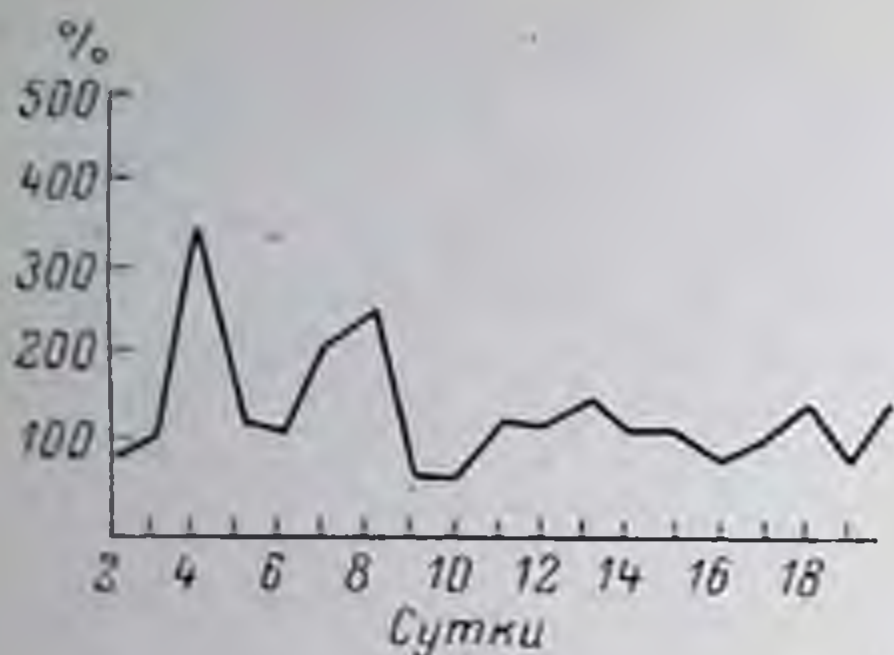


Рис. 3. Рост активности креатинкиназы в скелетных мышцах развивающихся куриных эмбрионов [15].

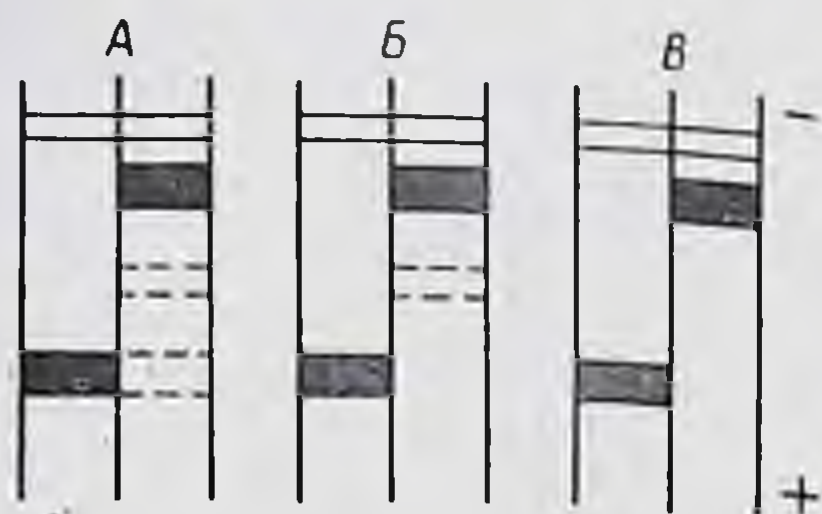


Рис. 4. Изменения изоферментного профиля креатинкиназы из скелетных мышц в эмбриогенезе куры (А), крысы (Б) и человека (В) [1].

А — до и после 7—9-ых сут; Б — до и после 18-ых сут; В — до 3 мес и между 3 и 4 мес.

коррелирующий с морфологической дифференцировкой скелетных мышц. Указанная разница в сроках обнаружения миозина и его ферментативной активности, по-видимому, связана с разной чувствительностью методов, используемых для их определения. Кроме того, имеет значение и факт изменения в эмбриогенезе физико-химических [20] и иммунохимических [21] свойств миозина. Изменения активности другого специфического для мышечной ткани фермента — креатинкиназы — отражают степень морфологической зрелости мышц [11, 15]. Он обнаруживается в различных областях куриного зародыша, как и миозиновая АТФаза, уже на первых этапах инкубации — через 30 ч [15]. Далее, первый подъем активности фермента (рис. 3) наблюдается с 3-х на 4-е сут; по-видимому, он связан с завершением дифференцировки миотомов во всех сомитах. Второй подъем — с 7-х на 8-е сут; в этот период в мышечных волокнах обнаруживается поперечная исчерченность и они приобретают способность сокращаться при раздражении. Третий подъем наблюдается в период вылупления, когда скелетные мышцы переходят к функциональной деятельности; к этому времени они уже имеют строение, типичное для сформировавшейся мышечной ткани. Известно, что уровень дифференцировки скелетных мышц в конце эмбриогенеза более высок у куры, чем, например, у крысы и мыши. Поэтому и скорость увеличения активности креатинкиназы в скелетных мышцах у эмбрионов крыс и мышей значительно меньше, чем у куриных зародышей [16].

В эмбриогенезе происходит не только увеличение активности креатинкиназы, но и изменение ее изоферментного профиля. Описаны три цитоплазматических изофермента креатинкиназы: изофермент ВВ построен из двух субъединиц мозгового (В) типа; изофермент ММ построен из двух субъединиц мышечного (М)

типа; изофермент MB построен из двух разных субъединиц, это «гибридный» изофермент; активная молекула креатинкиназы — димер с м. в. около 80 000 [1]. Распределение изоферментов креатинкиназы тканеспецифично. В скелетных мышцах взрослых животных в преобладающем количестве содержится изофермент MM, в мозговой — изофермент BB. Кроме того, имеется митохондриальный изофермент креатинкиназы.

На 7—9-е сут развития куриного эмбриона в скелетных мышцах происходит замена изофермента BB на изофермент MM [22, 23], специфичный для мышечной ткани (табл. 1 и рис. 4). Не-

Т а б л и ц а 1

Изоферментный профиль креатинкиназы из эмбриональных и дефинитивных скелетных мышц

Животные	Изоферменты			Литературные источники
	BB	MB	MM	
Крыса:				
эмбрион 12-суточный	++++	—	—	[22]
взрослая	—	±	++++	[22]
Кура:				
эмбрион 6-суточный	+++	+	±	[22, 23]
взрослая	—	—	++++	[22, 23]

сколько позже этот процесс происходит у эмбрионов крысы (табл. 1) и человека (рис. 4). Смена изоферментного профиля сопровождается значительным усилением активности креатинкиназы.

Имеется большое сходство в поведении креатинкиназы и фруктозобисфосфат-альдолазы скелетных мышц в ходе эмбриогенеза. По этой причине креатинкиназу и альдолазу называют «маркерными» ферментами скелетных мышц.

В эмбриогенезе происходит не только увеличение активности альдолазы, но и изменение ее изоферментного профиля [24, 25]. Активная молекула фруктозобисфосфат-альдолазы — тетрамер с м. в. около 160 000. Известны три типа субъединиц фермента — А, В и С. В мышцах взрослых животных содержится альдолаза, состоящая только из четырех А субъединиц — А₄. В мышечной ткани эмбрионов находится альдолаза, состоящая из четырех С субъединиц — С₄ и «гибридные» изоферменты АС₃, А₂С₂.

Наблюдается совпадение в сроках изменения изоферментного профиля креатинкиназы и альдолазы в скелетных мышцах куриных эмбрионов (табл. 2). «Эмбриональный» изофермент альдолазы С₄ заменяется на изофермент А₄, характерный для мышц взрослых

Т а б л и ц а 2

Изоферментный профиль альдолазы из эмбриональных и дефинитивных скелетных мышц

Животные	Изоферменты					Литературные источники
	C ₄	AC ₃	A ₂ C ₂	A ₃ C	A ₄	
Крыса:						
эмбрион 9-суточный	—	—	—	±	++++	[25]
взрослая	—	—	—	—	++++	[24]
Кура:						
эмбрион 7-суточный	+++	++	±	—	—	[24]
взрослая	—	—	—	—	++++	[24]

животных [24, 27]. Увеличение активности альдолазы, подобно возрастанию активности креатинкиназы, совпадает по времени с изменением изоферментного профиля. Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение активности этих ферментов идет параллельно с ростом интенсивности синтеза миозина [28].

В настоящее время есть много убедительных доказательств, что часть креатинкиназы и альдолазы в мышечных клетках ассоциирована с миофибрилярным сократительным аппаратом [25, 29]. Моримото и Харрингтон [30] сообщили, что им удалось очистить димерный белок из М-линии миофибрилл скелетной мышцы, его м. в. оказался равным 88 000. Другая группа исследователей [31] привела доказательства, что белок, который специфически связывается с М-линией скелетной мышцы (или изолируется из области М-линии миофибрилл), идентичен по своим свойствам (активности, по тесту двойной иммунодиффузии, электрофоретической подвижности и т. д.) мышечной форме креатинкиназы.

В опытах с реконструкцией миофибрилл показано, что очищенный изофермент MM креатинкиназы связывается с М-линией миофибрилл [31] или с миозиновыми филаментами [30, 33]. Иммунохимически установлено, что изофермент MM креатинкиназы располагается на М-линии миофибрилл скелетной мышцы [25]. Недавно получены новые строгие доказательства, что изофермент MM креатинкиназы является интегральной частью структуры М-линии. Это согласуется с предположением, что молекулы изофермента MM образуют М-мостики, ответственные за исчерпаемость М-линий [51]. С помощью специфической метки Хоук и Путнам [34] показали, что изофермент MM креатинкиназы взаимодействует с палочковидной частью миозиновой молекулы.

В отношении же альдолазы есть указания, что фермент связан с областью I-диска миофибрилл [29]. Этот диск с выпуклой

1/2-линией не содержит миозина и состоит главным образом из актиновых филаментов [35]. Так как альдолаза A_1 связывается строго с изолированным Ф-актином [36], можно полагать, что *in vivo* альдолаза связана прямо с актином миофибрилл.

Гистохимические наблюдения [36] показывают также, что большая часть альдолазы *in vivo* может быть локализована в интерфиламентной саркоплазме. Альдолаза A_1 присоединяется не только к очищенному актину; она связывается также, по мере прочно, с другими белковыми мышечными фракциями, включая актомиозин, миозин и «протепи стромы» [36].

Следует отметить, что другие ферменты гликолиза (или гликогенолиза) также связываются с миофибриллами. В их число входят фосфоорилаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа и ЛДГ [37]. Завершение дифференцировки мышечной ткани и переход к осуществлению функциональной нагрузки сопровождаются усилением анаэробного распада углеводов и деятельности креатинфосфат-креатинкиназной системы. Весь накопленный экспериментальный материал свидетельствует о том, что активность ферментов, обеспечивающих энергетические потребности мышц, значительно повышается в период перехода цыпленка к самостоятельному образу жизни, когда мышцы начинают активную деятельность. Существует тесная связь между энергетическим метаболизмом и функциональным состоянием ткани. Так, например, сердечная мышца курных эмбрионов, функционирующая в отличие от скелетных мышц уже в начале эмбриогенеза, имеет более высокий уровень энергетического обмена [1].

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ МЕТАБОЛИЗМЕ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Большую информацию о становлении реакций энергетического обмена дают исследования, проведенные на развивающейся однослойной культуре мышечных клеток. Мышечные клетки при их культивировании в особых условиях претерпевают изменения, близкие к тем, которые имеют место при развитии эмбриональной мышечной ткани *in vivo* [38, 39]. Изолированные мышечные клетки, полученные из 10—11-дневного куриного эмбриона в результате трипсинизации ножных мышц, прикрепляются к стеклянной поверхности, и в среде, содержащей все необходимые для развития компоненты, проходят отдельные стадии дифференцировки. Они подвергаются слиянию и образуют синцитиальные миотубы. Затем возникают мышечные волокна, в которых появляется поперечная исчерченность. Мышечные волокна приобретают способность к спонтанному сокращению.

Во время дифференцировки мышечных клеток *in vitro* и *in vivo* активность креатинкиназы увеличивается [40]. Поэтому уровень креатинкиназной активности может служить индексом дифференцировки мышечных клеток в культуре. Параллельно с нараста-

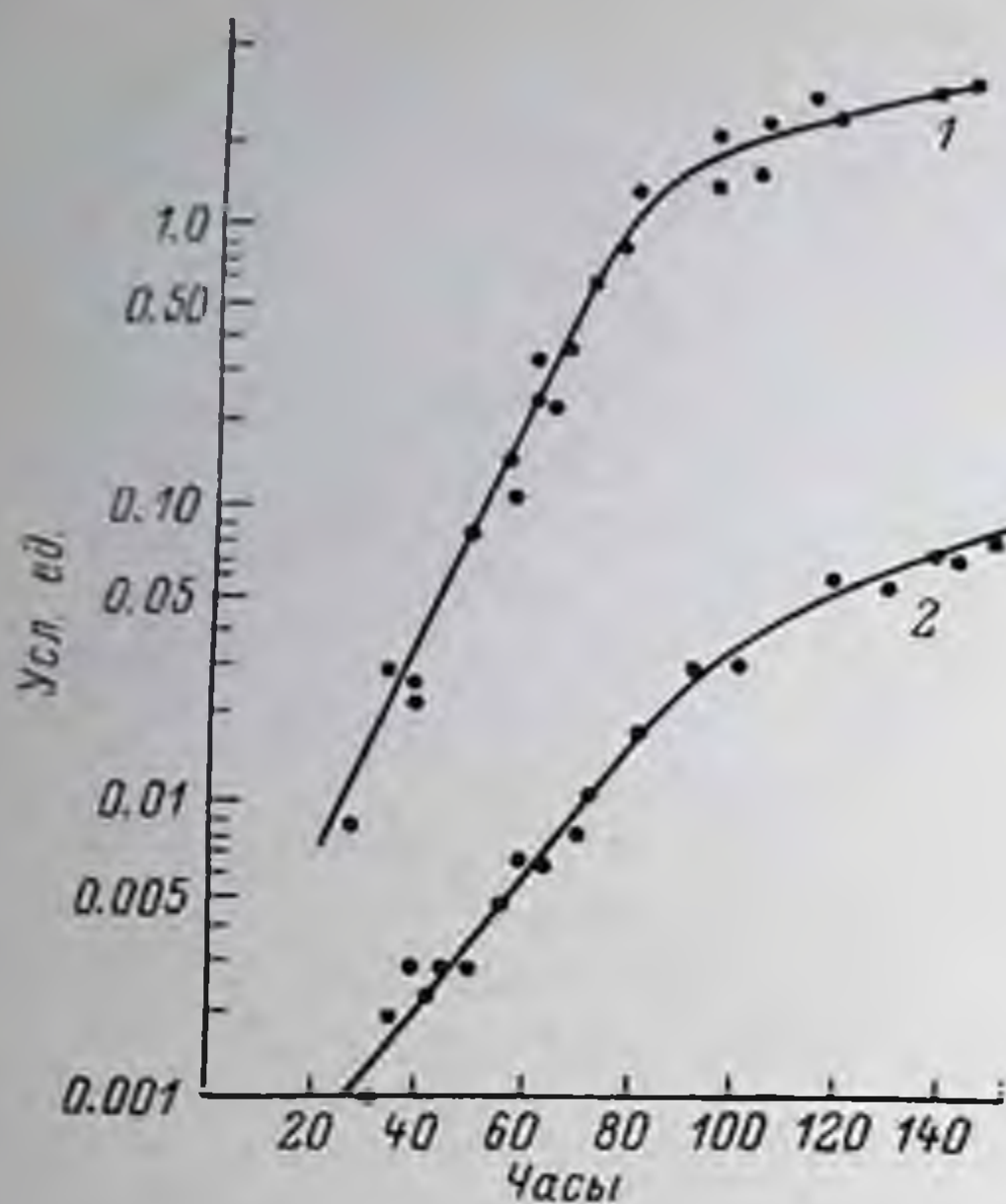


Рис. 5. Изменение активности креатинкиназы (1) и альдолазы (2) в культуре мышечных клеток (по данным [26]).

нием креатинкиназной активности увеличивается активность другого маркерного фермента — альдолазы [26]. Наибольший подъем активности имеет место между 25 и 80 ч, т. е. после слияния миобластов (рис. 5). Наряду с количественными происходят и качественные изменения. Вместо изофермента ВВ креатинкиназы и вместо изоферментов C_1 и AC_3 альдолазы — изофермент A_1 . Накопление креатинкиназы и аль-

долазы и изменение их изоферментного профиля коррелирует с образованием мышечного синцития [24, 27]. Параллельность в изменениях креатинкиназы и альдолазы (количественных и качественных) в ходе миогенеза позволила ряду авторов высказать предположение о том, что эти ферменты являются компонентами функциональных блоков мышечных белков, синтез которых подвергается координированной регуляции [24].

Активность других ферментов энергетического обмена — фосфоорилазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и ЛДГ также увеличивается во время миогенеза, хотя и не всегда строго параллельно с изменением активности креатинкиназы, альдолазы и миозина [28].

В настоящее время [26, 41—43] широко дискутируется вопрос о том, связаны ли количественные и качественные изменения специфических ферментов в ходе миогенеза *in vitro* со слиянием клеток. Следует заметить, что вообще культура клеток обычно развивается асинхронно и наряду с миосимпластами разных стадий развития в ней можно обнаружить миобласты, а также дефинитивные мышечные волокна. Для решения поставленного вопроса были проведены очень изящные опыты на синхронизированной культуре мышечных клеток [44]. В культуральную среду автор вводил ЭГТА, связывающий Ca^{2+} и таким образом блокирующий слияние клеток. После добавления ЭГТА накапливаются постмитотические клетки. При добавлении же в культуральную среду Ca^{2+} происходит их интенсивное слияние. Увеличение специфической активности креатинкиназы и альдолазы предшествует слиянию клеток, в которых уже имеются мышечные формы

креатинкиназы и альдолазы. Однако увеличение активности этих маркерных ферментов мышц и изоферментные переходы в такой культуре с блокированным слиянием клеток менее выражены, чем в нормально развивающейся культуре. Эти результаты были также подтверждены в опытах с использованием флуоресцирующих антител.

Таким образом, неслившиеся клетки могут аккумулировать маркерные ферменты, типичные для дифференцированной мышцы. Однако далее Тернер показывает, что миогенные клетки могут синтезировать изофермент ММ креатинкиназы и A_4 -альдолазу, если они уже прошли через стадию миогенеза, блокируемую бромдезоксиуридином. По данным Тернера, все миотубы наряду со «взрослыми» формами изоферментов содержат также эмбриональные креатинкиназу и альдолазу.

Увеличение активности мышечной креатинкиназы во время дифференцировки мышц связано с синтезом фермента *de novo* [45]. Отношение скоростей синтеза миозина и креатинкиназы в клеточной культуре сравнимо с отношением их конечных концентраций в зрелой мышечной ткани.

Хольтцер и др. [32, 41] подчеркивают, что накопление креатинкиназы во время терминальной мышечной дифференцировки хорошо координирует с синтезом элементов сократительного аппарата — миозина, тропомиозина и актина. Если изофермент ММ креатинкиназы и A_4 -альдолазу считать составными частями миофибриллярной органеллы, то можно полагать, что все миофибриллярные компоненты координированно синтезируются в результате одновременной активации «батареи мышечных генов» [26]. Пока не подобраны условия, чтобы разъединить или дифференциально подавить синтез этих белков. Однако должны существовать генетические или физиологические механизмы, которые позволяют различным мышцам (например, скелетным или сердечной) аккумулировать большие или меньшие количества того или иного специфического белка (миоглобина, креатинкиназы и т. д.).

Высокая синхронность возникновения биохимических признаков, определяющих структурную и метаболическую специфичность мышечной ткани на разных этапах миогенеза, свидетельствует о наличии в клетках специальных механизмов его регуляции. По-видимому, сначала развиваются те регуляторные связи, которые не зависят от гормонального контроля, возникающего на поздних этапах эмбриогенеза [12]. Может быть, к числу таких простых регуляторных влияний следует отнести эффект креатина на синтез различных белков в развивающейся мопослойной культуре мышечных клеток.

Так, креатин при его добавлении в культуральную среду увеличивает скорость синтеза тяжелых цепей миозина [46], активность креатинкиназы [47], скорость слияния миобластов и размер миотуб [48], концентрацию КФ в сердечной и скелетной мышцах [49]. Не исключено, что именно регуляторный эффект

креатина определяет его высокую концентрацию уже на ранних этапах развития куриных эмбрионов (рис. 2). Рабочая гипертрофия мышц может быть результатом влияния креатина как конечного продукта мышечной активности [48]. Все сказанное позволяет предположить, что креатин действует на генном уровне. Представляет интерес тот факт, что креатин оказывает свое влияние на синтез креатинкиназы лишь на ранних этапах развития культуры — до образования мышечных волокон [47].

Заключая настоящий обзор, следует подчеркнуть, что имеющийся экспериментальный материал свидетельствует о том, что на всех этапах мюгенеза, как правило, наблюдается строгая корреляция между степенью морфологической, биохимической и функциональной зрелости мышечной ткани. Рассмотренные примеры высокой синхронности возникновения биохимических признаков в развивающихся в эмбриогенезе скелетных мышцах подтверждают высказанное В. Б. Ушаковым [50] предположение о существовании в мышечных волокнах специального механизма, синхронизирующего эволюционные преобразования в их функциональных системах. Это предположение высказано автором на основании глубокого анализа характера изменений в эволюции отдельных показателей разных функциональных систем мышечных волокон.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Лызлова С. Н. Фосфагенкиназы. Л., Изд-во ЛГУ, 1974.
- [2] Moog F. — J. Exper. Zool., 1947, 105 : 209.
- [3] Needham J., Nowinski W. W. — Biochem. J., 1937, 31 : 1165.
- [4] Рашба Е. Я. — Укр. биохим. журн. 1939, 13 : 575, 591.
- [5] Никитина О. Ю. — Укр. биохим. журн., 1963, 35 : 188.
- [6] Перцева М. Н., Желудкова З. П. — В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л., Наука, 1969 : 85.
- [7] Желудкова З. П. — Биохимия, 1963, 28 : 31.
- [8] Перцева М. Н. — Биохимия, 1961, 26 : 254.
- [9] Рашба Е. Я. — Укр. биохим. журн., 1938, 11 : 31.
- [10] Перцева М. Н. — Укр. биохим. журн., 1963, 35 : 92.
- [11] Eppenberger H. M., Fellenberg R., Richterich R., Aebi H. — Enzym. Biol. Clin., 1962/63, 2 : 139.
- [12] Желудкова З. П. — В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л., Наука, 1969 : 103.
- [13] Bot G., Kovacs E. F., Andgassy K. O., Polyik E. N. — Acta physiol. Acad. sci. Hung., 1960, 17 : 383.
- [14] Лызлова С. Н., Леван Лиен — Укр. биохим. журн. 1968, 40 : 492.
- [15] Лызлова С. Н., Дондуа А. К., Ашмарин И. П., Чиржина Г. И., Южакова Г. А., Андрес Н. В., Калаш Н. Е., Райзе Т. Е. — Журн. эвол. биохим. и физиол. 1968, 4 : 3.
- [16] Ашмарин И. П., Лызлова С. Н., Салямон Л. С. — Цитология, 1972, 14 : 1538.
- [17] Ogawa J. — Exper. Cell Res., 1969, 26 : 269.
- [18] Deutsch G. M. — J. Embryol. Exper. Morphol., 1960, 8 : 251.
- [19] Пахомов А. М. — В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л., Наука, 1969 : 140.
- [20] Оипель В. В. — Усп. совр. биол., 1958, 46 : 281.

- [21] Коцюхов Б. В. — В кн.: Проблемы современной эмбриологии. М., Изд-во МГУ, 1964 : 548.
- [22] Erpenberger H. M., Erpenberger M., Richtelich R., Aebi H. — *Develop. Biol.*, 1964, 10 : 1.
- [23] Лызлова С. Н., Чихиржина Г. И., Южакова Г. А. — *Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. биол.*, 1968, 21 : 104.
- [24] Leberherz H. G., Rutter W. J. — *Biochemistry*, 1969, 8 : 109.
- [25] Turner D. C., Erpenberger H. M. — *Enzyme*, 1973, 15 : 224.
- [26] Turner D. C., Maier H., Erpenberger H. M. — *Develop. Biol.*, 1974, 37 : 63.
- [27] Herskovits J. J., Masters C. J., Wasserman P. M., Kaplan N. O. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1967, 26 : 24.
- [28] Hauschka S. D. — In: *The Stability of the differentiated state* / Ed. by H. Ursprung. Heidelberg, Springer-Verlag, 1968 : 37.
- [29] Arnold H., Nolte J., Pette D. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, 17 : 314.
- [30] Morimoto K., Harrington W. F. — *J. Biol. Chem.*, 1972, 247 : 3052.
- [31] Erpenberger H. M., Wallimann T., Kuhn H., Turner D. C. — In: *Isozymes II. Physiology and function*. San Francisco, Acad. Press, 1975 : 146.
- [32] Holtzer H., Sanger J. W., Ishikawa H., Strahs K. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37 : 549.
- [33] Botts J., Stone M. — *Biochemistry*, 1968, 7 : 2688.
- [34] Houk T. W., Putnam S. V. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, 55 : 1271.
- [35] Taylor E. W. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1972, 41 : 577.
- [36] Arnold H., Pette D. — *Eur. J. Biochem.*, 1968, 6 : 163.
- [37] Pette D., Brandau H. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, 9 : 367.
- [38] Konigsberg I. R. — In: *Organogenesis* Ed. by R. L. De Haan and H. Ursprung. Eds.). New York, Holt, Rinehart and Winston, 165 : 337.
- [39] Konigsberg I. R., Holtzer H. — *Exper. Cell Res.*, 1961, 24 : 508.
- [40] Лызлова С. Н., Соколов И. Н., Смирнов В. А., Ашмарин И. П. — *Бюхимия*, 1971, 36 : 329.
- [41] Holtzer H., Weintraub H., Mayne R., Mochan B. — *Curr. Topics in Develop. Biol.*, 1972, 7 : 229.
- [42] Zalin R. — *Biochem. J.*, 1972, 130 : 79P.
- [43] Zalin R. — *Exper. Cell Res.*, 1973, 78 : 152.
- [44] Turner D. C. — In: *Isozymes III. Developmental biology*. San Francisco, Acad. Press, 1975 : 161.
- [45] Morris G. E., Pipper M., Male R. — *Biochem. Soc. Transact.* 1976, 4 : 1063.
- [46] Ingwall T. S., Weiner C. D., Morales M. F., Davis E., Stockdale F. E. — *J. Cell Biol.*, 1974, 62 : 145.
- [47] Соколов И. Н., Лызлова С. Н., Ашмарин И. П. — *Бюхимия*, 1975, 40 : 3.
- [48] Seraydarian M. W., Artaza L. — *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1976, 8 : 669.
- [49] Seraydarian M. W., Abbot B. C. — *Mol. Cell Cardiol.*, 1976, 8 : 741.
- [50] Ушаков В. Б. — *Журн. эвол. бюхим. и физиол.*, 1977, 13 : 579.
- [51] Wallimann T., Pelloni G., Turner D. C., Erpenberger H. M. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, 75 : 4296.

О. Д. ЛОПИНА, А. А. БОЛДЫРЕВ

СИСТЕМА ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЙ СВЯЗИ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Кафедра биохимии

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

События, происходящие в мышце в период от прихода нервного импульса к синапсу до возникновения механического ответа, осуществляются специальной системой, которая называется системой электромеханического сопряжения.

После прихода нервного импульса к синаптическому контакту происходит деполяризация постсинаптической мембраны. Когда потенциал в области концевой пластинки достигает порогового уровня, возникает потенциал действия, распространяющийся вдоль по сарколемме и по Т-системе, являющейся ее продолжением внутри мышечного волокна (рис. 1). Таким образом, возбуждение достигает саркоплазматического ретикулума — системы внутренних мышечных мембран, внутренние полости которых являются хранилищем Ca^{2+} . В состоянии покоя мембраны СР почти непроницаемы для Ca^{2+} . Предполагается, что потенциал действия, проходящий по Т-системе, вызывает деполяризацию мембран СР [1], что приводит к кратковременному и резкому увеличению проницаемости ее для Ca^{2+} и выходу этого катиона в миоплазму. Здесь он связывается со специальными белками, которые контролируют образование актомиозинового комплекса, вследствие чего и происходит сокращение. Расслабление становится возможным в результате снижения концентрации Ca^{2+} в миоплазме. Выходящий из СР Ca^{2+} не только рецептируется регуляторными белками, но и активирует Са-насос СР, который транспортирует Ca^{2+} из миоплазмы во внутреннее пространство СР. Именно вследствие работы этого насоса уменьшается концентрация Ca^{2+} в миоплазме и становится возможным расслабление мышцы.

Таким образом, в системе ЭМС можно выделить три уровня. Первый из них — наружная плазматическая мембрана, по которой в виде потенциала действия проходит возбуждение. Второй — саркоплазматический ретикулум и встроенный в его мембрану Са-насос. И, наконец, третий — белки, контролирующие образование актомиозинового комплекса, к числу которых относятся белковые компоненты тропонин-тропомиозинового комплекса (актиновая система регуляции) и легкие цепи миозина (миозиновая система регуляции). Рассмотрим теперь более подробно

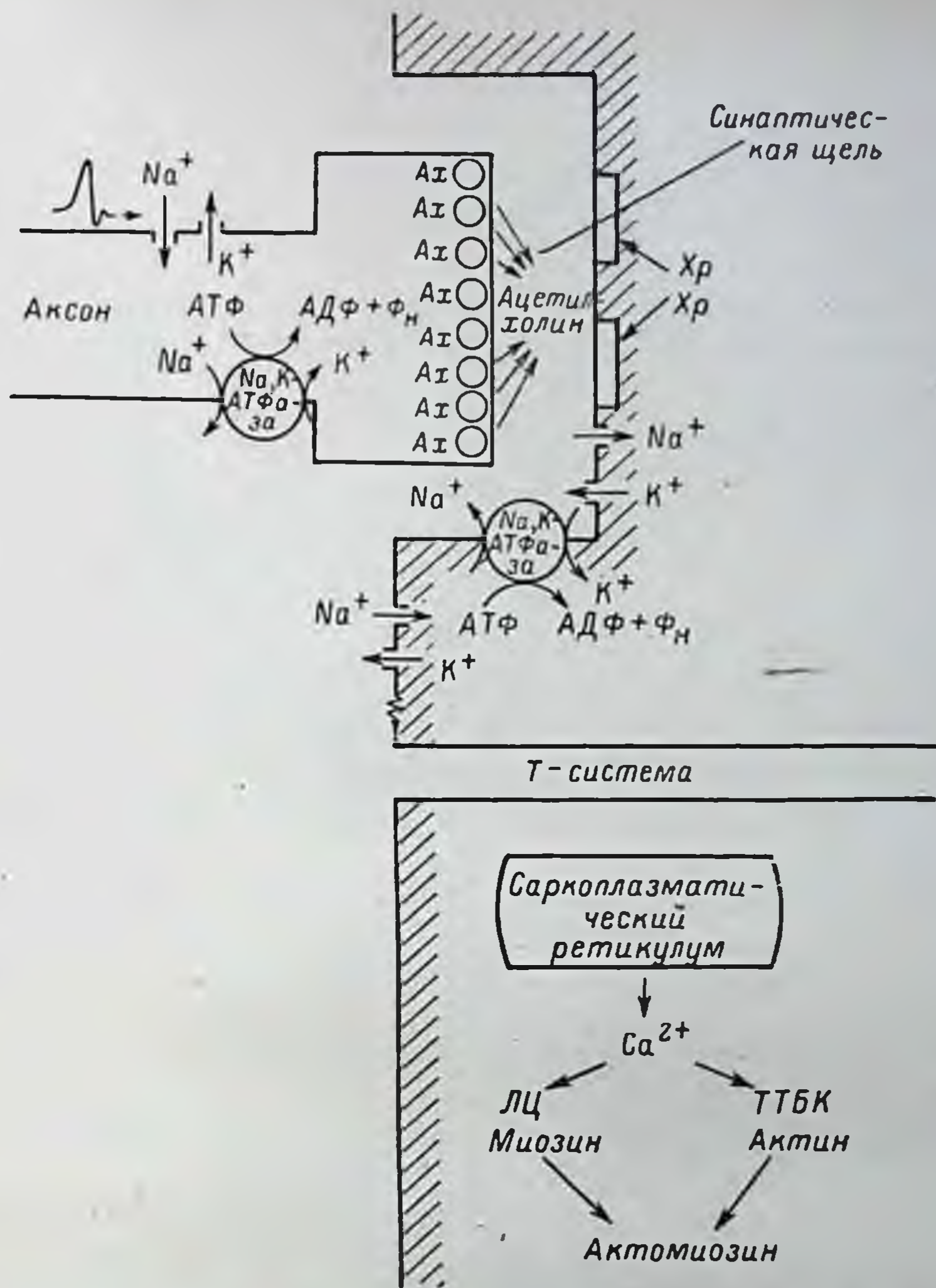


Рис. 1. Общая схема электромеханического сопряжения.

на примере быстрых скелетных мышц устройство этих уровней и их изменение в процессе онтогенеза.

Сарколемма — плазматическая мембрана мышечной клетки. Она участвует в регуляции концентрации различных ионов в мюплазме, обеспечивая за счет избирательного изменения проницаемости для Na^+ и K^+ проведение потенциала действия. Кроме того, она воспринимает внешние (в частности, гормональные) сигналы и обеспечивает механическую прочность мышечной клетки. Под электронным микроскопом сарколемма выглядит как трехслойная структура. Наружный ее слой представляет собой беспорядочно расположенные коллагеновые фибриллы, за ним сле-

дует базальная мембрана, состоящая из аморфного материала и, наконец, собственно плазмалемма [2].

Плазмалемма, как и другие биологические мембраны, состоит из белков и липидов, под электронным микроскопом отчетливо видны три слоя мембраны: два наружных оптически плотных, шириной по 25 Å, и между ними оптически прозрачный, шириной около 40 Å [2].

Сарколемма скелетных мышц взрослого кролика содержит 17.5% липидов [3]. Примерно 70% белка представлено коллагеном, входящим в состав наружных слоев [4]. Методом электрофореза в полиакриламидном геле в сарколемме выявляется около 12 различных белков с м. в. от 12 000 до 200 000 [5—7], 4 из них гликопротеиды [7]. Одна из возможных функций гликопротеидов — обеспечение иммунных свойств клетки. Кроме того, они обнаружены в составе некоторых олигомерных ферментов [8].

Величина соотношения липид : белок для сарколеммы составляет 0.25—0.9 мг/мл [6, 7].

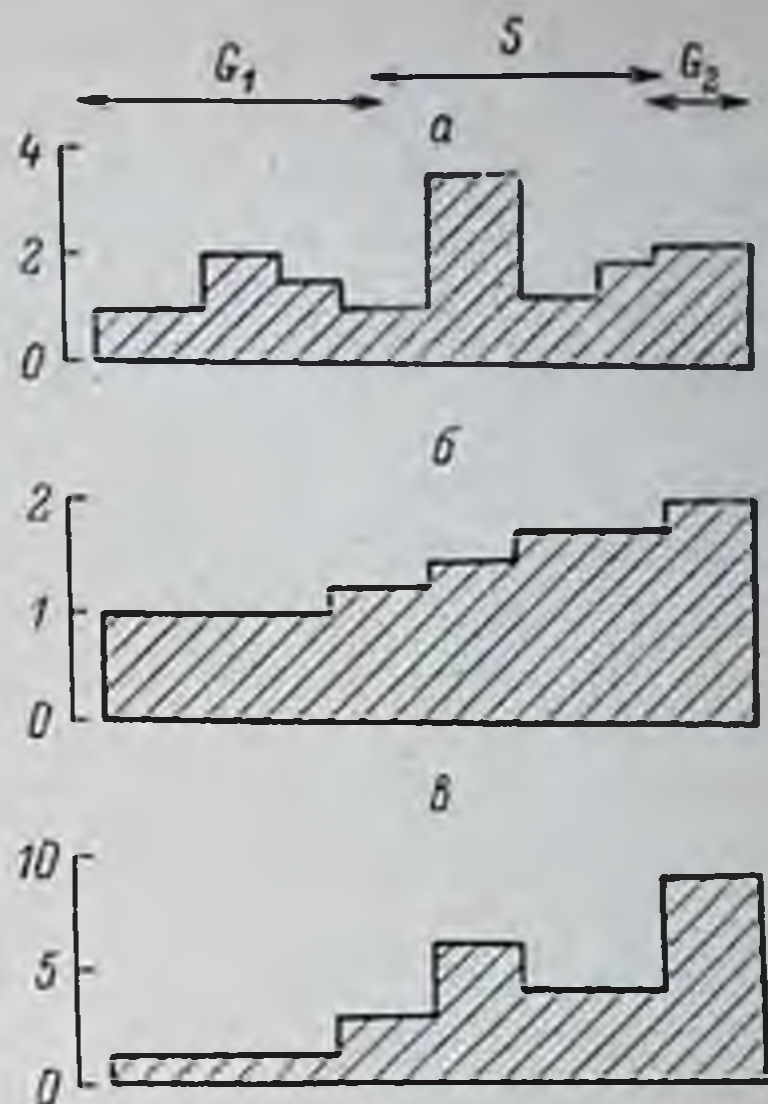
Среди липидов в значительных количествах (10—15%) обнаруживается холестерин [9]. Это один из наиболее характерных компонентов сарколеммы. Фосфолипиды представлены в основном лецитином (43%), фосфатидилэтаноламином (24%) и лизолецитином (10%).

Для очищенной сарколеммальной мембраны характерен ряд энзиматических активностей: Na,K-АТФазная, 5'-нуклеотидазная, ацетилхолинэстеразная, АМФ-аминогидролазная, аденилатциклазная [9, 11, 12]. Кроме того, ряд белков, по-видимому, участвует в формировании каналов для некоторых ионов, например для Cl^- .

Особенно интенсивный синтез компонентов плазматической мембраны идет на стадии деления недифференцированных мышечных клеток — миобластов. В культуре мышечной ткани это соответствует 1—2-му дню развития. Количество белка, которое можно извлечь из плазматической мембраны на разных стадиях клеточного цикла (в синхронной культуре), — величина постоянная, составляющая 2% его общего количества [13]. От начала фазы G_1 до конца фазы G_2 клеточного цикла общее количество белка, липидов и углеводов мембраны удваивается, при этом соотношение фосфолипид : белок и углеводов : белок в начале и в конце интерфазы оказывается одинаковым [13]. Однако, если фосфолипид и белок включаются в мембрану равномерно в течение всей интерфазы, то часть углеводов встраивается в мембрану сначала быстрее, чем белок. При этом непосредственно перед делением клеток (конец G_2 фазы) в плазматической мембране повышается уровень сиаловых кислот, а в конце G_1 фазы возрастает количество фукозы [13]; таким образом, включение отдельных компонентов клеточной мембраны может идти независимо друг от друга. Однако, поскольку мембраносвязанные ферменты тре-

Рис. 2. Активность аденилатциклазы (а), 5'-нуклеотидазы (б) и Na, K-АТФазы (в) плазматических мембран у синхронизированных клеток мышцы в различные периоды клеточного цикла [13].

Активность ферментов в начале G₁ фазы принята за 1.



буют определенного липидного окружения, в некоторых ситуациях происходит одновременное включение белков и липидов в мембрану. Синтез составных частей мембраны осуществляется в самой мышечной клетке: белки синтезируются на мембраносвязанных рибосомах, липиды — в эндоплазматическом ретикулуме. Часть липидов может доставляться в клетку пзвпе с помощью липид-переносящих белков [14]. К числу таких липидов относится, по-видимому, холестерин, присутствующий в значительных количествах в крови. Из вновь синтезированных белков и липидов сразу за синтезом образуются везикулы, которые сливаются с плазматической мембраной. Распределение белков вдоль по мембране становится возможным в результате латеральной диффузии. Основные компоненты плазматической мембраны синтезируются до стадии G₂, затем происходит растягивание мембраны, предшествующее делению мнoбласта [13].

Специфические компоненты плазматической мембраны, такие как отдельные ферменты или, как уже говорилось, углеводы, включаются на разных стадиях клеточного цикла. Количество 5'-нуклеотидазы в мембране возрастает с такой же скоростью, как и количество общего белка, а активность Na, K-АТФазы увеличивается лишь непосредственно перед митозом (рис. 2). Именно с этим может быть связано изменение концентрации Na⁺ и K⁺ в клетке, предшествующее митозу. Содержание аденилатциклазы, определяющее количество цАМФ в клетке, несколько увеличивается в середине фазы G₁ и значительно возрастает перед S-фазой, что и может быть сигналом для перехода в эту фазу (рис. 2).

Следующая стадия развития мышечных клеток, хорошо видимая в культуре мышечной ткани, — слияние отдельных мнoбластов и образование многоядерных мышечных клеток. В культуре клеток грудной мышцы цыпленка эта стадия наступает через 1—2 дня после инициации роста культуры. Сразу же после слияния мнoбластов в плазматической мембране многоядерной клетки начинают накапливаться белки, характерные для мембран возбудимых клеток: Na, K-АТФаза, ацетилхолинэстераза, рецептор ацетилхолина и аденилатциклаза [15]. Снижение концентрации

Ca^{2+} , предотвращающее слияние митохондрий, не оказывает ингибирующего действия на синтез этих белков: они накапливаются в мембране одноядерных митохондрий [15].

К сожалению, в настоящее время почти нет данных об изменении химического состава и электрофизиологических свойств плазматической мембраны в процессе развития культуры мышечных клеток. Однако имеются данные об изменении свойств этой мембраны в процессе развития отдельных животных. В эмбриональном периоде мембранный потенциал мышечных клеток кролика составляет 18—20 мВ, к моменту рождения он возрастает до 30—45 мВ [16]. В это время вся поверхность клеточной мембраны чувствительна к ацетилхолину. Непрямое раздражение мышечного волокна вызывает локальную электрическую реакцию, которая по свойствам похожа на потенциал концевой пластинки [16]. В раннем постнатальном периоде электрическая реакция возникает как на непрямое, так и на прямое раздражения. Через некоторое время после рождения происходит преобразование синаптической структуры мышечного волокна: чувствительность к ацетилхолину в быстрых скелетных мышцах сохраняется только в области синапса, мембранный потенциал достигает величины 80—90 мВ, и, наконец, формируется механизм, обеспечивающий генерацию распространяющегося потенциала действия [16]. Именно на этом этапе происходит разделение мышечных волокон на тонические, с химически возбудимой мембраной, и фазно-тетанические, с электрически возбудимой мембраной.

Большая часть описанных изменений осуществляется в результате влияния нервной системы. Это следует из сравнения свойств нормальной, эмбриональной и денервированной мышцы, а также из опытов по перекрестной реиннервации. Показано, что денервированная мышца так же, как и эмбриональная, чувствительна к ацетилхолину по всей поверхности [17]. После денервации изменяются как электрофизиологические свойства плазматической мембраны, так и ее белковый состав [18], причем эти явления, по-видимому, взаимообусловлены. Так, вследствие денервации в плазматической мембране исчезает белок с м. в. 100 000 [18]. Одновременно значительно уменьшается проводимость плазматической мембраны для Cl^- [19]. Известно, что белок с м. в. 100 000 участвует в транспорте Cl^- через плазматическую мембрану [20].

Одно из характерных явлений, наблюдаемых в плазматической мембране после денервации, — увеличение активности Na, K-ATФазы [18, 21]. Оно связано как с увеличением числа участков активного переноса одновалентных ионов, так и с возрастанием числа оборотов Na, K-ATФазы [18]. Увеличение активности Na, K-ATФазы наблюдается и в поздний эмбриональный период в плазматической мембране скелетной мышцы и мышцы сердца [22]. Расчеты показывают, что увеличение активности Na, K-ATФазы в этот период больше необходимого и не сопровождается

возрастанием градиента Na^+ и K^+ . Одна из причин этого явления — изменение свойств Na, K-ATФазы . Известно, что Na, K-ATФаза плазматической мембраны нормальных скелетных мышц ингибируется ацетилхолином [21]. Однако ингибирование никогда не бывает полным. Кроме того, концентрация ацетилхолина, обеспечивающая полумаксимальное ингибирование, очень высока.

После денервации чувствительность к ацетилхолину возрастает почти в 100 раз [21]. Таким образом, в эмбриональной мышце почти постоянно присутствует ингибитор, который не позволяет Na, K-ATФазе работать на полную мощность. После перехода мышцы в состояние, в котором чувствительность к ацетилхолину сохраняется только в области синапса, резко снижается и чувствительность Na-насоса к ингибирующему действию ацетилхолина. Значительное увеличение Na, K-ATФазы в поздний эмбриональный период может быть своеобразной компенсаторной реакцией.

В процессе онтогенеза изменяется и еще один фактор, контролирующей работу Na-насоса , — липидный состав мембраны. Известно, что активность Na, K-ATФазы существенно изменяется при различных модификациях липидного состава: увеличении содержания холестерина [23], обработке мембраны фосфолипазой С [24], замене жирнокислотных остатков, входящих в состав липидов [25]. Изменение активности фермента вызвано изменением его энергии активации, происходящим вследствие фазово-структурного перехода в окружающих фермент липидах [26].

Необходимо отметить, что изменение липидного состава мембраны в процессе онтогенеза также зависит от характера нервного влияния. Это хорошо видно при сравнении липидного состава плазматической мембраны быстрых и медленных мышц (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Липидный состав мембран быстрых и медленных мышц крысы [10]

Компоненты	<i>m. soleus</i>	<i>m. extensor digitorum longus</i>
Сиаловые кислоты	60 нмоль/мг белка	40 нмоль/мг белка
Фосфатидилхолин	10.8 мкг/мг белка	10 мкг/мг белка
Фосфатидилэтаноламин	3.7 мкг/мг белка	4.4 мкг/мг белка
Фосфатидилсерин	2.4 мкг/мг белка	1.5 мкг/мг белка
Фосфатидилинозит	2.4 мкг/мг белка	2.0 мкг/мг белка
Сфингомиелин	1.4 мкг/мг белка	0.9 мкг/мг белка

Таким образом, в зависимости от характера денервации в процессе развития мышечных клеток происходит формирование

плазматической мембраны, которая приспособлена к выполнению своей функции именно в этом типе мускулатуры.

Если плазматическая мембрана имеется у всех видов клеток, и в процессе дифференциации мышечных клеток она изменяется, приспособляется к выполнению своей функции, то саркоплазматический ретикулум — структура, характерная лишь для развитых мышечных клеток, которая появляется в процессе их дифференциации. Основная функция саркоплазматического ретикулума — регуляция концентрации Ca^{2+} в митоплазме. Концентрация Ca^{2+} во внутреннем пространстве СР достигает 1 мМ, в то же время в митоплазме она составляет в состоянии покоя 10^{-7} М. В состоянии возбуждения Ca^{2+} выбрасывается из клеток, а затем аккумулируется Са-насосом. Таким образом, мембрана СР быстрых мышц должна быть приспособлена для удержания Ca^{2+} в состоянии покоя, обеспечивать высокую проницаемость для Ca^{2+} в период возбуждения и быстро аккумулировать его после выброса.

По химическому составу мембрана саркоплазматического ретикулума достаточно проста: в ней обнаруживается в значительных количествах 4—6 белков [27]. Один из них с м. в. 100 000 — Са-АТФаза, транспортирующая Ca^{2+} с наружной стороны мембраны на внутреннюю. Этот белок составляет от 50 до 80% всего белка мембраны. Кроме Са-АТФазы в мембране имеются Са-связывающие белки с м. в. 44 000 (кальсеквестрин) и 55 000, способные связывать и удерживать значительные количества Ca^{2+} [27]. По-видимому, они значительно увеличивают емкость СР для этого катиона. В мембране СР обнаружен также липопротейд, белок с м. в. около 10 000, которому приписывается функция компонента, регулирующего встраивание Са-АТФазы в липидный слой мембраны [28]. Однако функцию этого белка, как и кислого белка с м. в. 30 000, нельзя считать окончательно установленной.

В зрелой скелетной мышце соотношение белок : липид для мембраны СР составляет обычно 0.5—0.6 [29]. Большая часть липидов представлена фосфолипидами (около 90%), среди них фосфатидилхолин (70%), фосфатидилэтанолламин (15%), фосфатидилинозит (около 4%) и фосфатидилсерин (2%) [29].

В культуре мышечной ткани (грудная мышца цыпленка) Са-АТФаза начинает синтезироваться примерно через 2 сут после инициации культуры, т. е. в тот же период, когда начинается слияние миобластов [30, 31]. В это же время в мышце начинается синтез других характерных для развитой мышечной клетки белков: тяжелых и легких цепей миозина, Г-актина, креатинкиназы, миокиназы [30]. Характерно, что скорость синтеза общего белка в этот период уменьшается [31].

В отличие от мембраносвязанного белка Са-АТФазы кальсеквестрин начинает синтезироваться в более ранний период (первые сутки жизни культуры) [32]. Изучение синтеза двух этих

белков показывает, что примерно 90% их синтезируется в связанных с мембранами полисомах [33]. Считается, что Са-АТФаза, синтезируемая на рибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом, секретруется прямо в фосфолипидные везикулы, образуя точку роста мембраны СР [33]. Это предположение подтверждается наличием на ранних стадиях развития клеточной культуры прямой морфологической связи между эндоплазматическим ретикулумом и вновь образующимся СР [34].

Кальсеквестрин первоначально обнаруживается в области аппарата Гольджи [33]. Предполагается, что он, как и другие гликопротеиды, синтезируется именно в этой области и секретруется в специальные везикулы, в которых и доставляется к СР.

Описанная картина синтеза мембраны СР хорошо согласуется с данными электронной микроскопии. После слияния мюбластов и образования многоядерных мышечных клеток в них первоначально не обнаруживаются ни элементы СР, ни мюфиламенты. В этот период внутри клеток наблюдаются линейно расположенные полисомы, отчетливо виден аппарат Гольджи [35]. Затем начинается организация мюфиламентов в фибриллы. Т-система и СР формируются лишь к 6-му дню развития культуры. К 9—11-му дню появляются хорошо организованные мюфибриллы, с четко видимой Z-линией и I-дисксом. Элементы СР располагаются между продольными пучками мюфибрилл, появляются триады — места контакта цистерн СР и Т-системы [35].

В культуре мышечных клеток птиц снижение концентрации Ca^{2+} предотвращает как стадию слияния мюбластов, так и синтез Са-АТФазы. Ингибируется также синтез контрактильных белков, креатинкиназы и других специфических для мышечной ткани белков [30]. Все эти белки получили название «модулируемые кальцием белки». Повышение концентрации Ca^{2+} внутри мышечной клетки на стадии слияния обусловлено, по-видимому, изменением в этот период проницаемости плазматической мембраны. Это предположение подтверждается экспериментом, в котором синтез «модулируемых кальцием белков» был ингибирован в среде с высокой концентрацией Ca^{2+} понофором А 23187 без ингибирования слияния мюбластов [30]. Однако нельзя считать, что ингибирование синтеза Са-АТФазы полностью зависит от слияния мюбластов, поскольку в незначительных количествах Са-АТФаза синтезируется уже на стадии мюбластов [30]. Кроме того, обнаружено, что снижение концентрации Ca^{2+} , ингибирующее стадию слияния мюбластов в культуре клеток крысы, практически не влияет на синтез Са-АТФазы [31]. Таким образом, этот вопрос требует дальнейшего выяснения.

Следует особо остановиться на влиянии иннервации на развитие СР. В культуре мышечных клеток, лишенных нервного влияния, развитие Т-системы и СР, как уже говорилось ранее, проходит почти нормально. Единственное морфологическое отличие — это гипертрофия Т-системы. В культуре мышечных клеток она

представляет собой широко разветвленную сеть [35]. Такая же картина характерна и для денервированной мышцы.

Детальное исследование мембраны СР позволило выявить, что плотность Са-АТФазы в ней к 9—11-му дню развития культуры составляет около 400/мкм² [35]. Это соответствует плотности Са-АТФазы в мембране СР куриного эмбриона к 14-му дню развития. У взрослого животного плотность молекул Са-АТФазы в мембране в 10 раз больше [35]. Во столько же раз увеличивается в процессе развития и скорость транспорта Са²⁺ фрагментами СР. Характерно, что у кролика, относящегося к незрелорождающимся млекопитающим, максимальное увеличение скорости транспорта Са²⁺ фрагментами СР наблюдается с 8-го по 20-й день постнатального развития [36], т. е. после установления нервно-мышечных контактов [16].

Изучение белкового состава СР в процессе эмбрионального развития показывает, что у 25-дневного эмбриона кролика Са-АТФаза представляет лишь 10—20% белка мембраны [29]. В это время в мембране уже обнаруживается липопротеид с м. в. 10 000—12 000, и значительное количество белков с м. в. от 30 000 до 80 000 [29]. Большая часть этих эмбриональных белков гидрофобна в отличие от белков (с таким же м. в.), которые часто обнаруживаются в мембране СР взрослых животных и являются гидрофильными.

В процессе эмбрионального и постнатального развития происходит увеличение активности Са-АТФазы, коррелирующее с увеличением содержания этого фермента в мембране. Активность Mg-АТФазы, достаточно высокая у эмбрионов, достигает максимума к рождению кролика и значительно уменьшается по мере развития новорожденного животного [29, 37].

Существенным изменениям в процессе развития мышечных клеток подвергается и липидная часть мембраны СР. Эмбриональная мембрана богата липидами; соотношение белок: липид составляет 0.3 у 19-дневного эмбриона кролика, возрастая до 0.4 к моменту рождения и до 0.5 у взрослых животных [29]. При этом не только уменьшается количество липидов, но и изменяется их состав. Так, количество фосфатидилхолина увеличивается от 50 до 75%, а содержание фосфатидилэтаноламина снижается с 27 до 8—14% [29]. Изменение состава мембраны отражается на ее свойствах: из мембраны СР взрослых животных диэтиловый эфир отмывает только нейтральные липиды, а из мембраны эмбрионов экстрагируется и около 60% фосфолипидов [38]. Изменяется также степень переваривания фосфолипидов фосфолипазой А₂ [38]. Эти факты свидетельствуют о том, что липиды эмбриональной мембраны СР связаны с ней менее прочно и, по-видимому, оказывают меньшее воздействие на Са-АТФазу.

Различия появляются не только в отдельных классах липидов, по мере развития меняется и состав жирных кислот, входящих в состав липидов мембраны. Количество насыщенных жирных

кислот при этом снижается, они заменяются ненасыщенными [39]. Изменение состава жирных кислот, входящих в состав липидов мембраны, приводит к изменению по крайней мере двух ее параметров: резко уменьшается проницаемость мембраны для Ca^{2+} [39], снижается температура, при которой происходит фазово-структурный переход в липидах [40]. Результаты последних лет показывают, что второй фактор очень важен для функционирования СР. В более жидком липидном бислое молекулы Са-АТФазы могут образовывать белковые ассоциаты, которые формируют каналы для выхода Ca^{2+} [41]. Образование олигомерных комплексов Са-АТФазы выявляет дополнительные возможности для регуляции активности этого фермента [42].

Можно заключить, что в процессе формирования зрелой быстрой мышцы идет образование мембран СР такого типа, который максимально приспособлен к выполнению своей функции. Необходимо отметить, что свойства, характерные для СР быстрых мышц (увеличение плотности Са-АТФазы в мембране, изменение липидного состава), выявляются, по-видимому, в результате первого влияния на мышцу.

Регуляция взаимодействия актина с миозином с помощью Ca^{2+} осуществляется специальными регуляторными белками. Они ингибируют образование актомиозинового комплекса в отсутствие Ca^{2+} . Связывание этого катиона с компонентами регуляторной системы устраняет их ингибирующее действие, вследствие чего и возникает сокращение.

В настоящее время известны две регуляторные системы. Одна из них, тропонин-тропомиозиновая, расположена на тонких (актиновых) миофиламентах, другая, в состав которой входят легкие цепи миозина, связана с толстыми миофиламентами (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Распространение актинового и миозинового типов регуляции образования актомиозина в мышцах различных животных [43]

Животные	Мышцы	ТТБК	ЛЦ
Кролик	поперечнополосатые	+	-
Цыпленок	гладкие	-	+
Рак речной	поперечнополосатые	+	-
Насекомые	поперечнополосатые	-	+
Морской гребешок	поперечнополосатые	-	+
Земляной червь	поперечнополосатые	+	+

Тропонин-тропомиозиновый белковый комплекс состоит из 4 белковых компонентов: три из них являются субъединицами тропонина (тропонин С, тропонин Т и тропонин И), четвертый —

сам тропомиозин [44]. Последний представляет собой фибриллярный белок, который располагается в бороздке спирали фибриллярного актина и стерически мешает взаимодействию актина с миозином. На расстоянии 40 Å друг от друга на тропомиозине располагаются компоненты тропонинового комплекса. Таким образом, на 7 мономеров актина приходится 1 тропониновый комплекс. Связывание Ca^{2+} осуществляется тропонином С, вследствие чего конформация этого компонента изменяется. С помощью других компонентов конформационный сигнал передается на тропомиозин, который выдвигается из борозды на спирали актина и не препятствует более взаимодействию сократительных белков.

Миозиновая система регуляции исследована в меньшей степени. Белки, участвующие в этой регуляции, — легкие цепи миозина — располагаются, по-видимому, по одному у каждой головы молекулы миозина [43]. До сих пор неясно, как осуществляется регуляция с помощью этих компонентов. Установлено только, что легкие цепи необходимы как для связывания Ca^{2+} , так и для самого процесса регуляции. Однако после отделения от молекулы миозина легкие цепи перестают связывать Ca^{2+} [43].

Миозиновый тип регуляции представлен у моллюсков, тропонин-тропомиозиновый комплекс участвует в регуляции сократительного процесса в поперечнополосатых мышцах позвоночных [43]. У большей части беспозвоночных (насекомые, черви, ракообразные) функционируют обе регуляторные системы [43]. Однако уже у моллюсков обнаруживаются почти все компоненты тропонин-тропомиозиновой системы (правда, они представлены в незначительных количествах); а в мышцах, для которых показано наличие актинового типа регуляции, присутствуют легкие цепи миозина [43]. Возможно, они принимают участие в регуляции лишь в специальных условиях, например при фосфорилировании специфическими протеинкиназами.

В процессе развития культур мышечных клеток птиц как компоненты тропонин-тропомиозиновой системы, так и легкие цепи миозина начинают синтезироваться одновременно с другими специфическими для мышцы белками в период, когда происходит слияние миобластов и образование многоядерных мышечных клеток [30]. Вместе с другими мышечными белками, синтез которых начинается при повышении концентрации Ca^{2+} в миоплазме, они отнесены Мартонози к «модулируемым кальцием белкам». К 4-му дню развития культуры встраивание компонентов тропонин-тропомиозиновой системы регуляции в актиновые миофиламенты уже полностью завершено. С помощью иммунофлуоресцентных методов показано, что в это время на актине на расстоянии 38 Å друг от друга уже расположены все субъединицы тропонина [45]. Нельзя исключить, однако, что молекулы тропонин-тропомиозинового комплекса у эмбрионов несколько отличаются по составу от этих же компонентов взрослых животных.

Так, например, предполагается, что в молекуле тропонина I взрослых животных имеется две антигенные детерминанты, а у эмбриона — только одна [45]. Показано также, что существуют две изоформы тропомиозина (α и β). Обе начинают синтезироваться одновременно с другими мышечными белками. Однако по мере оформления мышечной ткани увеличивается количество α -формы тропомиозина [46].

Интересны данные о влиянии нервной системы на миозиновую систему регуляции. Для миозина из эмбриональных мышц характерно наличие трех видов легких цепей с м. в. 16 000, 18 000 и 25 000 [47]. Такие же легкие цепи обнаруживаются и в быстрых мышцах взрослых животных. По мере развития нейромоторного аппарата в медленных мышцах происходит смена состава легких цепей, и в зрелой медленной мышце обнаружены легкие цепи с м. в. 20 000 и 27 000. Вероятно, нервная регуляция контролирует состав легких цепей в медленных мышцах [47].

Предполагается, что первично в эволюции животного мира возникла миозиновая система регуляции [48]. Затем появился актиновый тип регуляции, и некоторое время сократительный процесс регулировался с помощью обеих систем. По мере прогрессивного развития быстрых мышц миозиновая система утратила свое значение, и для регуляции сократительного процесса, по-видимому, стал использоваться только тропонин-тропомиозиновый комплекс. В настоящее время нет данных о том, какая система регуляции используется в мышцах на различных стадиях онтогенеза. Возможно, однако, что в онтогенезе наблюдается такая же картина, как и в филогенезе. Об этом может свидетельствовать тот факт, что соотношение тропонин : актин по мере развития мышц остается неизменным, а соотношение тяжелый миозин : ЛЦ в процессе эмбриогенеза возрастает от 1 : 10 до 1 : 2 [47].

Суммируя изложенное выше, можно выделить в процессе развития системы ЭМС в мышцах три важных этапа. Первый из них связан с изменением свойств плазматической мембраны. В этой стадии происходит синтез белков, специфичных для плазмалеммы возбудимой ткани: рецепторов ацетилхолина, холинэстеразы, Na, K-АТФазы, аденилатциклазы. Хотя этот этап совпадает с фазой слияния миобластов и образования многоядерных мышечных клеток, во время которой индуцируется синтез специфических для мышцы белков, включение синтеза белков плазматической мембраны осуществляется не под действием Ca^{2+} , а под влиянием другого, неизвестного пока фактора. Возможно, этот фактор удастся выявить, сравнивая развитие различных электровозбудимых тканей (например, мышечной и нервной). На втором этапе развития ЭМС осуществляется синтез белков, участвующих в регуляции мышечного сокращения: Ca-АТФазы CP, компонентов тропонин-тропомиозиновой системы, легких цепей миозина. Синтез этих белков, как и других белков, специфичных для мышечной ткани (актин, миозин, креатинкиназа), индуцируется,

по-видимому, повышенном концентрации Ca^{2+} внутри мышечных клеток. Закачивается этот этап формированием СР и образованием организованных в саркомеры мюофиламентов с встроенными в них регуляторными белками. Последний, заключительный период в развитии ЭМС — преобразование мембранных структур и регуляторных белков, их приспособление к типу сокращения — происходит под действием нервной системы. Различия в системе ЭМС, а значит, и различия в сократительных ответах мышц разного типа обусловлены именно характером нервного влияния.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Peachey L. D., Adrian R. H. In: Structure and function of muscle. New York; London, Acad. Press, 1973, 3 : 1.
- [2] Kono T., Colowick S. R. — Arch. Biochem. Biophys., 1961, 93 : 250.
- [3] Madeira V., Antunes-Madeira M. C., Carvalho A. — Cienc. biol. (Portugal), 1972, 2 : 9.
- [4] Kono T., Kakuma F., Homma M., Fukuda S. — Biochim. biophys. acta, 1964, 88 : 155.
- [5] Madeira V., Antunes-Madeira M. C. — Biochim. biophys. acta, 1973, 298 : 230.
- [6] Drabikowski W., Zubrzycka E. — In: Recent advanced studies of cardiac structure and metabolism. 9 «The sarcolemma». New York; London, Acad. Press, 1976 : 133.
- [7] De Molino A. M., Cabezas J. A. — Intern. J. Biochem., 1978, 9 : 253.
- [8] Peterson G. L., Eving R. D., Hootman S. R., Coute F. P. — J. Biol. Chem., 1978, 253 : 4762.
- [9] Boegman R., Manery J., Pinteric L. — Biochim. biophys. acta, 1970, 203 : 506.
- [10] Smith P., Appel S. — Biochim. biophys. acta, 1977, 455 : 109.
- [11] Ferdman D. L., Himmelreich N. G., Daydusha G. P. — Biochim. biophys. acta, 1970, 219 : 372.
- [12] Kidwai A. M., Radcliffe M. A., Lee E. H., Daniel E. E. — Biochim. biophys. acta, 1973, 298 : 593.
- [13] Пастернак С. А. — В кн.: Биологические мембраны. М., Атомиздат, 1978 : 61.
- [14] Бергельсон Л. Д. — В кн.: IV Всесоюзн. биохим. съезд. Симпоз. докл. Л., 1979 : 98.
- [15] Prives J. M., Paterson B. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71 : 3208.
- [16] Аршавский И. А., Даринский Н. В. — В кн.: Биофизика и биохимия мышечного сокращения. М., Наука, 1976 : 240.
- [17] Гинецкий А. Г. Химическая передача первого импульса и эволюция мышечной функции. Л., Наука, 1970.
- [18] Barry W. F., Oliver K. L., Reddy N. B. — J. Membrane Biol. 1977, 32 : 345.
- [19] Bryant S. H., Camerino D. — J. Neurobiol., 1976, 7 : 229.
- [20] Rothstein A., Knauf P. A., Cabantchic Z. I. Biochemistry of Membrane Transport / Ed. by Semenza G., Carafoli E. Berlin; Heidelberg; New York, Springer Verlag, 1977 : 316.
- [21] Severin S. E., Boldyrev A. A., Tkachuk V. A. — Comp. Gen. Pharmacol., 1974, 5 : 181.
- [22] Sperelakis N. — Biochim. biophys. acta, 1972, 226 : 230.
- [23] Seiler D., Fiehn W. — Experientia, 1976, 32 : 849.

- [24] Ко Ч же Ч жуи, Болдырев А. А. — Биохимия, 1978, 43 : 2100.
- [25] K i m e l b e r g H. K., P a r a h a d j o r o u l o s D. — J. Biol. Chem., 1974, 249 : 1071.
- [26] Болдырев А. А. — Усп. биол. химии, 1977, 18 : 122.
- [27] M a c L e n n a n D. — Canad. J. Biochem., 1975, 53 : 251.
- [28] R a c k e r E., E y t a n E. — J. Biol. Chem., 1975, 250 : 7533.
- [29] S a r z a l a M., P i l a r s k a M., Z u b z y c k a E., M i c h a l a k M. — Eur. J. Biochem., 1975, 57 : 25.
- [30] B o n g H. A., B o l a n d R., M a r t o n o s i A. — Biochim. biophys. acta, 1979, 585 : 165.
- [31] H o l l a n d P. C., M a c L e n n a n D. — J. Biol. Chem., 1976, 251 : 2030.
- [32] Z u b r z y c k a E., M a c L e n n a n D. — J. Biol. Chem., 1976, 251 : 7733.
- [33] G r e e n w a y D. C., M a c L e n n a n D. — Canad. J. Biochem., 1978, 56 : 452.
- [34] E d g e M. B. — Develop. Biol., 1970, 23 : 634.
- [35] M a r t o n o s i A., R o u f a D., B o l a n d R., R e y e s E., T i l l a c k T. W. — J. Biol. Chem., 1977, 252 : 318.
- [36] Алнев М. К. Состояние кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы в оптогенезе. Автореф. дис. М., 1976.
- [37] H o l a n d D. L., P e r r y S. V. — Biochem. J., 1968, 114 : 161.
- [38] S a r z a l a M., Z u b r z y c k a E., M i c h a l a k M. — In: Calcium transport in contraction and secretion / Ed. by Carafoli E., Clementi F., Drabikowski W., Margreth A., Amsterdam, North-Holland Publ. Co., 1975 : 329.
- [39] M a r t o n o s i A., B o l a n d R., H a l p i n R. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 37 : 455.
- [40] O v e r a t h P., T h i l o L., T r a u b l e H. — Trends Biochem. Sci., 1976, 1 : 186.
- [41] M a r t o n o s i A., N a k a m u r a H., J i l k a B. L., V a n d e r k o o i J. H. Biochemistry of membrane transport / Ed by Semenza G., Carafoli E. Berlin; Heidelberg; New York, Springer Verlag, 1977 : 401.
- [42] Болдырев А. А., Лопина О. Д., Прокопьева В. Д., Рубцов А. М., Свиныхова И. А., Швец В. И., Щеглова М. В. — В кн.: Матер. VIII Всесоюзн. совещания «Транспортные АТФазы» / Ред. Тяхепыльд Л. Я., Тарту, 1980 : 86.
- [43] L e h m a n W., S z e n t - G y ö r g y i A. G. — J. Gen. Physiol., 1975, 66 : 1.
- [44] H i t c h c o c k S., H u x l e y H., S z e n t - G y ö r g y i A. — J. Mol. Biol., 1973, 80 : 825.
- [45] O b i n a t a T., S h i m a d a Y., M a t s u d a R. — J. Cell Biol., 1979, 81 : 59.
- [46] P e l l o n i - M ü l l e r G., E r m i n i M., L e n n y E. — FEBS Letters, 1976, 70 : 113.
- [47] R o y R. K., P o t t e r J. D., S a r k a r S. P. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 70 : 28.
- [48] L e h m a n W., S z e n t - G y ö r g y i A., K e n d r i c k - J o n e s J. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1973, 37 : 319.

И. Ф. СКОРОВОВИЧУК

ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского
Ленинградского государственного университета им. А. А. Ждапова

ВВЕДЕНИЕ

Начало изучению функциональных свойств скелетных мышц в процессе их дифференцировки было положено многочисленными работами главным образом отечественных исследователей, выполненными в конце 30-х и в 40-х годах нашего столетия. Уже в этих работах, осуществленных под руководством и в соответствии с эволюционными идеями Л. А. Орбели, Х. С. Коштоянца, были отмечены основные функциональные черты, отличающие формирующиеся, созревающие мышцы от дефинитивных мышц взрослых животных. В исследованиях этих лет в общих чертах было показано, что в процессе нормальной дифференцировки мышц имеет место увеличение скорости их сокращения и уменьшение тоничности, а также происходит морфологическая и функциональная специализация скелетных мышц, поддерживаемая постоянными влияниями их центральной нервной системы. Обзор работ этих лет можно найти у Е. К. Жукова и др. [1].

Примерно в эти же годы были начаты исследования функциональных свойств скелетных мышечных элементов, дифференцирующихся в условиях культуры мышечной ткани, и получены первые результаты, свидетельствующие о том, что основные свойства мышечной ткани — возбудимость и сократимость — могут развиваться и в отсутствие нервных элементов [2, 3].

В последние два десятилетия обнаружился новый подъем интереса к рассматриваемой проблеме. В течение этого времени накопился большой материал, освещающий проблему функционального развития мышц с разных сторон.

Функционирование мышц, выражающееся в конечном специфическом акте — сокращении, предполагает работу целого ряда звеньев возбудимой и сократительной систем мышечного волокна. Это прежде всего генерация мышечного потенциала действия, проведение возбуждения по поверхностной мембране и внутренней проводящей системе мышечного волокна от поверхностной мембраны к сократительному аппарату, функционирование самого сократительного аппарата. В работах онтогенетического плана

практически уделено внимание каждому из этих вопросов, однако в большинстве случаев имеющиеся сведения весьма фрагментарны и не дают достаточно полной картины формирования того или иного функционального признака в процессе индивидуального развития животного. В целом же представляется, что последовательность формирования возбудимых свойств мышечных волокон прослежена более полно, чем сократительных. И главная причина этого состоит в том, что в первом случае широкое возможности для исследований предоставляет метод культуры мышечной ткани, тогда как для изучения формирования сократительных свойств этот метод дает очень мало и практически все результаты получены в гораздо более методически сложных условиях — при развитии *in situ*.

Разные функциональные характеристики, о которых далее пойдет речь, получены на разных стадиях дифференцировки мышечных клеток. Так, например, сократительные характеристики получены главным образом в раннем постнатальном и частично в позднем пренатальном онтогенезе. Напротив, электрические характеристики получены, начиная со стадии мюбластов, и главным образом в условиях культуры. Соответственно мы имеем дело с принципиально разными вещами. В одном случае (в культуре, в раннем онтогенезе) речь идет о донервном периоде развития, т. е. о собственно миогенных процессах. В другом случае речь идет об онтогенетических изменениях после установления иннервации и, следовательно, эти изменения могут быть индуцированы нервной системой. Сюда относятся все случаи позднего пренатального и всего периода постнатального развития. При рассмотрении конкретного материала это необходимо учитывать.

В настоящем обзоре мы коснемся развития функциональных свойств главным образом так называемых фазных мышечных волокон, т. е. таких, у которых сократительный аппарат активируется пробегающей по волокну волной деполяризации — распространяющимся ПД. Скелетная, или локомоторная, мускулатура теплокровных позвоночных состоит почти исключительно из волокон этого типа. Другая часть соматической мускулатуры позвоночных образована так называемыми тоническими мышечными волокнами, отличающимися от фазных (наряду с другими свойствами) тем, что их поверхностная мембрана не способна генерировать распространяющийся ПД. У млекопитающих этих волокон очень мало, они обнаружены пока только в двигательном аппарате органов чувств. Но эти волокна широко представлены в двигательном аппарате амфибий и других позвоночных, стоящих на эволюционной лестнице ниже млекопитающих. Об их развитии практически ничего не известно.

Рассматриваемые в статье работы выполнены главным образом на мышечных элементах теплокровных позвоночных. Обзор работ о развитии мышц оболочников и низших позвоночных можно найти в статье Н. А. Итиной [4].

Мембранный потенциал покоя

Рассмотрение процесса становления дефинитивных величин МПП является важным в нескольких аспектах. Величина МПП в значительной степени определяет те процессы на поверхностной мембране, которые происходят при возбуждении: от величины МПП зависит генерация ПД, от МПП зависит величина, а иногда и полярность электрического ответа мышечной мембраны на АХ, выделяющийся из нервных окончаний при подходе первого импульса.

Как свидетельствуют измерения, проведенные *in situ* на эмбриональном материале и в первые дни постнатальной жизни, а также многочисленные данные, полученные в условиях культуры мышечных клеток, дефинитивная величина МПП достигается постепенно в процессе дифференцировки мышечных волокон.

В мышцах конечностей новорожденных млекопитающих одни авторы регистрируют МПП, равный -20 , -30 мв [5—9], другие более высокий — -50 , -60 мв [10, 11], но всегда значительно ниже, чем у взрослых животных. Величина МПП зависит от функциональной значимости мышц к моменту рождения. Так, МПП диафрагмы всегда значительно выше МПП скелетных мышц. Мышцы зрелорождающихся животных (морских свинок по сравнению с белыми крысами, котятами) при рождении всегда имеют более высокий МПП. Например, МПП *m. semimembranosus* морской свинки от рождения до взрослого состояния изменяется в пределах от -83.3 до -87 мв, тогда как у белой крысы изменения составляют от -23.9 до -77.6 мв [12]. Те же закономерности прослеживаются и в процессе развития мышечных волокон холоднокровных [7].

Самые онтогенетически ранние измерения МПП *in situ* проведены Кано [13] на мышцах развивающейся конечности цыпленка с 13-го пренатального до 18-го постнатального дня. За этот период отмечено возрастание МПП от -40 до -75 мв. Наиболее крутой рост МПП наблюдался в течение нескольких дней, предшествующих вылуплению.

Можно было бы думать, что изменения МПП, обнаруживаемые *in situ*, обусловлены влиянием подрастающих нервов. Однако исследования, проведенные на первичных мышечных культурах, дают тот же результат. По мере развития мышечных элементов от миобластов к миотубам разного возраста и до зрелых мышечных волокон наблюдается постепенное возрастание величины МПП от $-5 \div -10$ до $-55 \div -60$ мв [14, 15], а иногда и до -80 мв [16]. По данным Ритчи и Фэмброу [15], плато на уровне $-55 \div -60$ мв достигается на 7-й день существования первичной культуры мышечных элементов белых крыс (культура получалась от 17—18-дневных эмбрионов). Примерно те же величины МПП полу-

чены этими авторами на мышечных клетках цыплят в первичной культуре.

При длительном клонировании мышечных элементов результаты получаются другие. Уже миобласты имеют высокий МПП (-70 мв, по Кидокоро [17, 18], и -56 , по Ритчи и Фэмброу [15]), и при созревании МПП не увеличивается. Эти данные свидетельствуют о том, что длительное клонирование клеток каким-то образом сказывается на свойствах их поверхностных мембран.

Поскольку величина МПП определяется такими факторами, как 1) соотношение концентраций основных неорганических ионов (K , Na , Cl) по обе стороны мембраны, 2) проницаемость мембраны для этих ионов и 3) работа Na^+ , K^+ -насоса, постольку целесообразно просмотреть, какие данные имеются в литературе относительно этих факторов применительно к развивающимся мышцам. В исследованиях *in situ* показано, что даже в постнатальном онтогенезе нормальное, «взрослое» соотношение внутриклеточной и внеклеточной концентраций ионов K и Na устанавливается постепенно. При этом одни авторы отмечают высокую стабильность внутриклеточной концентрации K^+ [19, 20], по данным других, — в первые постнатальные дни имеет место некоторое (до 15%) увеличение K_{in}^+ [21—23].

Относительно изменений внутриклеточной концентрации Na^+ данные разных исследователей расходятся очень значительно. Некоторые авторы отмечают постепенное снижение Na_{in}^+ . Одни из них находят весьма существенное снижение, примерно в 10 раз (от 18 до 3 мМ) на протяжении нескольких дней развития [21, 22]; другие обнаруживают менее существенное снижение, примерно в полтора раза [24]. А. И. Новикова [19], напротив, на том же объекте — белых крысах — обнаружила почти десятикратное возрастание внутренней концентрации ионов Na (от 2.69 до 18.79 мэкв/л внутриклеточной воды) на протяжении первых постнатальных недель. Внеклеточная концентрация ионов Na (в плазме крови) в процессе онтогенетического развития изменяется мало [19].

Исследуя с помощью пламенной фотометрии те же явления в первичной культуре мышечной ткани, Ритчи и Фэмброу [15] не обнаружили изменений внутриклеточного содержания ионов K и Na в процессе развития миотуб от 3-го до 9-го дня. Полученные ими средние величины составляют для K_{in}^+ 153 ± 5 мМ, для Na_{in}^+ — 13 ± 1 мМ. Тем не менее МПП миотуб в течение этого же времени изменялся весьма существенно, от -8 до -55 мв. А. И. Новикова [19] использовала полученные ею данные о внутриклеточной и внеклеточной концентрациях ионов K и Na для расчета величины МПП по формуле Гольдмана. При этом выявилось хорошее совпадение рассчитанных и измеренных величин МПП для мышц животных не моложе одного месяца. И в опытах А. И. Новиковой для новорожденных крысят, и в опытах Ритчи и Фэмброу для молодых миотуб (3 дня) получается очень большое несоответствие рас-

считанных и измеренных величины МПП, которое может быть связано с тем, что коэффициенты проницаемости для ионов K и Na на этих ранних стадиях развития существенно отличаются от «взрослых» значений.

Относительно изменений проницаемости мембран развивающихся мышечных клеток для основных потенциалобразующих ионов данных пока очень мало, но имеющийся материал свидетельствует, что такие изменения есть. По Кидокоро [18], МПП миобластов и миотуб культуры L_6 обусловлен преимущественно ионами K . Им показана линейная зависимость величины МПП этих объектов от K_{ii}^+ . Изменения МПП составляют около 50 мв на десятикратное изменение K_{ii}^+ . При линейной экстраполяции МПП до 0 концентрация ионов K внутри миобластов и миотуб оказывается равной 150 мМ. С другой стороны, изменение Na_{ii}^+ вплоть до полного удаления натрия из среды и замены его трисом или холином совершенно не влияет на величину МПП, что как будто должно свидетельствовать об очень низкой проницаемости мембраны для этих ионов. Сходные данные относительно влияния на МПП наружных концентраций K^+ и Na^+ получены Лендом и др. [25] на культуре L_6 и первичной культуре поперечнополосатых мышечных клеток мышей.

Ритчи и Фэмброу [15] обнаружили, что по ходу дифференцировки миотуб в первичных культурах крыс и цыплят параллельно возрастанию величины МПП происходит увеличение пассивной проницаемости мембран для ионов K (P_K) относительно проницаемости для ионов Na (P_{Na}). Трехдневные миотубы имели P_{Na}/P_K в среднем равным 0.4 при МПП = -24 мв. Начиная с 7 дней, в культуре P_{Na}/P_K становилось равным 0.07 при МПП более -55 мв. Эти исследователи полагают, что именно селективное увеличение проницаемости мембран для ионов K определяет увеличение МПП в процессе созревания мышечных элементов.

Мембрана «взрослых» мышечных волокон позвоночных обычно является высокопроницаемой для ионов хлора. P_{Cl} по величине обычно сопоставимо с P_K . Мышечные элементы, развивающиеся в культуре, по этому признаку существенно отличаются от мышечных волокон. Единодушное мнение исследователей [15, 18, 25] сводится к тому, что P_{Cl} покоящейся мембраны миобластов и миотуб чрезвычайно низка и ионы Cl не принимают участия в генерации МПП.

Как известно, в поддержании градиента ионов на мембране взрослых мышечных волокон (и, следовательно, определенной величины МПП) участвует Na, K -насос, который непрерывно удаляет из клетки ионы Na , поступающие в нее как в период покоя (вследствие наличия градиента Na^+ по обе стороны мембраны и той или иной проницаемости покоящейся мембраны для этих ионов), так и в моменты активности, поскольку генерация ПД связана с поступлением Na^+ внутрь клетки. Работа Na, K -насоса тормозится уабапином — глюкозидом, который специфически тормозит транс-

портную АТФазу, расщепляющую АТФ, используемую для работы насоса. Относительно работы Na, K-насоса в развивающихся мышечных волокнах можно судить только по работе Рптчи и Фэмброу [15]. Судя по их данным, насосный механизм на мембране мютоуб не работает, поскольку ни убаши, ни кратковременное снижение температуры не уменьшают трансмембранной разности потенциалов. Однако специальными приемами, например длительным охлаждением, работа насоса может быть активирована, и он начинает принимать участие в поддержании нормального градиента ионов на мембране. Это свидетельствует о том, что механизм насоса уже сформирован, но почему-то пребывает в неактивном состоянии.

Изменение пассивных электрических свойств поверхностной мембраны в процессе развития

Целым рядом исследователей проведены наблюдения за изменением констант поверхностной мембраны, характеризующих ее пассивные электрические свойства в процессе дифференцировки мышечных элементов в условиях культуры мышечной ткани и *in vivo* в процессе онтогенеза.

Разными авторами [14—16, 18, 26] на разных объектах в культуре и в раннем онтогенезе получены существенно различающиеся величины удельного сопротивления мембран (R_{yx}) — от 0.5 до 12 ком \times см². Однако почти все авторы отмечают отсутствие закономерных изменений R_{yx} в процессе созревания мышечных структур. Отмечается также отсутствие корреляций между R_{yx} и МПП, постепенно увеличивающимся в процессе созревания клеток, что как будто бы должно говорить о неизменности суммарной проницаемости каналов, ответственных за пассивную проницаемость мембран. Изменения R_{yx} в процессе онтогенеза обнаружены Гордоном и др. [27]. У взрослых кур R_{yx} медленного *m. anterior latissimus dorsi* во много раз превосходит значения R_{yx} быстрого *m. posterior latissimus dorsi* [28]. Авторы обнаружили, что на ранних донерных этапах развития этих мышц (14—16 дней инкубации) R_{yx} у них было одинаковым. После появления контактов с нервными элементами R_{yx} быстрой мышцы уменьшалось, а медленной — увеличивалось. Эти сдвиги продолжались и после вылупления.

Емкость мембраны (C_{yx}) в процессе развития от миобластов к мютоубам увеличивается (от 1 до 5 мкф/см²). Это увеличение C_{yx} авторы связывают с обнаруживаемым электронномикроскопически развитием системы поперечных трубочек, отходящих от поверхностной мембраны (Т-системы) [18].

Постоянная длины (λ_{yx}) [29, 30] и постоянная времени (τ_{yx}) [14, 16, 18] у развивающихся элементов обычно больше, чем у де-

финитивных. В целом величины рассмотренных мембранных констант развивающихся структур ближе по своим значениям к соответствующим константам денервированных мышц [14].

Потенциал действия развивающихся мышц

В естественных условиях ПД, возникающий в мышце в результате прихода к ней первого импульса и распространяющийся по поверхностной мышечной мембране вдоль всего волокна, является первым звеном среди процессов, участвующих в запуске сокращения. ПД мышц позвоночных представляет собой кратковременную деполяризацию, развивающуюся и спадающую на протяжении нескольких миллисекунд. При этом абсолютная величина ПД, как правило, превосходит величину МПП, образуя так называемый овершут (overshoot). Развитие деполяризации во время ПД обусловлено тем, что раздражающий (деполяризующий) стимул приводит к резкому лавинообразно нарастающему увеличению проницаемости мембраны для ионов Na и соответствующему перемещению этих ионов по градиенту концентрации снаружи внутрь клетки. ПД скелетных мышечных волокон взрослых позвоночных не имеет плато: восходящее колено ПД непосредственно переходит в нисходящее. Спад ПД, т. е. реполяризация мембраны, является следствием нескольких процессов. Во-первых, имеет место уменьшение Na -проводимости мембраны, являющееся следствием инактивации Na -каналов. Во-вторых, вход ионов Na внутрь клетки притормаживается вследствие приближения величины МПП к Na -равновесному потенциалу. В-третьих, процесс восстановления ускоряется за счет задержанного во времени увеличения калиевой проводимости мембраны (g_k). Калиевый ток, имея направление, противоположное току ионов Na (изнутри наружу), ликвидирует избыток положительных зарядов внутри клетки и тем самым ускоряет реполяризацию мембраны, укорачивает ПД.

Следует также напомнить, что развитию ПД взрослых мышечных волокон препятствует отравление тетродотоксином — ядом, специфически блокирующим так называемые быстрые, потенциалозависимые натриевые каналы мембраны. На ПД денервированных мышц взрослых позвоночных тетродотоксин не действует [31, 32].

У млекопитающих в последние пренатальные и первые постнатальные дни зарегистрированы мышечные ПД, принципиально не отличающиеся от дефинитивных. Имеющиеся отличия состоят в следующем. 1) ПД мышц новорожденных животных имеют более низкую амплитуду; 2) ПД часто не превышают величины МПП, т. е. не имеют овершута; 3) ПД новорожденных отличаются большей длительностью, которая в несколько раз превосходит длительность взрослых ПД. ПД новорожденных животных не блокируются тетродотоксином [33].

Очень интересные данные получены при изучении механизмов генерации мышечных ПД в условиях культуры ткани. Относительно

простой механизм генерации ПД, который обнаруживается в мышцах взрослых и даже поворожденных животных, является результатом определенной онтогенетической эволюции; ранние стадии развития ПД по механизмам могут существенно отличаться от того, что имеет место во взрослом состоянии. Истоки этих исследований восходят к работе 1959 г., выполненной Лп с соавторами [34]. Регистрируя с помощью микроэлектрода ПД от спонтанно сокращающихся клеток эксплантата бедренных мышц эмбриона цыпленка, авторы показали существование у этого объекта ПД разных типов: 1) быстрого высокоамплитудного пикового ПД, похожего по форме на ПД взрослых мышц, 2) медленного, затянутого, куполообразного ПД и 3) ПД, представляющего собой комбинацию первых двух форм. В дальнейшем разные авторы получили эти же три формы ПД уже в ответ на прямое электрическое раздражение и полагают, что эти разные формы ответов могут быть свойственны разным функциональным типам мышечных волокон [35]. Однако более поздние исследования показали, что разные формы потенциалов есть отражение последовательных стадий развития электрогенного механизма ПД на мышечной мембране. Сегодня мнение большинства исследователей сводится к тому, что одноядерные клетки (миобласты) не обладают электрической возбудимостью в том смысле, что их мембрана не способна продуцировать активный, реверсированный электрический потенциал (ПД) в ответ на деполяризующее воздействие [13, 17, 18, 25]. Однако какие-то зачатки регенеративного процесса выявляются уже у миобластов. Если мембрану миобластов предварительно гиперполяризовать до -100 мв, то при размыкании анодного тока можно зарегистрировать пиковые потенциалы регенеративного характера, имеющие амплитуду около 20 мв. Отсутствие подобного ответа на деполяризующий ток связано, вероятно, с инактивацией мембраны, имеющей место при нормальном низком МПП миобластов, равным $-30 \div -50$ мв [18]. Другие исследователи не обнаруживают у миобластов электрической возбудимости и полагают, что решающие изменения мембраны в этом отношении происходят в момент слияния миобластов и образования хотя бы двуядерной клетки [25].

В условиях мышечной культуры (как первичной, так и при длительном клонировании) удалось зарегистрировать ПД миотуб. Были зарегистрированы спонтанно возникающие ПД, ПД в ответ на прямое раздражение, а также мышечные ПД, возникающие в ответ на раздражение нервных элементов, подсаженных к мышечной культуре. ПД миотуб уже можно получить в ответ на деполяризующий толчок тока, если их МПП превосходит $-55 \div -60$ мв [14, 16, 25, 35]. Однако и на этой стадии развития ПД легче получаются в ответ на размыкание анодного тока [18, 25] или после предварительной гиперполяризации мембраны [16]. Например, Харрис и др. [10] отмечают, что вскоре после слияния миобластов ПД может быть вызван только размыканием анодного

тока, гиперполяризующего клетку примерно до -150 мв. Позже МПП увеличивается, и ПД может быть вызван деполяризующим стимулом. Поскольку ПД вначале может быть вызван только размыканием гиперполяризующего тока, некоторые авторы считают, что при нормальном для развивающихся элементов МПП паттерновый регенеративный механизм находится в инактивированном состоянии [18]. Однако другие авторы [36] отмечают, что даже при высоком и устойчивом МПП некоторые волокна не способны давать регенеративных ответов (ни спайков, ни плато) на деполяризующий стимул. Когда был зарегистрирован ПД уже у мюбластов, можно было видеть, как амплитуда ПД скачком увеличивается после слияния мюбластов. ПД с овершутом можно видеть уже в двуядерных клетках [18].

ПД развивающихся мышечных элементов на стадии мютуб по максимальной амплитуде (максимальный овершут составляет $+43$ мв) примерно таков же, как у дефинитивных мышечных клеток в организме, но по временным характеристикам и по форме этот ПД существенно отличается от обычных мышечных потенциалов. Иногда он пиковый, простой, а чаще сложный, состоящий из двух компонентов: быстрого пика и компонента, затянутого во времени, — горба или плато. В некоторых случаях исследователи регистрируют только плато-потенциал без первого пикового компонента или только пик [17, 25, 34, 35]. Пиковый компонент обычно имеет более высокую амплитуду и является реверсированным. Амплитуда плато у разных авторов различна. Иногда она практически равна амплитуде пикового компонента и является реверсированной [18, 25]. По данным других авторов, она значительно ниже, чем пик. Плато неградуально, генерируется по типу «все или ничего». Оно отличается по форме и длительности от подпороговых электротонических ответов, т. е. является ответом регенеративной системы [13, 17, 25, 35]. Характер активных ответов не коррелирует с величиной МПП и, следовательно, не обусловлен им [13].

Появление электрической возбудимости мембраны является чисто миогенным процессом и никак не связано с наличием или отсутствием нервных элементов в культуре [35, 37, 38]. Однако последние данные [39] свидетельствуют о том, что добавление в среду экстрактов из эмбрионального мозга приводит к увеличению плотности на мышечной мембране тетродотоксин-чувствительных Na-каналов.

Временные характеристики сложного ПД существенно различаются у разных объектов и разных авторов. Так, по данным Кидокоро [17, 18], длительность сложного ПД мютуб в клопе L_6 (вместе с плато) на середине амплитуды составляет около 100 мс. По мере созревания ПД укорачивается. Максимальная скорость роста переднего фронта потенциала составляет 93 в/с. Сходные характеристики получены Харрисом с соавторами [10] на той же культуре. Обе группы авторов отмечают наличие выраженной

(до 15 мв) и длительной (до 5 с) следовой гиперполяризации. Ленд и др. [25] на мюотубах линии L_6 и первичной культуры мышечной культуры мышечной зарегирировали ПД более кратковременные (до 30 мс), хотя и состоящие из тех же двух компонентов — пика и плато. Пауэлл и Фэмброу [14], используя первичную мышечную культуру мышечной, регистрировали ПД в специально подбираемых по морфологическим критериям зрелых мышечных волокнах. Они установили, что ПД этих образований могут быть получены в ответ на короткий (2—3 мс) деполярирующий толчок тока и имеют форму, характерную для ПД зрелых мышц. Однако эти ПД имеют несколько меньший, чем в норме, овершут, более низкую максимальную скорость нарастания (235 вместо 750 в/с, характерных для той же мышцы — *m. extensor digitorum longus* — мышцы в норме) и время полуспада около 2 мс. Эти параметры оказываются более близкими к соответствующим параметрам денервированной мышцы, чем нормальной, но не достигают даже их уровня. Авторы приходят к выводу, что в культуре, лишенной сложных влияний целого организма, в процессе развития мышечных элементов не достигается даже тот уровень дифференцировки, который характерен для денервированных мышц взрослых животных.

Таким образом, в культуре мышечной ткани при регистрации ПД от созревающих элементов, обнаруживается большая вариабельность ответов. Некоторые исследователи [34, 35] полагают, что разнообразие форм ПД мышечных волокон в культуре ткани является отражением дифференцировки культивируемых мышечных элементов и что быстрые ПД относятся к быстрым, фазным волокнам, а плато — к медленным, тоническим. Однако уже применительно к культуре было высказано и другое соображение, состоящее в том, что большое разнообразие электрических ответов мюотуб есть нормальный феномен развития мышечной ткани [25]. Это предположение подтвердилось при последовательном изучении электрических свойств мышечных волокон в процессе развития *in vivo*, где гораздо легче провести временные корреляции. При этом окончательно выяснилось, что широкий спектр электрических ответов на раздражение, полученный в условиях культуры ткани, и существенные отличия от ответов взрослых мышц не могут быть поняты как специфическая черта, привносимая условиями культуры.

Медленный плато-потенциал не является принадлежностью только медленных мышц [40]. Авторы выращивали в культуре медленный *m. anterior latissimus dorsi* и быстрый *m. posterior latissimus dorsi* цыпленка, выделенные до наступления иннервации, и показали, что примерно половина раздражаемых клеток в той и другой мышцах кроме быстрого спайкового потенциала генерировала и медленный плато-потенциал. Кано [13], изучая эмбриональное и раннее постнатальное развитие мышц ноги цыпленка *in vivo*, показал, что в ходе созревания мышечных клеток их электрические ответы на раздражение образуют следующую последовательность:

пассивный электрический ответ, плато-ответ, плато + спайк, спайк. Иными словами, в процессе онтогенетического развития сначала возникают механизмы, ответственные за плато, и только позже — механизмы, генерирующие спайк. Плато-потенциал максимально выражен к 19-му дню эмбрионального развития. К моменту вылупления плато превращается в маленький горб, следующий за быстрым пиковым ответом, а в первые дни постнатальной жизни полностью исчезает. Таким образом, у птиц механизм плато появляется только на некоторый период развития и совсем исчезает в полностью дифференцированных клетках.

Близкие результаты получили Деннис и Орт [30], изучая *in vivo* развитие мышечной ткани в регенерирующей конечности аксолотля. Наблюдения начинали с такой стадии развития, когда мышца содержала лишь несколько волокон с диаметром 3—10 мкм, окруженных большим количеством сливающихся миобластов. Они изучали свойства мембран незрелых тонких волокон и показали, что на определенной стадии развития в ответ на раздражение можно получить только плато-потенциал большой длительности (от 100 мс до нескольких секунд). Быстрый ПД на этой стадии развития у аксолотля получить не удается. При дальнейшем созревании волокон медленный ответ исчезает и замещается обычным быстрым ПД, сходным с ПД взрослых амфибий, но несколько меньшей амплитуды.

Таким образом, особенности генерации ПД, обнаруженные в опытах на культуре мышечной ткани, подтвердились и получили свое разъяснение в исследованиях *in vivo*.

При изучении ионных механизмов разных компонентов сложного ПД выявилось следующее. Быстрый компонент сложного ПД и быстрые ПД, не осложненные плато, регистрируемые от миотуб и зрелых мышечных клеток в культуре и на поздних эмбриональных и постэмбриональных стадиях *in vivo*, имеют натриевую природу [25, 41, 42]. Они не генерируются в безнатриевой среде и обычно подавляются тетродотоксином [13, 25, 35, 36, 41]. Но чувствительность этого компонента к тетродотоксину абсолютна, как у натриевого ПД взрослых мышц. В культуре мышечных клеток крыс быстрый натриевый компонент спайка оказывается резистентным к действию тетродотоксина [17, 25, 38, 42], напоминая в этом отношении натриевый ПД денервированных мышц взрослых животных [31, 32]. Однокомпонентные быстрые ПД мышц новорожденных крысят тоже достаточно устойчивы к действию тетродотоксина [33]. Следует отметить также, что иннервация миотуб в культуре L_6 не увеличивает чувствительность их ПД к тетродотоксину.

Плато-потенциал является более сложным по своей природе. Многочисленные данные говорят о том, что во время генерации плато увеличивается проницаемость мембраны для ионов кальция, и соответственно плато-потенциал генерируется главным образом входящим током этих ионов. Кальциевая природа плато-потенциала подтверждается следующими фактами: 1) удаление Ca^{2+} из

наружного раствора уничтожает плато, сохраняя быструю часть ПД, а повышение концентрации Ca^{2+} резко увеличивает и затягивает плато-потенциал; 2) плато-потенциал не генерируется при наличии во внешней среде ингибиторов Са-проницаемости (Mn^{2+} , La^{3+} , верапамил и др.); 3) Ca^{2+} в его способности генерировать плато может быть замещен Ba^{2+} [25, 38, 42]. Плато может быть получено в растворах без Na^+ [17]. Тетродотоксин в большинстве случаев на плато не влияет, но в некоторых случаях отравление этим агентом или удаление Na^+ несколько снижает величину плато [13, 25, 35]. Это, вероятно, говорит о том, что ионы Na тоже, хотя бы частично, участвуют в генерации плато-потенциала.

Специальные исследования показали, что генерация ПД в нормальных мышцах взрослых крыс обусловлена исключительно увеличением натриевой проницаемости мембраны [42]. В денервированных мышцах тех же животных величина ПД зависит от наружной концентрации Na^+ и не зависит от соответствующей концентрации ионов Са [45].

Как уже было сказано, в мышцах взрослых животных спад ПД (реполяризация мембраны) ускоряется за счет задержанного во времени увеличения калиевой проводимости, которое тоже является реакцией на деполяризацию. При этом калиевой ток, имея направление, противоположное направлению тока ионов Na (изнутри наружу), ликвидирует избыток положительных зарядов внутри клетки, который образовался в результате вхождения ионов Na во время развития ПД. Эта задержанная реакция мембраны на деполяризацию постепенно формируется в мышечной клетке в процессе дифференцировки. Однако она отстает в своем развитии от способности мембраны реагировать на деполяризацию увеличением натриевой проводимости. Кидокоро [18] показал, что даже одноядерные миоциты линии L_6 способны генерировать низкоамплитудный натриевый ПД, тогда как задержанное увеличение калиевой проводимости у них полностью отсутствует и механизм задержанного выпрямления появляется только после слияния клеток и образования многоядерных миотуб. Это проявляется прежде всего в том, что ПД приобретает следовую гиперполяризацию. По мере созревания мышечных клеток задержанное выпрямление наступает быстрее после начала стимула, и с его появлением авторы связывают постепенное исчезновение плато и превращение ПД в быстрый пиковый потенциал.

Отдельные мышечные волокна, входящие в состав сложно устроенного органа — мышцы, полностью электрически изолированы друг от друга. В отличие от этого отдельные мышечные элементы, растущие в культуре (например, миотубы и миоциты, расположенные в непосредственной близости друг от друга), оказываются электрически связанными, и электрический сигнал, возникший в одной клетке, передается в соседнюю, хотя и в значительно ослабленном виде [10, 14]. Некоторые исследователи рассматривают этот феномен, имеющий место у пространственно сближенных кле-

ток, как первый признак их предстоящего слияния [43]. Электрически связанные клетки контактируют друг с другом посредством специализированных образований, напоминающих синапсы щелевого типа. Вероятно, эти мембранные образования представляют собой первые морфологические признаки слияния, поскольку их остатки встречаются на электронограммах слившихся клеток.

Существование электрической связи показано и при развитии мышц *in vivo* в регенерирующей конечности аксолотля. Показано, что электрическая связь не имеет признаков выпрямления, т. е. одинаково хорошо работает в обоих направлениях. Каждое развивающееся мышечное волокно связано минимум с одним соседним, а часто и с большим числом соседних волокон. Мышечная ткань не является исключением в этом отношении, поскольку существование подобных электрических связей вообще характерно как для возбудимых, так и для невозбудимых клеток в разных эмбриональных системах [44].

Подводя итоги сказанному, следует еще раз подчеркнуть, что нормальная величина МПП, характерная для зрелых мышечных элементов, устанавливается постепенно в процессе формирования мышечной ткани и это обусловлено постепенным созреванием основных механизмов, ответственных за генерацию МПП. Что касается ПД, то из изложенного видно, что механизмы его генерации по ходу дифференцировки мышечных клеток высших позвоночных претерпевают определенную эволюцию. Конечным стадиям развития, когда генерация ПД осуществляется исключительно за счет активации быстрых потенциалозависимых Na-каналов, предшествуют такие этапы, когда мембрана имеет по крайней мере два типа каналов для входящего тока — быстрые натриевые и медленные кальций-натриевые. С другой стороны, на начальных стадиях развития мышечной клетки не работают потенциалозависимые калиевые каналы для выходящего тока (отсутствует задержанное выпрямление). Обсуждая эти особенности, исследователи высказывают различные соображения [4, 42]. Возможно, наличие работающих Ca-каналов есть остаточная функция (своего рода атавизм), выраженная только на определенных стадиях развития. Основанием для такого предположения служит то обстоятельство, что локомоторные мышцы некоторых филогенетически более примитивных животных имеют и во взрослом состоянии кальциевый ПД (раки, оболочники). Интересно при этом отметить, что в ПД мышечных волокон оболочников в процессе развития обнаруживают те же два компонента (натриевый и кальциевый), но в отличие от позвоночных, у которых во взрослом состоянии остается только натриевый компонент ПД, у оболочников остается только кальциевый. Полагают также, что Ca-механизм ПД на ранних этапах развития мышечной клетки имеет функциональное значение, являясь механизмом начального накопления Ca^{2+} в СР.

ИЗМЕНЕНИЕ СИЛЫ И СКОРОСТИ СОКРАЩЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ В ХОДЕ МНОГЕНЕЗА

Основными функциональными характеристиками сокращения скелетных мышц являются сила, развиваемая при сокращении, скорость укорочения и расслабления, а также продолжительность состояния активности.

Вследствие методических трудностей работы с эмбриональным материалом все сведения, имевшиеся до самого последнего времени, были получены на мышцах, взятых от животных или в первые дни постнатальной жизни, или в самые последние дни существования эмбриона, и только недавно появились физиологические работы, выполненные на мышцах более раннего периода развития, иногда даже в донервный период.

Основная отличительная черта мышц новорожденных млекопитающих состоит в том, что все они сокращаются медленно. И укорочение, и расслабление происходят значительно медленнее, чем у соответствующих мышц взрослых животных и, кроме того, как правило, отсутствуют различия между скоростными характеристиками быстрых и медленных мышц [45—47]. Показано также, что гистохимическая дифференцировка мышечных волокон как по ферментам энергетического обмена, так и по активности миелиновой АТФазы тоже приобретает главным образом в процессе постнатального онтогенеза [48]. Для достижения дефинитивных характеристик требуется разное время, которое зависит от степени зрелости двигательного аппарата к моменту рождения и от размера животных. У кошек этот период составляет около 6 нед, у крыс и мышей он короче. У морских свинок и овец онтогенетические преобразования самых различных свойств мышц происходят преимущественно пренатально и лишь завершаются в постнатальный период. Многие авторы отмечают асинхронность в развитии разных мышц у одного и того же животного. Например, переход от миотуб к сформированным волокнам в межреберных мышцах крыс завершается еще до рождения, тогда как в мышцах конечностей он продолжается в постнатальный период [49]. Диафрагмальная мышца у новорожденных котят сокращается примерно с той же скоростью, что и у взрослых животных [50].

Общей закономерностью онтогенетического развития является последующее ускорение мышц [47, 51—54]. Существует представление, что это увеличение скорости укорочения и расслабления является следствием начавшейся функциональной активности и что оно является частью общего процесса созревания мышечных волокон. Только после завершения этого процесса может начинаться более тонкая дифференцировка мышц на быстрые и медленные, которая всегда связана с соответствующими влияниями нервной системы [55—59].

Итак, при рождении млекопитающих все скелетные мышцы являются более медленными, чем соответствующие мышцы у взрослых животных. У зрелорождающихся животных быстрые и медленные

мышцы различаются по скоростям одиночного и тетанического сокращения уже к моменту рождения. У незрелорождающихся — скоростные характеристики всех мышц задней конечности одинаковы [48, 53]. В процессе постнатального развития имеет место постепенное и последовательное ускорение сократительных характеристик быстрых мышц. Соответственно в «быструю» сторону изменяются и другие, например гистохимические, показатели, постепенно становясь такими, которые свойственны зрелым быстрым мышцам [60].

Иначе развиваются медленные мышцы. В раннем постнатальном онтогенезе некоторые авторы отмечают более или менее значительное ускорение будущих медленных мышц, а затем их вторичное замедление [51, 61, 62]. Соответственно дефинитивные временные характеристики медленных мышц достигаются за более длительный отрезок времени. Так, формирование скоростных свойств быстрых мышц у кошек завершается через 6 нед после рождения, а в медленных мышцах изменения продолжаются до 16—20 нед [51, 63]. Другие авторы не обнаруживают первичного ускорения медленных мышц и отмечают лишь длительно прогрессирующее замедление [63].

Опыты с денервацией мышц, проведенной сразу после рождения животного, показали, что в отсутствие иннервации нормальной дифференцировки на быстрые и медленные мышцы не происходит [54]. То же положение, но уже в отношении дифференцировки мышц кур на быструю, фазную *m. posterior latissimus dorsi* и медленную, тоническую *m. anterior latissimus dorsi* подтверждено при изучении сократительных свойств этих мышц в процессе их эмбрионального развития. По данным ряда исследователей [27], мышцы цыпленка получают функциональную иннервацию на 14—15-й день инкубации. До этого времени фазная и тоническая мышцы эмбриона сокращаются и расслабляются с одинаковой скоростью, но уже через несколько дней после установления иннервации те же эмбриональные мышцы существенно различаются по временным характеристикам [27, 64].

«Дифференцирующая» роль нервной системы выявляется также в опытах с перекрестной перешивкой нервов. После перерезки нервов «быстрый» нерв подшивается к медленной мышце, а «медленный» нерв — к быстрой. При этом происходит перестройка быстрой мышцы в медленную и наоборот. Степень перестройки может быть различной в зависимости от ряда обстоятельств, но перестройка всегда тем полнее, чем раньше в онтогенезе произведена перешивка нервов [51, 65—67].

Таким образом, сегодня, по-видимому, можно утверждать, что основным, хотя и не единственным дифференцирующим фактором в отношении специфических функциональных свойств скелетных мышечных волокон являются трофические нервные влияния [68, 69]. Другим мощным фактором, формирующим специфические черты мышц, является самый характер их деятельности, который, однако, тоже определяется влияниями, исходящими из централь-

пой нервной системы, но в этом случае решающую роль играет частота и последовательность потенциалов действия, приходящих к мышце по двигательному нерву [70].

Существует очень мало данных о природе тех процессов, которые определяют изменение скорости сокращения мышц в процессе онтогенетического развития животных. До сих пор нет полной ясности о том, имеет ли место истинное увеличение скорости сокращения фибриллярного аппарата или наблюдаемое ускорение сокращений связано с изменением размеров мышцы, ее механических свойств и другими косвенными причинами. Вместе с тем Клоуз и Хох [52, 61] показали, что у быстрой *m. extensor digitorum longus* и медленной *m. soleus* новорожденных кошек и крыс скорость сокращения в расчете на один саркомер («внутренняя скорость сокращения») является одинаковой. По прошествии 4 нед внутренняя скорость сокращения быстрой мышцы увеличивается в $2^{1/2}$ —3 раза, тогда как у медленной мышцы она практически не изменяется. Эти и некоторые другие косвенные данные привели авторов к выводу, что по крайней мере в быстрых мышцах в процессе созревания сократительного аппарата происходит ускорение взаимодействия фибрилл. Недавно показано, что, несмотря на медленное сокращение эмбриональных быстрых мышц, их легкие цепи миозина относятся к быстрому типу, а замедленность сокращений связана с неполнотой активации, недоразвитием системы ЭМС [71].

Максимальное напряжение, которое может развить целая мышца, по ходу постнатального онтогенеза увеличивается в сотни раз. Однако это увеличение силы мышцы идет параллельно с увеличением ее массы. В результате величина максимального напряжения в расчете на саркомер остается неизменной, что как будто бы говорит о том, что силовые характеристики сократительного аппарата не изменяются в процессе онтогенеза, во всяком случае постнатального [52].

Е. К. Жуковым с соавторами [72] показано, что в процессе постнатального онтогенеза млекопитающих уменьшается способность их мышц производить сокращение контрактурного типа, т. е. уменьшается способность реагировать устойчивым сокращением на длительную стойкую деполяризацию поверхностной мембраны. При этом быстрые мышцы с возрастом полностью утрачивают способность производить деполяризационные контрактуры. Медленные мышцы сохраняют эту способность, но контрактура становится гораздо более кратковременной. Другими авторами [73, 74] аналогичные изменения показаны в отношении ацетилхолиновой и кофейновой контрактур.

Одной из особенностей скелетных мышечных волокон, развивающихся в культуре в отсутствие нервных элементов, является их спонтанная сократительная активность [3, 75]. Она проявляется в тот период, когда большинство миотуб в культуре приобретает поперечную полосатость [16, 34, 36]. Вначале появляются

медленные спонтанные сокращения, а затем и быстрые вздрагивания одиночных волокон. Постепенно зона активности расширяется, и в конце концов большое число мышечных волокон начинает сокращаться синхронно. Характер спонтанной активности по мере созревания культуры изменяется от одиночных сокращений к ритмическим подергиваниям, а позже к слитным тетанусам. В основе спонтанной сократительной активности лежат периодические изменения МПП клеток, приводящие к генерации ПД и сокращениям. По другим данным [10], спонтанные сокращения начинаются на стадии поздних миотуб до появления поперечной исчерченности, но способность к спонтанным сокращениям отстает от способности генерировать спонтанные ПД. Четкая ЭМС обнаруживается только тогда, когда МПП развивающихся клеток достигает величины $-55 \div 60$ мв [16].

Ритм спонтанных сокращений миосимпласта не является устойчивым и, как показано А. Г. Гинецинским с соавторами [76], колеблется от 60 до 300 сокращений в мин.

Культура как целое реагирует на прямое раздражение электрическим током. В зависимости от частоты раздражения можно получить одиночные сокращения или тетанусы. Однако сокращения элементов культуры являются гораздо более медленными (примерно в 10 раз), чем сокращения взрослой мышцы, давшей исходный материал для культуры [2].

Известно, что волокна взрослых мышц в условиях нормы никогда спонтанно не сокращаются. Не обнаружено спонтанной активности и у развивающихся мышечных волокон эмбрионов. Но спонтанные фибрилляции наблюдаются у взрослых мышц после денервации. Видимо, этот феномен характерен вообще для скелетных мышечных волокон, лишенных иннервации.

Наряду с эволюцией сократительных и возбудимых свойств в процессе дифференцировки мышечных волокон происходят существенные изменения холинорецепции. Мы не рассматриваем этот вопрос, поскольку детальный обзор последних данных по проблеме холинорецепции (включая материалы по онтогенезу) сделал М. А. Посконовой [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный в статье материал свидетельствует о том, что на пути достижения дефинитивных свойств мышечные волокна наряду с низким уровнем морфологической и биохимической дифференцировки обнаруживают и признаки малой функциональной дифференцировки. Во многих исследованных случаях это означает наличие у развивающихся мышечных элементов (миобластов, миотуб) большего набора функциональных признаков, чем у взрослой специализированной клетки. Это хорошо проявляется на примере ионных каналов поверхностной мембраны, ответственных за генерацию ПД: развивающиеся клетки генерируют ПД за счет ионов

и Na, Ca, взрослые — только за счет Na⁺. То же можно сказать и о сократительных свойствах — например, все мышцы на определенных стадиях развития обладают высокой тоничностью. Позже у быстрых фазных мышц это свойство утрачивается.

Однако относительно ряда других функциональных признаков следует признать, что они появляются (или проявляются) только при достижении определенного уровня дифференцировки. Это, по-видимому, можно сказать о регенеративном механизме ПД, механизме задержанного выпрямления и т. д. В функциональном плане (так же, как это показано в плане морфологическом) развитие сопровождается не только приобретением определенных элементов или свойств, но в какой-то степени и их утратой. В этом отношении функциональные изменения, происходящие в процессе онтогенетического развития, по своим тенденциям близки к тому, что происходит по ходу филогенетического преобразования поперечнополосатых мышц. Дополнительные материалы по этому вопросу можно найти в книге Е. К. Жукова с соавторами [1], а специальное его обсуждение — в книге Виттенбергера [77].

Многочисленные исследования, проведенные с использованием культуры мышечной ткани, а также *in vivo* в раннем онтогенезе, свидетельствуют о том, что функциональная дифференцировка мышечных волокон начинается и достигает определенного уровня в отсутствие нервных влияний. На этом этапе формируются черты, свойственные скелетной поперечнополосатой мышечной ткани вообще. Дальнейшая дифференцировка, проявляющаяся в определенной функциональной специализации (например, разделение на быстрые и медленные фазные мышечные волокна), осуществляется только под влиянием нервной системы. Изучение этих влияний, а также тех внутренних процессов, которые лежат в основе последовательного изменения функциональных свойств развивающихся мышц, является насущной задачей физиологов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Жуков Е. К., Итина Н. А., Магазаник Л. Г., Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А., Свицерский В. Л., Скоробовичук Н. Ф., Ушаков В. Б. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. Л., Наука, 1974.
- [2] Гнеципский А. Г., Закс М. Г., Итина Н. А., Соколова М. М. — Физiol. журн. СССР, 1950, 36 : 69.
- [3] Миггау М. — In: The structure and function of muscle. New York, Acad. Press, 1960, 1 : 11.
- [4] Итина Н. А. — Журн. эвол. биохим. и физиол. 1979, 15 : 401.
- [5] Новикова А. И. — Физiol. журн. СССР. 1962, 48 : 1504.
- [6] Фудель - Осипова С. И., Мартыненко О. А. — Биофизика, 1963, 8 : 45.
- [7] Моисова Ф. Е. — В кн.: Вопросы возрастной физиологии и морфологии. Изд-во Ленингр. пед. ин-та им. А. И. Герцена, 1965 : 108.
- [8] Соломатин С. С. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1967, 3 : 321.
- [9] Соломатин С. С. — Бюлл. эксперим. биол. медц., 1968, 66 : 9.
- [10] Harris A. Y., Heinemann S., Schubert D., Takakis H. — Nature, 1971, 231 : 296.

- [11] Vyskocil F. — Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1974, 352 : 155.
- [12] Новикова А. И., Ломапов Б. К. — В кн.: Молекулярная биология старения. Киев, Наукова думка, 1969 : 161.
- [13] Кано М. — J. Cell Physiol., 1975, 86 : 503.
- [14] Powell J. A., Fambrough D. M. — J. Cell Physiol., 1973, 82 : 21.
- [15] Ritchie A. K., Fambrough D. M. — J. Gen. Physiol., 1975, 66 : 327.
- [16] Fischbach C. D., Nameroff M., Nelson P. G. — J. Cell Physiol., 1971, 78 : 289.
- [17] Kidokoro J. — Nature New Biol., 1973, 241 : 158.
- [18] Kidokoro J. — J. Physiol., 1975, 244 : 129.
- [19] Новикова А. И. — Физiol. журн. СССР, 1964, 50 : 626.
- [20] Vernadakis A., Woodbury D. M. — Amer. J. Physiol., 1964, 206 : 1365.
- [21] Dickerson J. W. T. — Biochem. J., 1960, 75 : 33.
- [22] Dickerson J. W. T., Widdowson E. M. — Biochem. J., 1960, 74 : 247.
- [23] Фудель-Осипова С. И., Мартыненко О. А. — Биофизика, 1965, 10 : 796.
- [24] Мартыненко О. А. — В кн.: Механизмы старения. Киев, Медпатат УССР, 1963 : 290.
- [25] Land V. R., Lastre A., Podleski T. R. — J. Cell Physiol., 1973, 82 : 497.
- [26] Новикова А. И. — Физiol. журн. СССР, 1967, 53 : 344
- [27] Gordon T., Purves R. D., Vrbová G. — J. Physiol., 1977, 269 : 535.
- [28] Fedde M. R. — J. Gen. Physiol., 1969, 53 : 624.
- [29] Diamond J., Miledi R. — J. Physiol., 1962, 162 : 393.
- [30] Dennis M. J., Ort C. A. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1976, 40 : 435.
- [31] Redfern P., Thesleff S. — Acta physiol. scand., 1971, 82 : 70.
- [32] Harris J. B., Thesleff S. — Acta physiol. scand., 1971, 83 : 382.
- [33] Harris J. B., Marshall M. W. — Nature New Biol., 1973, 243 : 191.
- [34] Li C.-L., Engel K., Klatzo J. — J. Cell Comp. Physiol., 1959, 53 : 421.
- [35] Кано М., Shimada J., Ishikawa K. — J. Cell Physiol., 1972, 79 : 363.
- [36] Кано М., Shimada J. — J. Cell Physiol., 1973, 81 : 85.
- [37] Кано М., Shimada J. — J. Cell Physiol., 1971, 78 : 233.
- [38] Kidokoro J. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1976, 40 : 373.
- [39] Кано М., Suzuki N., Ojima H. — J. Cell Physiol., 1979, 98 : 327.
- [40] Purves R. D., Vrbová G. — J. Cell Comp. Physiol., 1974, 84 : 97.
- [41] Fucuda J. — Science, 1974, 185 : 76.
- [42] Kidokoro J. — J. Physiol., 1975, 244 : 145.
- [43] Rash J. E., Fambrough W. — Develop. Biol., 1973, 30 : 166.
- [44] Bennet M. V. — Fed. Proc., 1973, 32 : 65.
- [45] Вану Г. — Цит. по [53].
- [46] Денпу-Броун Д. Е. — Proc. Roy. Soc., B., 1929, 104 : 371.
- [47] Koschtobjanz Ch., Rabinowskaja A. — Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1935, 235 : 416.
- [48] Curless R. G. — Progress in Neurobiol., 1977, 9 : 197.
- [49] Kelly A. M., Zacks S. J. — J. Cell Biol., 1969, 42 : 135.
- [50] Глебовский В. Д. — Физiol. журн. СССР, 1961, 47 : 470.
- [51] Buller A. J., Eccles J. C., Eccles R. M. — J. Physiol., 1960, 150 : 399.

- [52] Close R. — J. Physiol., 1964, 173 : 74.
- [53] Close R. — Physiol. Rev., 1972, 52 : 129.
- [54] Brown M. D. — Nature, 1973, 244 : 178.
- [55] Vrbová G., O'Brien R. A. — In: Abstr. Intern. symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 69.
- [56] Engel W. K., Karpati G. — Develop. Biol., 1968, 17 : 713.
- [57] Nystrom B. — Acta neurol. scand., 1968, 44 : 405.
- [58] Brooke M. H., Kaiser K. K. — Arch. Neurol., 1970, 23 : 369.
- [59] Curless R. G., Nelson M. B. — J. Embryol. Exper. Morphol., 1976, 36 : 355.
- [60] Gutmann E., Melichná J. A. — Physiol. Bohemoslov., 1978, 28 : 35.
- [61] Close R., Hoh J. F. Y. — J. Physiol., 1967, 192 : 815.
- [62] Hammarberg C., Kellerth J. O. — Acta physiol. scand., 1975, 95 : 243.
- [63] Huizar P., Kano M., Miyata J. — J. Physiol., 1975, 252 : 465.
- [64] Gordon T., Vrbová G. — Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1975, 360 : 199.
- [65] Dubowitz V. — J. Physiol., 1967, 193 : 481.
- [66] Close R. — J. Physiol., 1969, 204 : 331.
- [67] Hnik P., Jirmanová J., Syrový I. — Physiol. Bohemoslov., 1977, 26 : 103.
- [68] Harris A. J. — Ann. Rev. Physiol., 1974, 36 : 251.
- [69] Gutmann E. — Ann. Rev. Physiol., 1976, 38 : 177.
- [70] Lomo T. — In: Motor innervation of muscle / Ed by S. Thesleff. London; New York, Acad. Press, 1976 : 289.
- [71] Pette D., Vrbová G., Whalen R. C. — Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1979, 378 : 251.
- [72] Жуков Е. К., Сперанская Л. А., Федоров В. В. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1968, 4 : 469.
- [73] Гинецинский А. Г., Шамарина Н. М. — Усп. соврем. биол., 1942, 15 : 283.
- [74] Gutmann E., Ganzliková V. — Physiol. Bohemoslov., 1966, 15 : 404.
- [75] Итина Н. А. — Усп. физиол. наук, 1976, 7 : 69.
- [76] Посконова М. А. — В кн.: Нервный контроль структурно-функциональной организации мышц. Л., Наука, 1980 : 52.
- [77] Wittenberger C. Evoluția funcției musculare la vertebrate. Bucuresti, 1971.

И. И. РАЗУМОВСКАЯ, С. А. ДАМБИНОВА

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УЧАСТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РАЗВИТИИ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы весьма разнообразны по своим функциям, размерам, скорости роста, метаболическим особенностям и т. д. Все эти характеристики, связанные с функциональной специализацией мышц, определяются факторами, регулирующими развитие мышечной ткани в пре- и постнатальный периоды жизни. Среди этих факторов важное место принадлежит нервной регуляции.

Поскольку именно характер иннервации является в конечном счете решающим моментом в функциональной деятельности мышц, их дифференцировка в процессе онтогенеза также в значительной степени сопряжена с развитием нервно-мышечных контактов. Хотя в культуре миобласты и дифференцируются в миотубы, способные к спонтанным сокращениям, однако дефинитивные мышечные волокна в этих условиях все-таки не образуются [1—4]. Очевидно, генетическая программа развития мышц включает в себя формирование нервно-мышечных контактов и подготовку мышечной ткани к приему и выполнению команд нервной системы.

При изучении метаболических путей нервно-мышечных взаимодействий в миогенезе следует, вероятно, прежде всего рассмотреть готовность мышечной клетки к восприятию нервных импульсов, а затем выяснить ее реакцию на нервный сигнал и оценить значение этой реакции в дальнейшем развитии и созревании мышцы. В настоящем обзоре предпринимается попытка суммировать и обобщить относительно немногочисленные данные по этому вопросу.

МЕМБРАННАЯ СИСТЕМА ПРИЕМА НЕЙРОМЕДИАТОРА

Непосредственной мишенью медиаторов, высвобождаемых нервными окончаниями, является поверхностная мембрана мышечной клетки. Биохимические свойства этой мембраны, обеспечивающие реакцию мышечного волокна на нервный сигнал, и развитие этих свойств в процессе миогенеза сравнительно хорошо изучены. Еще до формирования нервно-мышечного контакта в мышечных клетках появляется система мембранных белков, необходимая для приема нейромедиатора — ацетилхолина (холинорецептор и ацетилхолин-

эстераза) [5, 6]. ХР можно обнаружить на поверхности клеток, используя меченый α -бунгаротоксин. В ряде работ обнаружена способность культивируемых миобластов связывать меченый α -бунгаротоксин [7—9]. На клетках мышц куриных эмбрионов [10] и эмбрионов мыши [11] показано, что плазматическая мембрана миобластов обладает двумя типами участков связывания — с высоким и низким сродством к бунгаротоксину. Плотность ХР, связывающих бунгаротоксин, довольно высока: 200/мкм² для участков с высоким сродством и 1000/мкм² для участков с низким сродством [10], тогда как для концевой пластинки сформированного нервно-мышечного синапса эта величина составляет 13 000/мкм² [12]. На ранних стадиях развития миобласты уже обладают и АХЭ-активностью, которая резко возрастает в период слияния [13, 14]. До начала формирования нервно-мышечного соединения фермент еще не локализуется в мышечной мембране. Его активность проявляется во внутриклеточных структурах, в особенности в саркоплазматическом ретикулуме [15]. Присутствие АХЭ в миобластах обнаружено не только в условиях их культивирования *in vitro*. Гистохимические исследования показывают, что активность АХЭ *in situ* проявляется на очень ранних стадиях развития мышечной ткани, в премиобластах и миобластах [13]. При этом установлено, что уровень активности испытывает колебания в зависимости от стадий клеточного цикла: активность максимальна в стадии G₁.

Таким образом, синтез ХР и АХЭ в мышечной ткани генетически запрограммирован и, по-видимому, не зависит от влияния нервной системы. Однако специфическая локализация этих белков, связанная с особенностями их функционирования, характерна только для иннервированных клеток. Постепенное образование и созревание нервно-мышечного синапса сопровождается, как известно, падением общей чувствительности мышечного волокна к АХ и развитием локальной чувствительности в точке контакта нерва и мышцы [6, 15, 16]. В настоящее время еще трудно с полной уверенностью сказать, какие именно стадии в процессе функционального созревания системы ХР—АХЭ зависят от нервного контроля — только ли встраивание этих белков и постсинаптическую мембрану или и синтез специфических синаптических (и подавление синтеза внесинаптических) АХЭ и ХР. Некоторые данные не подтверждают прямого индуцирующего влияния иннервации на синтез АХЭ и ХР [17, 18]. Возможно, что появление синаптических форм является результатом их образования из неактивных предшественников. Тем не менее этот процесс прямо сопряжен с формированием синапса. Многочисленные эксперименты с денервацией мышц свидетельствуют о том, что нарушение нервно-мышечной связи вызывает появление внесинаптических ХР [19—22 и др.] и снижение активности АХЭ в концевой пластинке [23—25]. Сравнение свойств синаптических и внесинаптических ХР в иннервированных и денервированных мышцах показывает существование некоторых различий в величинах ИЭТ этих белков и в их способ-

ности связывать d-турбокурарин. В этом отношении внесинаптические ХР денервированных мышц оказались похожими на ХР развивающейся мышечной ткани [22]. Мышечная АХЭ также существует в нескольких формах. При седиментационном анализе обнаружено четыре варианта фермента: 4S, 9—10S, 12.5—13S и 16S. Последний из них выявляется в концевых пластинках, исчезает после денервации мышцы и восстанавливается при реиннервации [24, 25]. Эта же форма отсутствует в мышцах эмбрионов и появляется в мышцах крысят только на 14-й или 15-й день развития, являясь, таким образом, маркером степени зрелости нервно-мышечного синапса [25]. Следовательно, если внесинаптические АХЭ—ХР появляются еще в «донервный» период миелинизации, то формирование специфической синаптической системы неразрывно связано с морфологическим созреванием синаптических структур.

Какие же факторы, возникающие вследствие образования нервно-мышечного контакта, играют наиболее важную роль в появлении и регуляции синаптических АХЭ—ХР? По этому поводу, как и вообще по вопросу о механизмах влияния нервной системы на метаболизм мышцы, до сих пор не сложилось единого мнения. Одни исследователи считают таковыми мышечную активность, связанную с поступлением на клеточную мембрану нервных импульсов, другие — нейротрофические влияния, т. е. поступление в мышцу неких «трофических» молекул вместе с потоком аксоплазмы. Примерами, доказывающими важную роль мышечной активности, являются эксперименты, в которых паралич, вызванный тетродотоксином, увеличивает чувствительность мышцы к АХ и связывание меченого бунгаротоксина [26]. Электрическая стимуляция денервированной мышцы подавляет появление внесинаптических ХР [27, 28] и АХЭ [29, 30]. Снижение активности АХЭ концевой пластинки после обработки нерва колхицином, блокирующим только аксоплазматический ток без нарушения выхода медиатора и нормального сокращения мышцы, свидетельствует, по мнению других авторов [31], о доминирующем значении нейротрофического эффекта. К сторонникам нейротрофической регуляции активности мышечной АХЭ относятся и авторы серии работ, в которых активность фермента в культуре миогенных клеток стимулировалась при добавлении экстрактов или эксплантатов нервной ткани [32—36]. При этом авторы отрицают возможность неспецифической стимуляции, так как после фракционирования экстрактов ими была выделена только одна активная белковая фракция [35]. В то же время существуют убедительные доказательства «нейроподобного» эффекта даже прямой электрической стимуляции денервированной мышцы [28] и культуры миобластов [37], в результате которой подавляется активность эмбриональных форм АХЭ. Электрическая стимуляция культуры дифференцирующихся мышечных клеток снижает и количество внесинаптических ХР [38, 39]. В настоящее время, по-видимому, преждевременно спорить о том, что именно регулирует функцию и синтез системы АХЭ—ХР —

мышечная активность или нейротрофические влияния; реальнее ставить вопрос о выяснении относительной важности этих факторов [40].

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПОСРЕДНИКИ

В течение последнего десятилетия интенсивно исследуются молекулярные механизмы, при помощи которых информация о сигнале, поступающем на мышечную мембрану с нервных окончаний, достигает внутриклеточных структур. Роль «посредника» в этом процессе играют циклические нуклеотиды — цАМФ и цГМФ. Активируя ферментативные реакции фосфорилирования различных белков цАМФ- и цГМФ-зависимыми протеинфосфокиназами, они модифицируют те процессы, в которых эти белки участвуют. Например, фосфорилирование белков хроматина влияет на его активность, фосфорилирование мембранных белков изменяет проницаемость мембраны для ионов. Концентрация циклических нуклеотидов в клетке регулируется при помощи сложной системы, в которую входят ферменты, синтезирующие цАМФ и цГМФ (циклазы), ферменты их гидролизующие (фосфодиэстеразы), а также ионы кальция, влияющие на активность этих ферментов. Циклазы локализованы в клеточных мембранах (в настоящее время это достоверно установлено для аденилатциклазы, синтезирующей цАМФ из АТФ) и активируются в результате взаимодействия гормона или нейромедиатора со специфическим мембранным рецептором. Именно поэтому циклические нуклеотиды могут выполнять функции посредника между внешней мембраной клетки и внутриклеточными структурами. Следовательно, чтобы клетка приобрела метаболическую чувствительность к факторам центральной регуляции — гормонам и нейромедиаторам, — она должна обладать ферментами, регулирующими синтез и распад циклических нуклеотидов, а также ферментами, осуществляющими их биологическое действие.

На какой стадии миогенеза появляются эти ферменты в ткани мышц? При исследовании развития миобластов в культуре обнаружено, что через 34 ч после начала культивирования в них наблюдается кратковременное повышение содержания цАМФ, которое предшествует интенсивному слиянию миобластов в миотубы, наступающему через 48 ч [41]. Одновременно с повышением цАМФ снижается содержание цГМФ, что приводит к увеличению отношения цАМФ/цГМФ [42]. На основании этого феномена авторы приходят к выводу о контроле дифференцировки миобластов циклическими нуклеотидами. Этот контроль осуществляется по тому же принципу, что и в клетках других развивающихся тканей [43]: цГМФ является триггером роста, а цАМФ ингибирует пролиферацию и поэтому стимулирует слияние. В ткани *in situ* отмечаются сходные колебания содержания циклических нуклеотидов. В скелетных мышцах куриных эмбрионов уровень цАМФ повышается дважды: на 8—10-й и на 12—15-й день развития, причем максимальный уровень цАМФ совпадает с началом слияния клеток [44].

Реципрокные взаимоотношения в изменении содержания цАМФ и цГМФ были отмечены также в опытах на икроножных мышцах развивающихся крыс [45]. Причиной повышения уровня цАМФ и снижения цГМФ в эмбриогенезе является, по-видимому, изменение активности циклаз, присутствие которых в мышцах эмбрионов показано многими авторами [44, 46—50], так как активность фосфодиэстераз остается постоянной [44, 46].

Эти данные свидетельствуют о том, что до образования нервно-мышечного контакта в миогенных клетках эмбрионов уже имеются посредники для приема информации, поступающей к мышцам с молекулами гормонов и нейромедиаторов — цАМФ и цГМФ. Значит ли это, что мышечные клетки действительно способны воспринимать эту информацию в период эмбриогенеза, т. е. до начала своей функциональной деятельности? Готова ли к этому система циклических нуклеотидов мышечной ткани? Результаты изучения чувствительности мышечной аденилатциклазы к гормонам в онтогенезе кур показывают, что адреналин, активирующий этот фермент и повышающий содержание цАМФ в мышцах взрослых особей, не вызывает такого повышения в мышцах эмбрионов [48, 51]. Реакция на адреналин появляется только перед вылуплением цыплят. Так как эмбриональные мышцы, как было отмечено выше, уже обладают аденилатциклазной активностью, отсутствие влияния гормона на уровень цАМФ в эмбриональных мышцах авторы этих работ связывают с неспособностью мембранного функционального комплекса, состоящего из гормонорецептора и регулируемой части аденилатциклазы, воспринимать гормональный сигнал [48, 52]. Однако, по данным других авторов в культуре миогенных клеток крыс как в одноядерных миобластах, так и на стадии миотуб активность аденилатциклазы стимулируется адреналином и норадреналином [50]. Противоречивость этих результатов свидетельствует о том, что развитие мышечных клеток в культуре не полностью идентично развитию их в условиях целого организма даже в ранний «донервный» период. В культуре может быть исключено влияние целого комплекса гормональных и иных факторов, о чувствительности миогенных клеток к которым еще не имеется достаточно достоверных данных. Примером подобной неидентичности могут служить и результаты исследования протеинфосфокиназы мышцы — мишеней биологического действия циклических нуклеотидов. Совершенно очевидно, что для реализации эффекта системы посредников необходимо не только наличие самих цАМФ и цГМФ, но и реактивность к ним процессов фосфорилирования белков. Изучение фосфорилирования ядерных белков в культуре клеток, полученных из эмбриональных мышц кур, показывает, что включение меченого фосфата АТФ в изолированные ядра миобластов возрастает почти в 2 раза между 1-м и 3-м днем культивирования, т. е. в период слияния [53, 54]. В то же время в мышцах целого эмбриона происходит резкое снижение уровня фосфорилирования ядерных белков в период, также соответствующий максимальному

слиянию одноядерных клеток и образованию мютоуб. Авторы предполагают, что *in ovo* в ткани может накапливаться ингибитор протеинфосфокиназы, отсутствующий в культуре и являющийся ее естественным регулятором в условиях целого организма.

Особенно интересен тот факт, что цАМФ и цГМФ не влияют на фосфорилирование ядерных белков в эмбриогенезе [54]. Возникает вопрос о том, объясняется ли это особенностями эмбриональных форм протеинфосфокиназ или характерно и для взрослого организма. Известно, что активность протеинфосфокиназы, фосфорилирующей гистоны (гистонкиназы), зависит от цАМФ, но этот фермент обнаруживается в основном в цитоплазме. Ядерные же протеинфосфокиназы фосфорилируют главным образом негистоновые белки хроматина [54]. В результате исследования свойств неядерных протеинфосфокиназ мышц кур было обнаружено, что эмбриональный фермент в отличие от фермента взрослых особей почти не фосфорилирует гистоны и очень слабо стимулируется цАМФ [55]. После вылупления происходит смена набора изоферментов протеинфосфокиназы.

Приведенные примеры показывают, что при переходе от эмбриональной стадии к постнатальному периоду развития мышечной ткани функциональная роль системы циклических нуклеотидов, по-видимому, изменяется. В течение «донервного» периода миогенеза цАМФ и цГМФ могут участвовать в осуществлении общей плеiotипической программы пролиферации, подобно тому как это показано для других тканей. Выше отмечалось, что при этом были установлены реципрокные взаимоотношения цАМФ и цГМФ в контроле дифференцировки и развития [43]. Роль цАМФ как ингибитора деления мышечных клеток была продемонстрирована на мышце сердца. Физиологическое развитие адренергических нервов в сердце крыс происходит в раннем онтогенезе (к середине 3-й нед от рождения). К этому моменту в мышечных клетках прекращается синтез ДНК [56]. Фактором, приостанавливающим деление, является накопление цАМФ в ткани сердца. Об ингибирующем эффекте цАМФ свидетельствуют результаты экспериментов, в которых введение 3-дневным крысятам дибутирил-цАМФ или теофиллина (ингибитора фосфодиэстеразы) приводило к торможению включения меченого тимидина в ДНК [57], в то время как цГМФ не производил такого эффекта. Вместе с тем такое же тормозящее влияние оказывало введение изопротеренола или нор-адреналина, что указывает на взаимодействие этих мембрано-активных агентов с аденилатциклазой клеточных мембран сердечной мышцы крыс уже в возрасте 3 дней, т. е. может быть даже до окончательного формирования адренергических синапсов. Так как в сердечной мышце постсинаптические компоненты (рецепторы медиаторов и структуры, ответственные за мембранную проводимость) развиваются раньше пресинаптических компонентов [58], возможно, что и система гормонорецептор—аденилатциклаза уже сформирована на 3-й день постнатального развития крысы (у дыш-

лят эта система начинает функционировать перед вытуплением [48, 52]). Совпадение во времени накопления цАМФ, остановки синтеза ДНК и пролиферации, а также функционального созревания адренергических нейронов к середине 3-й нед постнатального развития дает основания для вывода о существовании нервного контроля в миокарде, реализующегося через цАМФ [57, 58].

Хотя относительно скелетных мышц пока нет сведений о прямом влиянии цАМФ на синтез ДНК, сам факт резкого возрастания содержания этого нуклеотида в период слияния миобластов [44, 45] свидетельствует о возможности его тормозящего эффекта на деление этих клеток.

Недавно обнаружено, что функции циклических нуклеотидов в эмбриональном периоде развития скелетных мышц могут принимать и специфический характер. Рецепторные взаимоотношения цАМФ и цГМФ показаны в их влиянии на синтез ХР в миотубах [59]. Добавление цГМФ к культуре миотуб снижало их способность связывать меченый бунгаротоксин, а добавление цАМФ повышало ее, т. е. приводило к возрастанию количества ХР. Эффект цАМФ имитировался простагландином E_1 , а эффект цГМФ мог быть достигнут путем деполяризации миотуб с помощью вератридина. Авторы приходят к интересному, но, на наш взгляд, преждевременному выводу о том, что циклические нуклеотиды могут быть внутриклеточными посредниками в регуляции синтеза ХР как в условиях электрической активности клетки, так и при действии нейротрофических факторов. Эффект цАМФ и цГМФ в данном случае, вероятнее всего, объясняется их участием в регуляции интенсивности транскрипции, что могло повлечь за собой соответствующее усиление или ослабление синтеза холинорецепторного белка. Однако, если влияние деполяризации мышечного волокна (в результате электрической стимуляции нерва или повышения концентрации калия в среде) на внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ в настоящее время уже экспериментально доказано [60, 61], то столь же конкретные данные об их участии в нейротрофическом эффекте отсутствуют. Конечно, нельзя отрицать принципиальную возможность взаимодействия неких «трофогенов» с мембранными рецепторами, результатом которого явилась бы также активация циклазных систем, но эта возможность пока остается гипотетической. Перенос же самих циклических нуклеотидов с потоком аксоплазмы вряд ли может иметь существенное значение для клетки-мишени, обладающей достаточно эффективной системой синтеза этих соединений. Следует отметить, что снижение связывания бунгаротоксина миотубами под влиянием цГМФ не становилось сильнее при совместном действии вератридина и цГМФ [60]. Следовательно, скорее всего эффект деполяризации сводился также к увеличению концентрации цГМФ в клетке вследствие активации гуанилатциклазы (или прямой активации фермента, локализованного в мембране, или внутриклеточной формы, которая может активироваться при повышении концентрации кальция). Так как

такая реакция характерна для зрелого мышечного волокна, эти данные позволяют предполагать, что формирование реактивности системы цГМФ—гуанилатциклаза к внешним факторам происходит и до начала морфогенеза нервно-мышечного синапса. В цитируемой работе мюотубы для культивирования были взяты от 11-дневного куриного эмбриона; по данным Хирано, первые морфологические признаки образования нервно-мышечного контакта у цыпленка *in ovo* проявляются только на 13-й день эмбрионального развития [62]. Чувствительность мюотуб 11-дневного эмбриона к деполяризации свидетельствует о генетически запрограммированной подготовке мембраны мышечной клетки к предстоящим структурно-химическим изменениям, связанным с иннервацией.

Формирование зрелых нервно-мышечных синапсов создает условия для функционирования циклических нуклеотидов уже в качестве посредников между нейромедиаторами, действующими на поверхностную мембрану мышечного волокна, и внутриклеточными структурами. Доказательством роли цАМФ и цГМФ в трофическом эффекте нервных импульсов является изменение их содержания в мышечной ткани при стимуляции нерва и при денервации. Так, показано, что избирательное раздражение симпатических волокон, входящих в состав седалищного нерва (при блокаде холинергических синапсов сукцинилхолином), приводит к повышению концентрации цАМФ в большеберцовой мышце [60], а калиевая деполяризация изолированной скелетной мышцы усонного рака, при условии присутствия кальция в среде, сопровождается повышением содержания цГМФ в ткани [61]. Денервация скелетных мышц снижает в них активность аденилатциклазы [63—65]. В то же время содержание цАМФ в скелетной мышце млекопитающего (крысы) увеличивается [66]. Эти факты на первый взгляд кажутся противоречивыми, однако их можно понять, если учесть, что уровень цАМФ в клетке зависит не только от аденилатциклазы, но и от фосфодиэстеразы, стимулируемой кальцием. Так как в денервированной мышце не происходит регулярных повышений концентрации цитоплазматического кальция, связанных с нервными импульсами, то, возможно, в этих условиях активность фосфодиэстеразы проявляется неполностью, что приводит к повышению содержания цАМФ.

Несмотря на огромное количество исследований, посвященных изучению функций медиаторной системы кальций—циклические нуклеотиды, в настоящее время еще совершенно неясно, каким образом при помощи этой системы может осуществляться дифференцированная регуляция активности генов, лежащая в основе специализации тканей. Пока существуют только предположения о важной роли в этом процессе фосфорилирования белков хроматина протеинфосфокиназами, зависимиыми от кальция, цАМФ и цГМФ [53, 54, 67]. Почти ничего неизвестно и о возможностях участия циклических нуклеотидов в посттранскрипционной регуляции синтеза белков в онтогенезе.

РОЛЬ ИННЕРВАЦИИ В СИНТЕЗЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ МЫШЦ

Специализация мышц в онтогенезе, как и специализация других тканей, достигается дифференцированным синтезом белков, который определяет создание специфического белкового набора, свойственного данному типу клеток. С точки зрения А. А. Нейфаха, для понимания механизмов дифференцированного включения и выключения генов необходимо учитывать явление компетенции, означающее способность клетки реагировать определенным образом на внешние факторы. В более узком смысле оно означает способность генетического аппарата данной клетки к активации синтеза определенных информационных РНК в ответ на определенные внешние влияния. Одни и те же внешние факторы, действуя на клетки, обладающие разной компетенцией, вызывают в них активацию разных генов или не оказывают влияния, если компетенция к этим факторам отсутствует. В ходе дифференцировки не только реализуется действие внешних факторов через уже имеющуюся компетенцию, но и происходит закономерное изменение самой компетенции клеток [68]. Рассматривая развитие и специализацию мышц в этом аспекте, можно видеть, как по мере смены стадий развития изменяется компетенция мышечных клеток, т. е. их способность отвечать на внешние сигналы. Одной из таких стадий и является формирование нервно-мышечных синапсов. К сожалению, несмотря на то что в настоящее время решающая роль иннервации в специализации мышц очевидна, наших сегодняшних знаний пока еще недостаточно для полного понимания механизмов нервных влияний на этот процесс.

Все характерные метаболические особенности быстрых и медленных волокон скелетных мышц — субъединичный состав миозина, уровень АТФазной активности мембран СР, преобладание гликолитического или окислительного энергетического обмена — развиваются по мере того, как мышцы начинают получать специфическую нервную импульсацию, определяющую их тип активности. Исследования последних лет показывают, что скорость развития перечисленных структурно-химических особенностей мышечного волокна может быть неодинаковой. В последние годы установлено, что в эмбриональных мышцах и в мышечных волокнах, растущих в культуре, преобладает миозин, характерный для быстрых мышц [69—72]. В то же время известно, что эмбриональные мышцы сокращаются медленно [73, 74]. Так как скорость сокращения зависит не только от субъединичного состава миозина, но и от других факторов, в частности от свойств внутриклеточных мембран, медленный тип сокращения может быть обусловлен недостаточным развитием Т-системы и СР. Трансформация СР по мере созревания нервно-мышечных синапсов совершается от медленного типа к быстрому [75, 76]. В будущих быстрых мышцах резко возрастает активность Са-насоса, что обеспечивает способ-

ность этих мышц к быстрому укорочению и расслаблению. Эмбриональные формы тропомозина, в которых содержится больше β -субъединиц, сменяются взрослым типом в результате постепенного возрастания содержания α -субъединиц [77]. Состав субъединиц миозина изменяется в ходе эмбриогенеза скорее от быстрого типа к медленному, хотя и более сложным путем. В мышечных волокнах эмбриона обнаруживаются только 2 легкие цепи миозина, сходные с цепями «быстрого» типа — ЛЦ1 и ЛЦ2, тогда как ЛЦ3 появляется перед моментом рождения в будущих быстрых мышцах [71, 78]. Более тонкий иммунохимический анализ мышц 18-дневного эмбриона показал присутствие и «медленного» миозина, хотя и в очень небольшом количестве волокон [79—81]. В процессе развития будущей медленной мышцы содержание «медленного» типа миозина увеличивается. Установлено, что возрастание содержания «медленного» миозина, т. е. синтез его легких цепей, зависит от влияния нервной системы, так как денервация мышцы при рождении предотвращает это увеличение, а культивируемые эмбриональные мышцы синтезируют только «быстрый» тип [81].

Все эти данные свидетельствуют о том, что в ходе развития мышцы совершаются закономерные изменения экспрессии генов, подготавливающие мышечные волокна к будущей функциональной деятельности. По-видимому, все волокна обладают генетической программой синтеза легких цепей как быстрого, так и медленного типов миозина, но экспрессия кодирующих их генов, определяющая специфические особенности миозинов быстрых и медленных мышц, осуществляется только при условии нормального развития нервной системы.

Возвращаясь к вопросу о природе пусковых факторов нейротрофических эффектов в развитии мышц, можно сделать следующее заключение. Дифференцировка каждой ткани в процессе онтогенеза готовит ее к специфической функциональной деятельности, которая по принципу обратной связи определенным образом воздействует на метаболизм этой ткани. Мышцы не составляют исключения из этого общеприродного закона. Именно тип двигательной активности, зависящий от нервной импульсации, определяет ход дифференцировки мышцы. Можно привести ряд примеров, свидетельствующих о том, что, независимо от возможности каких-либо специфических нервных влияний, само по себе возбуждение мембраны мышечного волокна является достаточно сильным эффектом, действующим на генетические структуры клетки. Прекрасной иллюстрацией этого положения являются экспериментальные данные, показывающие влияние электрической стимуляции на трансформацию мышечных волокон. Хроническая стимуляция быстрых мышц кролика с низкой частотой (10 гц) в течение 3—4 нед приводит к появлению медленного типа миозина в быстросокращающихся волокнах [82]. Уже через 3 дня можно отметить снижение активности гликолитических ферментов и возрастание активности ферментов аэробного окисления; максимума эти сдвиги достигают к 3 нед [83, 84].

Наконец, уже в течение 2 дней стимуляции можно добиться изменения характеристик СР быстрой мышцы в направлении, характерном для медленной мышцы (снижения активности Са—АТФазы и транспорта Ca^{2+} , снижения скорости фосфорилирования белков микросомальных мембран) [85]. Заметная трансформация СР наблюдается уже в течение первых 2—3 дней стимуляции; соответственно замедляется скорость как укорочения, так и расслабления мышцы. Показано также, что даже в культуре прямая электрическая стимуляция мышечных клеток повышает включение меченых аминокислот в тяжелые цепи миозина [86], т. е. активирует белок-синтезирующую систему клетки. В трансформирующем эффекте прямой электрической стимуляции мышцы убедились и Ломо с соавт. [87], подвергая стимуляции денервированную мышцу, чтобы исключить возможное ускорение аксоплазматического потока при мышечной активности. Стимулируя *m. soleus* с высокой частотой (100 гц) в течение 7—10 нед, эти авторы наблюдали, как эта медленная мышца приобретает некоторые свойства быстрой мышцы; напротив, частота 10 гц сохраняла особенности медленной мышцы.

Эффект электрической стимуляции мышцы не является неожиданным, если вспомнить многочисленные данные об активации синтеза РНК в нервной клетке при ее возбуждении. В настоящее время уже хорошо известна чувствительность ядра клетки к состоянию ее мембраны. Реактивность ядер мышечных волокон к денервации мышцы и к ее электрической стимуляции была показана в исследованиях нашей лаборатории, в которых было обнаружено быстрое снижение РНК-синтезирующей активности хроматина икроножной мышцы после перерезки седалищного нерва и активация синтеза РНК в результате $1\frac{1}{2}$ —2-часовой стимуляции мышцы через периферический отрезок нерва [88, 89]. При обсуждении возможных триггеров активации мы предположили, что, кроме циклических нуклеотидов, в этой роли может выступать кальций [90]. Подобные предположения высказывались по отношению к нервным клеткам Б. Н. Вепринцевым [91]; о возможной роли кальция в контроле дифференцировки мышц писал и Петте [85].

Мы получили экспериментальное подтверждение влияния изменений концентрации Ca^{2+} внутри ядра на генетический аппарат мышцы [90]. Оказалось, что для сохранения нормальной интенсивности синтеза РНК в мышечных ядрах должна поддерживаться оптимальная концентрация Ca^{2+} ; денервация приводит к потере Ca^{2+} ядрами, а стимуляция резко повышает его содержание и только при этом условии активирует РНК-синтезирующую способность ядер.

Одним из путей влияния кальция на генетический аппарат клетки может быть избирательное модулирование им скорости фосфорилирования белков хроматина. Об этом свидетельствуют данные, полученные недавно на срезах мозга [92], и результаты наших предварительных опытов. Если исходить из представлений о двух

уровнях регуляции активности генов у животных [93], то выдвигаемые положения могли бы облегчить понимание первого уровня регуляции, который осуществляется путем изменения общей структуры хромосомы и в котором большое значение должно иметь изменение ионной среды внутри ядра. Р. Б. Хесин считает, что на фоне этого структурного механизма действует другой, более тонкий, основанный на влиянии белков — регуляторов, специфичных к отдельным генам. Возможно, что специфичность достигается при помощи модификаций белков хроматина, в частности их избирательным фосфорилированием, зависимым от ионов кальция [67]. Для выяснения этого вопроса необходимы детальные исследования транспорта, локализации и разнообразных функций кальция в ядре при различных состояниях клеточной мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные данные позволяют расценивать участие нервной системы в дифференцировке скелетных мышц с точки зрения ее решающей роли в осуществлении их функциональной деятельности. Специализация мышц, основанная на синтезе специфических белков, развивается в результате получения мышцами нервной импульсации соответствующей частоты от специфических мотонейронов. Изменения, возникающие при этом на мембране мышечного волокна, через систему внутриклеточных посредников влияют на активность генетического аппарата. Роль посредника в мышечных клетках, как и в других тканях, играет система — кальций — циклические нуклеотиды. Тонкие механизмы регулирования этой системой дифференциальной активности генов пока не известны.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Хлоппи Н. Г. Общепатологические и экспериментальные основы гистологии. М.; Л., Медгиз, 1946.
- [2] Теодорович В. И. — Арх. анат., 1953, 30 : 12.
- [3] Григорьев Л. М. — Арх. анат., 1958, 35 : 101.
- [4] Клишов А. А. Гистогенез, регенерация и опухолевый рост скелетно-мышечной ткани. Л., Медицина, 1971.
- [5] Итина Н. А. Функциональные свойства нервно-мышечных приборов низших позвоночных. М.; Л., Изд-во АН СССР, 1959.
- [6] Haggis A. J., Heinemann S., Schubert D., Tarikas H. — Nature, 1971, 231 : 296.
- [7] Teng N. N. H., Fiszman M. Y. — J. Supramol. Struct., 1976, 4 : 381.
- [8] Devreotes P. N., Fambrough D. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 161.
- [9] Linkhart T. A., Hauschka S. D. — Develop. Biol., 1979, 69 : 529.
- [10] Elson H. F. — J. Supramol. Struct., 1979, 10 : 39.
- [11] Sugiyama H. — Proc. Jap. Acad., 1979, B55 : 75.
- [12] Крыжановский Г. Н., Поздняков О. М., Полгар А. А. Патология синаптического аппарата мышцы. М., Медицина, 1974.

- [13] Fluck R. A., Stroman R. C. — *Develop. Biol.*, 1973, 33 : 417.
- [14] Wilson B. W., Nierberg P. S., Walker C. P., Linkhart T. A., Fry D. M. — *Develop. Biol.*, 1973, 33 : 285.
- [15] Toth L., Karsu S. — *Acta histochem.*, 1979, 64 : 148.
- [16] Peterson E. R., Crain S. M. — *Exper. Neurol.*, 1972, 36 : 136.
- [17] Посконова М. А., Балеэина О. П. — *Журн. общ. бпол.*, 1975, 36 : 612.
- [18] Walker C. R., Wilson B. W. — *Neuroscience*, 1976, 1 : 509.
- [19] Жуков Е. К., Итина Н. А., Магазанк Л. Г., Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А., Свидерский В. Л., Скоробовичук Н. Ф., Ушаков В. Б. — *Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата*. Л., Наука, 1974.
- [20] Brockes J. P. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72 : 1368.
- [21] Tiedt T. N., Wisler P. L., Younkin S. G. — *Exper. Neurol.*, 1977, 57 : 766.
- [22] Brockes J. P., Berg D. K., Hall Z. W. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1976, 40 : 253.
- [23] Fernandez H. L., Inestrosa N. C. — *Nature*, 1976, 262 : 55.
- [24] Weinberg C. B., Hall Z. W. — *Develop. Biol.*, 1979, 68 : 631.
- [25] Vigny M., Koenig J., Rieger F. — *J. Neurochem.*, 1976, 27 : 1347.
- [26] Lavvie P. A., Collier B., Tenenhouse A. — *Exper. Neurol.*, 1977, 54 : 148.
- [27] Frank E., Gautvik K., Sommerschild H. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1976, 40 : 275.
- [28] Hall Z. W., Reiness C. G. — *Nature*, 1977, 268 : 655.
- [29] Weidoffe P. M., Wilson B. W. — *Exper. Neurol.*, 1977, 57 : 1.
- [30] Linkhart T. A., Wilson B. W. — *Exper. Neurol.*, 1975, 48 : 557.
- [31] Max S. P., Albuquerque E. X. — *Exper. Neurol.*, 1975, 49 : 852.
- [32] Oh T. H., Johnson D. D., Kim S. U. — *Science*, 1972, 178 : 1298.
- [33] Oh T. H. — *Exper. Neurol.*, 1976, 50 : 376.
- [34] Oh T. H., Markelonis G. J. — *Science*, 1978, 200 : 337.
- [35] Markelonis G. J., Oh T. H. — *Exper. Neurol.*, 1978, 58 : 285.
- [36] Friedel S. C., Johnson D. D. — *Exper. Neurol.*, 1977, 57 : 257.
- [37] Walker C. R., Wilson B. W. — *Nature*, 1975, 256 : 215.
- [38] Shainberg A., Burstein M. — *Nature*, 1976, 264 : 368.
- [39] Reis M. A., Shainberg A. — In: *Abstr. Intern. symp. «Plasticity of muscle»* / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 62.
- [40] Fambrough D. M. — *Physiol. Rev.*, 1979, 59 : 165.
- [41] Zalin R. J. — *Develop. Biol.*, 1976, 53 : 1.
- [42] Moriyama G., Hasegawa S., Murayama K. — *Exper. Cell Res.*, 1976, 101 : 159.
- [43] Pastan I. H., Johnson G. S., Anderson W. B. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, 44 : 491.
- [44] Zalin R. J., Montague W. — *Exper. Cell Res.*, 1975, 93 : 55.
- [45] Takahashi K., Takai T., Takao H. — *Exper. Neurol.*, 1977, 57 : 928.
- [46] Novak E., Drummond G. I., Skala J., Hahn P. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 150 : 511.
- [47] Перцева М. Н., Желудкова З. П., Кузнецова Л. А. — В кн.: *Тез. I Всесоюз. симп. «Циклические нуклеотиды»*. Красноярск, 1976 : 114.
- [48] Кузнецова Л. А. Гликогенсинтезирующая система мышц и ее регуляция катехоламинами и циклическими нуклеотидами в онтогенезе. Автореф. дис. Л., 1978.

- [49] Pertseva M. N., Kuznetsova L. A. — X Intern. Congr. biochem. Hamburg, 1976 : 413.
- [50] Wahrman J. P., Winand R. J. — Biochimie, 1978, 60 : 361.
- [51] Перцева М. Н., Кузнецова Л. А. — ДАН СССР, 1976, 230 : 985.
- [52] Pertseva M. N., Zheludkova Z. P., Mazina T. I., Kuznetsova L. A. — Comp. Biochem. Physiol., 1979, 63A : 135.
- [53] Nguyen Thi Man, Morris G. E., Cole R. J. — FEBS Letters, 1974, 42 : 257.
- [54] Nguyen Thi Man, Morris G. E., Cole R. J. — Develop. Biol., 1975, 47 : 81.
- [55] Piras M. M., Staneloni R., Leiderman B., Piras R. — FEBS Letters, 1972, 23 : 199.
- [56] Claycomb W. C. — J. Biol. Chem., 1975, 250 : 3229.
- [57] Claycomb W. C. — J. Biol. Chem., 1976, 251 : 6082.
- [58] Pappano A. J. — Pharmacol. Rev., 1977, 29 : 3.
- [59] Betz H., Changeux J. P. — Nature, 1979, 278 : 749.
- [60] Weis G. K., Kroker G. F., Ratner A. — Life Sci., 1973, 13 : 537.
- [61] Beam K. G., Nestler E. J., Greengard P. — Nature, 1977, 267 : 534.
- [62] Hirano H. — Zschr. Zellforsch., 1967, 79 : 198.
- [63] Novom S., Lewinsein C. — Neurobiology, 1977, 27 : 869.
- [64] Smith P. B., Appel S. H. — Exper. Neurol., 1977, 56 : 102.
- [65] Smith P. B., Grefrath S. P., Appel S. H. — Exper. Neurol., 1978, 59 : 361.
- [66] Carlsen R. C. — J. Physiol., 1975, 247 : 343.
- [67] Kanungo M. S., Thakur M. K. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, 79 : 1031.
- [68] Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М., Наука, 1978.
- [69] Sreter F., Holtzer S., Gergely J., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1972, 55 : 586.
- [70] Chi J. C. H., Rubinstein N., Strahs K., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1975, 67 : 523.
- [71] Rubinstein N. A., Pepe F. A., Holtzer H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 4524.
- [72] Pette D., Vrbova G., Whalen R. C. — Pflüger's Arch., 1979, 378 : 251.
- [73] Close R. J. — J. Physiol., 1968, 198 : 103.
- [74] Gordon T., Vrbova G. — Pflüger's Arch., 1975, 360 : 199.
- [75] Gauthier G. F., Lowey S., Hobbs A. W. — Nature, 1978, 274 : 25.
- [76] Gauthier G. F. — In: Abstr. Intern. symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 15.
- [77] Rubinstein N. A., Kelly A. M. — In: Abstr. Intern. symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 50.
- [78] Dabrowska R., Sosinski J., Drabikowski W. — FEBS Letters, 1977, 79 : 295.
- [79] Sarzala N. G., Zubryska-Gaarn E. — In: Abstr. Int. Symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 56.
- [80] Margreth A., Salviati G., Dalla Libera L., Betto R., Biral D., Salvatori S. — Ibid. : 42.
- [81] Roy R. K., Pluskal M. G., Sarkar S. — Ibid. : 54.
- [82] Pette D., Schnez U. — FEBS Letters, 1977, 83 : 128.
- [83] Pette D., Heilmann C. — Basic Res. Cardiol., 1977, 72 : 247.
- [84] Pette D., Heilig A. — In: Abstr. Intern. symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 49.
- [85] Heilmann C., Pette D. — Eur. J. Biochem., 1979, 93 : 437.

- [86] Brevet A., Pinto E., Peacock J., Stockdale F. E. — Science, 1976, 193 : 1152.
- [87] Engebretsen L., Lomo T., Westgaard R. H. — In: Abstr. Intern. Symp. «Plasticity of muscle» / Ed. by D. Pette. Konstanz, 1979 : 38.
- [88] Халафова Н. М., Разумовская Н. И. — Цитология, 1974, 8 : 983.
- [89] Ilyin V. S., Razumovskaya N. I., Usatenco M. S. — Adv. Enzyme Reg., 1974, 13 : 219.
- [90] Разумовская Н. И., Белявцева Л. М., Дамбинова С. А., Кулпкова О. Г., Говорова Л. В. — Биохимия, 1979, 44 : 2094.
- [91] Веприцев Б. Н. — В кн.: Клеточные механизмы памяти. Пущино-на-Оке, 1973 : 167.
- [92] Капунго М. С., Такур М. К. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1979, 86 : 14.
- [93] Хесин Р. Б., Лейбович Б. А. — Молек. биол., 1976, 10 : 3.

Э. Г. УЛУМБЕКОВ

РАЗВИТИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СКОРОСТИ СОКРАЩЕНИЯ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН В МИОГЕНЕЗЕ

Казанский медицинский институт им. С. В. Курашова

ВВЕДЕНИЕ

Когда организаторы школы «Миогенез» предложили прочитать лекцию «Нейротрофический контроль в миогенезе», автор, не предвидя особых сложностей, легко согласился. Действительно, только что состоялось рабочее совещание по трофическому контролю в нервно-мышечной системе [1]; эта проблема разрабатывается в ряде лабораторий, часто выходят обзорные статьи [2—13] и книги [1, 14, 15]. Получалось, что составить компиляцию будет несложно. Действительность оказалась совсем иной, что, как это ни странно, объясняется нарастающей лавиной фактов о контрактильных системах и, как следствие, быстро меняющимися представлениями об их организации. В частности, в наши дни происходит качественный скачок от наблюдения феноменов к началу понимания существа регуляторных отношений как между элементами сократительного аппарата, так между последним и, к примеру, системой его метаболического обеспечения, а также между мышечными и другими клетками. Постепенно усваивается, что регуляторные отношения между нервными и мышечными клетками, в частности феномены, обозначаемые термином «нейротрофический контроль», — лишь один из факторов регуляции фенотипа взаимодействующих клеток. Однако мы еще плохо знаем, как развивается фенотип мышечного волокна. Является ли он результатом реализации только эндогенной программы? Сколь велика роль факторов окружения? Фактора нейротрофического контроля? Каких еще? Сколь широки границы фенотипа? Насколько он устойчив? [12]. И так далее. Таким в действительности оказался неполный перечень вопросов, примерно очерчивающий границы обзора. И совсем немного можно сказать о механизмах, обеспечивающих экспрессию признаков при действии факторов регуляции фенотипа. Последнее как раз является предметом пристального внимания в наши дни. Так, в 1977 г. появились первые проверяемые экспериментально идеи о регуляции эндогенной программы миогенеза нервными влияниями [16]. В 1978 г. опубликованы факты, подтверждающие альтернативную гипотезу [17], а в 1979 г. наступил настоящий «бум»: только в журнале «Nature» вышло 8 статей и комментариев

но разбираемому вопросу. Ясно, что стройная картина взаимоотношений между развивающимися нервными и мышечными клетками пока не складывается. И читателю необходимо иметь в виду, что автор, пытаясь дать своего рода моментальный снимок этой динамично развивающейся области,* отдает отчет, что к моменту выхода книги в свет многое изменится: появятся новые факты, которые, вполне возможно, изменят излагаемую здесь картину.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПРИЗНАКА: ФЕНОМЕНЫ И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Из множества признаков фазного скелетного мышечного волокна реальному анализу в терминах молекулярной биологии поддаются немногие. К ним, в частности, относятся скорость сокращения, утомляемость, чувствительность к ацетилхолину, продолжительность синаптической передачи. Для каждого из этих признаков считается известным макромолекулярный комплекс, обеспечивающий реализацию признака. Коль скоро это так, то создаются хорошие предпосылки для анализа состояния этих макромолекул в миогенезе и установления зависимости между его критическими событиями (например, начало и характер иннервации) и изменениями макромолекул [18]. И уже на такой основе возможен разбор механизмов регуляции выраженности признаков в созревающих и зрелых мышечных волокнах, а также конкретных путей действия регулирующих моментов (эндогенная программа и факторы окружения) и уровней влияния факторов на клетки-мишени (от транскрипции до посттрансляционной модификации). Этот подход — «интерпретация развития клеток от детерминации до полного созревания как последовательности качественных и количественных изменений синтеза макромолекул...», — как справедливо отмечено в одном из лучших обзоров по миогенезу [19], — стал общим местом в биологии» (стр. 181). В рамках этой парадигмы в обзоре разбирается становление признака скорости сокращения и механизмов регуляции этого признака в миогенезе.

Дефинитивные миозины

Структура, физиологические и биохимические свойства различных миозинов детально рассмотрены в доступных обзорах [20—22]. Здесь достаточно привести самые общие представления о структуре скелетномышечных миозинов.

Быстрый миозин

В каждом толстом филаменте саркомера из мышечных волокон белых (быстрых) мышц кролика содержится около 300—400 молекул быстрого миозина (БМ).

* По состоянию литературы на 1 января 1980 г. В списке литературы приведены главным образом работы последнего времени, еще не вошедшие в обзоры, а также основополагающие ранние экспериментальные работы.

Структура. Пространственную организацию миозина принято представлять в виде нити, длиной до 135 мкм, состоящей из двух ТЦ по 200 кД, каждая из которых на NH_2 -конце вместе с парой ЛЦ образует одну из двух глобулярных головок миозина. При обработке трипсином в мягких условиях отщепляется легкий меромиозин — часть нити, длиной 85 мкм и м. в. 130 кД, состоящей из фрагмента ТЦ и не обладающей способностью ни связываться с актином, ни гидролизовать АТФ. Эти свойства присущи другому фрагменту — тяжелому меромиозину, а еще точнее его субфрагменту 1 с м. в. 115 кД и длиной 10 мкм, содержащему одну из глобулярных головок. В состав последних входит по две разных ЛЦ, причем фосфорилируемая ЛЦ2 (м. в. 21 кД) имеется в каждой головке. Второе вакантное место в каждой из головок замещается одной из щелочных ЛЦ: либо ЛЦ1 (м. в. 25 кД), либо ЛЦ3 (м. в. 16 кД). Эта схема БМ объясняет существование двух разных субфрагментов 1 тяжелого меромиозина: A_1 с ЛЦ1 и A_2 с ЛЦ3 [23]. Теория предсказывает существование трех изоферментов (изоферментов) БМ следующего состава: БМ-1: (ЛЦ3)₂, БМ-2: ЛЦ1 и ЛЦ3, БМ-3: (ЛЦ1)₂ [24]. В состав каждого изофермента входят также по две ЛЦ2 и две ТЦ. Полагая, что первичная структура ТЦ в БМ идентична, а всех трех ЛЦ БМ различная, получаем, что для кодирования трех изоферментов необходимо минимально 4 структурных гена. Реальное существование изоферментов подтверждено методом электрофореза в пирофосфатном геле [24—26], а наличие всех трех изоформ с предсказанным составом ЛЦ показано в изящных опытах с реконструкцией изоформ миозина [27].

Изоферменты и скорость сокращения. В основополагающей работе Барани [28] была установлена четкая корреляция между активностью Ca^{2+} -АТФазы миозина (Mg^{2+} -АТФазы актомиозина) и скоростью сокращения мышечного волокна. Не отличаются ли изоферменты БМ-1, БМ-2 и БМ-3 и фрагменты тяжелого меромиозина A_1 и A_2 по активности АТФазы? Эта идея была высказана Джоном в 1974 г. [29] на основании данных о практическом отсутствии ЛЦ3 в эмбриональных мышцах и постепенном ее появлении, начиная с конца эмбриогенеза. Это наблюдение было многократно подтверждено позднее при диск-электрофорезе миофибриллярных белков в геле полиакриламида с додецилсульфатом [30—31] и при двумерном электрофорезе БМ [32]. Хорошо известно также, что в быстрых мышцах скорость сокращения увеличивается в постэмбриогенезе [9, 10]. Другими словами, имеется прямая зависимость между содержанием ЛЦ3 в развивающихся мышцах и скоростью сокращения. Поэтому не оказалось удивительным, что субфрагменты A_1 и A_2 различаются по активности АТФазы [23, 33]. При этом активность Ca^{2+} -АТФазы субфрагмента A_2 , содержащего ЛЦ3, оказалась примерно в 2 раза выше, чем A_1 , содержащего ЛЦ1. Недавно показаны аналогичные различия и для Mg^{2+} -АТФазы A_1 и A_2 и для K_M их взаимодействия с актином [34]. Приведенные факты достаточно строго говорят за очевидную связь

между содержанием ЛЦЗ в БМ и активностью АТФазы миозина и актомиозина, а следовательно, и скоростью сокращения мышечных волокон. Из сказанного вытекает важное следствие: относительное содержание гомодимера БМ-1 (с ЛЦЗ) и отчасти гетеродимера БМ-2 (с ЛЦЗ и ЛЦ1) в каждом толстом филаменте каждого саркомера каждого мышечного волокна в каждой быстрой мышце позволяет регулировать, по крайней мере теоретически, скорость сокращения на каждом из названных уровней организации сократительного аппарата.

Медленный миозин

В так называемом медленном миозине (ММ), т. е. миозине, выделенном из медленных мышц млекопитающих и птиц, имеются только две ЛЦ: щелочная ЛЦ1 и фосфорилируемая ЛЦ2. Поскольку иммунологические характеристики, подвижность в электрическом поле и молекулярные веса всех ЛЦ ММ и ЛЦ БМ различны [22, 31, 35], то как будто нет оснований искать изоформы ММ. Однако в медленных мышцах птиц найдено 2 изофермента ММ с одинаковым содержанием обеих ЛЦ [24, 25]. Так как различия в электрофоретической подвижности изоферментов не могут быть объяснены модификациями ЛЦ, предполагается, что эти изоферменты ММ отличаются по составу ТЦ [24]. ТЦ ММ и ТЦ БМ определенно различны по первичной структуре, что доказано при сравнении паракристаллов легкого меромиозина, иммунологическом анализе и сопоставлении двумерных пептидных карт [25, 35—38]. Таким образом, минимальное количество структурных генов для кодирования обоих миозинов равно 7, а с учетом возможных различий между ТЦ ММ — 8.

Фосфорилирование миозина

В сердечной, гладкой и скелетной мышцах ЛЦ2 фосфорилируется при помощи Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы [39—41]. В результате фосфорилирования ЛЦ2 происходит увеличение активности АТФазы миозина и актомиозина. Хотя идея регулирования скорости сокращения посредством фосфорилирования ЛЦ2 привлекательна, здесь требуются более строгие доказательства. Интересно другое обстоятельство: степень фосфорилирования БМ увеличивается при кофеиновой контрактуре и непрямой стимуляции мышцы [42]. В этой же работе определенно показано, что для фосфорилирования ЛЦ2 имеет значение не механическое смещение сократительных структур, а изменения концентрации ионов Са. Почти нет сомнений, что кальциевая регуляция фосфорилирования БМ осуществляется при помощи калмодулина, регуляторной субъединицы протеинкиназы ЛЦ2 [39, 40], фосфорилирование которой в свою очередь происходит при помощи зависящей от цАМФ протеинкиназы. Калмодулин входит также в состав системы, регулирующей активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов [39] и в состав

киназы фосфоорилазы в качестве ее Δ -субъединицы [44]. Последнее обстоятельство особенно интересно, так как дает прямые доказательства взаимосвязи между контрактильным аппаратом мышечных волокон и гликолизом, режим которого явно связан с признаком резистентности к утомлению мышечного волокна. К этому вопросу мы вернемся при обсуждении данных о сосуществовании БМ и ММ в скелетных мышечных волокнах.

Эмбриональный миозин

Первичная структура ТЦ БМ, ТЦ ММ и эмбрионального миозина различна, что показано при сопоставлении паракристаллов легкого меромиозина [45, 46], анализе первичной структуры фрагмента БМ, содержащего метилированный гистидин, с гомологичными участками ТЦ эмбрионального миозина [47], сравнении триптических фрагментов ТЦ [30, 46], а также двумерном картировании бромцановых пептидов эмбрионального и обоих дефинитивных миозинов [26, 36]. ЛЦ эмбриональных мышц изучены главным образом методом диск-электрофореза в денатурирующих гелях [30—32, 46, 48]. Оказалось, что развивающиеся медленные мышцы млекопитающих и птиц содержат смесь быстрых и медленных семейств ЛЦ, тогда как развивающиеся быстрые мышцы содержат ЛЦ, совпадающие по электрофоретической подвижности с ЛЦ БМ. Однако данные, полученные при помощи иммунологического маркирования ЛЦ и ТЦ [17, 35] и двумерного электрофореза [32, 36], не подтверждают этой концепции. Из массы противоречивых результатов изучения эмбрионального развития быстрых и медленных мышц, выполненных различными методами, можно выделить следующие положения. Во-первых, в эмбриональных мышцах обнаруживаются те же ЛЦ, что и в постэмбриогенезе (осторожнее сказать, ЛЦ, совпадающие по электрофоретической подвижности и по иммунным характеристикам). Во-вторых, ЛЦЗ появляется только в позднем эмбриогенезе. Наконец, в дополнение к наличию эмбриональных ТЦ есть данные о существовании эмбриональной щелочной ЛЦ [49]. В частности, методом гибридизации миозиновой мРНК с комплементарной ДНК показано наличие в препаратах 26S мРНК большего числа различных последовательностей, чем ожидалось по расчетам для кодирования только одной ТЦ [50], что в сочетании с результатами проведенной авторами этой работы трансляции в бесклеточной системе указывает как на гетерогенность миозиновой 26S мРНК по отношению к ТЦ, так и на присутствие последовательностей для других полипептидов.

Смена миозинов в эмбриогенезе

Из сказанного следует, что эмбриональный миозин существует реально (речь идет о мышечном миозине, синтез которого начинается после слияния миобластов). Синтез немышечного миозина

в ранних миобластах и смена его на синтез мышечного миозина разобраны Г. П. Пинаевым [20]. Следовательно, миогенная линия клеток в эмбриогенезе проходит минимум 2 смены популяций миозиннов: одна наблюдается при слиянии миобластов, другая — при переходе к постэмбриогенезу. Регуляция первого репрограммирования связана с началом терминальной дифференцировки, когда резко возрастает координированный синтез контрактивных белков [51, 52]. Исключение составляет ЛЦЗ. Возникает вопрос, с какими событиями миогенеза связано второе репрограммирование? Идет ли оно по эндогенной программе? Специфицируется ли внешними влияниями? Если да, то какими? и как?

Гипотезы регуляции смены миозиннов

В последние годы выдвинуты гипотезы, призванные объяснить ход и причины смены эмбрионального на дефинитивные миозины. Согласно хронологически более ранней (1977 г.) гипотезе [16, 53, 54], после слияния в миотубах синтезируется БМ без ЛЦЗ. Наступление иннервации приводит к реализации эндогенной программы синтеза ММ в будущих медленных мышцах, а программа синтеза БМ свертывается. Сторонники гипотезы опираются на данные диск-электрофореза (упомянутое выше паличье в развивающихся медленных мышцах обоих типов ЛЦ) и иммунологического анализа развивающихся мышц при помощи антисывороток к ТЦ дефинитивных БМ и ММ. Эти данные, по мнению авторов гипотезы, подтверждают их точку зрения, но воспринимаются с сомнением [55, 56]. Именно здесь, в недостаточной чистоте примененного иммунологического анализа, вероятно, и находится слабое звено доказательств. Недавно авторы представили дополнительные факты [54] в пользу своей гипотезы (вначале был БМ, потом — где надо — появился ММ). Миобласты зачатков быстрой и медленной мышц куриных эмбрионов до наступления иннервации зачатков мышц культивировали *in vitro* и при помощи тех же иммунологических тестов показали отсутствие ММ в обеих эмбриональных мышцах.

Вторая гипотеза принадлежит Готье [17]. При помощи нескольких антисывороток к ММ, БМ, A_1 , A_2 показано, что в развивающейся диафрагме эмбрионов крыс содержатся как БМ, так и ММ. В постэмбриогенезе происходит постепенный распад однородной популяции на волокна, содержащие только БМ или только ММ. Причина дивергентной дифференцировки — смена полиаксональной (полинейронной) иннервации на моноаксональную. Заметим, что по мере дифференцировки быстрых мышечных волокон происходит усиление флуоресценции при обработке срезов антисывороткой к A_2 , что говорит об увеличении содержания изозимов с ЛЦЗ.

Не отдавая предпочтения ни одной из гипотез, отметим, что в пользу гипотезы о сосуществовании миозиннов в развивающихся мышечных волокнах недавно получены сильные доказательства. При изучении методом двумерного электрофореза зачатков мышц,

выделенных до наступления иннервации, ЛЦ БМ и ЛЦ ММ найдены в миогенных клетках зачатков быстрой и медленной мышц [57, 58]; особенно важно, что в одной из этих работ [57] использовано клоппрование миобластов. Смысл этих работ в том, что в эмбриогенезе экспрессируются оба миозина, а внешние факторы модулируют экспрессию в пользу одной из программ.

Гибридный миозин

Реальное положение значительно сложнее: в виде непротиворечивого целого факты по разбираемому вопросу не складываются. В последнее время появились новые противоречия. В двух работах [25, 26], выполненных при помощи электрофореза в пирофосфатном геле и анализа пептидных карт миозинов, сопоставлены эмбриональные и зрелые быстрые и медленные мышцы птиц и млекопитающих. У 2-дневных крольчат спектр изозимов миозина обеих мышц идентичен, что подтверждает гипотезу Готье [17, 59]. Пептидные карты БМ и ММ отличаются друг от друга и от миозина эмбриональных мышц; быстрая мышца на фореграмме представлена тремя, а медленная одним профилем. У птиц в ММ найдено 2 изозима, отличающихся, вероятно, по структуре тяжелых цепей; в будущей медленной мышце также присутствуют оба изозима, хотя и в других соотношениях. В эмбриональной быстрой мышце происходит постепенное появление 3 изоферментов, начиная с БМ-3 (содержит 2 ЛЦ1); последним появляется БМ-1 (содержит 2 ЛЦ3). Кроме того, есть указания, что в развивающейся медленной мышце содержится ЛЦ1, совпадающая по подвижности с ЛЦ1 БМ.

Одним из вариантов примирения противоречивых фактов является предложение [25, 26] о существовании гибридных форм миозинов, например миозина с эмбриональными ТЦ и ЛЦ БМ и т. д. Идея безусловно привлекательна; как принято говорить в таких случаях, будущие исследования внесут ясность в этот вопрос.

Регуляция трансляции ЛЦ3

Из разбора данных о характере миозина в развивающихся мышцах особый интерес имеют два факта: постепенное появление изофермента с ЛЦ3, что, как было установлено выше, прямо коррелирует с увеличением активности АТФазы миозина и скорости сокращения, и отсутствие ЛЦ3 среди контрактильных белков, координированный синтез которых начинается при слиянии миобластов [51, 52]. Возникают вопросы: как регулируется экспрессия ЛЦ3 в мышце и не связано ли появление ЛЦ3 с критическими фазами терминальной дифференцировки, например с наступлением иннервации и ее характером и появлением сократительной активности? По крайней мере первый из этих

вопросов можно обсудить. В эмбриональной мышце *in vivo* и в диссоциированных культурах *in vitro* ЛЦЗ отсутствует [51]. Однако матричная РНК для ЛЦЗ, по крайней мере *in vitro*, имеется, так как в бесклеточных системах происходит трансляция этого полипептида [51, 52, 60, 61]. Другими словами, регуляция экспрессии ЛЦЗ может происходить на уровне трансляции. Эта гипотеза объясняет многие факты, в частности отсутствие синтеза ЛЦЗ при начале координированного синтеза контрактельных белков после слияния миобластов, известные и уже разбирательные факты о корреляции между увеличением скорости сокращения и появлением ЛЦЗ в развивающейся мышце. Дополнительно в пользу разбираемой гипотезы могут быть привлечены данные о факторах регуляции трансляции матричной миозиновой РНК: имеются в виду представления о существовании РНК контроля трансляции [62] и белкового фактора, специфичного для трансляции миозина [63]. Разбираемой гипотезе как будто не противоречат недавно появившиеся данные об обнаружении ЛЦЗ *in vitro* [57, 62], так как, во-первых, обнаружена исключительная нестабильность ЛЦЗ [57], а, во-вторых, имеются косвенные указания, что ЛЦЗ в эмбриональных мышцах не связываются с ТЦ миозина [64]. Более того, появились данные, которые можно рассматривать как указание на существование посттрансляционного механизма контроля состояния миозинов в виде регулирования длительности полужизни молекул миозина [65—67]. Отметим, что в этих работах прямо указывается на то, что отсутствие контрактельной активности мышцы, вызванное экспериментально либо наблюдающееся у дистрофичных *mdg* мышей, снимает этот механизм контроля.

Возможные факторы регуляции

Обе гипотезы, рассматривающие смену миозинов в эмбриогенезе [16, 17], выделяют наступление иннервации и ее характер в качестве фактора регулирования экспрессии БМ и ММ в развивающихся быстрых и медленных мышцах. Этот вопрос подробно разбирается в недавних обзорах [1, 4, 8, 15]. Здесь мы ограничимся приведением некоторых новых данных, отложив разбор концептуальной стороны вопроса до следующего раздела. Влияние нерва на развитие быстрого или медленного мышечного фенотипа продемонстрировано в опытах с перекрестной трансплантацией развивающихся быстрой и медленной мышц у птиц [68]. Оказалось, что развитие быстрых и медленных мышечных волокон определяется не свойствами мышцы, а навязывается иннервацией. В дополнение к многочисленным опытам с перинатальной денервацией мышц [4, 10] еще раз показано, что при этом различия в скорости сокращения и других признаков мышечных волокон не развиваются [69]. Вторая группа фактов относится к раскрытию возможных механизмов, обеспечивающих

смену полинейрональной иннервации развивающихся мышц на моноаксональную, что, по современным представлениям [17], приводит к развитию соответствующего фенотипа по признаку скорости сокращения. Для дальнейшего обсуждения существенно, что паралич мышцы, вызванный блокадой синаптической передачи кураре или введением в нерв тетродотоксина, тормозит ретракцию «лишних» нервных волокон, что приводит к отсрочке появления различий в скоростных свойствах развивающихся мышц [70—73].

МНОГЕННЫЕ ФЕНОТИПЫ И ИХ ПЛАСТИЧНОСТЬ

Существует значительное количество доказательств, разобранных в соответствующих обзорах [1, 9, 38, 48, 74—76], что фенотип скелетного мышечного волокна лабилен. Например, перекрестная реиннервация быстрой и медленной мышц реципрокными нервами, экспериментальное навязывание характера импульсации в аксонах «быстрых» и «медленных» мотонейронов приводят к репрограммированию фенотипов по признаку скорости сокращения, что связано со сменой синтезируемых миозинов. Не приходится сомневаться, что такое репрограммирование должно быть связано с активацией соответствующих структурных генов для БМ и ММ, хотя, строго говоря, это не доказано. Действительно, не исключено, что в мышечных волокнах, претерпевающих смену миозинов в результате экспериментальных вмешательств, постоянно транскрибируются обе группы структурных генов, но сама регуляция экспрессии БМ и ММ происходит на постгенетических уровнях, например на уровне трансляции, как это, по-видимому, имеет место в развивающихся мышцах при экспрессии ЛЦЗ. Помимо отсутствия прямых доказательств, что репрограммирование происходит за счет избирательной транскрипции (лишь в последнее время появилось сообщение [56], что при репрограммировании наблюдается резкое увеличение синтеза полиаминов, что косвенно может свидетельствовать о вовлечении посттранскрипционного уровня регуляции), необходимо указать, что в популяции мышечных волокон типичной быстрой мышцы кроликов около трети волокон содержат БМ, треть — ММ, а в трети волокон одновременно присутствуют оба миозина [77, 78]. Более того, репрограммирование может наблюдаться и при действии других (помимо характера иннервации) факторов. Так, на фоне повышения уровня трийодтиронина (T_3) в медленной мышце появляются белые (быстрые) мышечные волокна [79]. Хотя в этой работе не проводился анализ миозинов, вряд ли приходится сомневаться, что и в этом случае имеет место репрограммирование миозинов.* Укажем также, что под

* При анализе содержания ЛЦ в миозине из медленной мышцы показано, что под влиянием T_3 ЛЦ ММ заменяются на ЛЦ БМ [96].

влиянием T_3 в миокарде начинается синтез других ГЦ вместо нормально синтезируемых [37]. В плане изучения пластичности фенотипа кардиомиоцитов интересны результаты работ, в которых показано, что синтез изоферментов миозина с различной активностью АТФазы модулируется как T_3 [37, 80], так и характером физической нагрузки на сердце [81] и что эти последние изменения спектра изоферментов могут быть частично предугаданы T_3 [82]. Приведенных фактов, вероятно, достаточно, чтобы убедиться в пластичности фенотипа мышечных клеток по признаку скорости сокращения. Важно также, что такая пластичность имеет место как в развивающихся, так и в зрелых мышцах. Еще одно важное обстоятельство заключается в том, что факторы, приводящие к репрограммированию миозинов, характеризуются множественностью: тип иннервации, T_3 , характер реальной физической нагрузки. Другими словами, регуляция фенотипа обеспечивается многими факторами окружения и, как мы видели выше, может регулироваться на различных уровнях гетеросинтеза, начиная с транскрипции и кончая посттрансляционной модификацией. Аналогичная ситуация возникает при анализе регуляции других признаков, характеризующих скелетное мышечное волокно, например чувствительности к ацетилхолину, утомляемости, длительности синаптической передачи. Во всех случаях выраженность признака и состояние обеспечивающего его макромолекулярного комплекса (никотинового холинорецептора, мультимеров ацетилхолинэстеразы) определяются многими факторами и регулируются на различных уровнях гетеросинтеза (особенно красива гипотеза [83, 84] о посттрансляционной модификации синаптической ацетилхолинэстеразы наличием иннервации). Разбор уровней регуляции состояния рецепторов ацетилхолина факторами окружения — иннервацией и контрактальной активностью — проведен недавно в обзоре Фэмброу [85]. Наконец, аналогичные выводы о множественности факторов регуляции фенотипа сделаны при разборе совершенно другого клеточного типа — развивающихся нейронов, производных ганглиозной пластинки [43, 86, 87].

Из этих посылок вытекают соображения, касающиеся возможного характера мессенджера, опосредующего множество факторов окружения на экспрессию признаков в клетке—мишени. Наиболее подходящими кандидатами на эту роль являются ионы Ca и система циклических нуклеотидов [88—94]. Хотя этот вопрос выходит за рамки обзора, два соображения могут быть приведены и здесь. Одним из них является факт соответствия мышечных волокон, содержащих оба миозина (БМ и ММ), волокнам, устойчивым к утомлению [77, 78]. Механизм, обеспечивающий подобную связанность двух признаков (скорость сокращения и утомляемость мышечного волокна), может заключаться в участии калмодулина, одновременно входящего в состав нескольких ферментных комплексов в составе миофибрилл, о чем

говорило выше. Наконец, участие цАМФ и цГМФ в регуляции синтеза и деградации никотиновых холинорецепторов, происходящих под влиянием нескольких факторов окружения, разобрано в экспериментальной работе, проведенной на куриных миоблестах [95].

Автор считает своим приятным долгом выразить признательность М. М. Огневцевой, С. Ю. Хайтлиной, Б. А. Маргулис и Г. П. Пинаеву за дружелюбное и плодотворное обсуждение материалов обзора.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Н е р в н ы й контроль структурно-функциональной организации мышц. Л., Наука, 1980.
- [2] Г о в ы р и н В. А. Трофическая функция симпатических нервов сердца и скелетных мышц. Л., Наука, 1967.
- [3] Ж е н е в с к а я Р. П. Нервно-трофическая регуляция пластической активности мышечной ткани. М., Наука, 1974.
- [4] И т и ц а Н. А. — Усп. физиол. наук, 1976, 7 : 69.
- [5] Б е р д ы ш е в Г. Д., М а с ю к А. И., Т ю л е н е в В. И. — Усп. соврем. биол., 1978, 86 : 43.
- [6] М а в р и ц с к а я Л. Ф., Р е з в я к о в Н. П. — Арх. анат., 1978, 75 : 23.
- [7] У л у м б е к о в Э. Г. — В кн.: Цитохимические корреляты торможения пейронов. Л., Наука, 1978 : 58.
- [8] У л у м б е к о в Э. Г., Р е з в я к о в Н. П. — В кн.: Нервный контроль структурно-функциональной организации мышц. Л., Наука, 1980 : 84.
- [9] G u t m a n n E. — Ann. Rev. Physiol., 1976, 38 : 177.
- [10] G u t m a n n E., M e l i c h n a G. A. — Physiol. Bohemoslov., 1978, 28 : 35.
- [11] H a r r i s A. G. — Ann. Rev. Physiol., 1974, 36 : 251.
- [12] T h o r s t e n s s o n A. Muscle Strength, Fibre Types and Enzyme Activities in Man. — Acta physiol. scand., 1976, Suppl. 443.
- [13] V a r o n S. S., B u n g e R. P. — Ann. Rev. Neurosci., 1978, 1 : 327.
- [14] T h e c h o l i n e r g i c s y n a p s e — Progr. Brain Res., 1979 : 49.
- [15] V r b o v a G., G o r d o n T., J o n e s R. Nerve-muscle interaction. London, Chapman and Hall, 1978.
- [16] R u b i n s t e i n N. A., Р е р е Е. А., H o l t z e r H. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 4524.
- [17] G a u t h i e r G. F., L o w e y S., H o b b s A. W. — Nature, 1978, 274 : 25.
- [18] M e r l i e G. P., B u c k i n g h a m M. E., W h a l e n R. G. — Curr. Topics in Develop. Biol., 1977, 11 : 61.
- [19] H e r g m a n n H., H e y w o o d S. M., M a r c h o k A. C. — Ibid., 1970, 5 : 181.
- [20] И в а н о в И. И., К о р о в к и н Б. Ф., П и н а е в Г. П. Биохимия мышц. М., Медицина, 1977.
- [21] Ж у к о в Е. К., И т и ц а Н. А., М а г а з а н и к Л. Г., М а н д е л ь ш т а м Ю. Е., Н а с л е д о в Г. А., С в и д е р с к и й В. Л., С к о р о б о в и ч у к Н. Ф., У ш а к о в В. Б. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. Л., Наука, 1974.
- [22] M a n n h e r z H. G., G o o d y R. G. — Ann. Rev. Biochem., 1976, 45 : 427.
- [23] W e e d s A. G., T a y l o r R. S. — Nature, 1975, 257 : 54.
- [24] H o h J. F. Y. — FEBS Letters, 1978, 90 : 297.

- [25] Hoh J. F. Y. — FEBS Letters, 1979, 98 : 267.
- [26] Hoh J. F. Y., Yeoh G. P. S. — Nature, 1979, 280 : 321.
- [27] Lowey S., Benfield P. A., Sielberstein L., Lang L. M. — Nature, 1979, 282 : 522.
- [28] Barany M. — J. Gen. Physiol., 1967, 50 : Suppl., Pt. 2 : 197.
- [29] John H. A. — FEBS Letters, 1974, 39 : 278.
- [30] John H. A. — FEBS Letters, 1976, 64 : 116.
- [31] Syrový I. — Intern. J. Biochem., 1979, 10 : 383.
- [32] Pette D., Vrbova G., Whalen R. C. — Pflügers Arch. ges. Physiol., 1979, 378 : 251.
- [33] Trayer H. R., Winstanley M. A., Trayer I. P. — FEBS Letters, 1977, 83 : 141.
- [34] Wagner P. D., Slater C. S., Pope B., Weeds A. G. — Eur. J. Biochem., 1979, 99 : 385.
- [35] Obinata T., Masaki T., Takano H. — J. Biochem., 1979, 86 : 131.
- [36] Brevet A., Whalen R. G. — Biochemie, 1978, 60 : 459.
- [37] Flink I. L., Rader J. H., Morkin E. — J. Biol. Chem., 1979, 254 : 3105.
- [38] Weeds A. G., Burrige K. — FEBS Letters, 1975, 57 : 203.
- [39] Barylko B., Kuznicki J., Drabikowski W. — FEBS Letters, 1978, 90 : 301.
- [40] Perry S. V. — Biochem. Soc. Transact., 1979, 7 : 593.
- [41] Perry S. V., Grand R., Nairn A. C., Vanaman T. C., Wall C. M. — Biochem. Soc. Transact., 1979, 7 : 619.
- [42] Barany K., Barany M., Gillis M., Kushmerick M. — J. Biol. Chem., 1979, 254 : 3617.
- [43] Patterson P. H. — An. Rev. Neurosci., 1978, 1 : 1.
- [44] Cohen P., Picton C., Klee C. — FEBS Letters, 1979, 104 : 25.
- [45] Sreter P. A., Holtzer S., Gergely J., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1972, 55 : 586.
- [46] Sreter P. A., Balint M., Gergely J. — Develop. Biol., 1975, 46 : 317.
- [47] Huszar G. — Nature New Biol., 1972, 240 : 260.
- [48] Roy R. K., Sreter P. A., Sarkar S. — Develop. Biol., 1979, 69 : 15.
- [49] Whalen R. G., Butler-Brown G. S., Gros F. — J. Mol. Biol., 1978, 126 : 415.
- [50] Patrinoou-Georgoulas M., John H. A. — FEBS Letters, 1979, 109 : 239.
- [51] Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. — Cell, 1978, 13 : 599.
- [52] Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. — Develop. Biol., 1979, 69 : 202.
- [53] Rubinstein N. A., Kelly A. M. — Develop. Biol., 1978, 62 : 471.
- [54] Rubinstein N. A., Holtzer H. — Nature, 1979, 280 : 323.
- [55] Weeds A. G. — Nature, 1978, 274 : 417.
- [56] Weeds A. G. — Nature, 1979, 282 : 232.
- [57] Faller L. R., Emerson C. P., Jr. — J. Cell Biol., 1979, 83 : 42a.
- [58] Fuchs G. F., E., Baden H. — J. Cell Biol., 1979, 83 : 385a.
- [59] Fuchs G. F., Lowey S. — J. Cell Biol., 1979, 81 : 10.
- [60] Fuchs G. F., Z., Yaffe D. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 3700.
- [61] Fuchs G. F., Z., Yaffe D. — Differentiation, 1977, 8 : 133.
- [62] Kennedy D. S., Siegel E., Heywood S. M. — FEBS Letters, 1978, 90 : 209.
- [63] Kennedy D. S., Durheim G., Kennedy D., Heywood S. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 341a.
- [64] Takahashi M. — J. Biochem., 1970, 80 : 621.

- [65] Charuk J., Bandman E., Strohman R. — *J. Cell Biol.*, 1979, 83 : 386a.
- [66] Friedman B. A., Powell J. A. — *J. Cell Biol.*, 1978, 79 : 325a.
- [67] Walker C., Strohman R. — *Exper. Cell Res.*, 1978, 116 : 341.
- [68] Ashurst D. E., Vrbova G. — *J. Cell Sci.*, 1979, 36 : 137.
- [69] Stanley E. F., Drachman D. — *Exper. Neurol.*, 1979, 64 : 231.
- [70] O'Brien R. A. D., Östberg A. J. C., Vrbova G. — *J. Physiol.*, 1979, 295 : 92P.
- [71] Oliver J. R., Wareham A. C. — *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1979, 380 : 111.
- [72] Srihari T., Vrbova G. — *J. Neurocytol.*, 1978, 7 : 529.
- [73] Thompson W., Kuffler D. P., Jansen J. — *Neurosci.*, 1979, 4 : 271.
- [74] Dhoot G. K., Perry S. V. — *Nature*, 1979, 278 : 714.
- [75] Salmons S., Sreter F. A. — *Nature*, 1976, 263 : 30.
- [76] Sreter F. A., Luff A. R., Gergely J. — *J. Gen. Physiol.*, 1975, 66 : 811.
- [77] Lutz H., Weber H., Billeter R., Jenny E. — *Nature*, 1979, 281 : 142.
- [78] Lutz H., Weber H., Billeter R., Jenny E. — *Experientia*, 1979, 35 : 970.
- [79] Ianuzzo D., Patel P., Chen V., O'Brien P., Williams C. — *Nature*, 1977, 270 : 74.
- [80] Hoh J. F. Y., Egerton L. J. — *FEBS Letters*, 1979, 101 : 143.
- [81] Lompere A. M., Schwartz K., d'Albis A., Lacombe G., Thiem N. — *Nature*, 1979, 282 : 105.
- [82] Afflitto J. J., Inchiosa M. A. — *Life Sci.*, 1979, 25 : 353.
- [83] Koenig J., Vigny M. — *Nature*, 1978, 271 : 75.
- [84] Vigny M., Koenig J., Rieger F. — *J. Neurochem.*, 1976, 27 : 1347.
- [85] Fambrough D. M. — *Physiol. Rev.*, 1979, 59 : 165.
- [86] Black I. — *Ann. Rev. Neurosci.*, 1978, 1 : 183.
- [87] Patrick J., Heinemann S., Schubert D. — *Ann. Rev. Neurosci.*, 1978, 1 : 417.
- [88] Разумовская Н. И. — В кн.: III Всесоюзн. конфер. по биохимии мышц. Тезисы докл. Л., Наука, 1978 : 15.
- [89] Blosser J. C., Appel S. H. — *J. Biol. Chem.*, 1978, 253 : 3088.
- [90] Holmberg E., Waldeck B. — *Arch. Pharmacol.*, 1977, 301 : 109.
- [91] Kameyama T., Etlinger J. D. — *Nature*, 1979, 279 : 344.
- [92] Levine S. N., Steiner A. L., Shelton E. H., Meissner G. — *Biochim. biophys. acta*, 1979, 566 : 171.
- [93] Nestler E. J., Beam K. G., Greengard P. — *Nature*, 1978, 275 : 451.
- [94] Thesleff S. — *Progr. Brain Res.*, 1979, 49 : 385.
- [95] Betz H., Changeux J.-P. — *Nature*, 1979, 278 : 749.
- [96] Johnson M. A., Mastaglia F. L., Montgomery A. G., Pope B., Weeds A. G. — *FEBS Letters*, 1980, 110 : 230.

И. И. ФРИДЛЯНСКАЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИОГЕНЕЗА

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к культивированию мышечных клеток вне организма возник давно. Еще в начале века Льюис, культивируя кусочки поперечнополосатой мышцы, обнаружил ритмичное спонтанное сокращение мышечной ткани в отсутствии иннервации. Позднее, с развитием техники монослойного культивирования [1], число исследований на мышечных клетках значительно возросло, ибо оказалось, что способностью к дифференцировке обладают не только кусочки мышечной ткани, но и отдельные клетки. Этот факт, а именно образование в культурах мышечных клеток высокодифференцированных структур, сохраняющих морфологические и функциональные особенности мышечной ткани, обуславливает широкое их использование для изучения механизмов миогенеза, а также для исследования общих закономерностей процессов цитодифференцировки.

В настоящем обзоре будут рассмотрены разные аспекты миогенеза: образование дифференцированных структур из недифференцированных клеток, экспрессия маркерных для мышечной ткани признаков, соотношение процессов пролиферации и дифференцировки, обособление мышечных клеток в онтогенезе и др. Многие эти проблемы подробно изложены в отдельных сообщениях настоящего сборника. Цель данной работы — показать возможности использования культур миогенных клеток для решения этих вопросов и те успехи в изучении миогенеза, которые уже достигнуты с их применением.

ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Первичные культуры

Существующие в настоящее время методы позволяют культивировать различные типы мышц (сердечные, гладкие, скелетные). Однако культивированию скелетных мышц уделено ве-

сравнимо большее внимание, что и отразится в настоящем сообщении. Оно в основном будет касаться результатов, полученных при культивировании клеток скелетных мышц. Подробно с техникой культивирования скелетных мышц можно ознакомиться в ранее опубликованных обзорах [2, 3]. Здесь будут кратко суммированы лишь общие сведения.

Мышцы культивируют либо в виде отдельных фрагментов ткани (органные культуры), либо кусочки диспергируют на отдельные клетки и получают клеточные культуры. Данный обзор касается в основном лишь клеточных культур.

Имеющийся ассортимент питательных сред, а также разработанная техника культивирования позволяют культивировать мышечные клетки практически любого вида животных [2]. Однако до недавнего времени наиболее популярным объектом исследования были клеточные культуры скелетных мышц куриного эмбриона. В последние годы круг объектов значительно увеличился. Широко используются культуры клеток других видов птиц (например, перепелки), крысы, мыши, человека и др. Очень перспективным объектом является дрозофила, поскольку она подробно изучена генетически. Уже разработаны методы культивирования ее мюогенных клеток и прослежены основные этапы мюогенеза [4]. Начинают накапливаться данные о дифференцировке мюогенных клеток в культурах, полученных от особей с мутациями, нарушающими нормальное функционирование мышц [5].

Для получения первичной культуры мышцу (взрослую или эмбриональную) диспергируют на отдельные клетки. Для этого либо используют различные ферменты (трипсин, коллагеназу, эластазу и др.), либо осуществляют этот процесс механически [5, 6]. Полученную суспензию клеток культивируют в питательной среде, состоящей обычно из трех компонентов: среды определенного химического состава, сыворотки и куриного эмбрионального экстракта. К сожалению, состав среды, используемый для культивирования мышечных клеток, сильно варьирует в разных исследованиях, что часто затрудняет сравнение результатов разных авторов. Это относится как к среде определенного химического состава [2, 7] (используют основную среду Игла и ее модификации, среду 199, среды Хэма F₁₀ и F₁₂), так и к сыворотке [2, 5] (варьирует тип сыворотки: лошадиная, телячья, бычья, эмбриональная телячья и ее концентрации) и к эмбриональному экстракту (способ его приготовления и дозы) [2, 5, 8]. Какие факторы куриного эмбрионального экстракта обуславливают его роль в осуществлении мюогенеза культивируемых мышечных клеток, до сих пор не известно, но он является желательным, хотя и необязательным [9, 10] компонентом среды. Делаются попытки заменить сыворотку, химический состав которой неопределен и изменчив, другими, более стандартными компонентами [11].

Мышечные клетки чрезвычайно чувствительны к субстрату, на котором их культивируют, и в большинстве случаев их дифференцировка осуществляется лишь тогда, когда они растут на коллагене. нативном или денатурированном (желатине). Добавление коллагена особенно существенно при клональном росте мышечных клеток. В плотных культурах он может образовываться эндогенно за счет имеющейся примеси фибробластов, которые способны к образованию экстраклеточного коллагена. Присутствие коллагена резко повышает адгезивность клеток, однако этот фактор, по-видимому, не является единственным, обуславливающим необходимость присутствия коллагена для осуществления дифференцировки мышечных клеток [2].

Одноядерные миогенные клетки после прикрепления к субстрату *in vitro* начинают делиться. После достижения определенной плотности культуры темп деления снижается, образуются тяжи плотноприлегающих одноядерных клеток, вытянутые в продольном направлении. Это — начало процесса слияния, следствием которого является появление многоядерных миотуб. В образовавшихся миотубах синтезируются специфические белки, формируется организованный миофибрилярный аппарат, обеспечивающий их спонтанное ритмичное сокращение. С подробностями описанных событий, исследованных на ультраструктурном уровне, можно ознакомиться в других обзорах [4, 12, 13].

Таким образом, миогенез *in vitro* в основных чертах протекает так же, как *in vivo*. Конечным его результатом является образование высокодифференцированных многоядерных клеток, которые одни авторы называют мышечным волокном (*muscle fiber*), другие — (зрелой) миотубой [(*mature*) *myotube*], желая тем самым указать все же на имеющиеся различия. Эти отличия следующие: 1) ветвление мышечного волокна, которое часто наблюдается *in vitro*, и 2) отсутствие физиологической дифференциации. Электрофизиологические свойства культивируемых быстрых и медленных мышц цыпленка сходны [14]. Можно думать, что подобные результаты обусловлены отсутствием иннервации. Культивируемые мышечные клетки сохраняют способность образовывать специфические контакты с нервными клетками [15]. Однако даже в смешанных культурах гистохимических различий между мышечными волокнами не обнаруживается [3].

«Чистые» популяции мышечных клеток

Выше были описаны события миогенеза, развивающиеся при введении в культуру клеток диссоциированной мышцы. Однако следует иметь в виду, что взвесь клеток, получаемая из мышцы, неоднородна. Помимо миогенных клеток, в ней присутствуют соединительнотканые клетки.

Одноядерные клетки-предшественники мышечного и соединительнотканного происхождения могут различаться морфоло-

гически. Миобласты описывают как биполярные веретеновидные клетки. Сильно распластаные клетки неправильной формы относят к фибробластам [1]. Найдены отличия и в их ультраструктуре [16], однако многие авторы [17, 18] указывают на то, что форма этих клеток чрезвычайно чувствительна к условиям культивирования и может сильно варьировать, поэтому морфологический критерий определения гистогенетических потенций клетки не может считаться надежным.

Для изучения различных аспектов миогенеза очень важно иметь «чистые» культуры миогенных клеток, не содержащие примеси других клеток. Получить популяцию, состоящую только из мышечных клеток, можно при клонировании. Однако для ряда исследований (например, биохимических) количество клеток в клоне слишком мало, и при дальнейшем пассировании способность клеток к дифференцировке утрачивается. Поэтому такого рода эксперименты проводят на первичных культурах, которые можно существенно обогатить содержанием миогенных клеток, используя несложный прием, основанный на различной скорости прикрепления к субстрату миобластов и фибробластов [19]. Этот метод наиболее распространен, хотя существуют и другие. Так, например, присутствие в ростовой среде ЭГТА создает селективные преимущества для миогенных клеток дрозофилы, и с помощью этого агента удается получать культуры, содержащие в основном миогенные клетки [20]. Мышечные клетки удается отделить от фибробластов в градиенте фикола [21].

Гетерогенность культур миогенных клеток обусловлена не только присутствием фибробластоподобных клеток, но и тем, что сами мышечные клетки также не однородны. Популяция миогенных клеток представлена по крайней мере тремя разными типами клеток: одноядерными пролиферирующими миобластами, миобластами, подготовленными к слиянию, и многоядерными дифференцированными клетками. В настоящее время разработаны методы, позволяющие расчленить эту гетерогенную популяцию на отдельные клеточные типы, т. е. получить культуры однородных мышечных клеток. При добавлении в среду в ранние сроки после посева митотических ингибиторов [22], таких как амниоптерин или Д-арабинофуранозил цитозин, одноядерные делящиеся миобласты погибают. Одноядерные клетки, готовые к слиянию, не чувствительны к этим агентам. В результате получают культуру, состоящую только из высокодифференцированных структур — миотуб.

Низкие концентрации 5-бромдезоксиуридина полностью, но обратимо подавляют слияние и образование миотуб, но не влияют на размножение клеток. Таким образом можно получить «чистую» культуру размножающихся одноядерных миобластов [23]. Подготовка миобластов к слиянию блокируется также в присутствии ацетата свинца [24].

Одноядерные миобласты, подготовленные к слиянию, можно

селектировать с помощью цитохалазина В. В его присутствии фибробласты и деящиеся миобласты сильно меняют форму, образуя множество древовидных отростков, но остаются прикрепленными к субстрату; миобласты, подготовленные к слиянию, округляются и открепляются от субстрата. В отсутствие цитохалазина В они снова прикрепляются к субстрату, вытягиваются и сливаются в нормальные мнотубы [25]. Помимо цитохалазина В, для этой цели можно использовать колхицин, колцемид, ЭДТА [26], снижение концентрации ионов кальция в среде [27], однако в последнем случае могут получаться противоречивые результаты [28].

Описанные методы получения «чистых» культур разных клеточных типов уже широко используются, что способствует значительному прогрессу в понимании закономерностей мюгенеза.

Постоянные мюгенные клеточные линии

Нормальные мюгенные клетки дифференцируются только в первичной культуре. Поэтому наряду с исследованием мюгенеза в первичных эксплантатах были предприняты попытки получить постоянные мюгенные клеточные линии, сохраняющие способность к дифференцировке.

Впервые это удалось сделать при культивировании бедренных мышц новорожденных крысят [29]. Обычно через 3—5 пассажей мюгенные нормальные крысиные клетки полностью прекращают деление и погибают. Добавление канцерогена 20-метилхолантрена в среду на первых 2 пассажах стимулировало дальнейшее клеточное деление, и культура приобрела способность к неограниченному размножению. Одна из линий, полученных таким образом, получила название L_6 . Впоследствии постоянные линии клеток скелетной мышцы новорожденных крысят удалось получить и без обработки клеток канцерогеном [29]. К их числу относятся линия L_8 . Обе линии в настоящее время широко используются в опытах с мюгенными клетками.

Культуры поддерживаются таким образом, чтобы плотность клеток была низкой; в плотных культурах начинается слияние клеток в мнотубы. Варьируя условия культивирования, можно работать либо с пролиферирующими клетками, либо с дифференцированными. Уровень дифференцировки клеток этих линий такой же, как и в первичных культурах скелетных мышц, т. е. в мнотубах, образующихся при слиянии одноядерных клеток постоянных линий: формируются поперечная исчерченность и другие маркерные для мышечной ткани признаки, в том числе и характерные физиологические особенности клеточной мембраны [30—32]. Выделенные линии имеют в основном диплоидное число хромосом, но и при отклонении его от $2n$ способность клеток к дифференцировке может сохраняться [29, 33]. Известно, что длительное культивирование клеток часто сопровождается

их неопластическим превращением. Поскольку линии L_6 и L_8 получены от нелинейных животных, проверка их злокачественных свойств затруднена. Однако при инъекции этих клеток крысам и бестимусным мышам опухоли не образуются [29, 34]. Получена постоянная миогенная клеточная линия мышей [35], а также линия скелетных мышечных клеток мыши из тератокарциномы [36].

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МИОГЕННЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Пролиферация и дифференцировка клеток

Сейчас уже ни у кого нет сомнений, что многоядерные мышечные волокна, формирующиеся в ходе миогенеза, образуются путем слияния одноядерных клеток-предшественников, а не путем деления ядер внутри них. Существенный вклад для установления этого факта внесли эксперименты на клеточных культурах с использованием методов автордиографии и микрокинносъемки.

Микрофотометрические измерения содержания ДНК в ядрах миотуб установили, что количество ДНК в одном ядре постоянно и соответствует 2 С. Ясно, что сливающиеся одноядерные клетки должны содержать такое же, т. е. диплоидное, количество ДНК. Этот факт и лежит в основе многолетней дискуссии о том, на какой стадии клеточного цикла происходит слияние одноядерных миогенных клеток.

Согласно одной из точек зрения [23], способностью сливаться обладают клетки, вышедшие из клеточного цикла, так называемые постмитотические миобласты. Они возникают в ходе миогенеза из делящихся презумптивных миобластов при особом типе митоза, который назван «квантальным». Особенность квантального митоза заключается в том, что образующиеся в результате него дочерние клетки не тождественны родительским. Противоположное мнение [37] состоит в том, что выход клеток из митоза является не причиной, а следствием слияния.

Однако не вызывает сомнений, что способностью к слиянию обладают не все, а лишь определенные миогенные клетки. Так, при смешивании культур разного возраста *in vitro* в миотубах оказываются преимущественно ядра более «старых» миобластов [38], причем различия между одноядерными клетками культур мышечных клеток, отличающихся по сроку культивирования, оказываются гораздо существеннее, чем межвидовые различия между миобластами одного срока культивирования.

При совместном культивировании мышечных клеток разных видов животных, но одного «культурального» возраста легко образуются гибридные миотубы, содержащие ядра разных видов. В таких химерных миотубах ядра разных видов животных со-

храняют функциональную активность, в результате появляются разные миофибриллы [39, 40].

Дискуссионным является также вопрос о необходимости синтеза ДНК и деления клеток для осуществления миогенеза *in vitro*. Ряд авторов полагает, что эти процессы очень существенны [38], поскольку дифференцированные структуры появляются при достижении в культуре определенной плотности. С другой стороны, опыты с применением массивных доз облучения и других митотических ингибиторов показали, что миогенез *in vitro* происходит в отсутствие синтеза ДНК и деления клеток [21, 41]. По-видимому, указанные противоречия возникают вследствие использования разных видов животных и разных условий культивирования. Особенно важное значение, по-видимому, имеет возраст животного, так как события, происходящие *in vitro*, отражают события, произошедшие *in situ*. Эксплантат клеток растущих мышц, вероятно, представляет собой гетерогенную популяцию, включающую как пролиферирующие миогенные клетки, так и отличающиеся от них одноядерные клетки, подготовленные к слиянию. Вероятно, необходимость деления клеток при дифференцировке *in vitro* зависит от соотношения этих клеточных типов в эксплантируемой ткани.

Конечно, миобласты, непосредственно участвующие в слиянии, происходят из делящихся миогенных клеток-предшественников, но пока не ясно, возникают ли их особые свойства, отличающие их от пролиферирующих клеток, вследствие митоза («квантального»), или независимо от него.

Ядра слившихся миобластов утрачивают способность к делению и к синтезу ДНК. Ни митотических фигур, ни включения меченых предшественников для синтеза ДНК в ядрах миотуб не наблюдается.

Причины блокирования синтеза ДНК в результате слияния пока не выяснены. Предполагалось, что оно связано с уменьшением активности ДНК-полимеразы, которое наблюдается в миотубах [42]. Более поздние исследования показали, что количество этого фермента при слиянии примерно такое же, как и в одноядерных клетках, а затем оно медленно падает [43]. Однако показано, что активность других ферментов, участвующих в синтезе ДНК, резко уменьшается в момент слияния.

Возможно, что важную роль в инактивации синтеза ДНК в ядрах миотуб играют гистоны, определяющие структуру хроматина. В дифференцированных миотубах обнаружена фракция гистона, отсутствующая в пролиферирующих одноядерных клетках [44].

Блок синтеза ДНК в многоядерных волокнах может быть обратим. Например, при действии химических мутагенов и УФ-излучения в ядрах миотуб *in vitro* наблюдается репаративный синтез ДНК [45]. При заражении культивируемых миогенных клеток температурочувствительным мутагеном онкогенного вируса

нормальная дифференцировка и образование миотуб наблюдаются только в том случае, когда культуры помещают при температуре, непермиссивной для размножения вируса. Если такие дифференцирующиеся культуры перенести в температуру, позволяющую репликацию вируса, то в ядрах миотуб начинается синтез ДНК [46].

Ряд авторов полагает, что мышечное волокно может при повреждении распадаться на одноядерные фрагменты, в ядрах которых возобновляется пролиферативная активность. Такие клетки являются источником, позволяющим восстановить поврежденные дифференцированные структуры [47]. Однако, несмотря на то что ингибирование синтеза ДНК в мышечных волокнах может быть обратимо, индукция его приводит к дегенерации ядер. Исследование культивируемых клеток скелетных мышц взрослых особей [48], а также одиночных изолированных мышечных волокон [49] показало, что регенерация мышечной ткани осуществляется не с помощью почкования ядер мышечного волокна, а за счет клеток-сателлитов, расположенных под базальной мембраной мышечных волокон.

Таким образом, в процессе миогенеза дифференцированные структуры полностью утрачивают способность к делению, а в восстановлении повреждения эту функцию выполняют специализированные сателлитные клетки. Этот механизм регенерации характерен только для скелетных мышц. В культурах гладкомышечной ткани этот процесс протекает иначе: дифференцированная гладкомышечная клетка постепенно утрачивает контрактильные свойства и характерные ультраструктурные особенности, т. е. дедифференцируется, затем начинает активно размножаться, и после достижения определенной плотности образовавшихся клеток их деление прекращается и дифференцировка восстанавливается [50]. В культурах клеток сердечной мышцы митоз может проходить в клетках, сохраняющих функциональную активность [51].

При анализе взаимоотношения процессов пролиферации и дифференцировки клеток скелетных мышц обращает на себя внимание следующий факт. Массовая дифференцировка мышечных клеток наблюдается только в первичных культурах, при пересеве уровень ее снижается и во вторичных культурах ее уже обычно нет, хотя клетки сохраняют жизнеспособность и пролиферативную активность, которая начинает затухать позже [52]. Этот феномен не связан с постепенным вытеснением миогенных клеток фибробластами, поскольку такие же результаты получаются при клонировании и реклонировании мышечных клонов. Таким образом, возможно, что число делений, которое могут пройти нормальные миогенные клетки-предшественники и сохранить способность к экспрессии дифференцировки, ограничено, как ограничено число делений клеток в пределах жизни индивидуума [53].

Экспрессия тканеспецифических особенностей мышечных клеток

Фенотипическая дифференцировка клеток скелетных мышц выражается в слиянии одноядерных клеток в многоядерные волокна, в синтезе сократительных, а также других маркерных белков (креатинфосфокиназа, миокиназа, гликогенсинтетаза, альдолаза), формировании миофибрилярного аппарата, появлении химической и электрической возбудимости мембраны мышечного волокна. Все эти характерные черты миогенеза свойственны и миогенным клеткам, дифференцирующимся в культуре.

Слияние одноядерных миобластов рассматривают как наиболее важное событие в миогенезе скелетной мускулатуры, поэтому изучению его механизмов уделено большое внимание. Предполагают, что способность миогенных клеток к слиянию определяется особыми свойствами их поверхности.

Действительно, миогенные клетки и фибробласты обладают разной способностью прикрепляться к субстрату, могут различаться формой клетки, что, по-видимому, указывает на различие их поверхностных свойств, но молекулярная природа этих отличий пока не выяснена.

Характерной особенностью миогенных клеток является наличие на их поверхности холинорецепторов [54]. Однако эти рецепторы обнаруживаются не у всех мышечных клеток, а только у одноядерных миобластов, подготовленных к слиянию, и в дифференцированных структурах. Показано, что блокировка их у миобластов накануне слияния не препятствует образованию миотуб [54, 55], т. е. в процессе слияния холинорецепторы не участвуют; их наличие свидетельствует о специфической функциональной дифференцировке клеточной мембраны.

Имеется довольно много сообщений об изменениях свойств мембран миогенных клеток при миогенезе. Так, показано, что в миотубах скорость транспорта аминокислот через мембрану меньше, чем у одноядерных клеток [56]. Спектр специфических мембранных белков и гликопротеинов в миобластах и в миотубах неодинаков [57]. Подробно исследован основной поверхностный гликопротеин — белок LETS. Обнаружено, что в делящихся миобластах его мало. Он встречается в основном в участках мембраны, близких к соседней клетке. В плотных культурах (в них много миобластов, готовых к слиянию) этот белок расположен диффузно по всей мембране, но особенно его много в экстраклеточном нитчатом матриксе, который характерен для этих миогенных клеток. После слияния в миотубах наружный матрикс исчезает, LETS-белок диффузно распределен по поверхности [58]. Показано, что подвижность некоторых поверхностных рецепторов в одноядерных и многоядерных мышечных клетках различна [58]. Методом двумерного электрофореза мембранных белков обнаружен белок, появляющийся накануне слияния, в момент специ-

фической агрегации одноядерных миобластов, и исчезающий после слияния [59]. Из мышечных клеток выделен лектиноподобный белок и показано, что максимальная активность его наблюдается в момент слияния [60]. Некоторые растительные лектины блокируют процесс слияния [61].

Во всех работах, цитированных выше, показано, что мембрана клеток в ходе митоза подвергается существенным изменениям, но какие из них непосредственно обуславливают процесс слияния, пока не известно. По-видимому, их должно быть несколько, поскольку слияние представляет собой процесс, отдельные этапы которого, возможно, имеют собственные контролируемые механизмы [62]. Этот процесс включает: 1) узнавание, 2) адгезию, 3) объединение мембран.

Начальным этапом слияния является узнавание клетками друг друга и образование клеточных агрегатов. Как уже указывалось выше, этот процесс очень специфичен: только миобласты, подготовленные к слиянию, «признают» друг друга и собираются в агрегаты. Предварительное подавление белкового синтеза в митотических клетках нарушает процесс узнавания [61]. Следовательно, в период подготовки клеток к слиянию происходит синтез какого-то белка (белков), с помощью которого клетки узнают друг друга. Этот белок ткане-, но не видоспецифичен, поскольку миобласты разных видов животных (куры, крысы, мыши и др.), на одной стадии митоза сливаются и образуют гибридные митоты [39].

Клеточные агрегаты, образующиеся в процессе узнавания, непрочные и легко диссоциируют в присутствии ЭДТА. Следующим этапом слияния является адгезия, образование плотных контактов, разрушающихся только трипсином [51]. В этот период клетки уже не чувствительны к ингибиторам белкового синтеза [61].

Агрегация клеток необходима, но сама по себе не достаточна для осуществления слияния. Ряд агентов (колхицин, цитохалазин В) не препятствует образованию агрегатов, но блокирует слияние. Таким образом, завершающий этап слияния, т. е. объединение мембран, по-видимому, имеет самостоятельный контроль.

Основную роль в объединении мембран играют, вероятно, липиды. Модификация липидного состава мембран митотических клеток не влияет на узнавание или адгезию клеток, но влияет на их слияние. Так, олеат ускоряет образование многоядерных клеток, а изомер его, элаидат, понижающий текучесть мембраны, тормозит их формирование, но не образование плотных агрегатов [63]. Предполагается, что объединение мембран миобластов осуществляется механизмом, подобным слиянию двуслойных липидных пузырьков *in vitro* [64].

При исследовании динамики фенотипических особенностей мышечной ткани отмечено, что синтезы сократительных бел-

ков [65] и ферментов энергетического обеспечения [66], а также физиологическая дифференцировка мембраны [67] начинаются в момент слияния, а затем происходит резкая их интенсификация. Поэтому было сделано предположение, что пусковым механизмом экспрессии «мышечного» фенотипа является слияние одноядерных клеток.

С другой стороны, многие авторы указывают, что уже в одноядерных клетках имеются холинорецепторы [32, 54, 55, 68], синтезируются креатинфосфокиназа [69—72] и сократительные белки [23, 73]. Более того, в определенных условиях одноядерные мышечные клетки могут спонтанно сокращаться, причем в них обнаруживаются гексагонально упакованные толстые и тонкие филаменты [23, 26].

Обработка одноядерных клеток актиномицином D за несколько часов до слияния не препятствует ни слиянию, ни синтезу миозина и креатинфосфокиназы [65]. Таким образом, транскрипция генов, контролирующая тканеспецифические синтезы, а в некоторых случаях и их трансляция происходят в одноядерных клетках. Однако, как уже указывалось выше, в популяциях мышечных клеток имеется, по крайней мере, два типа одноядерных клеток: пролиферирующие и подготовленные к слиянию; поэтому возникает вопрос, в каких из них происходят транскрипция и трансляция «мышечных генов». Есть основания считать, что фенотипическая экспрессия дифференцировки происходит не в пролиферирующих миобластах, а в клетках, подготовленных к слиянию [23]. По-видимому, процессы транскрипции генов, контролирующей «мышечный фенотип», также осуществляются в миобластах, переключившихся с деления на слияние [74, 75], но для подтверждения этого предположения нужны эксперименты на «чистых» популяциях миогенных клеток.

Известно, что актин, миозин, креатинфосфокиназа, альдолаза и некоторые другие белки синтезируются не только в мышечных клетках, но и в клетках других тканей. Поэтому были проведены специальные исследования, в том числе с использованием «чистых» популяций миогенных клеток, для того чтобы определить, происходит ли в ходе миогенеза лишь их количественное увеличение, или имеют место и их качественные изменения. В настоящее время все больше накапливается данных о том, что сократительные белки мышечных клеток качественно отличаются от сократительных белков неммышечных клеток. Это относится, по крайней мере, к актину [23, 76, 77], миозину [23, 74, 75], тропомиозину [78]. Кроме того, показано, что в ходе миогенеза происходит замена форм креатинфосфокиназы и альдолазы на «мышечный» тип [69, 70].

Высказывается предположение, что изоэпимеры сократительных белков являются продуктами разных генов [78], хотя вероятно возможность того, что наблюдаемые отличия белков и стабиль-

ности их мРНК могут быть связаны с посттранскрипционными событиями.

Приведенные выше данные свидетельствуют против того, что реализация миогенной программы обусловлена слиянием. По-видимому, его следует рассматривать как один из признаков, характеризующих мышечный фенотип. Таким образом, пусковые механизмы дифференцировки мышечных клеток по-прежнему остаются не выясненными. Известны лишь некоторые факторы, влияющие на ее проявления: состав среды для культивирования, концентрация ионов кальция в среде и др. (см. выше). Предполагается, что внешние сигналы опосредованно влияют на уровень цАМФ в клетке, который имеет очень важное значение в осуществлении процесса дифференцировки [79, 80].

Клональный анализ миогенеза

В ходе нормального эмбриогенеза миогенные клетки-предшественники, по-видимому, обособляются от других мезенхимных клеток значительно раньше, чем начинается слияние. Однако определить те стадии, когда происходит вычленение линии миогенных клеток *in vivo*, практически невозможно, поскольку в настоящее время нет цитологических или биохимических критериев, по которым можно фенотипически различать популяции одноядерных клеток.

Одним из подходов к решению этой проблемы является использование клонального анализа клеток *in vitro*. Клонирование позволяет исследовать свойства отдельных клеток, в том числе их потенции к дифференцировке. В таблице приведены данные разных авторов по выявлению миогенных клеток в зачатке ноги цыпленка в ходе эмбриогенеза. *In vivo* первые единичные мюотубы в зачатке конечности наблюдаются примерно на стадии 24—25 [81].

Из данных таблицы следует, что морфологическое сходство одноядерных мезенхимных клеток зачатка конечности куриного эмбриона ранних стадий развития является кажущимся. В ней присутствуют клетки, отличающиеся по потенциям к развитию.

Клональный анализ позволяет определить не только когда, но и где возникает определенный тип клеток. Для этого выре-

Т а б л и ц а

Появление миогенных клеток в зачатке ноги цыпленка в ходе нормального эмбриогенеза

Стадии эмбриогенеза	Наличие миогенных клеток	Литературные источники
20	—	[81]
21—22	+	[81, 82]
24—25	++	[68, 82]
29	+++	[68, 81]
32	++++	[83]
36	+++++	[83]

Примечание. О наличии миогенных клеток в зачатке ноги куриного эмбриона судили по появлению клонов, содержащих мюотубы, при клонировании зачатка разных стадий эмбриогенеза. Количество миогенных клеток в зачатке ноги в ходе эмбриогенеза увеличивается, ибо при клонировании зачатка увеличивается количество мышечных клонов и степень выраженности их дифференцировки.

зают определенные участки зачатка и их клонируют. При клонировании мезенхимных клеток зачатка крыла куриного эмбриона на стадии 23—24 образуются как мышечные, так и хондрогенные клоны, причем из периферической части зачатка образуются преимущественно мышечные клоны, а внутренняя часть зачатка представлена клетками, из которых в будущем разовьется хрящ [84]. Определенно также пространственное расположение миогенных, хондрогенных и фибробластоподобных клеток зачатка ноги куриного эмбриона на ранних стадиях развития [85].

Клональный анализ миогенных клеток выявил еще один очень интересный факт. Он показал, что клоны, образующиеся при клонировании мышечной ткани одного и того же органа, на разных этапах развития отличаются по количеству и степени зрелости миотуб. С увеличением возраста эмбриона выраженность дифференцировки усиливается [68, 86, 87]. Это означает, что в ходе индивидуального развития миогенные клетки претерпевают ряд наследственных изменений. По-видимому, неоднородность популяции мышечных клеток еще значительнее, чем та, на которую уже указывалось выше.

Таким образом, клональный анализ, позволяющий определить, где и когда в онтогенезе происходит появление миогенных клеток, может быть использован для выявления природы и механизмов детерминирующих стимулов, а также для изучения факторов, регулирующих фенотипическое проявление дифференцировки.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ МИОГЕНЕЗА

Культура клеток патологических мышц

Одним из методических подходов к исследованию миогенеза является изучение наследственно обусловленной мышечной патологии. Если патологические нарушения возникают в результате изменений в самих мышечных клетках, то их поведение в культуре будет отличаться от поведения нормальных клеток. Если же аномальные процессы в мышечных клетках индуцируются внешними сигналами, например от нервных волокон, то поведение таких мышечных клеток в культуре будет нормальным. Роль иннервации в патогенезе заболеваний мышц можно изучать при совместном культивировании нервных и мышечных клеток. В таких смешанных культурах образуются функциональные нервно-мышечные связи и, комбинируя мышечные и нервные клетки здоровых и больных особей, можно установить, является ли аномальная дифференцировка мышц следствием влияния нервных волокон.

Особое значение эти работы имеют для понимания природы наследственных нервно-мышечных заболеваний у человека.

Однако здесь возникают значительные трудности, ибо только в последние годы и только в нескольких лабораториях удается успешно культивировать мышцы от взрослых людей. Поэтому в качестве модельных объектов используют клеточные культуры животных с наследственными нервно-мышечными заболеваниями. В основном работают с дистрофией мышц у мутантных мышей и цыплят, а также с мышечной дистонией у мышей. Клеточные культуры для подобных исследований получают из мышц взрослых животных с явно выраженными симптомами болезни. Предполагается, что в этом случае, так же как и при регенерации нормальных взрослых мышц, источником культуры служат сателлитные клетки [3].

При наблюдении с помощью световой микроскопии или при гистохимических исследованиях существенных различий в дифференцировке культивируемых дистрофических мышц цыпленка, мыши (du 29) и человека обнаружено не было [88]. Однако дифференцировка мутантных мышей du с дистрофией мышц резко отличалась от дифференцировки культивируемых нормальных мышц: в культурах клеток «больных» мышц миобласты не сливались, миотубы не образовывались, дифференцировка останавливалась на стадии агрегатов [89]. У мышей с наследственным мышечным дистонезом в культурах можно получить мышечные волокна, но они не способны к спонтанному сокращению. Показано, что электрофизиологическая активность усиливает дифференцировку нормальных миотуб (одновременно увеличивается стабильность тяжелых цепей миозина), в то время как в «дистрофических» миотубах развиваются дегенеративные изменения и ускоряется деградация тяжелых цепей миозина [90]. Таким образом, по крайней мере в двух последних случаях морфологические и функциональные изменения имеют место в самих мышечных клетках, что указывает на миопатическую природу этих изменений. К числу миопатий, по-видимому, относятся кардиомиопатия хомячков, у которых в культивируемых клетках сердца синтезируется значительно меньше актина и миозина и нарушены Z-линии, а также мышечная дистрофия Дюшенна у человека, так как в клетках дистрофических мышц изменен белковый синтез и активность некоторых ферментов [3].

Вывод о том, что исследованные выше наследственные заболевания мышечной ткани относятся к первичным миопатиям, следует также из опытов по совместному культивированию первичных клеток от нормальных и больных животных с дистрофическими и нормальными мышечными клетками (см. обзор [3]). Следует, правда, указать, что в смешанных однослойных культурах синапсы, образующиеся между нервными и мышечными клетками, примитивны [91]. Так, диффузное распределение холинорецепторов, а также экстраинаптическая чувствительность к ацетилхолину, характерная для эмбриональных и денер-

вированных мышечных волокон, сохраняются и в однослойных нервно-мышечных культурах [22].

Какие генетические процессы лежат в основе наследственных заболеваний мышечной системы, обусловлены ли они мутациями структурных или регуляторных генов, пока не известно. Использование клеточных культур показало, что в ряде случаев нарушения возникают, возможно, в регуляторных системах. Так, в дистрофических мышцах цыплят *in vivo* отсутствует один из изоформ ЛДГ, но при культивировании мышечных клеток от больных животных этот изоформ обнаруживается [3].

Характерной особенностью некоторых дистрофий, например болезни Дюшенна у человека, наряду с измененными процессами дегенерации и регенерации является гиперплазия соединительной и жировой ткани. Хотя не исключено, что разрастание соединительной ткани возникает в результате дегенерации мышечной ткани, высказывается и другое предположение [92], согласно которому имеет место не феномен замены одной ткани другой, а функциональные изменения только в мышечной ткани. Эта гипотеза основана на экспериментах по культивированию нормальных мышечных клеток в измененных условиях. В присутствии 5-бромдезоксипуридина нормальные миобласты не дифференцируются в миотубы, но размножаются и по ультраструктурной организации, а также по усиленной продукции коллагена очень схожи с фибробластами. В условиях *in vitro*, имитирующих ишемию в организме, нормальные мышечные клетки перестают делиться и по морфологии очень напоминают жировые клетки [92].

Таким образом, при изменении условий культивирования миогенные клетки ненаследственно изменяются и становятся сходными с клетками других тканей (фибробластами и жировыми клетками), с которыми они тесно связаны онтогенетически. Считается, что ненаследственные изменения (модуляции) являются регуляторными. Можно думать, что при дистрофии Дюшенна соединительнотканная гиперплазия представляет собой наследственное изменение регуляции дифференцировки в мышечных клетках. Это одновременно приводит к изменению числа клеток, способных к регенеративному восстановлению поврежденных мышц [16].

Другим подходом к применению генетического расчленения для исследования миогенеза является исследование культивируемых опухолевых мышечных клеток. Обнаружено, что уровень дифференцировки в клеточных культурах разных опухолей может резко отличаться. В ряде случаев образуются миотубы, сходные с нормальными, в других — миогенез останавливается на стадии агрегации одноядерных клеток; в некоторых случаях признаки дифференцировки отсутствуют [93], что указывает, вероятно, на то, что злокачественному превращению могут подвергаться клетки на разных стадиях миогенеза.

Наблюдаемые различия в экспрессии дифференцировки культивируемых клеток опухолей скелетной мускулатуры наследственно обусловлены, так как воспроизводятся при клеточном размножении. Однако длительное культивирование опухолевых мышечных клеток приводит к нивелированию этих отличий, к постепенному исчезновению фенотипических особенностей мюогенеза; морфологически они становятся сходными с фибробластами. Сохраняются ли при этом у них детерминированные свойства мюогенных клеток, пока не известно, по пути для решения этой проблемы уже намечаются [9]. Знание закономерностей дифференцировки опухолевых клеток существенно как для выяснения общих механизмов мюогенеза, так и для понимания их роли в канцерогенезе.

Генетические варианты мюогенных клеточных линий

Поскольку слияние одноядерных миобластов в многоядерные миотубы сопровождается одновременным появлением различных «мышечных» маркеров [94—96], существует предположение, что экспрессия дифференцировки мюогенных клеток регулируется координированно.

Клонированием постоянных мюогенных клеточных линий выделены клоны, различающиеся по способности к дифференцировке. Так, клетки линии L₆, устойчивой к 8-азагуанину, сливаются, после слияния в них усиливается синтез миозина и появляется М-изозим фосфокреатинкиназы, но холинорецепторы на мембране не обнаруживаются [75]. У температурочувствительного клона линии L₆ экспрессия дифференцировки зависит от температуры, но и при перmissive температуре в образующихся миотубах накопления миозина не происходит [97].

Клон Ата-102, устойчивый к α -аманитину, утрачивает способность к слиянию, синтезу М-изозима фосфокреатинкиназы. У него изменена чувствительность РНК-полимеразы II к α -аманитину [98]. Связано ли изменение РНК-полимеразы II в мутантном клоне с утратой клетками способности к слиянию и специфическим синтезам, пока не известно. Показано лишь, что относительное количество РНК-полимеразы II в пролиферирующих миобластах и миотубах одинаково [99].

Из линии L₈ выделен клон, утративший способность к слиянию и синтезу миозина. Эти клетки по ряду параметров характеризуются как злокачественные [97], что указывает на тесную связь механизмов дифференцировки и канцерогенеза.

Приведенные примеры иллюстрируют широкие возможности использования вариантов с наследственно измененным блоком различных этапов мюогенеза для исследования процесса дифференцировки. Они показывают, что отдельные признаки дифференцировки мышечной ткани имеют собственный контроль и поэтому могут проявляться независимо друг от друга, но для всех них,

по-видимому, имеется общий пусковой механизм, при включении которого в норме и происходит одновременная экспрессия «мышечного» фенотипа.

Гибриды мюогенных клеток

Постоянные клеточные линии позволяют использовать для расшифровки механизмов дифференцировки еще один подход, который трудно применить при работе с первичными культурами, а тем более в опытах *in vivo*. Этот подход, заключающийся в гибридизации соматических клеток, позволяет изучить роль ядра и цитоплазмы в регуляции процесса дифференцировки.

Пересадив ядро одной клетки в цитоплазму другой, получают так называемые гибриды. Гибридные клетки получают при объединении в одной клетке и ядер, и цитоплазмы двух родственных клеток.

Показано, что при гибридизации мюогенных и фибробластоподобных клеток гибридная клетка утрачивает способность к мышечной дифференцировке: не образуются миотубы, не синтезируются сократительные белки [9, 33]. По крайней мере для гена, контролирующего синтез тяжелых цепей миозина, изменение регуляции осуществляется на уровне транскрипции.

Широко распространена точка зрения, согласно которой выключение в гибридах транскрипции генов, контролирующих признаки дифференцировки одного из партнеров, происходит за счет репрессоров другого партнера. Это предположение было проверено на гибридах мюогенных (линия L_6) и соединительнотканых клеток (A_9) [9]. Действительно, потомство гибридной клетки утрачивает способность сливаться в миотубы и образовывать мышечные сократительные белки. Однако анализ полипептидов, синтезируемых в гибридных и родительских клетках, проведенный с помощью двумерного гель-электрофореза, показал, что почти все белки, характерные для миобластов, присутствуют и в гибридных клетках [9]. Таким образом, результаты детерминирующего воздействия, определившего мюогенные потенциалы клеток, по-видимому, сохраняются при гибридизации, однако в гибридной клетке реализация этих потенциалов осуществиться не может.

Возможно, блок обусловлен присутствием генетического материала партнера иного направления дифференцировки, поскольку при элиминации хромосом из гибрида происходит восстановление ряда признаков мюогенеза, например слияния [100].

Существенные доказательства важной роли ядра в регуляции программы развития получены в опытах по пересадке ядер мюогенных клеток в цитоплазму немюогенных клеток. Показано, что клоны клеток, реконструированных из цитоплазмы фибробласта и ядра мюогенной клетки, являются мышечными: в них формируются миотубы с хорошо развитой поперечной исчерченностью [101]. С другой стороны, после введения ядра тератокарциномы в цитоплазму мюогенных клеток линии L_6 мышечные клоны не образуются [102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивируемые миогенные клетки *in vitro* формируют высокодифференцированные структуры, которые морфологически, биохимически и функционально сходны с мышечными волокнами *in situ*, поэтому они могут быть использованы для изучения механизмов миогенеза. Широкие возможности этого метода, позволяющего проводить эксперименты с мышечными клетками, лишенными примеси соединительнотканых клеток, присутствующих в интактных мышцах, работать с «чистыми» популяциями мышечных клеток разных стадий миогенеза, изучать потенциалы единичных клеток, значительно углубили наши представления о механизмах цитодифференцировки мышечной ткани.

Установлено, что образование мышечного волокна происходит за счет слияния одноядерных клеток, находящихся на определенной стадии клеточного цикла. Показано, что накануне слияния митобласты претерпевают существенные изменения и поэтому отличаются от пролиферирующих миогенных клеток. Выяснено, что слияние представляет собой процесс, основными этапами которого являются узнавание и адгезия клеток, причем возможно, что эти этапы контролируются независимо.

Показано, что слияние в норме сопровождается резкой интенсификацией синтеза маркерных для мышечной ткани белков, причем многие из них синтезируются координированно. Однако экспериментально разные признаки миогенеза (в том числе слияние) можно разобщить, что указывает на то, что они контролируются независимо и что слияние не является пусковым механизмом цитодифференцировки.

Выявлено, что обособление миогенных клеток в онтогенезе происходит раньше, чем появляются миотубы. Для некоторых видов животных определена их пространственная локализация в эмбриональных зачатках. Приобретенные миогенные потенциалы сохраняются при размножении клеток и определяются на клеточном, а не популяционном уровне. Способность клеток дифференцироваться в мышечные волокна обусловлена ядром, а не цитоплазмой.

Однако многие аспекты миогенеза по-прежнему остаются непонятыми. Наиболее важными вопросами, требующими решения, представляются следующие. 1. Каков механизм детерминирующего влияния, в результате которого клетки приобретают способность дифференцироваться в мышечное волокно? 2. Что и как переключает пролиферацию миогенных клеток на синтез специфических макромолекул? 3. Являются ли сократительные белки и ряд ферментов, которые, с одной стороны, выполняют общеклеточные функции и поэтому встречаются во многих клетках многоклеточного организма, а, с другой стороны, характерны для мышечной ткани, в которой они количественно и качественно изменены, продуктами одних и тех же или различных генов? 4. Как регулируется экспрессия отдельных признаков миогенеза?

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Konigsberg I. R. — Science, 1963, 140 : 1273.
- [2] Hauschka S. D. — In: Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. New York; London, Acad. Press, 1972 : 67.
- [3] Witkowski J. A. — Biol. Rev., 1975, 52 : 431.
- [4] Gerson I., Seecof R. L., Teplitz R. L. — In vitro, 1976, 12 : 615.
- [5] Buzin C. H., Dewhurst S. A., Seecof R. L. — Develop. Biol., 1978, 66 : 442.
- [6] Bullaro J. C., Brookman D. H. — In vitro, 1976, 6 : 564.
- [7] Summers P. Y., Parsons P. — Cell Differentiation, 1978, 7 : 399.
- [8] De la Haba G., Amundsen R. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69 : 1131.
- [9] Brzeski H., Linder S., Kron Dahl U., Ringertz N. R. — Exper. Cell Res., 1980, 128 : 267.
- [10] Friedlander M. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 32a.
- [11] Florini J. R., Roberts S. B. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 77a.
- [12] Fischman D. A. — Curr. Topics Develop. Biol., 1970, 5 : 235.
- [13] Shimada Y., Obinata T. — J. Cell Biol., 1977, 72 : 777.
- [14] Purves R. D., Vrbova G. — J. Cell. Physiol., 1974, 84 : 97.
- [15] Nelson P. G. — Physiol. Rev., 1975, 55 : 1.
- [16] Lipton B. H. — Develop. Biol., 1977, 60 : 26.
- [17] De la Haba G., Kamali H. M., Tiede D. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72 : 2729.
- [18] White N. K., Bonner P. H., Nelson D. R., Hauschka S. D. — Develop. Biol., 1975, 44 : 346.
- [19] Yaffe D. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 61 : 477.
- [20] Bernstein S. J., Fyrberg E. A., Donady J. J. — J. Cell Biol., 1978, 78 : 856.
- [21] Turner D. C. — Differentiation, 1978, 10 : 81.
- [22] Fischbach G. D., Cohen S. A. — Develop. Biol., 1973, 31 : 147.
- [23] Holtzer H., Rubinstein N., Dienstman S., Chi J., Biehl J., Somlye A. — Biochemie, 1974, 56 : 1575.
- [24] Harary J., Masamitsu M. — Develop. Biol., 1978, 65 : 28.
- [25] Holtzer H., Strahs L., Biehl J., Somlye A., Ishikawa H. — Science, 1975, 188 : 943.
- [26] Croop J., Holtzer H. — J. Cell Biol., 1975, 65 : 271.
- [27] Konigsberg I. — Methods Enzym., 1979, 58 : 511.
- [28] Morris G. E., Cole R. J. — Develop. Biol., 1979, 69 : 146.
- [29] Richler C., Yaffe D. — Develop. Biol., 1970, 23 : 1.
- [30] Garrels J. I. — Develop. Biol., 1979, 73 : 134.
- [31] Podleski T. R., Nichols S., Ravdin P., Salpeter M. M. — Develop. Biol., 1979, 68 : 239.
- [32] Stallcup W. B., Cohn M. — Exper. Cell Res., 1976, 98 : 277.
- [33] Buckingham M. E., Cohen A., Gros F., Luzzati D., Charmot D., Dugeon G. — Biochemie, 1974, 56 : 154.
- [34] Kaufman S. J., Parks C. M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 3888.
- [35] Linkhart T., Clegg C., Hauschka S. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 25a.
- [36] Jacob H., Buckingham M., Cohen A., Dupont L., Fisman M., Jacob F. — Exper. Cell Res., 1978, 114 : 403.
- [37] Buckley P. A., Konigsberg I. R. — Develop. Biol., 1974, 37 : 186.
- [38] Yaffe D. — Exper. Cell Res., 1971, 66 : 33.
- [39] Рингерц Н., Сэвиджер Р. Гибридные клетки. М., Мир, 1979.
- [40] Loeffler C. A. — J. Morphol., 1970, 130 : 491.
- [41] Friedlander M., Beyer E. C., Fischman D. A. — Develop. Biol., 1978, 66 : 457.

- [42] O'Neil L. M., Strohmman R. C. — *Biochemistry*, 1970, 9 : 2832.
- [43] Cossu G., Grippo P., Molinaro M. — In: Proc. 7th Europ. conf. muscle and motility. Warsaw, 1978 : 118.
- [44] Block J. A., Atkinson B. G. — *Cell Differentiation*, 1979, 8 : 413.
- [45] Hahn G. M., King D., Yang S. J. — *Nature New Biol.*, 1971, 230 : 242.
- [46] Kobayashi N., Kaji A. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, 75 : 5501.
- [47] Dawkins R. L., Lamout M. — *Exper. Cell Res.*, 1971, 67 : 1.
- [48] Nag A. C., Toster J. D. — *J. Cell Biol.*, 1978, 79 : 322a.
- [49] Konigsberg J. R., Lipton B. H., Konigsberg I. R. — *Develop. Biol.*, 1975, 45 : 260.
- [50] Chamley J. H., Campbell G. R., Burnsbock G. — *J. Embryol., Exper. Morphol.*, 1974, 32 : 297.
- [51] Mark G. E., Strasser F. F. — *Exper. Cell Res.*, 1966, 44 : 217.
- [52] Abbott J., Schiltz D. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 479 : 1506.
- [53] Hayflick L. — *Exper. Cell Res.*, 1965, 37 : 614.
- [54] Fambraigh D., Rash J. E. — *Develop. Biol.*, 1971, 26 : 55.
- [55] Smilowitz H., Fischbach G. D. — *Develop. Biol.*, 1978, 66 : 539.
- [56] Grove B., Stockdale F. E. — *Develop. Biol.*, 1978, 66 : 142.
- [57] Zani B., Molinaro M., Battilomo T. — In: Proc. 7th Europ. conf. muscle and motility. Warsaw, 1978 : 73.
- [58] Furcht L. T., Mosher D. F., Wendelschater-Crabb G. — *Cell*, 1978, 13 : 263.
- [59] Pauw P. G., David J. D. — *Develop. Biol.*, 1979, 70 : 27.
- [60] Nowak T., Hayward P., Barandes S. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1976, 68 : 650.
- [61] Knudsen K. A., Horwitz A. F. — *Develop. Biol.*, 1978, 66 : 294.
- [62] Knudsen K. A., Horwitz A. F. — *Develop. Biol.*, 1977, 58 : 328.
- [63] Horwitz A. F., Wright A., Knudsen K. A. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86 : 514.
- [64] Kantor H. L., Prestegard J. H. — *Biochemistry*, 1975, 14 : 1790.
- [65] Yaffe D., Dym H. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37 : 543.
- [66] Shaiberg A., Yagil G., Yaffe D. — *Develop. Biol.*, 1971, 28 : 1.
- [67] Spector J., Prives J. V. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74 : 5166.
- [68] Linkhart T., Hauschka S. D. — *Develop. Biol.*, 1979, 69 : 529.
- [69] Morris G. E., Cooke A., Cole R. J. — *Exper. Cell Res.*, 1972, 74 : 582.
- [70] Turner D. C., Maier V., Eppenberger H. M. — *Develop. Biol.*, 1974, 37 : 63.
- [71] Tarikas H., Schubert D. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71 : 2377.
- [72] Kligman D. E., Nameroff M. — *J. Cell Biol.*, 1979, 79 : 37a.
- [73] Holtzer H., Sanger J. M., Ishikawa H., Strahs K. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1973, 37 : 549.
- [74] Zani B., Cossi G., Adamo S., Molinaro M. — *Differentiation*, 1978, 10 : 95.
- [75] Merlie J. P., Buckingham M. E., Whalen R. G. — *Curr. Topics Develop. Biol.*, 1979, 11 : 61.

- [76] Sorti R., Horowitz S. J., Seecof M. P., Rich A., Par-
due M. L. — Cell, 1978, 13 : 589.
- [77] Devlin R. B., Emerson C. P. — Cell, 1978, 13 : 599.
- [78] Carman I., Neuman S., Yaffe D. — Cell, 1978, 14 : 393.
- [79] Zalin R. — Develop. Biol., 1979, 71 : 274.
- [80] Wahrman J. P., Winand R., Luzzati D. — Nature
New Biol., 1973, 245 : 12.
- [81] Bonner P. H., Hauschka S. D. — Develop. Biol., 1974, 37 :
317.
- [82] Dienstman S. R., Biehl J., Holtzer S., Holtzer H. —
Develop. Biol., 1974, 39 : 83.
- [83] White N. K., Hauschka S. D. — Exper. Cell Res., 1971, 67 :
479.
- [84] Ahrens P. B., Solursh M., Reiter R. S., Sing-
ley C. T. — Develop. Biol., 1979, 69 : 436.
- [85] Hauschka S., Haney C. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 24a.
- [86] Hauschka S. D. — Develop. Biol., 1974, 37 : 345.
- [87] Bonner P. H. — Develop. Biol., 1978, 66 : 207.
- [88] Witkowski J. A., Durbidge M., Dubowitz V. —
In vitro, 1976, 12 : 98.
- [89] Parsons R. — Nature, 1974, 251 : 621.
- [90] Friedman B., Powell J. A. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 3254.
- [91] Shimada Y., Fischman A. — Develop. Biol., 1973, 31 : 200.
- [92] Lipton H. C. — Develop. Biol., 1977, 61 : 153.
- [93] Фридлянская И. И. Изучение процессов цитодифференцировки
в однослойных культурах мюгенных опухолевых клеток. Автореф. дис.
Л., 1970.
- [94] Devlin R. D., Emerson C. P. — Develop. Biol., 1979, 69 : 202.
- [95] Fyrborg E. A., Donady J. J. — J. Cell Biol., 1978, 79 : 33a.
- [96] Allen R. E., Stromer M. H., Goll D. E., Robson R. M. —
Develop. Biol., 1979, 69 : 655.
- [97] Loomis N. F., Wahrman J. P., Luzzati D. — Proc.
Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 425.
- [98] Somers D. G., Pearson M. L., Ingles C. Y. — J. Biol.
Chem., 1975, 250 : 4825.
- [99] Van der Westhuyzen D. R. — Develop. Biol., 1979, 68 : 280.
- [100] Rogers J., Coulter M., Ng S. K., Sanwall B. D. —
Somatic Cell Genetics, 1978, 4 : 573.
- [101] Ringertz N. R., Kron Dahl U., Coleman J. R. — Exper.
Cell Res., 1978, 113 : 233.
- [102] Linder S., Brzeski H., Ringertz N. R. — Exper. Cell
Res., 1979, 120 : 1.

Л. Д. Л И О З Н Е Р

РЕГЕНЕРАЦИЯ МЫШЦ

Институт морфологии человека АМН СССР, Москва

Способность мышц к регенерации была известна очень давно, по крайней мере с конца XIX в., когда стали систематически изучать регенерационные процессы. Восстановление мышц обнаружили как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных. Изучали, с одной стороны, регенерацию мышц как составной части органов, например целой конечности или целого хвоста у позвоночных, кожно-мышечного мешка у беспозвоночных, а, с другой стороны, регенерацию мышц как самостоятельных органов, например мышц бедра у аксолотля.

Восстановление мышц было обнаружено почти у всех животных за исключением тех, которые были признаны лишенными способности к регенерации органов. Согласно биологическому учению о регенерации, регенерационная способность постепенно уменьшается по мере повышения организации животных и почти полностью исчезает у птиц и млекопитающих, которые не способны будто бы к регенерации органов. Эта концепция распространялась и на мышцы млекопитающих, т. е. считалось, что повреждение мышц приводит лишь к образованию рубца, настоящей регенерации мышц у млекопитающих не происходит. Хотя отдельные ученые [1] и возражали против этой концепции, выступления их не имели успеха, традиционное мнение держалось очень крепко. Впервые, пожалуй, поколебал его канадский исследователь Ле Гро Кларк [2]. Он перевязывал кровеносный сосуд, питающий переднюю большеберцовую мышцу кролика, и наблюдал регенерацию мышцы после ее разрушения, вызванного отсутствием кровоснабжения. Однако эта работа не произвела решительного поворота во взглядах. Последнее объясняется, с моей точки зрения, тем, что автор применил метод повреждения мышцы путем перевязки сосуда, а не путем перерезки мышечных волокон. Между тем регенерацию, вызываемую воздействием патологических факторов (включая ишемию), издавна относят к явлениям, изучаемым патологами, но не биологами, а регенерация патологически измененных органов не имела прав гражданства в биологии. Поэтому биологи слабо реагировали на данную работу, хотя она представлялась убедительной. Кроме того, Ле Гро Кларк не совсем

четко высказывался о способе регенерации, т. е. о происхождении клеток, дающих начало регенерирующей мышце.

Подлинный сдвиг в представлениях о способности мышц к регенерации произошел лишь после появления работ А. Н. Студитского и его сотр. [3—7]. Убедительность их опытов определялась рядом моментов, и прежде всего наглядностью. Поскольку авторы производили перерезку мышц и перерезанные концы отстояли далеко друг от друга, можно было даже на тотальных препаратах убедиться, что произошла регенерация, и достаточно было простого гистологического контроля, чтобы выяснить, что произошла регенерация именно мышц, а не просто разрастание соединительной ткани. Решение было довольно простым, так как существовали только эти две возможности.

Опыты А. Н. Студитского и сотр. были проведены на очень удачных объектах: молодых петушках и крысах. И те и другие отличаются высокой регенерационной способностью мышц, что явилось очень благоприятным обстоятельством. Авторы показали, что регенерируют мышцы всех исследованных видов млекопитающих и птиц. Было установлено, что регенерация мышц наблюдается у крыс, морских свинок, кроликов и собак, т. е. у всех лабораторных видов млекопитающих. Степень регенерации в отдельных случаях оказалась неодинаковой. Регенерация далеко не всегда была полной в том смысле, что не восстанавливалась типичная структура мышцы. Нередко в мышце преобладала соединительная ткань, или структура вновь образовавшихся мышечных волокон была неправильной [5]. А. Н. Студитский и его сотр. установили ряд условий, необходимых для регенерации мышц [6]. Необходимо натяжение, т. е. определенное состояние опорных структур мышцы. Перерезка сухожилия, естественно, ведет к утрате нормального состояния мышцы. Необходима также нервная связь. В условиях денервации осуществляются лишь первые стадии регенерации мышцы, окончательная дифференцировка оказывается невозможной. Перерезка мышцы приводит к ослаблению ее функции. Но эта функция восстанавливается, хотя и не так скоро. Так, полное восстановление икроножной мышцы крысы наблюдали через 4 мес. К этому времени восстанавливалась и ее функция [7].

А. Н. Студитский считал, что регенерация мышц происходит за счет отщепления миобластов от поврежденного мышечного волокна [3, 8]. Миобласты, объединяясь после периода усиленного размножения, образуют миотубы, симпласты. На стадии миосимпластов размножение миобластов прекращается. Миотубы в результате роста превращаются в мышечные волокна и приобретают окончательное дифференцированное строение. Такой представлялась картина регенерации скелетных мышц в 50-х годах. Многие советские исследователи начали ставить опыты по регенерации мышц и, как правило, успешно. То, что раньше никак не удавалось получить, теперь стало ежедневным опытом. Иссле-

дования по регенерации мышц проводили Г. М. Литвер и его соотр. [9—11], Л. Н. Жинкин [12, 13], соотр. Г. С. Стрелина [14—16], Е. Я. Корытный [17], Е. В. Дмитриева [18] и др. За рубежом исследования по регенерации мышц у млекопитающих также проводились, хотя и в меньшем объеме [19—21]. Разногласия между авторами заключались главным образом в понимании способа происхождения мышц. Если А. Н. Студитский признавал образование мышц только за счет миобластов, отщепляющихся от мышечных волокон, то большинство других авторов отстаивали способ образования мышц за счет симпластов и наплывов цитоплазмы на концах мышечных волокон, содержащих много ядер. Л. Н. Жинкин [13] не придавал принципиального значения разногласиям по этому вопросу, полагая, что у молодых животных больше развит миобластический способ регенерации мышц, а у более взрослых животных — миосимпластический.

С конца 50-х годов преобладающим методом изучения регенерации мышц становится трансплантация. Свободная пересадка мышц считалась еще более невозможной, чем регенерация мышц у млекопитающих. Считалось, что мышцы очень чувствительны к гипоксии, поэтому мышца, будучи пересаженной не на сосудистой ножке, неизбежно погибает. Оказалось, однако, что это не совсем так. Опыт свободной пересадки мышц был впервые проведен А. Н. Студитским [6.] Автор удалил икроножную мышцу крысы, измельчил ее ножницами на кусочки размером примерно 1 мм³ и пересадил на прежнее место. Измельченную массу мышцы А. Н. Студитский называл в дальнейшем мышечным фаршем. Оказалось, что такой мышечный фарш приживляется. Однако возникновение на месте пересадки целой мышцы — это не просто приживание аутопластически пересаженной ткани, но в значительной мере и регенерация. Гистологическое исследование показывает, что огромная масса пересаженных мышечных фрагментов погибает. В большей степени гибнут центрально расположенные фрагменты, лишенные васкуляризации, так как сосуды проникают в мышечную массу, конечно, с периферии. Но и периферические мышечные волокна претерпевают в конечном счете разрушение, и сохраняются лишь регенерирующие мышцы. А. Н. Студитский считал, что процесс идет так же, как при перерезке мышцы или удалении ее участка: образуются миобласты, они делятся, сливаются в миотубы, из которых образуются мышечные волокна. Мышца сначала имеет небольшие размеры, но в дальнейшем размеры ее увеличиваются в результате усиленного функционирования.

Опыты А. Н. Студитского были встречены с большим недоверием. Некоторые исследователи в Советском Союзе и за рубежом повторили их, но не смогли подтвердить [10, 22]. Пересаженные мышцы полностью разрушались. Однако с течением времени все больше исследователей стало получать результаты, аналогичные тем, которые получил А. Н. Студитский. Особенности

значение имело подтверждение его данных американским исследователем Карлсоном [23], который обучался методике пересадки измельченных мышц в лаборатории А. Н. Студитского и поставил большое количество такого рода опытов с детальным их анализом. Другие исследователи [24] также получали мышцы из пересаженной мышечной кашицы. Этот прием получил довольно большое распространение как метод изучения регенерации мышц. В дальнейшем выяснилось, что возможно и приживление пересаженных мышц, хотя при этом часть пересаженных мышечных волокон приживляется, а часть разрушается и регенерирует. Можно пересаживать и целые мышцы, не разделенные на фрагменты [25, 26]. Регенерационная способность пересаженных мышц может быть усилена рядом методов, в частности предварительной депервацией пересаженной мышцы, а также нанесением ей дополнительных разрезов. А. Н. Студитский объясняет усиление регенерационной способности денервированной или травмированной мышцы тем, что в ней повышается пластическая активность [27].

В целом данные, полученные при резекции и удалении части мышц, а также при их пересадке, указывают на высокую регенерационную способность мышц млекопитающих. Она неодинакова у разных видов. Очень высокая регенерационная способность мышц у крыс. Г. М. Литвер и соотр. [11] показали, что можно удалить мышцу почти целиком, оставив на сухожилиях небольшие кусочки мышечной ткани, и после этого регенерирует целая мышца. Хуже оказалась регенерационная способность мышц у морских свинок и собак, у которых регенерируют лишь небольшие участки, и при регенерации мышцы оказываются содержащими большое количество соединительной ткани. Строение мышцы часто нарушено, отличается от исходного. Можно думать, что снижение регенерационной способности у морских свинок связано со слабым обменом веществ у них. Когда стимулировали у морских свинок обмен веществ, вводя им гормон щитовидной железы, регенерационная способность мышц значительно повышалась [28]. У собак А. Н. Студитский и его соотр. [5] также получали лучшие результаты, применяя различные методы, усиливающие регенерацию.

Можно думать, что всем млекопитающим в той или иной степени свойственна регенерация мышц, равно как и то, что все мышцы способны к свободной трансплантации. Данные по регенерации и пересадке мышц начали использовать в клинических условиях на больных. Пересадки мышц применяют, в частности, для лечения последствий паралича мышц. При этом усиливается способность мышцы приживляться и регенерировать. Пока, однако, опыт применения мышц в пластических операциях такого рода невелик [29 — 32].

Другим примером регенерации является восстановление мышцы, поврежденной фармакологическими воздействиями [24, 26]. В последнее время такого рода опыты получили широкое

распространение. Например, введение в мышцу маркаина вызывает разрушение ее волокон [33]. При определенной дозе этого наркотика, особенно если к нему добавляют гиалуронидазу, разрушение мышцы оказывается практически полным. Несмотря на это, в течение сравнительно короткого времени наступает регенерация мышцы. Регенерация оказывается более полной, чем при удалении части мышцы, и, хотя восстановление идет более быстро, оно оказывается более правильным: регенерирующая мышца содержит меньшее количество соединительной ткани.

Чувствительность отдельных мышц к маркаину неодинакова. Например, для длинного разгибателя пальцев у крыс маркаин не приводит к полному разрушению всех мышечных волокон и для достижения последнего используют еще дополнительную пересадку. В результате наблюдается интенсивная регенерация мышечных волокон, хотя мышца долго не достигает исходного веса. При этом исследовали ряд ферментов, чтобы получить представление о типе метаболизма мышцы. Оказалось, что при регенерации мышцы уже в течение первых дней начинает резко возрастать активность глюкозо-6-дегидрогеназы и гексокиназы. В относительно более поздние сроки резко возрастает активность креатинкиназы и аденилаткиназы [34]. Авторы считают, что метаболизм регенерирующих мышц резко отличается от обмена веществ мышц при эмбриональном развитии. Они приходят к выводу, что регенерирующие мышцы интенсифицируют пентозофосфатный путь метаболизма и усиленно используют глюкозу.

Структура регенерировавших мышц разных животных не отличается существенно от структуры интактных мышц, хотя некоторые отклонения в их строении все же отмечены. Это касается, в частности, соединительной ткани и ориентации мышечных волокон. Сравнение васкуляризации интактных и регенерировавших мышц также не выявило существенных различий, хотя и в этом случае отклонения в распределении сосудов определенно наблюдались. В регенерировавших мышцах были обнаружены нервные окончания. Р. П. Женева [35] указывает, что в пересаженных и затем регенерировавших мышцах отсутствуют всегда проприоцепторы и поэтому регенерирующие из измельченной и пересаженной мышечной ткани мышцы не достигают веса интактных мышц у контрольных животных.

Вопрос о том, какая часть нервной системы играет определяющую роль при регенерации, решался рядом исследователей, причем для разных органов по-разному. Так, в отношении регенерации конечности у хвостатых амфибий давно было установлено, что этот процесс зависит от нервной системы. Перерезка плечевого или поясничного сплетения не давала осуществиться регенерации конечности. Длительное время существовали разногласия в отношении того, какой раздел нервной системы ответствен за обеспечение регенерации. Наконец, американский исследователь Сингер [36] твердо установил, что зависимость регенерации конеч-

ности от наличия нервной системы не качественная, а количественная. Достаточно, чтобы на раневой поверхности было известное количество нервных волокон — безразлично, двигательных, чувствительных или симпатических — и регенерация будет протекать. Он даже считает, что отсутствие регенерации конечности (например, у лягушек) связано с недостаточным количеством нервной ткани на раневой поверхности. Приводя седалищный нерв из задней конечности лягушек в переднюю, Сингер получал регенерацию последней, правда, не совсем совершенную [37]. Несколько иначе, видимо, обстоит дело с зависимостью от нервной системы регенерации отдельных мышц. Р. П. Женевская [35] считает, что основное значение имеют двигательные эфферентные нервные волокна, тогда как в отсутствие чувствительной нервной системы регенерация мышц происходит.

Большой интерес представляет вопрос о том, за счет каких клеточных элементов происходит регенерация скелетных мышц. К сожалению, ответить на этот важный вопрос точно не удастся. Можно изложить только существующие по этому вопросу точки зрения. Хотя строение и развитие мышц изучается довольно интенсивно и давно, все же многое в этих вопросах остается еще неясным. В частности, невыясненным остается до сих пор вопрос о том, свойственна ли скелетным мышцам физиологическая регенерация, т. е. подвергаются ли они клеточному обновлению. Больше всего было приведено данных в пользу того, что с течением времени часть мышечных волокон погибает, а новые возникают путем расщепления старых мышечных волокон. Однако общего признания эта точка зрения не получила. Поэтому наиболее вероятным является представление, что обновление мышц носит лишь внутриклеточный характер, а возможно, что и молекулярный, который свойствен всем живым организмам.

В связи с неясностью этого важного вопроса неясным остается и способ регенерации после повреждения мышц. Часть авторов настаивает на миобластическом способе регенерации скелетных мышц. Например, А. Н. Студитский полагает, что от мышечного волокна отделяются фрагменты его в виде ядра с небольшим участком цитоплазмы. Фигуры, напоминающие этот процесс, можно найти при всякой регенерации мышц, но реальность этого процесса остается проблематичной. Ряд авторов считает очень маловероятной возможность выживания ядер с участком цитоплазмы, отделившихся от мышечных волокон. Однако сторонники этой теории существуют как в Советском Союзе [38], так и за рубежом [39, 40].

Большое распространение получила в последнее время теория клеток-сателлитов. Клетки-сателлиты были открыты в 1961 г. Мауро [41] в мышцах лягушки, а затем они были найдены и в мышцах млекопитающих и других животных. Эти клетки представляют собой как бы резервные клеточные элементы, вкрапленные в зрелые мышечные волокна. Они лежат под базальной мембра-

ной мышечного волокна, но отделены от его остального содержимого. Эти клетки одноядерны и не содержат фибрилл. При повреждении мышцы они отделяются от мышечного волокна и превращаются в мнобласты. Они делятся и сливаются, образуя мнотубы и мышечные волокна. Существование клеток-сателлитов не вызывает сомнений. Они хорошо идентифицируются под электронным микроскопом. Подсчитано их число у разных животных и в разных мышцах. Показано увеличение их числа при повреждении мышц, т. е. их способность делиться, что подтверждено методом введения в организм меченого тимидина и получения меченых клеток-сателлитов.

В некоторых исследованиях выделяли из мышцы отдельные волокна и наблюдали за их поведением в культуре ткани [42]. Из такого изолированного мышечного волокна выделялись клетки-сателлиты, которые одни только и сохраняли жизнеспособность, тогда как остальная часть волокна погибала. Метились только клетки-сателлиты, метки в ядрах мышечного волокна не обнаруживались. Однако сторонники теории мнобластов также продолжают отстаивать свои позиции, утверждая, что клетки-сателлиты, существование которых они не отрицают, представляют собой возникающий, т. е. отделяющийся от мышцы, мнобласт, его раннюю стадию. Они отрицают резервный характер клетки-сателлита, указывая при этом на то, что число клеток-сателлитов может увеличиваться при ряде условий, например после денервации. Однако известно, что клетки-сателлиты способны делиться при нарушении их нормального состояния. Хотя клетки-сателлиты открыты уже около 20 лет назад, до сих пор вопрос о способе регенерации мышц не может считаться окончательно разрешенным. Это поражает, если учесть, какое большое число работ проводится по регенерации мышц.

Вопрос о регенерации гладких мышц разработан гораздо слабее, чем вопрос о регенерации скелетной мускулатуры, но и в отношении гладких мышц также длительное время существовало мнение, что они не способны к регенерации, и всякое повреждение гладкой мускулатуры заживает рубцом. Это мнение в зарубежной литературе имеет очень сильные позиции до сих пор, что отражено в современных учебниках гистологии [43] и патологической анатомии [44]. Таким образом, и гистологи, и патологи отрицали способность гладких мышц к регенерации. Тем не менее совершенно ясно, что гладкие мышцы млекопитающих обладают высокой регенерационной способностью. Это показано в отношении мышц стенки кишечника и желудка, мочеочника и мочевого пузыря, кровеносных сосудов и матки [45, 46]. Например, вырезали участки средней оболочки кишечника и при этом наблюдали регенерацию с восстановлением нормальной структуры меди. Такой же результат получали при раздавливании кусочков мышечной оболочки кишечника. Мочевой пузырь удаляли целиком у кроликов и собак, помещая вместо него пластмассовый протез. В этих условиях

образовался новый мочево́й пузырь, в стенке которого развивались мышцы, так что он хорошо функционировал.

Имеются данные о регенерации мышечной стенки сосудов в условиях сохранения непрерывности тока крови. Наконец, о способности матки к регенерации свидетельствует хотя бы тот факт, что у женщин, даже неоднократно перенесших кесарево сечение, отсутствуют рубцы матки.

О способности гладких мышц к вторичному развитию, хотя и не совсем к регенерации, говорит то обстоятельство, что они способны к гипертрофии. Это явление хорошо известно на примере матки, которая резко увеличивается при беременности. То же явление известно и в отношении других гладких мышц. Так, усиленное развитие мышц наблюдается в опытах резекции желудка, что было прослежено и в нашей лаборатории [47]. После удаления дна желудка у крыс отмечается сильное утолщение мышечной оболочки. Мышечная оболочка утолщается в кровеносных сосудах — как в артериях, так и в венах — при усиленной функциональной нагрузке, т. е. при перевязке их, когда создаются затруднения току крови [46]. Исследование способа, посредством которого происходит регенерация или гипертрофия гладких мышц, показало, что обычно им является митотическое деление гладкомышечных клеток. Например, при изучении регенерации мышц кишечника морских свинок [45] на 3-и сут после раздавливания мышц было найдено 1.5% митозов, а через 5 сут — 2.3—2.6%. В тот же период, когда регенерационные процессы идут особенно интенсивно, в опытах с введением меченого тимидина было обнаружено до 17% меченых гладкомышечных клеток.

Сложнее вопрос о регенерации сердечной мышцы. Длительное время существовало представление, что мышца сердца не способна к регенерации. Это мнение сохранилось и после того, как была выявлена способность к регенерации скелетных и гладких мышц. Несмотря на появление отдельных работ, в которых утверждалось, что регенерация миокарда возможна, все же большинство исследователей придерживались взгляда, что сердечная мышца не регенерирует. Опыты, в которых получали регенерацию сердечной мышцы, не воспроизводились. Однако в последнее время вопрос несколько сдвинулся с мертвой точки. Известное значение в этом отношении имело новое понимание явлений регенерации [48]. При изучении реакции на повреждение внутренних органов млекопитающих выяснилось, что им свойственна особая форма регенерации — регенерационная гипертрофия. Она выражается в том, что масса органа восстанавливается, тогда как форма его остается нарушенной. Восстанавливается при этом и функция органа, так как для внутренних органов паренхиматозного типа безразлично, какова будет их форма. Примером такой регенерации может служить печень. При удалении большей части печени крыс происходит быстрая ее регенерация. Масса печени восстанавливается в течение нескольких недель, тогда как отрезанные доли вновь не

отрастают. Восстановление печени происходит за счет двух явлений: интенсивного деления клеток и их гипертрофии. Таким образом, клеточная гипертрофия является одним из процессов регенерации наряду с клеточным делением.

Когда с этих позиций посмотрели, что происходит при инфаркте миокарда (когда страдает значительная масса мышцы), то выяснилось, что сердце реагирует на повреждение миокарда как целое, т. е. происходит как бы его регенерационная гипертрофия. Другими словами, после инфаркта не только возникает рубец в месте повреждения, но и происходит увеличение мышечной массы, мышца сердца гипертрофируется [48, 49]. Обнаружено, кроме того, что после экспериментального инфаркта имеется и пролиферативная реакция в миокарде, но только она проявляется в основном в предсердиях и преимущественно в ушках их [50, 51]. П. П. Румянцев показал, что большинство клеток предсердий содержит метку при длительном введении меченого тимидина и многие клетки испытывают митотическое деление. В связи с тем, что опыты П. П. Румянцева встречали возражения, в моей лаборатории В. Ф. Сидорова и Г. Б. Большакова [52, 53] повторили и полностью подтвердили их. Оказалось, что, помимо гипертрофии мышечных волокон, при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс действительно происходят и клеточные деления, и синтез ДНК, предшествующий, как известно, митозу. Авторы [52, 53] ограничились подсчетом митозов в различных отделах сердца. Было обнаружено известное количество митозов, выражавшееся в долях процента, но тем не менее устойчивое, в левом и правом желудочках, и особенно много в предсердиях и их ушках. Таким образом, несомненно способность миокарда к регенерации, выражающаяся как в гипертрофии сохранившихся мышечных волокон, так и в клеточном делении, вернее, делении ядер, так как отмечали собственно митоз и не всегда прослеживали цитотомиию. Характерно во всяком случае, что сердце реагировало иначе, чем скелетная мускулатура, а именно как целое.

Таким образом, можно прийти к выводу, что мышцы птиц и млекопитающих обладают высокой регенерационной способностью. Особенно это касается скелетных и гладких мышц. Однако и сердечная мышца способна к регенерации, только способ ее восстановления иной, чем у скелетной мускулатуры. Регенерация происходит как при резекции, так и при патологическом поражении органов. Степень регенерации может быть различной в зависимости от вида животных, их возраста, кровоснабжения и иннервации органа и др. Регенерация нередко оказывается неполной, поэтому очень важно создать условия для проявления максимальной регенерационной способности, которая может привести к полноценному восстановлению мускулатуры.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bier A. — *Deutsch. med. Wochschr.*, 1917, 40 : 1249.
- [2] Le Gros Clark W. E. — *J. Anat.*, 1946, 80 : 24.
- [3] Студитский А. Н. — *ДАН СССР*, 1949, 64 : 391.
- [4] Студитский А. Н. — *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, 1952, 29 : 27.
- [5] Студитский А. Н., Стриганова А. Р. Восстановительные процессы в скелетной мускулатуре. М., Изд-во АН СССР, 1951.
- [6] Студитский А. Н. — В кн.: Вопросы восстановления органов и тканей позвоночных животных. М., Изд-во АН СССР, 1954 : 225.
- [7] Стриганова А. Р. — Там же: 322.
- [8] Студитский А. Н. Экспериментальная хирургия мышц. Изд-во АН СССР, М., 1959.
- [9] Литвер Г. М. — *Учен. зап. I Ленингр. мед. ин-та*, 1955, 2 : 12.
- [10] Литвер Г. М., Дампель Н. Н. — *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, 1959, 37 : 54.
- [11] Литвер Г. М., Дампель Н. Н., Симельсон И. В., Косткин В. Г. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1961, 51 : 101.
- [12] Жинкин Л. Н. — *ДАН СССР*, 1945, 48 : 706.
- [13] Жинкин Л. Н. — *ДАН СССР*, 1948, 63 : 205.
- [14] Козлова Н. В. — *ДАН СССР*, 1959, 127 : 1121.
- [15] Тужилкова Т. Н. — *Мед. радиол.*, 1956, 1 : 14.
- [16] Тужилкова Т. Н. — Реакция мышцы на действие понизирующей радиации. Автореф. дис. М., 1969.
- [17] Корытный Е. Я. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1953, 35 : 42.
- [18] Дмитриева Е. В. — *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, 1960, 39 : 11.
- [19] Betz H. C. — *R. Soc. Biol.*, 1948, 142 : 1117.
- [20] Godman G. C. — *Exper. Cell Res.*, 1955, 8 : 488.
- [21] Godman G. C. — *J. Morphol.*, 1957, 100 : 27.
- [22] Klika E., Doskocil M. — *Ceskoslov. Morphol.*, 1956, 4 : 1.
- [23] Carlson B. M. *The regeneration of minced muscles*. Basel, Karger, 1972.
- [24] Hall-Kragg E. C. V. — *Exper. Neurol.*, 1974, 43 : 349.
- [25] Босова Н. Н. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1962, 53 : 88.
- [26] Carlson B. M., Gutman E. — *Exper. Neurol.*, 1976, 53 : 82.
- [27] Студитский А. Н. Трансплантация мышц у животных. М., Медицина, 1977.
- [28] Румянцева О. Н. Пластические свойства скелетно-мышечной ткани. М., Наука, 1960.
- [29] Thompson N. — *Plast. Reconstr. Surg.*, 1971, 48 : 11.
- [30] Thompson N. — *Clinics in Plast. Surg.*, 1974, 1 : 349.
- [31] Hakelius L. — *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 1974, 8 : 220.
- [32] Hakelius L. — *Acta chir. scand.*, 1975, 141 : 69.
- [33] Jirmanova J., Thesleff S. — *Z. Zellforsch.*, 1972, 131 : 77.
- [34] Wagner K. R., Carlson B. M., Max J. R. — *J. Neurol. Sci.*, 1977, 34 : 373.
- [35] Женевская Р. П. Нервно-трофическая регуляция пластической активности мышечной ткани. М., Наука, 1974.
- [36] Singer M. — In: *Regeneration in vertebrates*. Chicago, Univ. Press. 1959 : 59.
- [37] Singer M. — *J. Exper. Zool.* 1965, 126 : 419.
- [38] Студитский А. Н., Игнатьева З. П. Восстановление мышц у высших позвоночных. М., Изд-во АН СССР, 1961.
- [39] Mauro A., Shafiq S. A., Milhorat A. T. *Regeneration of Striated Muscles and Myogenesis*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1970.
- [40] Mufti S. A., Carlson B. M., Maxwell L., Faulkner J. A. — *Anat. Rec.*, 1977, 188 : 417.
- [41] Mauro A. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 9 : 493.

- [42] Bischoff R. — Anat. Rec., 1975, 182 : 215.
- [43] Bloom W., Fawcett H. W. A textbook of histology. New York, John Wiley, 1969.
- [44] Florey H. W. General pathology. London, Acad. Press, 1970.
- [45] MacGeechie S. K. Smooth muscle regeneration. A review and experimental study. Basel, Karger, 1975.
- [46] Кауфман О. Я. Гипертрофия и регенерация гладких мышц. М., Наука, 1979.
- [47] Тимашкевич Т. Б. Пути и механизмы регенерации пищеварительного тракта у позвоночных. М., Наука, 1978.
- [48] Саркисов Д. С. Регенерация и ее клиническое значение. М., Медицина, 1970.
- [49] Митип К. О. Электронномикроскопический анализ изменений сердца при инфаркте. М., Медицина, 1974.
- [50] Румянцев П. П., Миракян В. О. — Цитология, 1968, 10 : 1276.
- [51] Румянцев П. П. — В кн.: Проблемы регенерации миокарда (состояние и перспективы изучения). Ярославль, 1977 : 71.
- [52] Сидорова В. Ф., Большакова Г. Б. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1976, 82 : 998.
- [53] Большакова Г. Б. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1977, 83 : 610.

Ю. Б. ВАХТИИ, И. Н. ШВЕМБЕРГЕР

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ МИОБЛАСТЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Лаборатория генетики клеточных популяций,
Институт цитологии АН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественная трансформация клеток, каковы бы ни были ее причины, приводит к резкому повышению их изменчивости, причем изменения затрагивают и морфологические, и физиологические, и биохимические признаки клеток. В некоторых случаях они носят характер ретроидифференцировки, придавая клеткам черты сходства с эмбриональными, однако большей частью случайные изменения нарушают различные звенья морфогенетических, физиологических и биохимических процессов, и клетки претерпевают дисдифференцировку. Возникающие в результате наследственные варианты («мутанты») могут быть размножены до любой численности, что дает возможность исследователям анализировать и такие формы изменчивости, которые не наблюдаются ни в норме, ни при патологических состояниях организма.

Описанный выше подход в последние годы плодотворно используется для расшифровки механизмов биохимической дифференцировки, ультраструктурной организации и физиологической активности нейронов, однако до сих пор не нашел широкого применения при изучении миогенеза. Вместе с тем, как будет показано ниже, злокачественные миобласты скелетных мышц, формирующие рабдомиосаркомы, представляют собой весьма удобный материал для анализа многих вопросов биохимии, структурной организации и физиологии скелетных мышц.

Злокачественные опухоли скелетных мышц по их происхождению можно подразделить на спонтанные, индуцированные и образующиеся в результате прививки миобластов, трансформировавшихся (малигнизовавшихся) при культивировании вне организма [1]. Частота спонтанного возникновения рабдомиосарком у человека и животных низка, линии лабораторных животных с наследственно повышенной частотой спонтанного развития опухолей скелетных мышц до сих пор не созданы, а потому использование спонтанных рабдомиосарком для заранее запланированных экспериментов чрезвычайно затруднено.

Индукция рабдомиосарком у мышей, крыс и других лабораторных животных может быть осуществлена внутримышечным

введением 20-метилхолантрена, солей никеля и других канцерогенов, а у мышей — и заражением вирусом Молони [1]. Опухоли, как правило, достигают макроскопических размеров (1—1.5 см в поперечнике) у мышей через 1—3 мес после введения канцерогена, у крыс — через 3—6 мес. Опухолевая ткань часто перемежается участками дегенерирующей и регенерирующей мышечной ткани. Опухолевые миобласты можно освободить от примеси нормальных миобластов путем подкожной или внутрибрюшинной перевивки кусочков первичных рабдомиосарком животным той же линии или беспородным животным. Таким путем получают перевивные рабдомиосаркомы, в которых не содержится примеси нормальных миобластов (так как последние не входят в состав нормальных клеток стромы опухоли). Свободны от примесей нормальных миобластов и рабдомиосаркомы, получаемые путем прививки малигнизированных *in vitro* однослойных культур.

В ходе последовательных трансплантаций рабдомиосаркомы претерпевают закономерные изменения, связанные с процессом прогрессии опухолей [2]. По окончании этих изменений свойства их стабилизируются — они становятся перевиваемыми штаммами рабдомиосарком. В лабораторных исследованиях используют перевивную рабдомиосаркому Р-1 [3], перевивную рабдомиосаркому РА-2 крыс [4], перевивные рабдомиосаркомы мышей [4, 5], перевивную рабдомиосаркому МОП кроликов [6] и ряд других.

Рабдомиосаркомам свойственны все основные свойства злокачественных опухолей — инвазивный и деструктивный рост, ослабление и нарушение процессов дифференцировки, нечувствительность к регуляторным воздействиям организма-опухоленосителя, вследствие чего они приводят организм к гибели [7, 8]. Подобно опухолям иного гистогенеза, рабдомиосаркомы представляют собой популяции опухолевых клеток — популяции злокачественных миобластов скелетных мышц.

Хотя термин «популяция» применительно к опухолевым клеткам строго не определен, его использование предполагает, что опухоль представляет собой систему клеток, способных к изменчивости, пролиферации и конкуренции друг с другом. Поскольку опухолевым клеткам, как и соматическим клеткам нормальных тканей организма, не свойствен обмен наследственной информацией, популяции опухолевых клеток представляют собой систему клонов — потомств отдельных клеток, что заставляет относить их к типу менделевских (термин Добжанского) популяций [9].

КИНЕТИКА РОСТА

Клеточный цикл в рабдомиосаркомах и кинетика их роста подробно изучены лишь у рабдомиосаркомы Р-1 крыс [3]. У этих перевивных рабдомиосарком при объеме опухолей 0.3 см³ пролиферативный пул составляет около 30%, причем он одинаков как в центре, так и на периферии опухолевых узлов. Среднее время

удвоения числа клеток варьирует в широких пределах — от 60 до 140 ч, причем для большинства клеток продолжительность S-периода составляет 9—10 ч, а продолжительность всего митотического цикла — 18.5—25 ч. Гибель опухолевых клеток происходит на всех этапах роста опухоли — при объеме 0.3 см³ фактор потерь клеток составляет 34%, при объеме 1.5 см³ он повышается до 62%.

По способности пролиферировать в рабдомиосаркомах можно выделить три типа клеток: 1) клетки, утратившие способность делиться (в результате повреждения, дифференцировки и т. п.); 2) клетки, обладающие ограниченной способностью к пролиферации (пережив 3—6 циклов деления, все потомство таких клеток погибает); 3) клетки, обладающие неограниченной способностью к пролиферации. Последние клетки получили название клоногенных, так как в условиях *in vitro* и *in vivo* от них можно получить клоны, способные к неограниченному разрастанию [10]. Клоногенные (или стволовые) клетки воспроизводят все остальные типы клеток и играют решающую роль в процессах роста и метастазирования рабдомиосарком.

У рабдомиосаркомы Р-1 крыс в условиях *in vitro* 35% клеток являлись клоногенными [3]. У первичных рабдомиосарком, индуцированных 20-метилхолантеном мышей и крыс, при клонировании *in vivo* [11] в легких привитых животных макроскопические клоны формируют 10⁻⁷—10⁻⁴ внутривенно введенных клеток. Столь низкая прививаемость обусловлена, очевидно, тем, что далеко не все клоногенные клетки рабдомиосаркомы способны имплантироваться и пролиферировать в легочной ткани; у перививных рабдомиосарком МХ-53 мышей и РА-2 крыс с повышенным путем искусственного отбора аффинитетом клеток к легочной ткани выявляется значительно большая доля клоногенных клеток — 10⁻³ и 10⁻¹ соответственно [4]. Клоногенные клетки рабдомиосарком гетерогенны по многим показателям (см. ниже), в том числе по кинетике роста. Например, клоны рабдомиосаркомы МХ-53 в легких по 25-е сут варьировали на весу от 1 до 41 мг [12], а клоны рабдомиосаркомы РА-2 на 19-е сут роста — от 0.5 до 88—150 мг [13]. Таким образом, показатели кинетики роста рабдомиосарком являются среднестатистическими показателями, которые нельзя переносить на отдельные клоногенные клетки и их потомства.

КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

И цитогенетическими методами, и путем цитофотометрического определения содержания ДНК в интерфазных ядрах показана широкая вариабельность клеток рабдомиосарком по числу хромосом [9]. Например, среднее содержание ДНК в интерфазных ядрах 50 клонов МХ-53, растущих в легочной ткани мыши, варьировало от 41.1 ± 2.9 до 72.8 ± 9.0 отн. ед., или от 4.2 до 7.2 С. Содержание ДНК в интерфазных ядрах рабдомиосаркомы МХ-53,

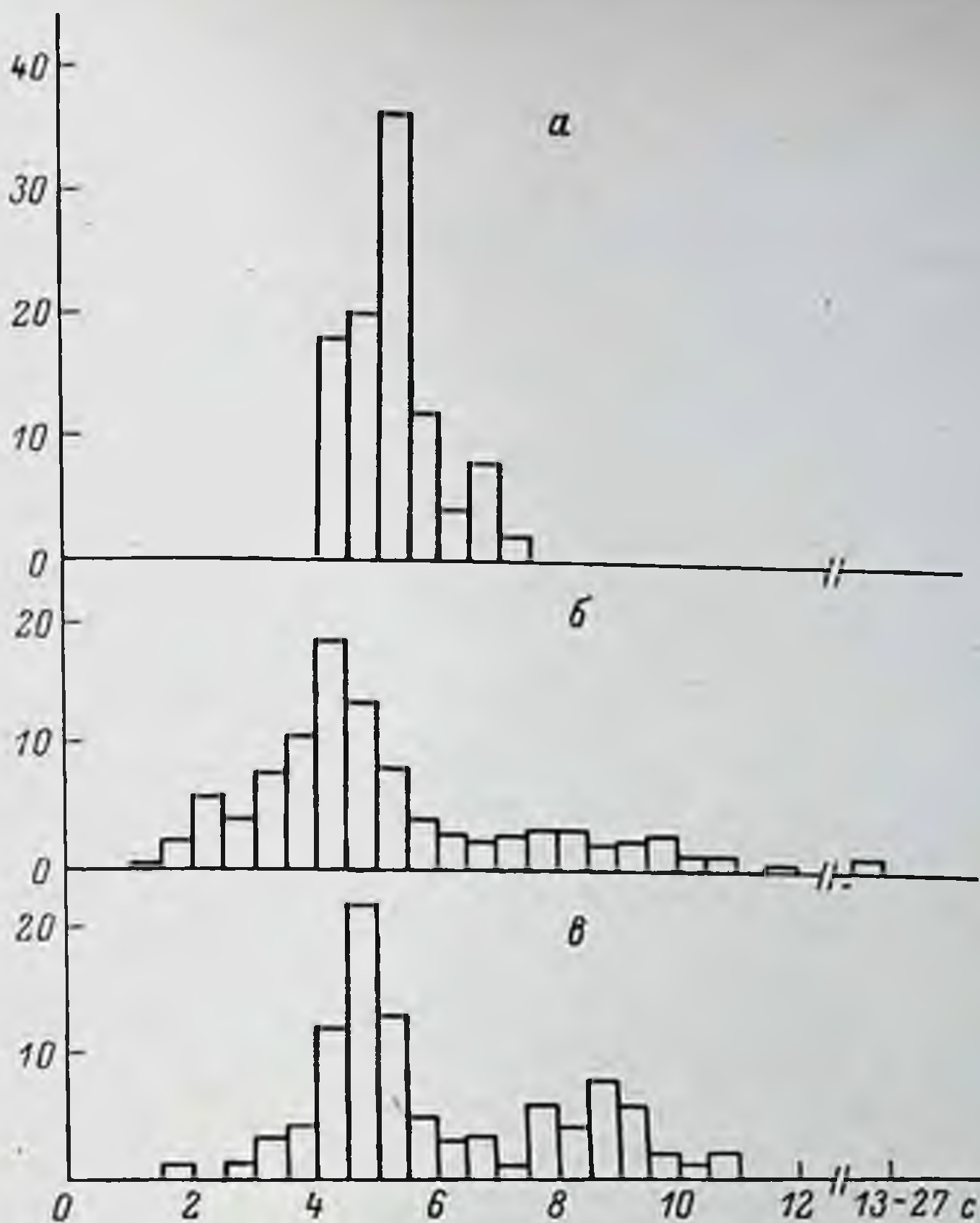


Рис. 1. Содержание ДНК в интерфазных ядрах клеток рабдомиосаркомы МХ-53 мыши.

а — клоны; б — клетки клонов; в — клетки подкожно растущей опухоли.
По оси ординат — число клеток и клонов (%); по оси абсцисс — содержание ДНК.

растущей подкожно, равнялось 56.6 ± 2.2 отн. ед. (5.8 С), а в подкожно растущей рабдомиосаркоме МХ-63 — 44.3 ± 1.9 отн. ед. (4.6 С). Как видно из рис. 1, в случайно взятой выборке большинство клонов (около 70 %) не отличалось достоверно по среднему содержанию ДНК в интерфазных ядрах от подкожно растущей опухоли МХ-53, но встречались и клоны с достоверно ($p < 0.01$) повышенным или пониженным содержанием ДНК в ядрах клеток. Клетки изученной клоновой популяции варьировали по содержанию ДНК от 1.5 до 27 С, а клетки подкожно растущей опухоли МХ-53 — от 2 до 13.5 С. Частоты полиплоидных клеток (с 11 С и выше) в обеих популяциях одинаковы, но в клоновой популяции достоверно повышена доля клеток с 2—4 С [12].

Кариотипическая структура клеточных популяций может меняться не только в результате клонирования, но и при изменении условий роста опухолей. Очень резкие изменения кариотипической структуры наблюдаются при выращивании многих первичных и перевивных рабдомиосарком в передней камере глаза [14].

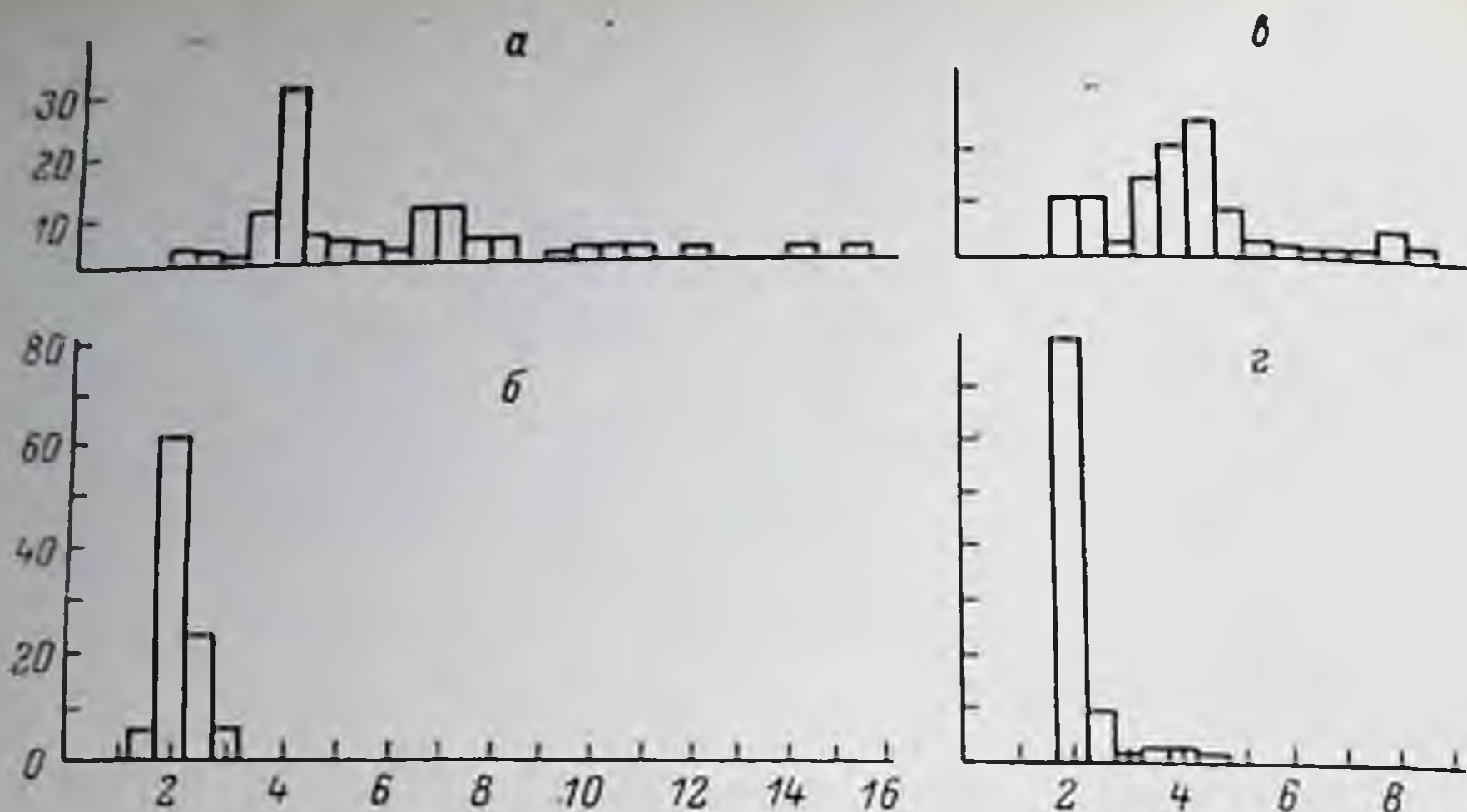


Рис. 2. Карпотипическая структура рабдомиосарком МХ-III мыши (а, б) и РА-2 крысы (в, г) при пассировании в передней камере глаза мыши (б) и крысы (г) и при подкожном пассировании (а, в).

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

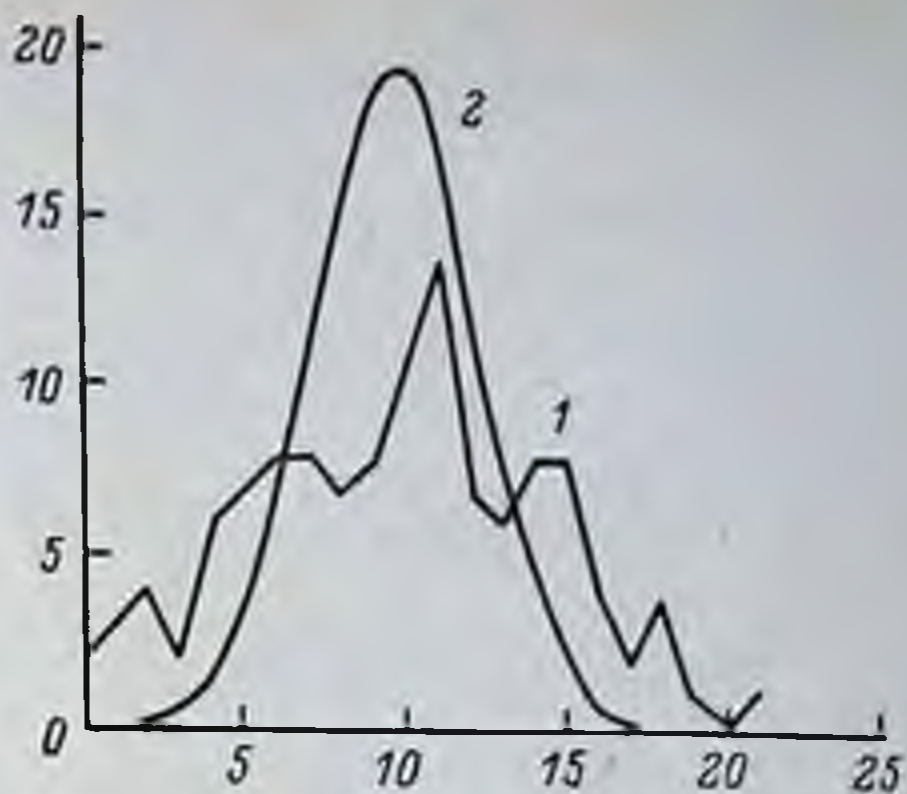
При подкожном росте в таких рабдомиосаркомах наблюдается обычный очень широкий размах изменчивости клеток по содержанию ДНК в интерфазных ядрах, причем обычно клетки с содержанием ДНК, соответствующим 6—8 С, составляют в их популяциях не менее 10%. При выращивании в передней камере глаза в большинстве случаев варьирование клеток по содержанию ДНК оказывается резко суженным (рис. 2). В отдельных трансплантатах вся выборка состояла только из клеток, ядра которых содержали количества ДНК, соответствующие 1.5—3 С.

Кариотипическая гетерогенность клеточных популяций рабдомиосарком поддерживается постоянным возникновением клеток с измененным числом хромосом. В популяции рабдомиосаркомы МХ-53 мышей в условиях клонирования *in vivo* средняя частота геномных мутаций равнялась $17.4 \pm 0.3 \times 10^{-2}$ на клетку на поколение, причем клетки с увеличенным числом хромосом (гиперплоидные мутанты) возникали с частотой 12.5×10^{-2} , а клетки с уменьшенным числом хромосом — с частотой 2.9×10^{-2} , т. е. примерно в 3 раза реже [12]. В потомствах клоногенных клеток рабдомиосаркомы РА-2 крыс геномные мутации также возникают с очень высокой частотой — $10.8—13.7 \times 10^{-2}$, причем, как и в популяциях МХ-53, клетки с увеличенным числом хромосом возникают в 2—3 раза чаще, чем клетки с уменьшенным числом хромосом [13].

На рис. 3 приведены наблюдавшееся распределение 121 клона РА-2 по числу реально обнаруженных в них мутантов и теоретическое (биномиальное) их распределение, построенное на основе ожидаемой одинаковой вероятности возникновения мутаций в по-

Рис. 3. Распределение 121 клона рабдомиосаркомы РА-2 по числу обнаруженных в них геномных мутантов (1) и их теоретически ожидаемое (биномиальное) распределение (2). (Опыты Л. И. Степаньян и Е. В. Каминской).

По оси ординат — число клонов; по оси абсцисс — число мутантов.



томстве любой клетки. Хорошо видно резкое различие этих распределений ($p < 0.001$), обусловленное тем, что клоны с очень низким и очень высоким числом мутантов встречались намного чаще, чем следовало бы ожидать при одинаковой вероятности возникновения мутантов во всех клонах. Такая же картина наблюдается и в клеточных популяциях рабдомиосарком мышей [12]. Таким образом, клеточные популяции рабдомиосарком резко гетерогенны по мутабельности — они включают как клетки, в потомстве которых геномные мутации происходят с очень высокой частотой, так и клетки, в потомстве которых кариотип воспроизводится очень стабильно. Как известно, частоты геномных мутаций повышаются при неблагоприятных для клеток изменениях среды, при которых возрастает вероятность нарушений правильного распределения хромосом между дочерними клетками в митозе [15] и правильного протекания редупликации хромосом [16]. Потомство отдельных клеток (клоны) неизбежно попадают в неодинаково благоприятные условия среды, что и должно приводить, естественно, к различным частотам возникновения геномных мутаций. Однако эта причина не единственная. Частоты мутаций лишь незначительно повышаются в клонах с понижением темпов деления и обнаруживают прямую зависимость от ploидности клеток — родоначальниц клонов [12, 13]. Налицо, таким образом, наследственная гетерогенность в популяциях рабдомиосарком по мутабельности входящих в их состав клоногенных клеток.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

Расчленение клеточных популяций рабдомиосарком на потомства отдельных клеток (клональный анализ) и изучение этих потомств (рис. 4) показало, что морфологическая изменчивость рабдомиобластов и их изменчивость по способности проявлять признаки миогенной дифференцировки (сливаться в миосимпласты, формировать поперечноисчерченные миофибриллы) не обусловлены генными, хромосомными или геномными мутациями. Вместе с тем многие морфологические различия и различия по способности дифференцироваться (при наличии благоприятных

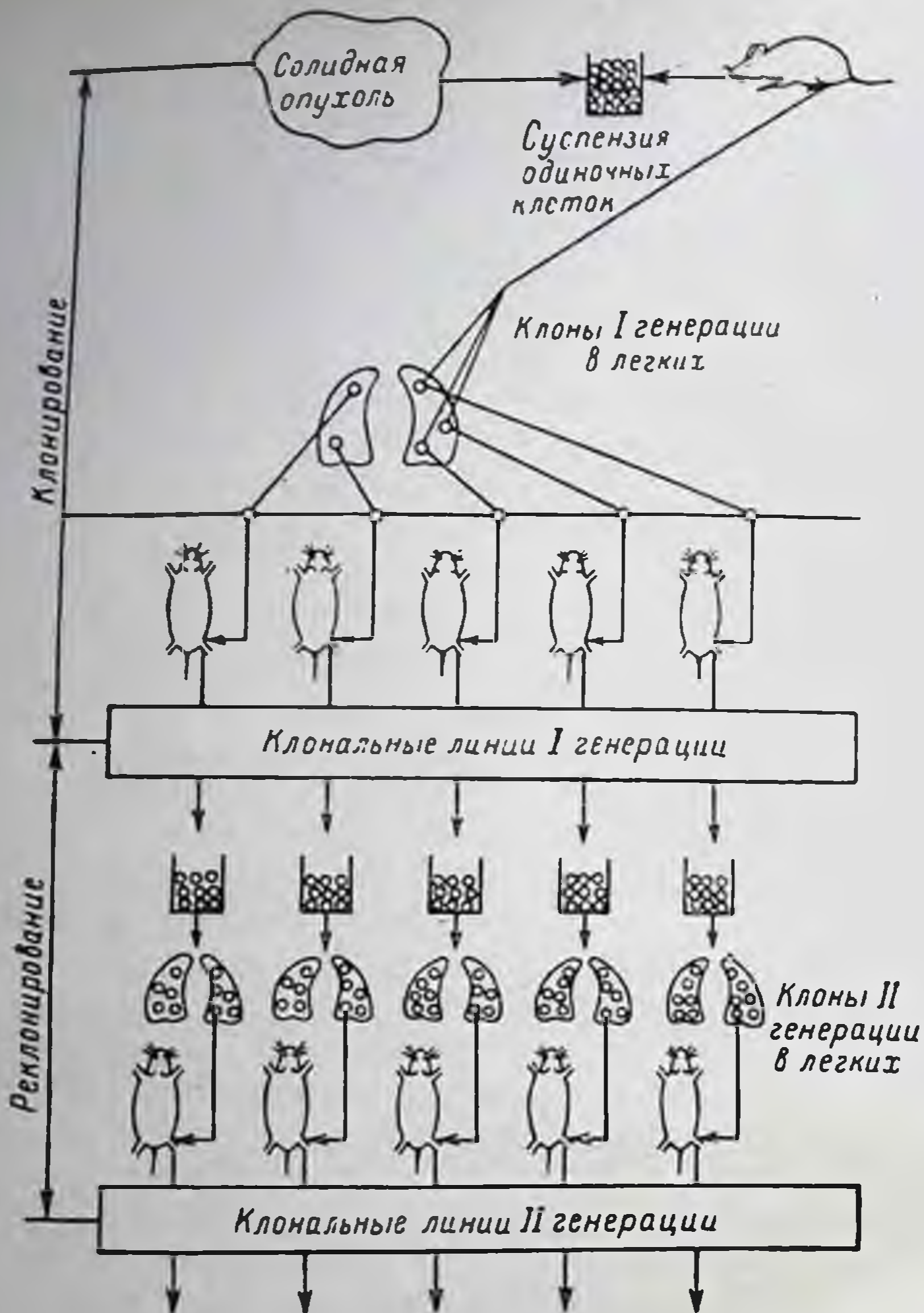


Рис. 4. Схема получения перевивных клональных линий рабдомиосарком крыс и мышей.

для дифференцировки условий среды) воспроизводятся в ряду клеточных поколений, т. е. являются наследственными. С помощью клонального анализа *in vivo* удастся выделить около 10 типов наследственно различающихся рабдомиобластов [1, 9, 17]. Из них большие круглые, большие веретеновидные и средние веретеновидные клетки проявляют способность к миогенной дифференцировке (являются дифференцирующимися), а остальные — малые круглые, малые веретеновидные, плеоморфные и др. — не проявляют ни морфологических, ни морфогенетических признаков миогенеза (см. раздел «Ультраструктура опухолевых миобластов»), хотя с помощью биохимических методов можно показать, что и у них продолжается синтез миозина [18]. Многие из перечисленных клеточных элементов достоверно отличаются по среднему



Рис. 5. Частоты эпигенетических изменений (внутриклеточных трансдетерминаций) в клеточных популяциях рабдомиосарком мышей (%) по данным клопирования морфологически однородных и смешанных опухолей.

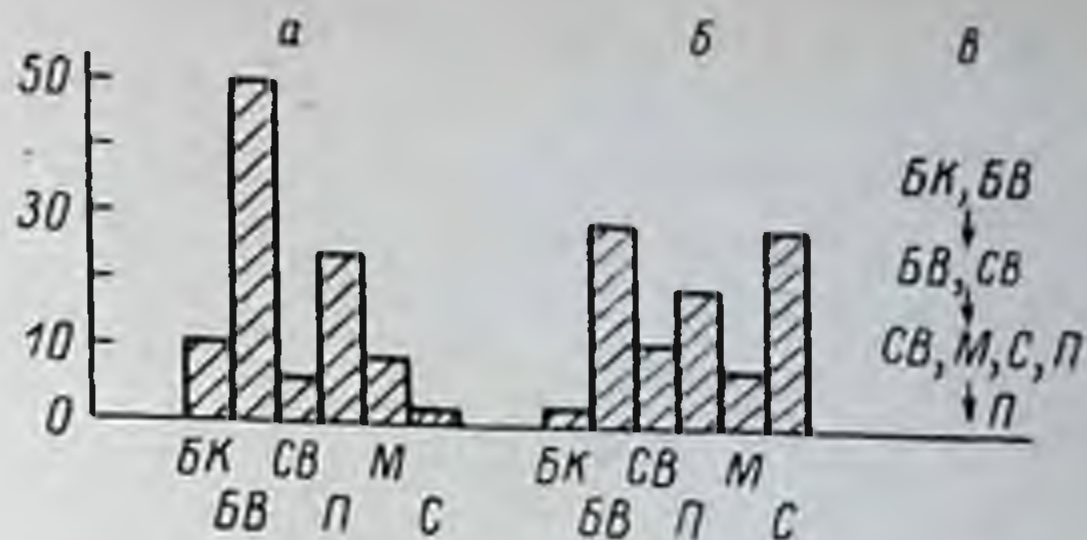


Рис. 6. Частота встречаемости сформированных различными клеточными элементами клонов (%), полученных *in vivo* от первичных рабдомиосарком мышей (а) и рабдомиосарком II—IX генераций (б); в — схема эволюции клеточных популяций рабдомиосарком.

БК — большие круглые клетки; BV, СВ — большие и средние веретеновидные, М — мезенхимоподобные, С — саркоматозные, П — плеоморфные клетки.

объему клеток и проявляют в условиях клонирования разную скорость роста [19]. Подобные наследственные, но не мутационные различия, играющие решающую роль при формировании многоклеточных организмов (в процессах детерминации и дивергентной дифференцировки [20]), получили название эпигенетических. Они обусловлены наследуемыми в ряду клеточных поколений изменениями генной активности, причем механизмы возникновения и последственной передачи этих изменений до сих пор не ясны [9, 21]. Для эпигенетической изменчивости в клеточных популяциях рабдомиосарком характерны очень высокие частоты — до 1—15% [9]. Для определения частот изменчивости рабдомиосаркомы приходится клонировать, и возможно, что процедура клонирования повышает частоты эпигенетических изменений. В таком случае частоты эпигенетических изменений в клеточных популяциях опухолей, растущих в обычных условиях (не подвергаемых клонированию), должны быть более низкими. Эпигенетическая изменчивость в клеточных популяциях рабдомиосарком является асимметричной — «прямые» и «обратные» изменения происходят с очень разными частотами (рис. 5). Дифференцирующиеся рабдомиобласты превращаются в недифференцирующиеся обычно с намного большей частотой, чем недифференцирующиеся рабдомиобласты в дифференцирующиеся.

Клеточные популяции первичных рабдомиосарком часто бывают эпигенетически гетерогенными, состоящими из рабдомиобластов, наследственно отличающихся по морфологии и способности к многоклеточной дифференцировке (рис. 6). Эта наследственная гетерогенность не всегда обнаруживается при гистологическом исследовании рабдомиосарком, не позволяющем провести различия между наследственными и ненаследственными вариациями признаков рабдомиобластов, но хорошо выявляется при их клональном анализе

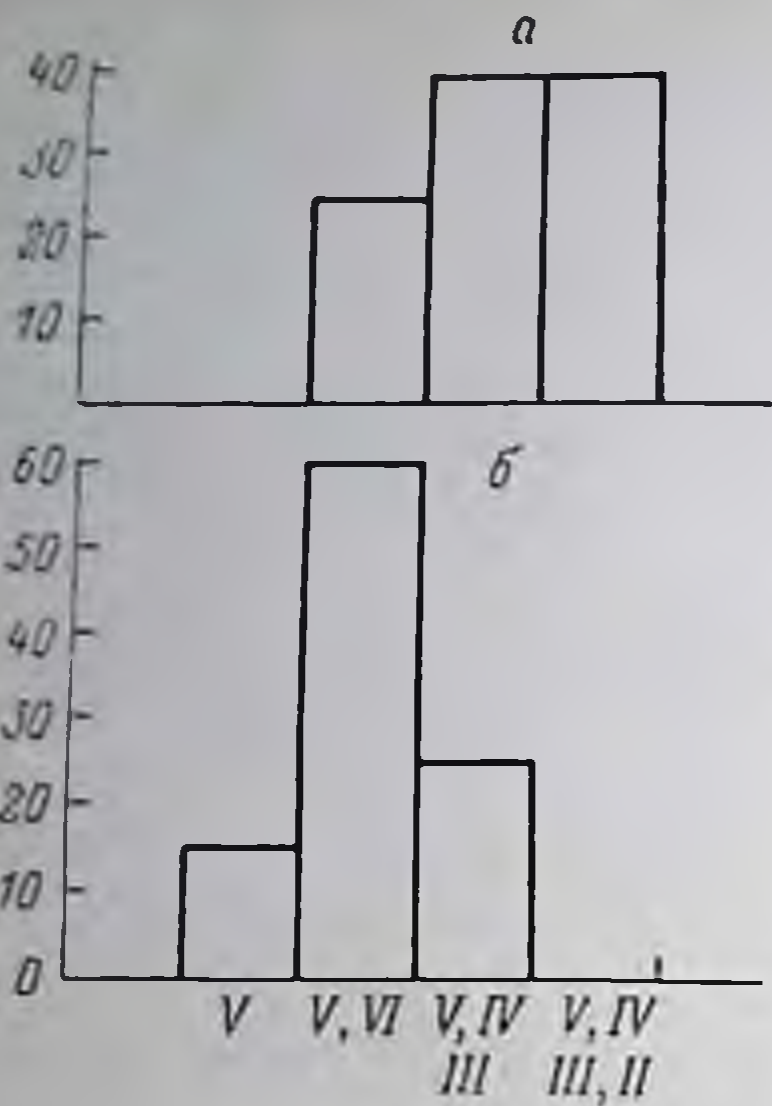


Рис. 8. Распределение клонов, полученных от рабдомиосаркомы мышей в условиях *in vivo*, по константам экспоненциального роста. (Опыты Л. И. Степаньян).

По оси ординат — число клонов (%); по оси абсцисс — константы экспоненциального роста ($\tau^{-1} \times 10^3$).

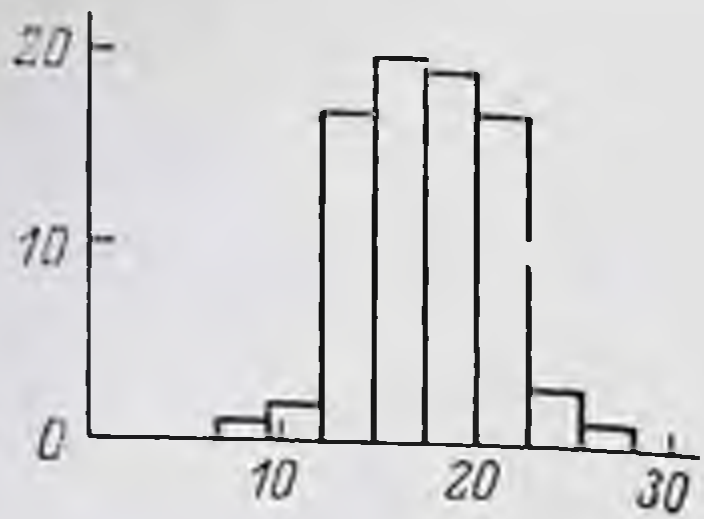


Рис. 7. Распределение клонов первичной (а) и перевивной (б) рабдомиосарком мышей по числу изоферментов ЛДГ. (Опыты Е. В. Санчаковой).

По оси ординат — число клонов (%); по оси абсцисс — число и тип изоферментов.

in vivo. В ходе серийных трансплантаций рабдомиосарком их эпигенетическая структура претерпевает закономерные изменения — происходит быстрая или медленная замена дифференцирующихся клеточных элементов недифференцирующимися, и в конце концов в популяциях остаются только плеоморфные клетки (рис. 6, в). Для прогрессии рабдомиосарком характерно совпадение направления эволюции их клеточных популяций (рис. 6) с направлением преобладающих частот эпигенетических изменений (рис. 5).

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РАБДОМИОСАРКОМ ПО ПРИЗНАКАМ С НЕЯСНОЙ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТЬЮ

С помощью клонального анализа *in vivo* можно выявить гетерогенность клеточных популяций рабдомиосарком по многим признакам. Электрофорез в полиакриламидном геле показал гетерогенность популяций рабдомиосарком мышей по содержанию изоферментов ЛДГ (рис. 7), путем подсчета числа клеток в клонах обнаруживается гетерогенность клеточных популяций рабдомиосарком мышей и крыс по константам экспоненциального роста (рис. 8), измерение диаметра клеток выявляет статистически достоверные межклональные различия по величине клеток и в тех случаях, когда давшие начало клонам клоногенные клетки не отличаются эпигенетически (рис. 9). Вопрос о наследственном или модификационном характере гетерогенности клоновых популяций по содержанию изоферментов в настоящее время не решен. Что касается различий по темпам деления, то специальные опыты по

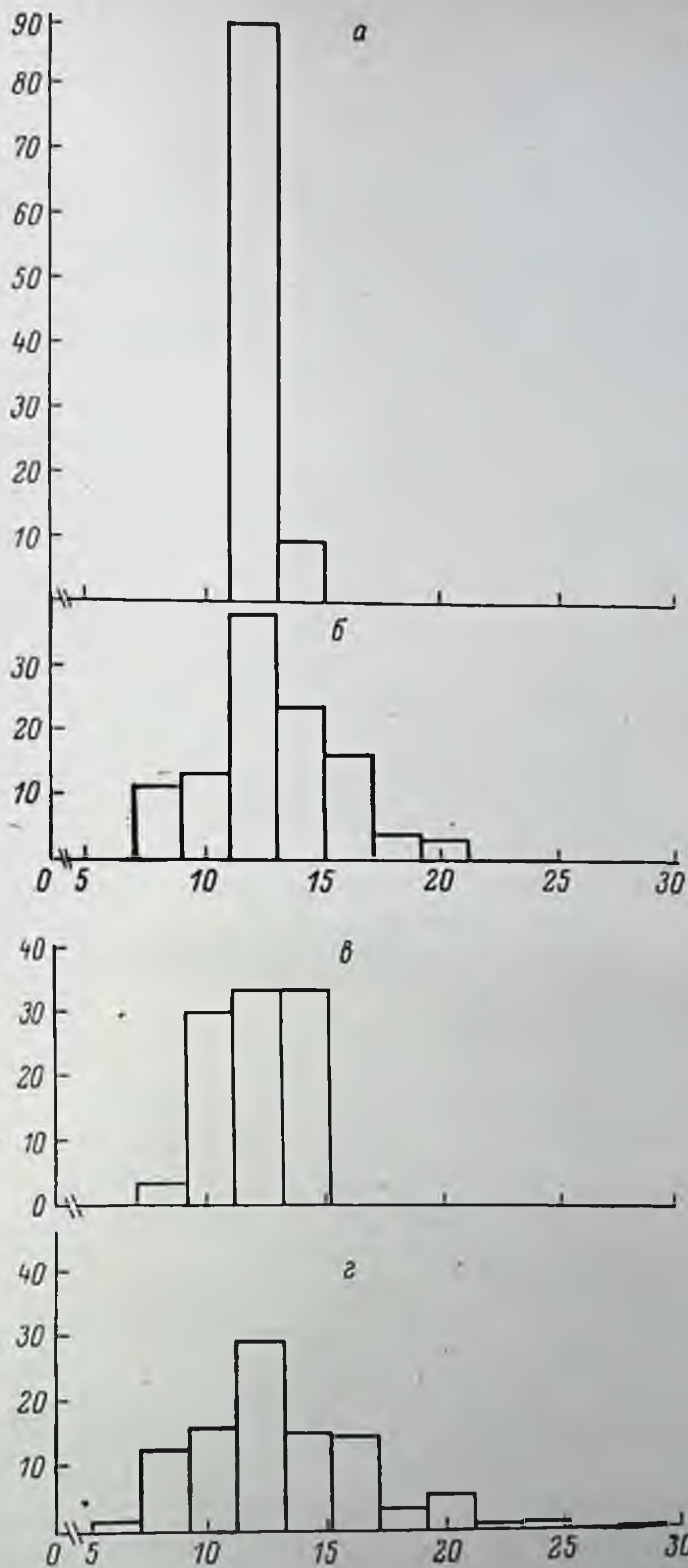


Рис. 9. Диаметр клеток рабдомиосаркомы РА-2 крыс.

а — распределение клонов по среднему диаметру составляющих их клеток; *б* — распределение клеток клонов; *в* — распределение подкожно растущих опухолей по среднему диаметру клеток; *г* — распределение клеток подкожно растущих опухолей (%). По оси ординат — число клеток, клонов и подкожно растущих опухолей (%); по оси абсцисс — диаметр клеток (мкм). (Опыты Л. И. Степастьян).

отбору в популяциях рабдомиосаркомы РА-2 крыс на повышение и снижение темпов деления клеток показали, что они обусловлены не только средовыми факторами, но и наследственными различиями рабдомиобластов. В этих опытах коэффициент реализованной наследуемости (h^2) при отборе на снижение темпов деления был равен 0.35, при отборе на повышение темпов деления — 0.08, а средний коэффициент реализованной наследуемости составил 0.12 [22]. Таким образом, эти опыты показали, что примерно на 90% вариабельность по темпам деления обусловлена в клеточной популяции изученной рабдомиосаркомы факторами среды, а на 10% — наследственными различиями клоногенных рабдомиобластов.

Относительная роль наследственных и ненаследственных факторов в варьировании размеров клеток была определена путем сопоставления средних дисперсий диаметра клеток в клонах и в подкожно растущих рабдомиосаркомах мышь и крысы. Коэффициенты наследуемости варьировали в разных опытах от 0.15 до 0.46 [23]. Наследственная обусловленность межклональных различий по величине клеток частично связана с различиями клоногенных клеток по плоидности, о которой говорилось выше, так как увеличение числа хромосом в клетках приводит, как правило, к увеличению размеров ядра и всей клетки в целом. Однако, как известно, величина нормальных диплоидных миобластов может зависеть от характера и стадии их дифференцировки, и гетерогенность по числу хромосом клеточных популяций рабдомиосарком, очевидно, является не единственной причиной довольно высокой наследуемости размеров рабдомиобластов в этих популяциях.

ОТБОР В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ РАБДОМИОСАРКОМ

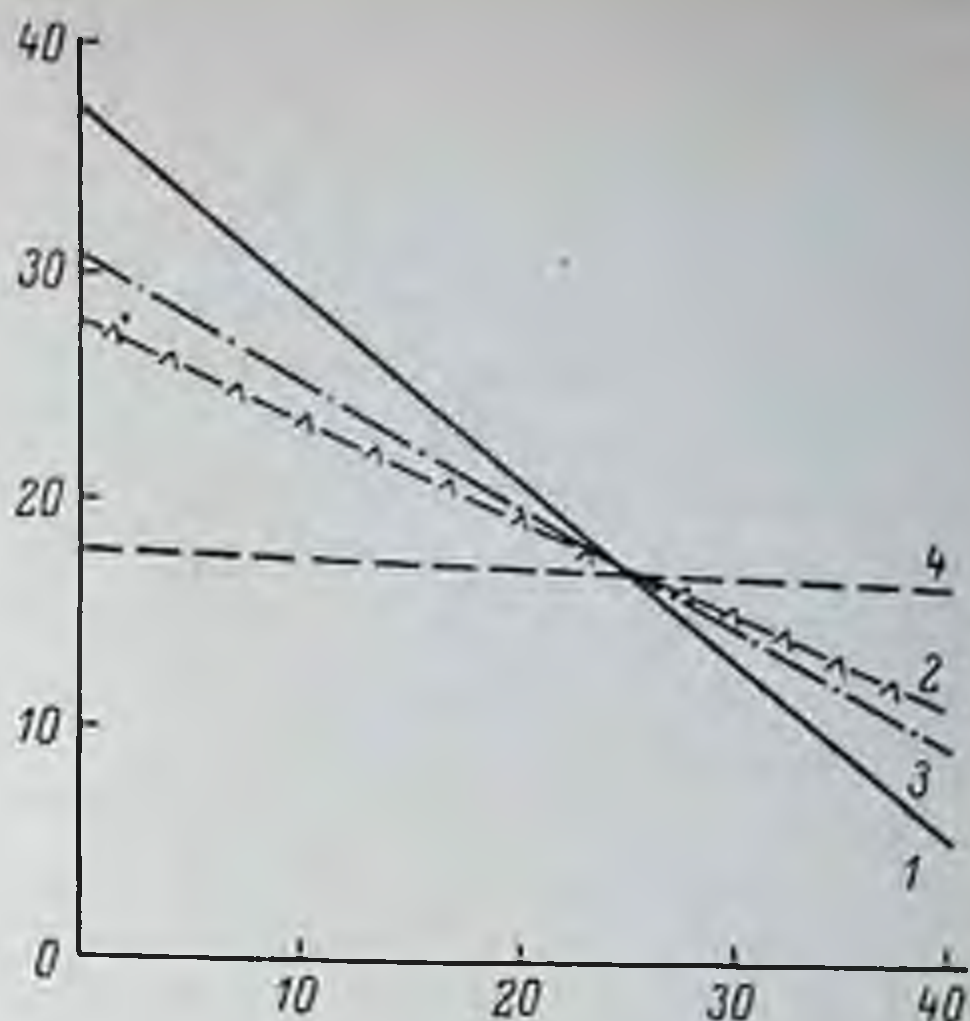
Описанная выше наследственная гетерогенность клеточных популяций рабдомиосарком прямо или косвенно приводит к их гетерогенности по темпам пролиферации, что делает неизбежным вытеснение потомствами быстро делящихся клеток потомств клеток с более медленным темпом деления, т. е. естественный отбор в этих популяциях. Интенсивность отбора в популяциях рабдомиосарком достаточно высока; при улучшении условий роста опухолей интенсивность отбора увеличивается, а при ухудшении условий — падает [9], так как процессы селективной гибели клеток смежаются процессами их неселективной гибели.

Интенсивность естественного отбора по отдельным признакам не определена. Изменения в числе хромосом влияют на темпы деления рабдомиобластов [9], но естественный отбор по признакам кариотипа никогда не приводит к кариотипической однородности популяций рабдомиосарком из-за очень высокой частоты возникновения клеток с измененным числом хромосом (стр. 224). По этой же причине и в потомствах отдельных клеток очень быстро нарастает кариотипическая гетерогенность (рис. 1), и клопаль-

Рис. 10. Зависимость темпов деления дифференцирующихся (1) и недифференцирующихся (2—4) клеточных элементов рабдомиосарком мыши от возраста сформированных ими клонов.

1 — большие круглые, большие веретеновидные и средние веретеновидные клетки; 2 — плеоморфные, малые веретеновидные и мезенхимоподобные; 3 — плеоморфные и малые веретеновидные; 4 — мезенхимоподобные.

По оси ординат — константы экспоненциального роста ($\text{ч}^{-1} \times 10^3$); по оси абсцисс — возраст клонов (сут).



ные группы рабдомиосарком по карiotипической гетерогенности не отличаются от опухолей неклонального происхождения [9]. На этом основании нами был сделан вывод о слабой интенсивности естественного отбора по признакам карiotипа в популяциях рабдомиосарком. Следует, однако, напомнить, что несмотря на высокие частоты геномных мутаций и резкое преобладание среди них гиперклонов (стр. 224), карiotипическая структура перевиваемых рабдомиосарком остается относительно постоянной, что может объясняться только равновесием между изменчивостью клеток по числу хромосом и отбором по этому признаку. Как указывалось выше, при ухудшении условий роста интенсивность отбора падает и карiotипическая гетерогенность популяций рабдомиосарком должна возрастать. Напротив, при улучшении условий роста интенсивность отбора повышается и рабдомиосаркомы должны становиться карiotипически более гомогенными. По-видимому, последним и объясняется резко выраженная «нормализация» карiotипической структуры многих рабдомиосарком при их росте в передней камере глаза (рис. 3).

Как указывалось в разделе «Эпигенетическая гетерогенность», эпигенетически различные клеточные элементы рабдомиосарком обладают различной кинетикой роста, что должно приводить к естественному отбору в клеточных популяциях рабдомиосарком по признакам дифференцировки. Специально поставленные опыты показали [19], что дифференцирующиеся клеточные элементы (большие круглые, большие и средние веретеновидные) рабдомиосарком мышей на начальных этапах роста клонов обладают более высокими темпами пролиферации, чем недифференцирующиеся клеточные элементы (малые веретеновидные, плеоморфные), но по мере роста клонов темпы деления их замедляются быстрее, чем у недифференцирующихся клеточных элементов, и в результате через 20—25 сут роста недифференцирующиеся клеточные элементы начинают обгонять по скорости пролиферации дифференциру-

ющиеся клеточные элементы (рис. 10). Иными словами, на начальных этапах роста естественный отбор должен благоприятствовать дифференцирующимся клеточным элементам, а затем направление отбора меняется и он начинает благоприятствовать снижению дифференцировки в клеточных популяциях рабдомиосарком. Таким образом, полученные результаты не позволяют сделать вывод о существенной роли отбора в дедифференцировке популяций рабдомиосарком, которая закономерно происходит в ходе прогрессии этих опухолей. Скорее всего, дедифференцировка наступает под совокупным влиянием отбора и изменчивости, в ходе которой, как указывалось в разделе «Эпигенетическая гетерогенность», недифференцирующиеся клеточные элементы возникают намного чаще, чем дифференцирующиеся.

Искусственный отбор в клеточных популяциях рабдомиосарком проводился до настоящего времени лишь по одному признаку — по аффинитету (тропности) рабдомиобластов к легким после их внутривенного введения [4]. Многократный массовый отбор привел к постепенному повышению способности клоногенных рабдомиобластов задерживаться и пролиферировать активно в легочной ткани. У рабдомиосаркомы МХ-53 мышей тропность клеток к легочной ткани за 26 циклов отбора была повышена в 10—15 раз, а у рабдомиосаркомы РА-2 крыс за 40—50 циклов массового отбора — в сотни и тысячи раз. В результате были получены перевивные рабдомиосаркомы мыши и крысы с повышенным аффинитетом клеток к легочной ткани, удобные для проведения клонального анализа рабдомиосарком *in vivo* и изучения генетики популяций клоногенных клеток экспериментальных рабдомиосарком. Приведенный пример показывает, что в клеточных популяциях рабдомиосарком можно проводить искусственный отбор по самым разным признакам, в том числе по морфологическим и функциональным признакам миогенной дифференцировки.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ОПУХОЛЕВЫХ МИОБЛАСТОВ

Хорошо известный и описанный рядом авторов клеточный полиморфизм рабдомиосарком представляет собой сложное явление, поскольку он обусловлен разными причинами. В результате можно выделить три категории полиморфизма клеточных элементов рабдомиосарком, которые в совокупности и определяют полиморфизм рабдомиосарком в целом. Это прежде всего наследственный полиморфизм, полиморфизм, обусловленный разным уровнем дифференцированности разных типов клеточных элементов, и ненаследственный модификационный (модуляторный) полиморфизм.

Изучение наследственного полиморфизма, проведенное методом клонального анализа [1], позволило выявить следующие наследственно различающиеся типы клеточных элементов рабдомиосарком: большие, средние и малые веретеновидные клетки, большие и малые круглые клетки, большие и малые плеоморфные

клетки и мезенхимоподобные клетки [9, 17, 24, 25]. Выделение всех этих клеточных типов из смешанной популяции клеток рабдомиосарком без клонирования опухолей очень затруднено, поэтому большинство авторов при электронномикроскопическом исследовании описывает всего 3—4 типа рабдомиобластов [26, 27].

По способности к цитотипической и гистотипической дифференцировке все типы опухолевых рабдомиобластов могут быть разделены на дифференцирующиеся (большие и средние веретеновидные, большие круглые клетки) и недифференцирующиеся (все остальные типы). Однако некоторые авторы считают целесообразным в группе дифференцирующихся рабдомиобластов различать миофибриллярные и миофиламентозные клетки [28, 29]. Непосредственный модификационный полиморфизм проявляется в изменении величины и формы наследственно различающихся клеточных типов [17, 24].

Основные типы клеточных элементов рабдомиосарком описаны преимущественно при изучении их в световом микроскопе. Исследования ультраструктуры клеточных элементов рабдомиосарком имеют отрывочный характер, поскольку материалом для них служили или отдельные случаи рабдомиосарком человека [26, 27], или 1—2 перевивных линии экспериментальных рабдомиосарком [30—34]. Используя клонирование *in vivo* индуцированных у мышей 20-метилхолантеном рабдомиосарком, удалось выделить и провести электронномикроскопическое исследование 6 способных к воспроизведению типов клеточных элементов [17, 25, 36].

Большие веретеновидные клетки имеют в среднем размеры 10—60 мкм [19] и очень длинные цитоплазматические отростки. Цитоплазма их электроннооптически темная, свободных рибосом немного, большая их часть образует розетки или связана с мембранами цитоплазматической сети. В некоторых клетках хорошо развит пластинчатый комплекс Гольджи. Многочисленные полиморфные митохондрии беспорядочно располагаются по всей цитоплазме или же образуют цепочки, ориентированные вдоль длинной оси клетки и лежащие в непосредственной близости от пучков миофиламентов (рис. 11, а, б). Митохондрии имеют обычно светлый матрикс и дезориентированные кристы (круглые и овальные). Палочковидные и грушевидные митохондрии отличаются темным матриксом и правильным чередованием крист. Ядра больших веретеновидных клеток имеют округлую или овальную форму, относительно ровную поверхность и расширенное перинуклеарное пространство. Хроматин образует крупные скопления, прилежащие к мембране, часто встречаются крупные ядрышки. В цитоплазме таких клеток нередко содержатся миофибриллы с разной степенью организованности и отдельные миофиламенты (см. ниже). В таких случаях в цитоплазме больших веретеновидных клеток выявляется послойная дифференциация, заключающаяся в довольно правильном чередовании цепочек органелл (митохондрий

и цистерны цитоплазматической сети) и пластов мюфиламентов или мюфибрилл (рис. 11, б, в).

Большие веретеновидные клетки, не содержащие мюфибрилл, имеют электроннооптически светлую цитоплазму с умеренным или большим количеством свободных рибосом. Митохондрии многочисленные со светлым матриксом, кристы сглажены и дезориентированы. В цитоплазме таких клеток могут встречаться отдельные филаменты диаметром 5—15 нм (рис. 11, г). Ядра их электроннооптически светлые с тонкодисперсным хроматином, более уплотненный слой которого лежит под ядерной мембраной и вокруг ядрышка, часто прилежащего к оболочке ядра. Перинуклеарное пространство расширено, в ядерной оболочке нередко видны ядерные поры.

Большие круглые клетки (рис. 12, а, б) не имеют цитоплазматических отростков; во многих клетках ядра смещены к периферии, средний диаметр клеток 14—23 мкм. Цитоплазма электроннооптически светлая, бедная органоидами, содержит множество свободных рибосом, нередко образующих розетки. Цитоплазматическая сеть представлена обычно немногочисленными шероховатыми канальцами с гранулярным содержимым. Митохондрии круглые или овальные со светлым матриксом и дезориентированными кристами. Пластинчатый комплекс Гольджи умеренно развит. В большинстве таких клеток цитоплазма содержит филаменты толщиной 5—15 нм, единичные или собранные в небольшие пучки, располагающиеся беспорядочно (рис. 12, б). Ядра светлые с тонкодисперсным хроматином, диффузно распределенным по всему ядру, а местами образующим небольшие сгущения. В некоторых ядрах встречаются круглые ядрышки.

Средние веретеновидные клетки имеют вытянутую форму и длинные цитоплазматические отростки (рис. 12, в). Размеры их составляют в среднем 8 мкм в ширину и 50 мкм в длину. Цитоплазма их электроннооптически темная, содержит большое количество свободных рибосом. Цитоплазматическая сеть развита слабо. Митохондрии многочисленные, крупные со светлым матриксом и дезориентированными кристами (рис. 12, г). В цитоплазме иногда обнаруживаются единичные филаменты или их небольшие пучки. Ядра клеток удлиненные, палочковидные, иногда с неправильной изрезанной поверхностью. Хроматин в виде крупных глыбок равномерно распределен по ядру.

Плеоморфные клетки обычно тесно прилегают друг к другу и имеют неправильно округлую или полигональную форму (рис. 13, а, б). Размеры плеоморфных клеток варьируют от 10 до 25 мкм в диаметре. Цитоплазма в одних клетках электроннооптически светлая, в других состоит из двух слоев: светлая цитоплазма в виде ободка прилежит к ядру, а по периферии располагается более электроннооптически плотная. Свободные рибосомы немногочисленны, комплексов не образуют. Цитоплазматическая сеть умеренно развита. Митохондрии широко варьируют по опти-

ческой плотности матрикса, форме и по степени набухания. В отдельных клетках могут быть найдены многочисленные неориентированные филаменты (рис. 13, б). Ядра с гладкой, иногда изрезанной оболочкой. Хроматин мелкодисперсный, распределен равномерно, лишь местами группируется в небольшие глыбки.

Малые веретеновидные клетки (рис. 13, в) узкие, удлинённые, с длинными цитоплазматическими отростками, ширина их 7 мкм, длина 33 мкм. Их цитоплазма электроннооптически темная, с большим количеством свободных рибосом, иногда собранных в розетки. Хорошо развитая цитоплазматическая сеть, иногда гладкая, но преимущественно шероховатая, представлена многочисленными цистернами. Пластинчатый комплекс Гольджи обычно хорошо развит. Митохондрии округлые или овальные с просветленным матриксом и нерегулярно расположенными кристами. В цитоплазме нередко встречаются филаменты толщиной 10 нм, расположенные под клеточной мембраной и ориентированные параллельно поверхности клетки. В отдельных клетках наблюдается беспорядочное расположение филаментов. Ядра малых веретеновидных клеток вытянутые, их поверхность чаще гладкая, иногда изрезанная. Гомогенный хроматин распределен равномерно, лишь слегка конденсируясь у ядерной оболочки. Иногда встречаются мелкие единичные ядрышки.

Мезенхимоподобные клетки представляют собой мелкие клетки, лежащие свободно и анастомозирующие длинными узкими отростками (рис. 13, г). Диаметр тела клеток варьирует от 3 до 7 мкм. Контуры клеток неровные, с многочисленными выростами и отростками. Цитоплазма таких клеток электроннооптически темная, содержит много свободных рибосом. Цитоплазматическая сеть хорошо развита. Митохондрии многочисленные, разной формы, слегка набухшие. Комплекс Гольджи хорошо развит. Ядра электронноплотные, хроматин гомогенный, не образующий сгущений.

МИОФИБРИЛЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ В ОПУХОЛЕВЫХ МИОБЛАСТАХ

В ряде работ, посвященных изучению ультраструктуры клеточных элементов рабдомиосарком человека [26, 27, 36] и экспериментальных рабдомиосарком [32, 33], описаны разные типы филаментов и миофибрилл. Однако эти работы, выполненные на опухолях разных гистологических типов, не позволяют выявить закономерности в развитии фибриллярных структур в опухолевых миобластах и обнаружить отклонения от нормального миофибриллогенеза. Имеющиеся в нашем распоряжении клоны экспериментальных рабдомиосарком разного гистологического типа и рабдомиосаркомы человека позволили выявить последовательные стадии цитотипической дифференцировки опухолевых рабдомиобластов, заключающейся в развитии внутриклеточных миофиб-

риллирных структур [37], сопоставить их со стадиями миофибриллогенеза в эмбриональных и регенерирующих миобластах, а также выделить атипичные формы миофибриллогенеза в опухолевых миобластах и в опухолевых миосимпластах [37, 38].

Начало цитотипической дифференцировки опухолевых миобластов связано с появлением в цитоплазме беспорядочно разбросанных тонких филаментов (толщина 4—8 нм) как в ядродержащих отделах клетки, так и в цитоплазматических отростках. На этой стадии дифференцировки хорошо выявляется связь тонких филаментов с полирибосомами. Следующей стадией миофибриллогенеза можно считать появление в цитоплазме клеток параллельно ориентированных пучков, состоящих исключительно из тонких миофиламентов. Такие пласты располагаются преимущественно между ядром и цитоплазмой и могут достигать значительной мощности (рис. 14, а).

Толстые филаменты могут появляться и на стадии отдельных неориентированных тонких филаментов и тогда, когда тонкие филаменты организованы в пучки. Толстые филаменты имеют толщину 10—16 нм и обнаруживаются только в сочетании с тонкими (рис. 14, а). По-видимому, пучки филаментов толщиной 10 нм, расположенные в средней части цитоплазмы опухолевого рабдомиобласта и ориентированные вдоль его длинной оси, — явление очень редкое.

Появление пластов миофибрилл происходит одновременно с послойной дифференциацией цитоплазмы (рис. 14, б). Послойная дифференциация цитоплазмы должна рассматриваться как важный этап в дифференцировке опухолевых миобластов. В наиболее типичном варианте эта дифференциация выглядит следующим образом. Слой цитоплазмы, расположенный непосредственно под клеточной оболочкой, свободный от фибриллярных структур, содержит каналцы гладкой или шероховатой цитоплазматической сети, окруженные розетками полирибосом и гранулами гликогена. В следующем по направлению к центру клетки слое цитоплазмы расположены множественные параллельные пучки филаментов, между которыми находятся немногочисленные рибосомы и редкие мелкие цистерны гладкой цитоплазматической сети. Центральный слой цитоплазмы отростка, так же как и окооядерный слой, содержит преимущественно комплексы митохондрий в виде цепочек, а также единичные цистерны цитоплазматической сети, полирибосомы и гликогеновые гранулы.

Следующая стадия развития миофибрилл в опухолевых миобластах связана с появлением Z-подобных полос. На этой стадии наряду с правильно ориентированными параллельно расположенными в цитоплазме пучками филаментов обычно наблюдаются и неориентированные филаменты, и отдельные пучки их, т. е. в одной и той же клетке могут наблюдаться картины, соответствующие всем предыдущим стадиям миофибриллогенеза в опухолевых рабдомиобластах. Самые ранние структуры, которые

могут быть расщеплены как примитивные Z-полосы или даже как скопления Z-материала, представляют собой диффузные размытые образования толщиной от 0.1 до 0.8 мкм и длиной около 0.5 мкм. Иногда на протяжении миофибриллы можно было видеть 2—3 такие полосы. Определенная в таких случаях длина саркомера составляет приблизительно 1.5 мкм. А- и I-диски в миофибриллах опухолевых миоцитов наблюдаются крайне редко, тогда как в опухолевых миосимпластах они могут быть отчетливо различимы, что свидетельствует о более высокой степени зрелости миофибрилярного аппарата в миосимпластах и о меньшей его атипичности.

Многоядерные миосимпласты образуются путем слияния опухолевых рабдомиоцитов, и от уровня развития в них миофибрилярных структур зависит степень дифференцированности миофибрилярного аппарата в миосимпластах. Этот вывод базируется на случаях неоднократного обнаружения массивных многоядерных миосимпластов, не содержащих не только миофибрилл, но и отдельных миофиламентов. Такие наблюдения подтверждают обоснованность высказанного ранее положения о независимом проявлении разных признаков дифференцировки, в частности о независимом проявлении цитотипических (миофибриллы в одноядерных клетках) и гистотипических (миосимпласты) признаков дифференцировки [1, 17].

В миосимпластах, в которых происходит формирование сократительного аппарата, могут наблюдаться все стадии развития миофибрилярного аппарата, описанные выше на примере одноядерных больших веретеновидных миоцитов, но его дифференциация может достигать значительно более высокого уровня. Так, в миосимпластах могут наблюдаться пучки миофибрилл, заполняющие всю свободную от органоидов цитоплазму и достигающие очень высокой степени зрелости, сопоставимой со зрелостью миофибрилярных структур в миосимпластах и миотубах развивающейся скелетной мышцы. В таких миосимпластах множественные параллельно ориентированные пучки миофибрилл имеют четкие компактные Z-полосы и отчетливо различимые А- и I-диски (рис. 14, б, в).

Приведенное выше описание миофибриллогенеза в опухолевых рабдомиоцитах сделано на примере больших веретеновидных клеток из высокодифференцированных клонов, т. е. из клонов, проявляющих гистотипическую дифференцировку (формирующих миосимпласты). Миофибрилярные структуры могут быть найдены и в больших веретеновидных клетках из клонов, не формирующих миосимпласты, а также в больших круглых клетках из высоко- и низкодифференцированных клонов, сформированных этими типами клеточных элементов. Таким образом, проведенное ранее разделение всех типов клеточных элементов рабдомиосарком на дифференцирующиеся и недифференцирующиеся по признаку «способность формировать миосимпласты» оказалось справедливым и для признака «способность к внутриклеточному

миофибрилlogenезу». Это не противоречит сделанному выше заключению о независимом проявлении этих признаков.

Способность к миофибрилlogenезу у больших круглых и у средних веретеновидных клеток понижена в сравнении с миофибрилlogenезом в больших веретеновидных клетках. Это означает, что в этих типах клеточных элементов миофибрилlogenез проходит те же стадии, что и в больших веретеновидных клетках, но останавливается раньше — как правило, на стадии образования пучков тонких или пучков тонких и толстых миофиламентов в больших круглых клетках (рис. 12, а, б) и на стадии дезорпентированных филаментов или их дезорпентированных пучков у средних веретеновидных клеток (рис. 12, в). В больших круглых клетках с центральным расположением ядра пучки филаментов или миофибрилл располагаются обычно в центральном слое между ядром и клеточной мембраной, в клетках со смещенным к периферии ядром скопление переплетающихся пучков миофибрилл находится в центре свободной от ядра цитоплазмы.

Одной из задач, возникающих при электронномикроскопическом исследовании рабдомиобластов, является необходимость отличать миофиламенты от так называемых 100 Å-ных филаментов. Как известно [39], 100 Å-ные филаменты широко варьируют в диаметре (от 4 до 12 нм) и по этому признаку не могут быть отличимы от толстых филаментов, диаметр которых варьирует в пределах 10—17 нм [40]. В результате для дифференциации этих двух типов филаментов следует пользоваться совокупностью признаков: формой филаментов, характером поверхности, взаимным расположением, ориентацией относительно длинной оси клетки, способностью давать агрегаты с тонкими филаментами, отношением к рибосомам и внутриклеточным мембранным структурам, реакцией с антимозиновой сывороткой. В отличие от толстых (мозиновых) филаментов 100 Å-ные филаменты имеют гладкую поверхность, одинаковую на всем протяжении толщину, не образуют параллельно расположенных пучков, не ориентированы относительно длинной оси клетки, не агрегируют с тонкими филаментами, не обнаруживают связи с рибосомами, митохондриями и цистернами цитоплазматической сети, а также не дают реакции с антимозиновой сывороткой. По нашим данным, наиболее удобным для использования признаком толстых филаментов, позволяющим отличать их от 100 Å-ных филаментов, является их способность формировать пучки, в которые обязательно входят и тонкие филаменты.

АТИПИЯ МИОФИБРИЛЛОГЕНЕЗА В ОПУХОЛЕВЫХ МИОБЛАСТАХ

При сопоставлении данных по миофибрилlogenезу в опухолевых и нормальных рабдомиобластах (в эмбриогенезе, при регенерации, в культуре ткани) выявляется характерная особенность опухоле-

вых миобластов, заключающаяся в сочетании в одной и той же клетке различных стадий миофибриллогенеза [26, 41, 42]. По-видимому, как признак опухолевой атипичности следует рассматривать случаи неправильного хаотического расположения массивных пучков миофибрилл достаточно высокой для опухолевых миобластов степени дифференцированности (рис. 14, з). Вероятно, к проявлению опухолевой атипичности можно отнести и образование неправильных атипичных Z-полос. Атипичия Z-полос обычно заключается в варьировании их толщины, в уменьшении электронной плотности, нечеткости контуров. Только в опухолевых миобластах могут встречаться массивные скопления Z-материала, не связанные с миофибриллами, и огромные лентовидные скопления Z-материала, располагающиеся по длине пучка тонких филаментов. Своеобразным проявлением опухолевой атипичности, встречающейся только в больших круглых клетках экспериментальных рабдомиосарком и в больших круглых клетках эмбриональных рабдомиосарком человека, являются располагающиеся в свободной от ядра части цитоплазмы конгломераты из переплетающихся пучков миофиламентов и скоплений (глыбок) — Z-материала (рис. 14, д).

ПРОБЛЕМА ГИСТОГЕНЕЗА РАБДОМИОСАРКОМ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПУТИ РЕШЕНИЯ

В литературе имеются указания на возможность происхождения рабдомиосарком из четырех основных источников: 1) остатков эмбриональных закладок, в том числе сохранивших плюрипотентность (дисонтогенетическая теория); 2) производных мезенхимы; 3) миобластов, обособляющихся из мышечных волокон при повреждении; 4) одноядерных клеток миогенной природы, входящих в состав скелетных мышц. При этом следует учитывать, что все перечисленные теории происхождения рабдомиосарком должны давать рациональное объяснение постоянному обнаружению в подобных опухолях не только клеток миогенного типа, в различной степени проявляющих способность к цитодифференцировке, но и клеток соединительнотканного типа, синтезирующих коллаген и другие, свойственные соединительной ткани белки, а также клеток, имеющих ярко выраженное морфологическое сходство с клетками эмбриональной мезенхимы.

С точки зрения дисонтогенетического происхождения рабдомиосарком смешанный характер опухолей скелетных мышц обусловлен малигнизацией эмбриональных остатков, в том числе сохранивших плюрипотентность. Эта теория чаще всего привлекается для объяснения гистогенеза эктопических рабдомиосарком и участков рабдомиосарком, обнаруживаемых в тератоидных опухолях. На срезах этих опухолей можно видеть сплошные поля мезенхимоподобных клеток, среди которых расположены более или менее дифференцированные мышечные волокна. Так как в подобных

опухолях клетки других каких-либо типов отсутствуют, остается предположить, что наблюдаемые в них мышечные волокна представляют собой продукт дифференцировки окружающих их мезенхимоподобных клеток.

Таким образом, с точки зрения эмбрионального происхождения эктопических рабдомиосарком, в качестве вероятных источников развития поперечнополосатых мышечных волокон, встречающихся в этих опухолях, рассматриваются следующие эмбриональные клеточные элементы: дистопические клетки миотомов, мезенхимные клетки, детерминированные в направлении развития скелетных мышц, мультипотентные клетки герминативного зачатка, нефрогенные, а, возможно, также и нейроэктодермальные клеточные элементы. Во всех случаях предполагается, что источником развития эктопических рабдомиосарком являются клетки, обособившиеся от участия в нормальном онтогенезе на одной из стадий эмбрионального развития, но до достижения ими зрелого, дифференцированного состояния.

Дисонтогенетическая теория распространяется рядом авторов не только на эктопические рабдомиосаркомы, но и на рабдомиосаркомы скелетных мышц, что не лишено известной логики. В этом случае как возможный источник формирования рабдомиосарком упоминаются те же эмбриональные клеточные элементы, что и при формировании эктопических рабдомиосарком [43, 44].

В настоящее время не только среди эмбриологов и гистологов, но и среди патологов существует тенденция рассматривать скелетную мышечную ткань как производное мезенхимы [45, 46]. Эта точка зрения нашла отражение и в классификации опухолей мягких тканей, принятой ВОЗ в 1969 г., согласно которой опухоли скелетных мышц отнесены к мезенхимным опухолям. В группе мезенхимных опухолей рассматриваются рабдомиосаркомы и в «Руководстве по патологоанатомической диагностике опухолей человека» [47]. При таком понимании гистогенеза скелетных мышц естественно рассматривать в качестве источников мышечных опухолей недифференцированные мезенхимные клетки или соединительнотканые клетки с потенциями мезенхимных, сохраняющиеся во взрослом организме по ходу капилляров. Разделяющий эту точку зрения автор одного из фундаментальных исследований рабдомиосарком Стаут [48] считает, что соединительнотканые элементы, присутствующие в рабдомиосаркомах, свидетельствуют о способности мезенхимных клеток принимать форму и выполнять функции фибробластов. С его точки зрения, равновероятно также, что соединительнотканые клетки, обладающие потенциями мезенхимы, могут в процессе aberrantной дифференцировки принимать форму и выполнять функции рабдомиобластов. Другими словами, наиболее распространенная в настоящее время точка зрения на гистогенез опухолей скелетных мышц заключается в том, что рабдомиосаркомы являются новообразованиями мезенхимы и различных мезенхимных дериватов, а фибробластические клетки

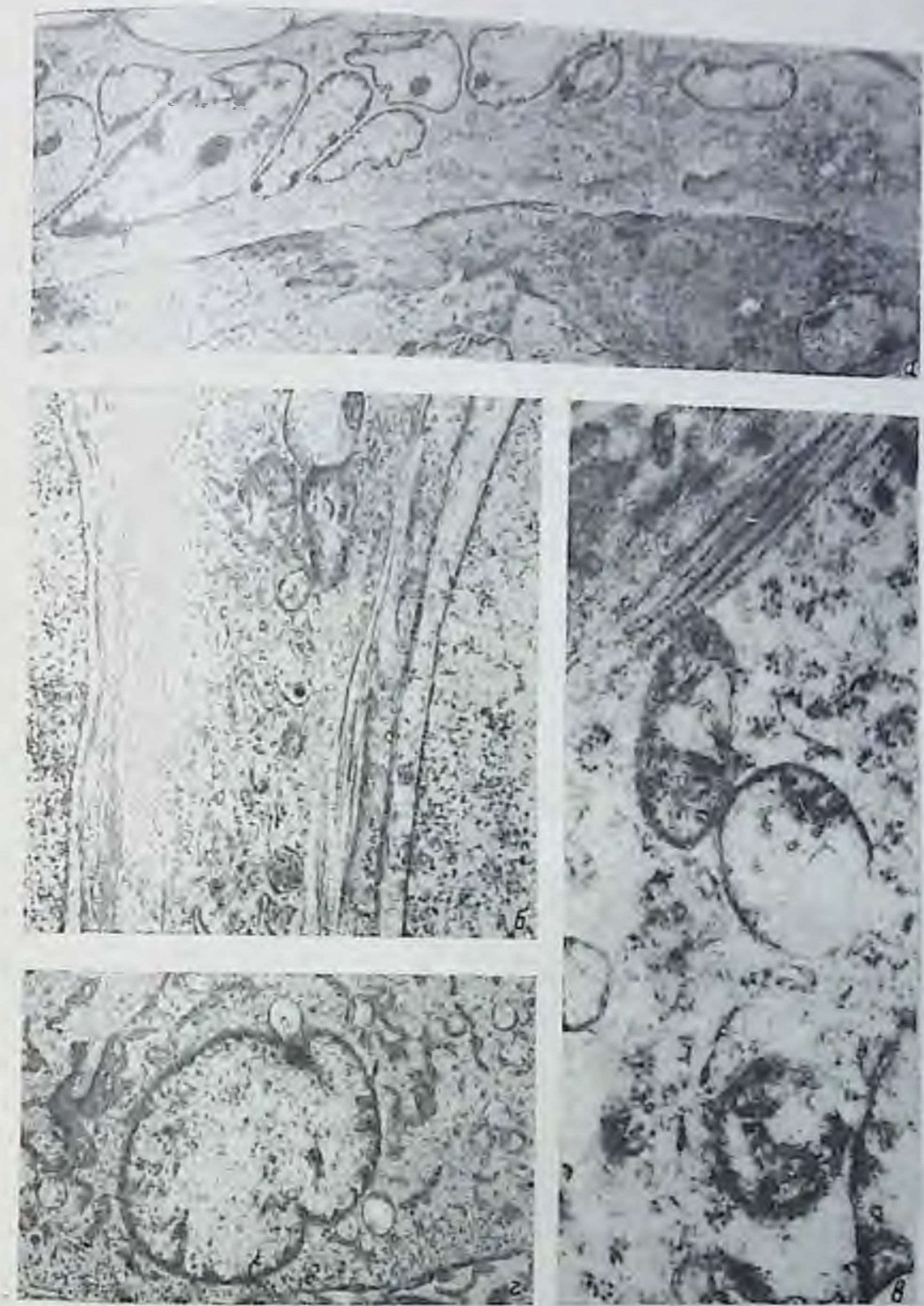


Рис. 11. Большие веретеновидные рабдомиобласты.

a — высокодифференцированная большая веретеновидная клетка, прилежащая к мио-
 симпласту; *b* — миофибриллярные структуры и послойная дифференциация цитоплазмы
 в большой веретеновидной клетке; *v* — ориентированные пучки миофибрилл; *z* — низко-
 дифференцированная большая веретеновидная клетка.

Увел.: *a* — 3000 ×; *b* — 12 000 ×; *v* — 54 000 ×; *z* — 4000 ×.

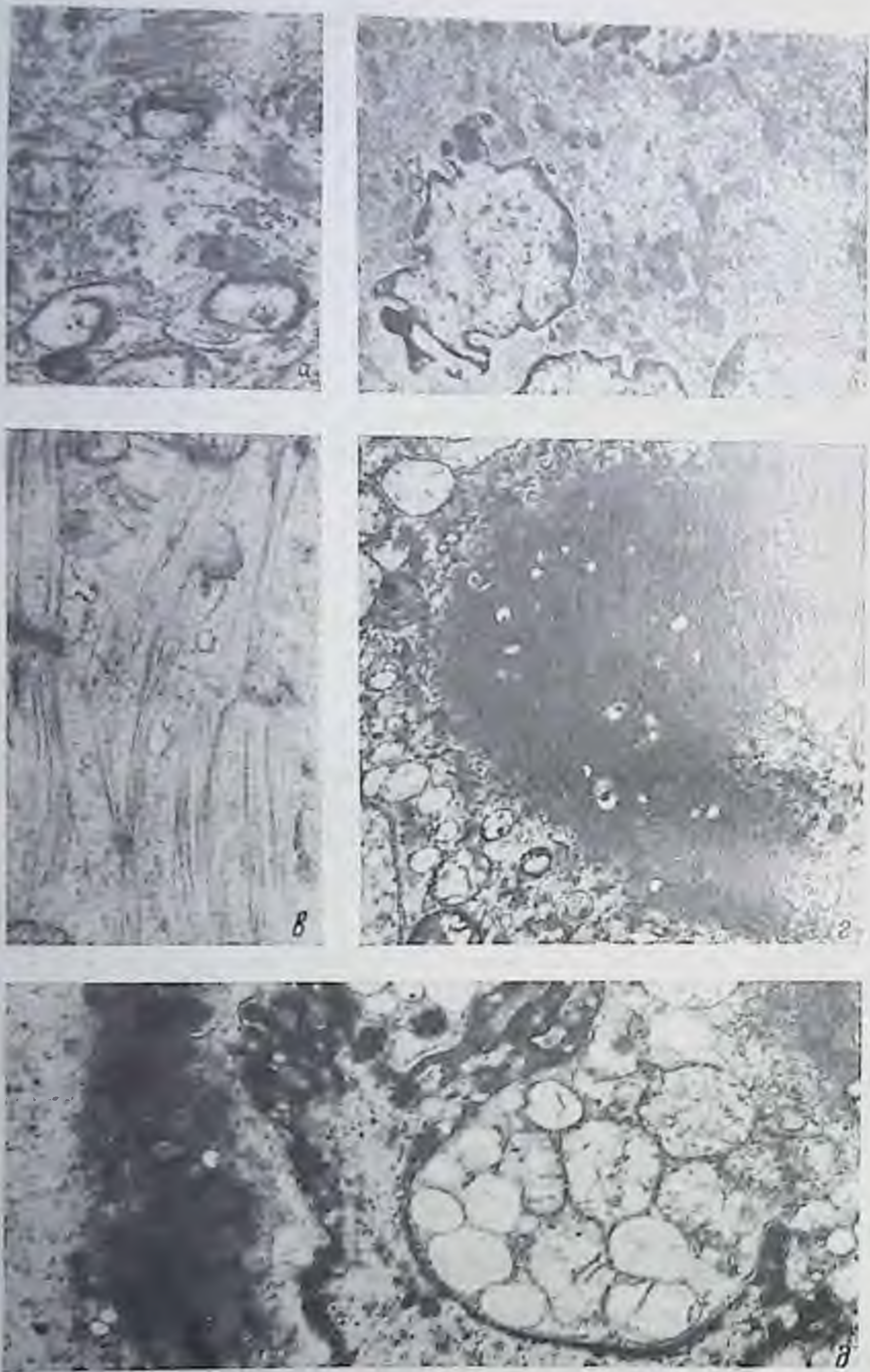


Рис. 14. Стадии и атипия миофибриллогенеза в опухолевых рабдомиобластах.

a — дезориентированные пучки примитивных миофибрилл; *б* — фрагмент миосимплекта с множественными пучками миофибрилл; *в* — пучки миофибрилл с Z-дисками, I- и A-полосами. *г* — массивные пучки миофибрилл; *д* — конгломераты, состоящие из филаментов и Z-материала (Z-диски?). Увел.: *a* — 16 000 ×; *б* — 24 000 ×; *в* — 18 000 ×; *г* — 18 000 ×; *д* — 21 000 ×.

и мышечные клетки с поперечной исчерченностью, присутствующие в них, свидетельствуют о различных направлениях, в которых может происходить их дифференцировка.

Вместе с тем нужно учитывать, что хотя теоретически представление о бипотенциальности мезенхимных клеток достаточно аргументировано, практически не существует тестов, с помощью которых можно уверенно идентифицировать мезенхимную клетку, тем более что, по мнению ряда авторов, мезенхима — это клеточная популяция, гетерогенная по морфогенетическим потенциалам и существующая только в эмбриональном периоде [49]. Следовательно, речь должна идти о предполагаемых камбиальных плюрипотентных клетках, являющихся производными эмбриональных мезенхимных клеток. Следует также еще раз подчеркнуть, что «мезенхимоподобные» клетки и клетки «соединительнотканного типа» в рабдомиосаркомах могут являться результатом трансгрессии признаков у злокачественных рабдомиобластов, а не свидетельством происхождения рабдомиосарком из клеток мезенхимной природы.

Доводы в пользу происхождения рабдомиосарком из миобластов, обособляющихся из поврежденного мышечного волокна, приведены в книге А. А. Клишова [50]. Основанием для подобной точки зрения явились традиционные представления о скелетной мышечной ткани как о высокоспециализированной строго детерминированной в раннем эмбриогенезе ткани исключительно митомного происхождения, лишенной камбия. Изучение регенерации поврежденных мышечных волокон, выявившее камбиальную функцию одноядерных миобластов, расположенных внутри регенерирующего волокна, привело к созданию концепции, согласно которой ядра мышечного волокна, обособляясь с прилегающей к ним цитоплазмой, превращаются в камбиальные клетки — миобласты. Издавна описывавшиеся в мышечном волокне сарколеммные ядра не рассматривались как вероятные источники образования одноядерных миобластов при регенерации мышечной ткани. Открытие благодаря электронномикроскопическим исследованиям в мышечных волокнах клеток-сателлитов и дальнейшее их изучение с помощью ^3H -тимидиновой метки при нормальном росте, повреждении и регенерации мышечной ткани позволило пересмотреть сложившийся взгляд на скелетную мышечную ткань как на ткань, лишенную камбиальных клеток [51]. Существенный вклад в разрешение этой сложной проблемы внесли и работы на скелетных миобластах в культуре ткани. Изучение *in vitro* регенеративных реакций отдельного изолированного зрелого мышечного волокна убедительно показало, что источником одноядерных миобластов, появляющихся в мышечном волокне, а позднее и в сарколеммной трубке, являются не мышечные ядра с прилегающей к ним цитоплазмой, а пролиферирующие клетки-сателлиты [59]. Приведенные здесь данные заставляют заново пересмотреть и вопросы гистогенеза опухолей скелетных мышц. Дока-

занная камбальная роль клеток-сателлитов и отсутствие экспериментальных доказательств возможности превращения ядер мышечного волокна в клетки-миобласты позволяют скептически отнестись к возможности развития рабдомиосарком из мышечных ядер.

В целом имеющиеся в настоящее время данные указывают, что рабдомиосаркомы различного типа в основном происходят из клеточных элементов миогенной природы, главным образом, по-видимому, из одноклеточных элементов скелетных мышц. Однако нельзя полностью исключить и происхождения части рабдомиосарком из клеток мезенхимной природы, эмбриональных или неэмбриональных, особенно эктопических рабдомиосарком. Вместе с тем приведенные данные показывают, что проблема гистогенеза рабдомиосарком до сих пор не получила однозначного решения. Основные причины этого чисто методические, связанные с невозможностью безошибочно отличить дифференцированные клетки миогенной, соединительнотканной и мезенхимной природы. Это существенно ограничивает и «разрешающую способность» клонального анализа: из клеток миогенной, соединительнотканной и мезенхимной природы «маркированными» являются только миогенные, у которых можно безошибочно выявить нетрансгрессирующие морфогенетические признаки дифференцировки. Поэтому с помощью клонального анализа в настоящее время можно выявить миогенную природу «мезенхимоподобных» клеток и клеток «соединительнотканного» типа, входящих в состав рабдомиосарком, но нельзя доказать, что рабдомиосаркомы не происходят от клеток мезенхимной природы или от производных мезенхимы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Вахтин Ю. Б., Швембергер И. Н. Цитология и генетика рабдомиосарком. Л., Наука, 1968.
- [2] Foulds L. Neoplastic Development. 1. London; New York, Acad. Press, 1969.
- [3] Негменс А. Г., Вагендсен Г. В. — Eur. Journ. Cancer, 1969, 1 : 173.
- [4] Степаньян Л. И., Вахтин Ю. Б. — Цитология, 1980, 22 : 198.
- [5] Степаньян Л. И., Вахтин Ю. Б. — Эксперим. онкол., 1980, 2 : 53.
- [6] Студитский Н. И. — ДАН СССР, 1962, 146 : 724.
- [7] Салямон Л. С. — Рак и дисфункция клетки. Л., Наука, 1974.
- [8] Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., Медицина, 1975.
- [9] Вахтин Ю. Б. Генетика соматических клеток. Л., Наука, 1974.
- [10] Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Готлиб В. Я. Клеточные факторы реакции опухолей на облучение и химиотерапевтические воздействия. М., Наука, 1978.
- [11] Ивашкевич Л. Г., Вахтин Ю. Б. — Вопр. онкол., 1970, 16 : 78.

- [12] Григорьева Э. Г., Степаньян Л. И., Вахтин Ю. Б. — Цитология, 1980, 22 : 670.
- [13] Степаньян Л. И. Отбор на аффинитет к легочной ткани в клеточных популяциях экспериментальных рабдомиосарком. Автореф. дис., Л., 1980.
- [14] Сапчакова Е. В. — В кн. : Материалы конф. молодых онкологов. Л., 1979 : 75.
- [15] Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М. Медицина, 1972.
- [16] Lejeune J., Berger R., Rethore M. O. — Compt. Rend. Acad. Sci., 1966, 263 : 1880.
- [17] Швембергер И. Н. Рак и дифференцировка клетки. Л., Наука, 1976.
- [18] Матвеев В. В., Борхсеннус Т. В., Швембергер И. Н., Пинаев Г. П., Вахтин Ю. Б. — В кн. Научн. конф. Ин-та цитологии АН СССР, Л., 1972 : 60.
- [19] Степаньян Л. И., Швембергер И. Н., Вахтин Ю. Б. — Цитология, 1980, 22 : 61.
- [20] Tsanev R., Sendov B. — J. Theor. Biol., 1971, 30 : 337.
- [21] Cell Biology. 1. Genetic mechanisms of cells / Ed. by Goldstein L., Prescott D. M. New York; London, Acad. Press, 1977.
- [22] Степаньян Л. И., Каминская Е. В., Вахтин Ю. Б. — Экспер. онкол., 1981, 4 (в печати).
- [23] Степаньян Л. И., Вахтин Ю. Б. — Цитология, 1980, 22 : 823.
- [24] Швембергер И. Н., Ивашкевич Л. Г., Вахтин Ю. Б. — Цитология, 1972, 14 : 104.
- [25] Швембергер И. Н. Гистология и прогрессия рабдомиосарком. Автореф. дис., Л., 1974.
- [26] Hosoda S., Suzuki H., Kawabe J., Watanabe J., Isojima C. — Cancer, 1971, 27 : 943.
- [27] Sarkar K., Tolnai G., McKay D. E. — Cancer, 1973, 31 : 442.
- [28] Kroll A. J. — Invest. Ophthalmol., 1967, 6 : 531.
- [29] Кац Л. А. — В кн. : Современные методы морфологического исследования в теоретической и практической онкологии. Тбилиси, 1978 : 112.
- [30] Ченцов Ю. С. — ДАН СССР, 1960, 132 : 447.
- [31] Dalton A. J. — Nat. Cancer Inst. Monograph., 1966, 22 : 143.
- [32] Clarke M. A. — Cancer, 1969, 24 : 147.
- [33] Resnik K. M., Nameroff M. A., Hensen J. L. — Cancer Res., 1970, 30 : 601.
- [34] Kolomiez O. L., Levenbuk I. S., Voroobjeva M. S., Guseva L. N., Voronin E. S. — Neoplasma, 1974, 21 : 21.
- [35] Чернина Л. А., Швембергер И. Н. — Вопр. онкол., 1975, 21 : 65.
- [36] Horvat B. L., Gaims M., Fisher E. — Amer. J. Clin. Pathol., 1970, 53 : 555.
- [37] Чернина Л. А., Швембергер И. Н. — Цитология, 1976, 18 : 811.
- [38] Чернина Л. А. — Арх. патол., 1979, 41 : 13.
- [39] Nakashima H. — Fukuoka acta med., 1974, 65 : 228.
- [40] Ichikawa H., Bischoff R., Holtzer H. J. — Cell Biol., 1968, 38 : 538.
- [41] Райхлин Н. Т. — В кн. : Гистохимия и электронная микроскопия в клинической и экспериментальной онкологии. М., Медицина, 1975 : 17.
- [42] Гепетическая классификация рабдомиосарком (электронно-микроскопический атлас). Л., Наука, 1981.
- [43] Glasnov M. — Frankf. Zschr. j. Pathol., 1938, 45 : 328.
- [44] Geschickter Ch. F. — Amer. J. Cancer, 1934, 22 : 378.
- [45] Pack Y. T., Ariel J. M. — In: Tumors of the soft somatic tissues. New York, 1958 : 8.

- [46] Willis R. A. Pathology of Tumours. London, 1962.
- [47] Краевский Н. А., Смольяников А. В. Руководство по патологоанатомической диагностике опухолей человека. М., Медгиз, 1971.
- [48] Stout A. P. — Ann. Surg., 1946, 123 : 447.
- [49] Кворре А. Г. — Эмбриональный гистогенез. Л., Медгиз, 1971.
- [50] Клишов А. А. — Гистогенез, регенерация и опухолевый рост скелетномышечной ткани. Л., Медгиз, 1971.
- [51] Regeneration of striated muscle and myogenesis. Amsterdam, 1970.
- [52] Konigsberg U. R., Lipton B. H., Konigsberg J. R. — Develop. Biol., 1975, 45 : 260.

В. Б. У Ш А К О В

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ В МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

ВВЕДЕНИЕ

В процессе дифференцировки изменяются практически все характеристики мышечных волокон — морфологические, биохимические и физиологические. К числу последних относится, в частности, теплоустойчивость волокон, т. е. их способность противостоять повреждающему действию повышенной температуры. Связь между теплоустойчивостью и уровнем дифференцировки клеток впервые была обнаружена П. П. Румянцевым 20 лет назад в опытах на эксплантатах сердечной мышцы. Культивируя в течение длительных сроков кусочки сердечной мышцы лягушки, П. П. Румянцев показал, что в этих условиях имеет место отчетливая морфологическая дедифференцировка волокон миокарда, которой соответствует достоверное и весьма значительное повышение их теплоустойчивости. Привлечение литературного материала позволило П. П. Румянцеву распространить эти результаты на другие типы поперечнополосатой мышечной ткани и высказать общее заключение о том, что «...возрастание дифференциации мышечной клетки сопровождается снижением ее теплоустойчивости» ([1], стр. 684).

Это заключение выдержало проверку временем. За истекшие 20 лет не было получено каких-либо данных, которые побуждали бы усомниться в его справедливости. Напротив, несмотря на свою разрозненность, весь имеющийся на сегодня экспериментальный материал со всей определенностью подтверждает существование отрицательной зависимости между уровнем дифференцировки мышечных волокон и их теплоустойчивостью. Особую убедительность этому материалу придает тот факт, что он получен разными авторами, которые в большинстве своем не имели в виду непосредственно анализировать связь между дифференцировкой и теплоустойчивостью в мышечных волокнах, а преследовали совсем иные цели. Обнаружение этой связи является обычно непреднамеренным результатом этих исследований, о котором авторы могут даже не упоминать в своих выводах.

Задача настоящего обзора — обобщить эти разрозненные сведения, а также обсудить функциональный смысл снижения теплоустойчивости мышечных волокон по мере их дифференцировки.

СДВИГИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

По своему содержанию проблема цитодифференцировки относится к эволюционным биологическим дисциплинам [2]. Поэтому при анализе связи между дифференцировкой и теплоустойчивостью в мышечных волокнах целесообразно использовать три традиционных метода эволюционной физиологии, а именно — сравнительный, онтогенетический и патологический [3]. Несмотря на известную фрагментарность, экспериментальный материал позволяет это сделать.

Сравнительно-физиологические данные о сопряженных изменениях теплоустойчивости и дифференцировки в мышечных волокнах

Сейчас уже нет сомнений в том, что разные типы мышечной ткани — гладкомышечные элементы внутренних органов, миокард с его различными отделами, скелетные фазные, скелетные тонические волокна и т. д. — возникли и развивались в филогенезе поливергентно из относительно неспециализированных, мультифункциональных, сократительных клеток (см. обзор литературы [4—7]). В индивидуальной жизни организма все эти типы мышечных волокон развиваются, естественно, так же поливергентно из недифференцированных эмбриональных клеток. Однако развиваются волокна с разной скоростью, причем темп их дифференцировки зависит от того, какую конкретную физиологическую роль придется исполнять волокнам на том или ином этапе индивидуальной жизни организма. В результате во взрослом организме дефинитивные мышечные волокна, будучи специализированными на выполнении именно данной функции, различаются по степени своей дифференцировки, которая углубляется в следующем ряду: гладкие волокна внутренних органов — спонтанно сокращающиеся волокна предсердий — волокна предсердий, не обладающие собственным автоматизмом — волокна желудочков — скелетные тонические волокна — скелетные медленные фазные волокна — скелетные быстрые фазные волокна.

В этой последовательности усложняется строение миофибрилл, происходит постепенное оформление их в правильно чередующиеся диски, все более развитыми становятся саркоплазматический ретикулум и система поперечных трубочек, усиливается смещение ядер к периферии и наблюдаются другие изменения, указывающие на возрастающую морфологическую дифференцировку воло-

кон. Физиологическая дифференцировка волокон в этом ряду проявляется, в частности, в таких признаках, как утрата собственного автоматизма, увеличение скорости возбуждения и скорости сокращения, повышение специфичности хеморецепции, все большее подчинение пусковым влияниям нервной системы, утрата способности к пролиферации и т. д. Наконец, на прогрессирующую биохимическую дифференцировку волокон в этом ряду указывают изменения активности едва ли не всех ферментов, переход от аэробного типа метаболизма к гликолизу и многие другие сдвиги. Более детально структурный, функциональный и биохимический аспекты дифференцировки мышечных волокон разных типов обсуждаются в специальных обзорах и монографиях [8—12].

С позиций рассматриваемой проблемы, наибольший интерес представляет тот факт, что именно в этой же последовательности, без каких-либо исключений и оговорок, снижается теплоустойчивость мышечных волокон. Первые указания на неодинаковую теплоустойчивость мышц разных типов появились еще в прошлом веке [13]. Они были неоднократно подтверждены в более поздних работах [14—20 и др.]. Накопленные к настоящему времени данные показывают, что в дефинитивном состоянии мышечные волокна разных типов по своей устойчивости к повышенной температуре образуют следующий ряд: гладкие волокна внутренних органов > волокна предсердий > волокна желудочков сердца > > тонические волокна > фазные волокна.

Таким образом, судя по этим многочисленным сравнительно-физиологическим данным, изменение теплоустойчивости мышечных волокон является одним из факторов их дифференцировки — с углублением последней устойчивость волокон к теплу снижается.

Снижение теплоустойчивости мышечных волокон в раннем постнатальном онтогенезе

У многих видов животных к моменту рождения мышечные волокна являются еще незрелыми, и их дифференцировка продолжает углубляться в постнатальный период. По своей сути изменения мышечных волокон в раннем постнатальном онтогенезе не отличаются от тех, что описаны в предыдущем разделе. Эти изменения подробно рассмотрены в книге Е. К. Жукова и др. [12], а также в ряде статей, помещенных в настоящем сборнике.

В процессе постнатального созревания волокон изменяются практически все их признаки, включая теплоустойчивость. Уже самые первые, в известной мере случайные, наблюдения выявили более высокую теплоустойчивость мышечной ткани у молодых как холоднокровных [21], так и теплокровных [22] животных. Эти данные наводили на мысль о том, что в ходе дифференцировки мышечных волокон их устойчивость к повреждающему действию тепла уменьшается. Специальные опыты, проведенные на длинном разгибателе пальцев стопы у белых крыс в первый месяц постна-

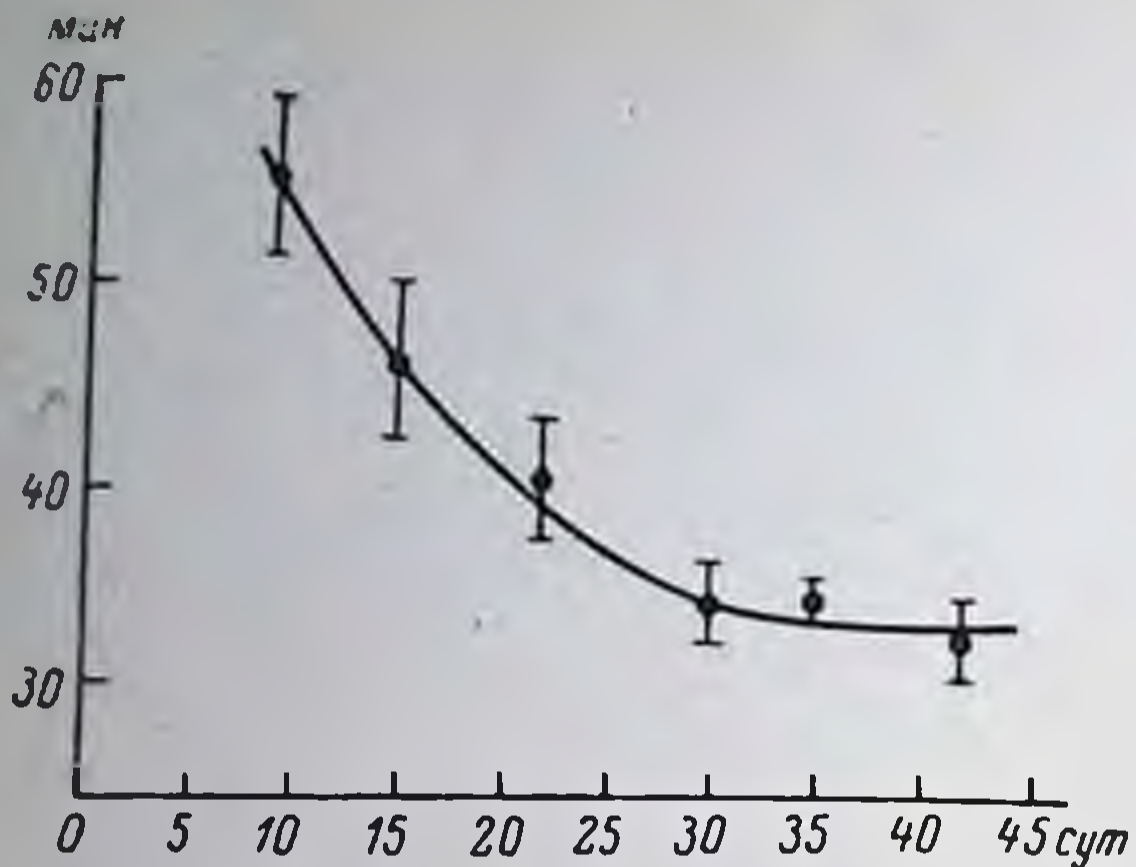


Рис. 1. Уменьшение теплоустойчивости мышечных волокон в раннем постнатальном онтогенезе белых крыс.

По оси ординат — продолжительность переживания длинного разгибателя пальцев при температуре 44°С; по оси абсцисс — возраст животных.

тальной жизни, подтверждают это предположение. У 9-дневных крысят продолжительность переживания этой мышцы при температуре 44°С составляет около одного часа. По мере созревания животных она существенно уменьшается и к концу первого месяца достигает дефинитивных значений, которые почти вдвое ниже, чем у новорожденных (рис. 1). Следовательно, онтогенетические наблюдения приводят к тому же выводу, что и сравнительно-физиологические: в ходе дифференцировки мышечных волокон их теплоустойчивость уменьшается.

В заключение этого раздела статьи остановимся на одной работе, результаты которой, на первый взгляд, противоречат этому заключению [23]. В ней описывается не снижение, а двукратное увеличение теплоустойчивости мышечных волокон на начальных стадиях развития головастиков лягушки. Приводя этот результат, автор проявляет определенную осторожность и связывает изменения теплоустойчивости волокон не с их дифференцировкой, а с возрастанием линейных размеров животных. Однако и для этого вывода, по нашему мнению, у автора нет достаточных оснований. Особенностью головастиков является чрезвычайно высокая индивидуальная изменчивость по теплоустойчивости мышечной ткани [24]; крайние значения этого признака даже у особей, относящихся к одной семье и имеющих одинаковые размеры тела, могут различаться в 16 раз [25]. На этом фоне всего лишь двукратные сдвиги теплоустойчивости волокон, обнаруженные у растущих головастиков, представляются статистически не достоверными. Поэтому возможность существования связи между размерами тела и теплоустойчивостью мышечной ткани у головастиков остается открытой для более тщательного экспериментального изучения.

Возрастание теплоустойчивости мышечных волокон при функциональных расстройствах и дедифференцировке

Одним из традиционных методов эволюционной физиологии является экспериментальная индукция различных функциональных нарушений, в результате которых органы или клетки обна-

руживают признаки регрессивного развития, т. е. претерпевают определенную дедифференцировку [3]. Напомним, что предположение о связи между теплоустойчивостью и степенью дифференцировки в мышечных волокнах впервые было высказано при изучении именно дедифференцирующейся сердечной мышцы [1]. При длительном культивировании миокарда желудочка в нем возникала спонтанная ритмическая активность, которая является характерным признаком более примитивной функциональной организации мышечных волокон. В этих условиях теплоустойчивость миокарда значительно возрастала.

Повышение теплоустойчивости мышечных волокон обнаружено при дедифференцировке не только в условиях культуры тканей, но и *in situ*. Нанесение механической травмы сердечной мышце в целом организме вызывало морфологическую дедифференцировку волокон желудочка, которая сопровождалась возрастанием их теплоустойчивости [26].

Классическим приемом, приводящим к регрессивным изменениям в мышечных волокнах, является денервация. Дедифференцировка зрелых волокон после денервации столь значительна, что по целому ряду признаков они становятся похожими на эмбриональную мышечную ткань (см. обзоры литературы [11, 12, 27, 28]). При этом теплоустойчивость мышечных волокон возрастает в несколько раз [29].

Эти данные весьма рельефно подчеркивают реципрокный характер соотношения между теплоустойчивостью и глубиной дифференцировки мышечных волокон. Если методы, рассмотренные в предыдущих разделах статьи, выявляли снижение теплоустойчивости волокон в ходе прогрессирующей дифференцировки, то метод функциональных нарушений позволяет видеть эти же процессы в обратной перспективе.

Таким образом, все три методических подхода — сравнительно-физиологический, онтогенетический и экспериментально-патологический — взаимно дополняя друг друга убедительно показывают, что одним из элементов прогрессивной дифференцировки мышечных волокон являются такие преобразования, которые снижают устойчивость волокон к повреждающему действию повышенной температуры.

СДВИГИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ В РАЗНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

В предыдущих разделах статьи были приведены доказательства того, что в процессе дифференцировки теплоустойчивость мышечных волокон снижается. При этом речь шла о волокне в целом. Между тем, каждое мышечное волокно (как и любая другая клетка) — это единица, состоящая из нескольких различных по своему функциональному назначению систем — системы энерге-

тического обмена, электрогенной (возбудимой) системы, системы электромеханической связи, специфической сократительной системы и т. д. Каждая из этих систем «компартиментализована» в соответствующем субклеточном образовании и обладает известной автономностью. Было бы очень заманчиво обсудить вопрос о том, как изменяется теплоустойчивость всех этих систем при дифференцировке или дедифференцировке мышечного волокна как единого целого. Имеющийся сегодня экспериментальный материал позволяет конспективно рассмотреть этот вопрос пока лишь в отношении трех функциональных систем — сократительной, электромеханической и возбудимой.

Сократительная система

Результаты количественной оценки теплоустойчивости фибриллярных белков и самих фибрилл из мышечных волокон разных типов содержатся в работах многих авторов. Они хорошо согласуются друг с другом и не вызывают каких-либо сомнений в их достоверности.

Судя по утрате растворимости при нагреве, у теплокровных животных актомиозин из сердечной мышцы примерно на 4°C более устойчив, чем актомиозин из скелетных мышц [30]. Такие же данные получены на актомиозине из сердечной и скелетных мышц холоднокровных животных [30]. Более высокая теплоустойчивость актомиозина из сердечной мышцы выявляется и в том случае, когда в качестве критерия денатурации используют утрату не растворимости, а АТФазной активности [30].

Очищенная миозиновая АТФаза из гладких мышц имеет более высокий температурный оптимум активности и более высокую теплоустойчивость, чем аналогичный препарат из скелетных мышц [31, 32]. Гладкие мышцы обладают и более теплоустойчивой актомиозиновой АТФазой [33].

Для подавления сократительного ответа на добавление АТФ в изолированных тонических фибриллах требуется температура на 8° выше, чем для инактивации фибрилл из фазных волокон [34].

Количественный анализ этих данных позволяет расположить различные типы мышечной ткани по теплоустойчивости сократительных белков и миофибрилл в следующем порядке: гладкие мышцы внутренних органов $>$ сердечная мышца $>$ скелетные тонические волокна $>$ скелетные фазные волокна. Этот ряд в точности соответствует той последовательности, в которой осуществляется как дифференцировка самих волокон, так и совершенствование структурно-функциональной и биохимической организации их сократительной системы. Напротив, регрессивные изменения в сократительном аппарате скелетных мышечных волокон, вызванные денервацией, включают, в частности, резкое возрастание теплоустойчивости миозиновой АТФазы [35].

Таким образом, по мере дифференцировки сократительного аппарата его теплоустойчивость, а также теплоустойчивость составляющих его белков, снижаются.

Система электромеханической связи

Сведения о теплоустойчивости ЭМС в мышечных волокнах разных типов ограничиваются пока лишь только одной работой, выполненной В. В. Васильевой в нашей лаборатории [36]. Для измерения устойчивости ЭМС она применила очень простой, но вполне адекватный метод, основанный на способности кофеина избирательно активировать эту связь в мышечных волокнах. Для облегчения проникновения кофеина внутрь волокон с них предварительно снималась саркоlemma, и дальнейшая работа проводилась на так называемых «skinned fibres». Используя этот препарат, В. В. Васильева определяла пороговые термические воздействия, необходимые для необратимого подавления кофеиновой контрактуры в фазных и тонических волокнах травяной лягушки. Как известно, фазные волокна обладают очень сильно развитым саркоплазматическим ретикулумом, который является структурной основой ЭМС. Напротив, тонические волокна значительно беднее фазных по содержанию элементов саркотубулярной сети [37, 38]. Активность Са-аккумулирующих механизмов саркоплазматического ретикула в тонических волокнах также намного ниже, чем в фазных [39]. Оказалось, что в тонических волокнах ЭМС выдерживает прогрев при температуре 47° в течение 100 мин. В фазных волокнах за это же время она необратимо инактивируется уже при температуре 39° . Судя по этим (к сожалению, пока единственным) данным, совершенствование системы электромеханической связи в мышечных волокнах сопровождается снижением ее теплоустойчивости.

Возбудимая система

Морфологической основой возбудимой системы клетки является поверхностная плазматическая мембрана. В мышечных волокнах эта система включает, по крайней мере, два компонента — холинергический и электрогенный, которые могут различаться по своей теплоустойчивости [40].

Имеющиеся данные позволяют сравнить теплоустойчивость холинергического (холинорецептивного) компонента возбудимой системы в различных типах мышечных волокон лягушки. Наиболее высокая устойчивость холинорецепторов обнаружена пока в волокнах миокарда желудочка; для их необратимой инактивации необходимо действие температуры 40° в течение 4 мин [41]. Теплоустойчивость холинорецепторов в тонических волокнах из прямой мышцы живота примерно на 1° ниже. Еще более низка устойчивость холинорецепторов в волокнах из портняжной и кожно-

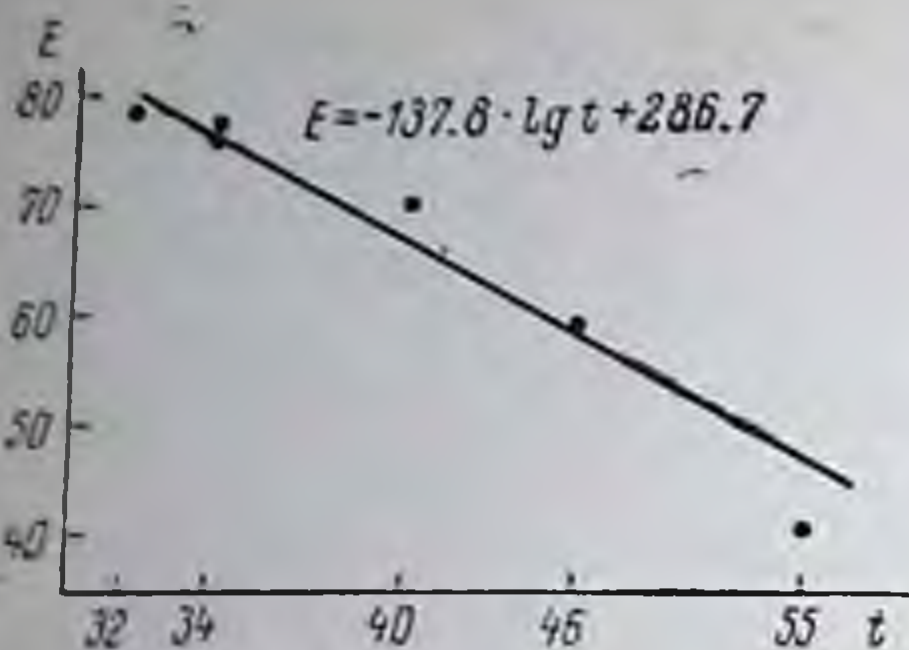


Рис. 2. Соотношение между мембранным потенциалом покоя и теплоустойчивостью в волокнах длинного разгибателя пальцев у растущих белых крыс.

По оси ординат — мембранный потенциал (—мв; по данным Хазелвуда и др. [45]); по оси абсцисс — продолжительность переживания волокон при температуре 44° С (мин, шкала логарифмическая; по данным рис. 1).

Наклон прямой рассчитан методом наименьших квадратов.

грудной мышц, которые являются типичными фазными [42]. Напомним, что дифференцировка холинэргического компонента, проявляющаяся в повышении специфичности холинорецепции поверхностной мембраны, углубляется в ряду гладкие висцеральные мышцы—миокард—тонические волокна—фазные волокна (см. обзор литературы [43]). Поэтому приведенные данные указывают на снижение теплоустойчивости холинэргического компонента по мере его прогрессирующей дифференцировки.

Дифференцировка электрогенного компонента возбудимой системы заключается прежде всего в увеличении избирательности ионной проницаемости мембраны и в возрастании полярной асимметрии клеток, вследствие чего разность электрических потенциалов между клеткой и средой (мембранный потенциал покоя) также возрастает. Как показывает большой сравнительно-физиологический материал, с повышением величины мембранного потенциала покоя теплоустойчивость мышечных волокон снижается [44]. Реципрокные отношения между теплоустойчивостью и мембранным потенциалом покоя обнаружены также в денервированных волокнах [29]. Наконец, отрицательный характер связи между МПП и теплоустойчивостью в мышечных волокнах выявляется при сопоставлении сдвигов этих показателей в раннем постнатальном онтогенезе. Это видно из рис. 2, построенного по результатам измерения теплоустойчивости волокон в настоящей работе (рис. 1) и литературным данным об увеличении их МПП у растущих животных [45].

Таким образом, дифференцировка как холинэргического, так и электрогенного компонентов возбудимой системы сопровождается снижением их теплоустойчивости.

Синхронность, однозначность и взаимная пропорциональность изменений теплоустойчивости в разных функциональных системах

При анализе приведенного в настоящем разделе статьи материала обращает на себя внимание не столько самый факт изменения теплоустойчивости в разных функциональных системах мы-

шечных волокон в ходе их дифференцировки. В конце концов, почему бы не изменяться теплоустойчивости этих систем, если при дифференцировке меняются их и структурные, и функциональные, и биохимические показатели? Наибольшее внимание привлекает самый характер сдвигов теплоустойчивости в этих системах.

Во-первых, как видно из приведенного материала, при дифференцировке (или дедифференцировке) теплоустойчивость разных функциональных систем мышечных волокон изменяется одновременно, синхронно. В доступной литературе нам не удалось найти указаний о том, что в дифференцирующихся мышечных волокнах теплоустойчивость у одних функциональных систем может изменяться, в то время как у других систем она остается прежней. Судя по всему, сдвиги теплоустойчивости в разных функциональных системах взаимообусловлены и сопряжены друг с другом.

Во-вторых, сдвиги теплоустойчивости в разных системах имеют один знак — при дифференцировке устойчивость систем снижается, при дедифференцировке возрастает. Об этом убедительно свидетельствует весь рассмотренный выше материал.

В-третьих, по своей величине сдвиги теплоустойчивости в разных функциональных системах пропорциональны друг другу. Особенно четко это видно при сопоставлении мышечных волокон разных типов. Теплоустойчивость какой бы системы мы ни рассматривали, волокна разных типов располагаются по этому признаку всегда в одной и той же последовательности: гладкие висцеральные волокна — миокард — скелетные волокна. Как показывают приведенные в этом разделе данные, теплоустойчивость всех функциональных систем снижается в этом ряду слева направо и возрастает в обратном порядке. Если бы эти системы различались по величине сдвига своей теплоустойчивости, последовательность расположения мышечных волокон в этом ряду изменялась в зависимости от того, какую систему мы рассматриваем.

При анализе этих данных складывается впечатление, что в мышечных волокнах имеется какой-то специальный механизм, который координирует изменения теплоустойчивости в разных функциональных системах при дифференцировке мышечных волокон. Вероятно, именно этот механизм обеспечивает тотальный характер дифференцировки мышечного волокна как целого, контролируя направление (знак) и глубину дифференцировки каждой из входящих в его состав функциональных систем. В результате волокна, обладающие хорошо развитой какой-либо одной системой (например, фазные волокна с высокой специфичностью хеморецепции), непременно имеют столь же хорошо развитые остальные системы. Напротив, низкому уровню развития, например, системы ЭМС в гладкомышечных висцеральных волокнах соответствует и относительно несовершенная организация в них сократительного аппарата, и низкая величина мембранного потенциала покоя, и высокая неспецифичность хеморецепции. В этом отношении клеточный уровень, по-видимому, существенно отличается от орга-

изменного, где разные функциональные системы могут развиваться «вразброд». Например, особи одного вида могут иметь более острое зрение, но слабо развитую слуховую систему по сравнению с особями другого вида.

Мы пока еще не знаем, как работает этот механизм, обеспечивающий сопряженные изменения теплоустойчивости разных функциональных систем мышечных волокон при дифференцировке. Однако самая идея о существовании этого механизма гармонирует с современными представлениями о блочной, или координированной, депрессии генов при гетеросинтезе, в результате чего в дифференцирующихся клетках в строй вступают не отдельные ферменты, а их наборы (clusters), полностью обеспечивающие осуществление той или иной клеточной функции. Эти представления сейчас очень популярны, и они нашли отражение в работе данной школы [46, 47]. Быть может, принцип координированного гетеросинтеза и лежит в основе сопряженных изменений теплоустойчивости разных функциональных систем в дифференцирующихся мышечных волокнах. Во всяком случае, синхронность, однозначность и взаимная пропорциональность сдвигов теплоустойчивости в этих системах делают эти сдвиги интригующей моделью для изучения регуляции мюогенеза. Первые шаги в этом направлении [48, 49] дают основание надеяться на успех.

О БИОЛОГИЧЕСКОМ СМЫСЛЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН ПО ПРИЗНАКУ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ

Действительно, — зачем мышечным волокнам при дифференцировке нужно менять свою теплоустойчивость? Используют ли работающие в одном и том же организме зрелые мышечные волокна разных типов свою неодинаковую теплоустойчивость? Несмотря на кажущуюся простоту, эти вопросы достаточно каверзные, однако их решение является необходимым шагом в понимании природы тех факторов, которые контролируют формирование теплоустойчивости клеток вообще и мышечных волокон в частности.

Теплоустойчивость представляет универсальный признак, которым обладают все без исключения объекты. Трудность состоит в том, чтобы понять каждый раз, является ли этот признак для данного объекта функциональным, т. е. имеющим отношение непосредственно к температуре окружающей среды и управляемым ею. Альтернативная возможность заключается в том, что этот признак в силу своей универсальности произвольно выбран экспериментатором и не лимитируется температурными условиями, в которых функционирует данный объект. Поясним эту мысль на примере оптической плотности клеток. Десятки исследователей работают с этим признаком, но едва ли у кого-то из них возникает идея связать возможные сдвиги оптической плотности в развиваю-

щихся мышечных волокнах со световым режимом их активности или с длиной волны падающего на них света. Поскольку в организме мышцы не подвергаются прямому действию света, постановка этого вопроса лишена биологического смысла, и в данном случае оптическая плотность является произвольно выбранным методическим признаком. В то же время для роговицы или сетчатки глаза этот признак имеет непосредственное функциональное значение, так как их активность зависит от оптической плотности *per se*. Возвращаясь к теплоустойчивости, попытаемся обсудить, в какой мере изменения этого признака при дифференцировке мышечных волокон являются функциональными, имеющими прямое отношение к температурным условиям их работы.

Дифференцировка и температурный режим работы мышц

Поскольку все процессы в природе зависят от температуры, любые свойства мышечных волокон, включая теплоустойчивость, должны соответствовать тем конкретным температурным условиям, в которых эти волокна работают *in situ*. Опыты на млекопитающих показывают, что теплоустойчивость мышц действительно зависит от локальной температуры в организме — устойчивость тем выше, чем выше температура в данной участке тела. Например, у глубоколежащих и поэтому имеющих более высокую температуру внутренних межреберных мышц теплоустойчивость примерно на 2° выше, чем у поверхностно расположенной и более «холодной» передней большеберцовой мышцы [50]. Результаты этой единственной в своем роде работы позволяют заключить, что дифференцировка мышечных волокон по теплоустойчивости может иметь прямое отношение к особенностям температурного режима их деятельности.

При желании можно усмотреть некоторую логику и в более высокой теплоустойчивости мышечной ткани у новорожденных млекопитающих. У них механизмы поддержания температуры тела на постоянном уровне еще несовершенны. Например, у крыс созревание температурного гомеостаза заканчивается лишь к концу первого месяца постнатальной жизни [51]; к этому же времени теплоустойчивость их мышц снижается до дефинитивных значений (рис. 1). Поэтому высокую устойчивость мышц у новорожденных можно рассматривать как защитный феномен, оберегающий их от перегрева в тот период онтогенеза, когда животные еще не способны самостоятельно регулировать температуру тела.

Этими двумя примерами исчерпываются те известные случаи, когда изменения теплоустойчивости при дифференцировке мышечной ткани можно поставить в прямую связь с температурными условиями *in situ*. Однако эти примеры не объясняют, почему находящиеся в одной и той же мышце и, следовательно, работающие в идентичных температурных условиях фазные и тонические

волокна имеют разную теплоустойчивость. Едва ли есть основания говорить и о существенных температурных градиентах внутри сердечной мышцы; тем не менее, разные отделы миокарда имеют неодинаковую устойчивость к нагреву. Точно так же нет никаких оснований связывать сдвиги теплоустойчивости в денервированных мышцах с гипотетическими изменениями их температурного режима. Наконец, неоднократно упоминавшиеся ранее дифференцировка и повышение теплоустойчивости волокон миокарда в культуре имели место на фоне постоянной температуры и, таким образом, не лимитировались ею [1].

Имея в виду эти две неравные по объему и противостоящие друг другу по смыслу две группы данных, приходится заключить, что формирование теплоустойчивости мышечных волокон во время дифференцировки контролируют как температурный, так и нетемпературные факторы. Температурный фактор контролирует становление в мышечных волокнах теплоустойчивости как таковой, приводя ее в количественное соответствие с теми локальными температурными условиями, в которых волокна находятся и работают *in situ*. Ясно, что при этом теплоустойчивость выступает как функциональный признак, непосредственно соотносящийся с температурой. Однако значительно более мощное влияние на теплоустойчивость дифференцирующихся мышечных волокон оказывают другие, не температурные факторы их развития. Эти факторы контролируют формирование не теплоустойчивости *per se*, а каких-то иных свойств волокон. При развитии этих свойств в ходе мезогенеза теплоустойчивость волокон изменяется побочно, и поэтому в данном случае она выступает не как функциональный, а как произвольный методический признак, позволяющий косвенно оценивать изменения этих свойств при дифференцировке волокон.

Прежде чем перейти к обсуждению возможной связи между этими свойствами и теплоустойчивостью в мышечных волокнах, представляется целесообразным рассмотреть ряд примеров, которые наглядно показывают, что нетемпературные влияния действительно могут эффективно контролировать теплоустойчивость.

Нетемпературная регуляция теплоустойчивости мышечных волокон, моделей и белков

В основе определения теплоустойчивости клеток лежит их необратимое повреждение под влиянием нагрева. Поэтому любые повреждающие воздействия — механические, химические, электрические и т. д. — в принципе могут суммироваться с температурным повреждением, используемым для измерения теплоустойчивости мышечных волокон. Ясно, что на фоне дополнительного повреждающего воздействия эффект нагрева будет более сильным, вследствие чего теплоустойчивость волокон окажется более низкой, чем при отсутствии такого воздействия. Очевидно, в этих

случаях имеет место неспецифическое снижение устойчивости в результате аддитивного действия двух или более повреждающих агентов, одним из которых является тепло.

Следует специально подчеркнуть, что далеко не всякое повреждение мышечных волокон снижает их теплоустойчивость. Например, одним из последствий механического повреждения волокон миокарда является не снижение, а повышение теплоустойчивости [26]. Резкое увеличение теплоустойчивости мышечных волокон отмечается и при таких видах нарушения их функций, как острая [52] или хроническая [29] денервация. Более того, некоторые (казалось бы, очень сильные) травмы мышечной ткани вообще не изменяют ее устойчивости к нагреву. Удивительный пример этого — отсутствие достоверных сдвигов теплоустойчивости в скелетных мышцах крысы после перерезки сухожилия и развившейся в результате атрофии мышц [29]. Отнюдь не предрешая вопрос о возможности суммирования повреждающего действия тепла и нетемпературных влияний, отметим лишь, что последние могут не только снижать, но и повышать теплоустойчивость мышечных волокон.

Регулирующий эффект нетемпературных влияний на теплоустойчивость мышечной ткани проявляется как в системе целого организма, так и на изолированных мышцах. Изменения теплоустойчивости мышечных волокон в целом организме могут быть индуцированы гормональными инъекциями [53, 54, 58], изменениями осмотичности среды [55], различными стрессорными нагрузками [56, 57] и некоторыми другими нетемпературными воздействиями [52]. Сдвиги теплоустойчивости в изолированных мышцах отмечались под влиянием таких различных по своей физической природе факторов, как изменение ионного состава среды [59], растяжение [60], оксигенация физиологического раствора [61], замена в нем обычной воды на тяжелую [62], содержание в условиях тканевой культуры [1] и т. д. Хотя знак и механизмы изменения теплоустойчивости мышечных волокон под влиянием этих факторов могут быть разными, общим для этих изменений является то, что все они вызваны нетермическими воздействиями и осуществляются в условиях постоянной температуры. Это означает, что непосредственной мишенью этих воздействий является не теплоустойчивость, а иной или иные, функционально не связанные с температурой (и, возможно, разные для разных факторов) признаки мышечных волокон. Иными словами, изменения теплоустойчивости волокон представляют всего лишь побочный продукт изменения этих признаков.

Нетемпературные воздействия способны изменять теплоустойчивость не только целых мышечных волокон, но и их глицеринизированных моделей, а также индивидуальных мышечных белков. Например, смена H_2O на D_2O в среде повышает теплоустойчивость самих волокон [62, 63], их моделей [63] и актомиозиновой АТФазы [64]. Аналогичным образом изменяется теплоустойчивость

волокон и моделей при растяжении [60, 65]. Многочисленные сведения об изменениях теплоустойчивости различных белков, включая мышечные, под влиянием сдвигов рН, ионного состава и других нетемпературных факторов среды можно найти в монографии Жолт [66]. Одним из примеров таких изменений является стабилизация белков путем присоединения к ним разного рода лиганд или с помощью других способов ограничения их конформационной подвижности [67—70].

Таким образом, нетемпературные факторы среды способны как повышать, так и снижать теплоустойчивость мышечных волокон, причем сдвиги теплоустойчивости под влиянием этих факторов реализуются на всех уровнях организации волокон начиная с молекулярного.

Сдвиги теплоустойчивости мышечных волокон как побочный результат изменений электрогенных свойств их поверхностной мембраны

Мысль о том, что изменения теплоустойчивости мышечных волокон при дифференцировке не имеют адаптивного по отношению к температуре среды значения, была высказана уже в первой работе, обнаружившей эти изменения [1]. В более общей форме эта же мысль позднее была развита В. Я. Александровым [71, 72], который считает, что у многоклеточных животных изменения теплоустойчивости клеток в подавляющем большинстве случаев не имеют приспособительного смысла. Согласно В. Я. Александрову, уровень теплоустойчивости клеток и клеточных белков «... количественно сопряжен с какими-то свойствами белковых молекул, которые крайне существенны для полноценного их функционирования. . . Сдвиги в этих свойствах нами и диагностируются при испытании прочности белка и клеток к действию сильных перегревов. Следовательно, задача сводится к отысканию этих свойств белковых молекул, сопряженных с их устойчивостью к тепловой денатурации» [72, стр. 147]. Решение этой задачи В. Я. Александров видит в том, что под непосредственным контролем факторов внешней среды находится не теплоустойчивость, а конформационная гибкость белковых молекул; приспособительное значение для организма и его клеток в онто- и филогенезе имеет сдвиг конформационной гибкости протоплазматических белков, а не какого-либо другого их параметра. «Изменение же теплоустойчивости клеток и белков следует признать лишь внешним отражением этого сдвига» [72, стр. 181].

Детальное обсуждение молекулярных механизмов изменений теплоустойчивости в развивающихся мышечных волокнах не является задачей настоящей статьи. Однако отметим, что если исходить из гипотезы В. Я. Александрова, то сдвиги теплоустойчивости волокон в ходе миогенеза представляют побочный ре-

зультат изменений конформационной гибкости мышечных белков. Проверить это заключение, к сожалению, пока не удастся. «В настоящее время мы не располагаем методом, который дал бы возможность количественно определить степень конформационной гибкости белковой макромолекулы» [72, стр. 172].

Гипотеза В. Я. Александрова удовлетворительно объясняет в первом приближении биологический смысл изменений теплоустойчивости клеток только на молекулярном уровне их организации. Однако она оставляет без ответа вопрос о том, изменения каких клеточных свойств отражаются в сдвигах теплоустойчивости клетки как целого. Другими словами, в рамках этой гипотезы остается неясным, с изменениями каких признаков, контролируемых нетемпературными факторами мютогенеза, сопряжены изменения теплоустойчивости мышечных волокон. Последующее изложение представляет попытку ответить на этот вопрос.

Если температурный фактор может непосредственно контролировать только теплоустойчивость (точнее, температурный оптимум жизнедеятельности) клеток, то нетемпературные факторы развития регулируют все остальные клеточные признаки. Среди многочисленных биохимических, морфологических и физиологических признаков, формирующихся под воздействием нетемпературных факторов мютогенеза, нас интересуют только те, изменения которых отражаются на теплоустойчивости мышечных волокон.

Существенным подспорьем в поисках этих признаков являются данные о неодинаковой теплоустойчивости разных функциональных систем в мышечных волокнах. Наиболее высокой устойчивостью к нагреву обладают сократительная система и электро-механическая связь [18, 73—75]. Поэтому их тепловая инактивация не может лимитировать теплоустойчивость волокна как целого. Не может быть причиной тепловой гибели волокна и избирательная инактивация его дыхательной системы: как известно, мышечные волокна способны длительное время работать в анаэробных условиях, тогда как достаточно интенсивные тепловые воздействия необратимо повреждают целые волокна в течение считанных секунд. Эти данные указывают на неодинаковый вклад различных функциональных систем в формирование теплоустойчивости мышечных волокон. Теплоустойчивость волокна как целого определяется устойчивостью не всех его функциональных систем и не любой из них, а только той, которая обладает самой высокой чувствительностью к нагреву. Этой наиболее термолабильной системой является поверхностная возбудимая мембрана мышечных волокон ([42, 76, 77], см. также обзоры литературы [40, 78]). Поэтому причину сдвигов теплоустойчивости волокон при дифференцировке следует искать в изменениях свойств их возбудимой мембраны. К аналогичному заключению приводят и некоторые другие косвенные данные [79].

Одним из проявлений связи между теплоустойчивостью мышечных волокон и свойствами их возбудимой мембраны служит упо-

минавшаяся ранее зависимость устойчивости волокон от величины их мембранного потенциала покоя. Существование этой зависимости подтверждается всеми методами эволюционной физиологии — сравнительным [44], экспериментально-патологическим [29] и онтогенетическим (рис. 2). Как видно из этого рисунка, соотношение между теплоустойчивостью и МПП в волокнах является отрицательным и приближается к линейному — чем выше потенциал, тем ниже устойчивость. Напомним, что по своей электрохимической природе МПП является концентрационным потенциалом, он обусловлен неодинаковым содержанием ионов K внутри и снаружи мышечных волокон (см. обзор литературы [80]). Это делает понятным отрицательный характер связи между теплоустойчивостью и МПП: чем больше ионная асимметрия мышечных волокон, тем более неравновесны они в термодинамическом отношении и тем менее устойчивы к термическому повреждению. Таким образом, выигрывая в электрогенезе, мышечные волокна закономерно проигрывают в теплоустойчивости.

Как следует из этих данных, сдвиги теплоустойчивости мышечных волокон при дифференцировке сопряжены в первую очередь с изменениями электрогенных свойств их поверхностной мембраны. В процессе миогенеза нетемпературные факторы контролируют становление пассивной проницаемости мембраны к ионам [81], активность электрогенных насосов, а также другие механизмы, обеспечивающие создание ионной асимметрии [82] и электрического градиента на мембране мышечных волокон (см. обзоры литературы [83, 84]). Молекулярной основой изменения этих мембранных характеристик являются, очевидно, такие превращения, которые одновременно изменяют устойчивость мембраны и, следовательно, устойчивость самих мышечных волокон к повреждающему действию тепла.

Итак, согласно предлагаемой гипотезе, сдвиги теплоустойчивости мышечных волокон при дифференцировке или дедифференцировке представляют побочный результат изменений электрогенных свойств поверхностной мембраны волокон. Это вовсе не означает, что нетемпературные факторы миогенеза изменяют теплоустойчивость волокон путем прямого воздействия только на мембрану. Непосредственной мишенью этих факторов могут быть (и, несомненно, являются) все функциональные системы мышечных волокон. Развитие этих систем, как мы видели, также сопровождается побочными сдвигами их устойчивости к теплу. В силу однозначности и синхронности изменений в разных системах (см. об этом с. 252 — 254), сдвиги в любой из них повлекут за собой соответствующие преобразования во всех остальных системах, включая возбудимую, т. е. ту, которая определяет теплоустойчивость целого волокна. Однако в любом из этих случаев теплоустойчивость самих волокон изменяется на основе таких превращений, которые обязательно включают изменения электрогенных свойств возбудимой мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За 20 лет, прошедших после первого обнаружения связи между дифференцировкой мышечных волокон и их устойчивостью к повреждающему действию тепла, накопилось много новых экспериментальных данных. Рассмотренный материал позволяет утверждать, что в ходе миогенеза изменяется теплоустойчивость как самих волокон, так, по-видимому, и всех входящих в их состав функциональных систем — возбудимой, сократительной, электро-механической связи и т. д. По своему характеру соотношение между теплоустойчивостью и дифференцировкой является отрицательным: чем выше степень структурной, физиологической и биохимической организации целых волокон или их отдельных функциональных систем, тем ниже их устойчивость к термическому повреждению. Таким образом, в ходе дифференцировки мышечные волокна и их функциональные системы становятся все более и более термодинамически неравновесными.

Сопряженные сдвиги теплоустойчивости и дифференцировки выявлены на большом сравнительном, экспериментально-патологическом и онтогенетическом материалах и в этом смысле они являются закономерными, не имеющими исключений. Это создает реальные предпосылки для использования теплоустойчивости в качестве объективного количественного критерия дифференцировки мышечных волокон в целом и каждой из их функциональных систем в отдельности.

Дифференцировка мышечных волокон по признаку теплоустойчивости осуществляется под воздействием как температурного, так и нетемпературных факторов развития. Одной из главных задач настоящего обзора было выявить и обсудить творческую роль нетемпературных факторов в формировании теплоустойчивости волокон. Эта роль очень важна. Контролируя непосредственно нижний предел электрогенной функции в мышечных волокнах, нетемпературные факторы одновременно побочно регулируют верхний предел их теплоустойчивости [25, 79]. Значительно меньше внимания в обзоре уделено температурной регуляции теплоустойчивости волокон. Помимо общего влияния, которое оказывает температура на процесс развития [85], она специфически контролирует нижний предел [25, 79] температурных оптимумов всех клеточных функций и тем самым — нижний предел теплоустойчивости всех клеток, включая мышечные волокна. При этом температура побочно, опосредованно (подобно тому, как это делают нетемпературные факторы в отношении теплоустойчивости) может влиять на развитие многих отнюдь не термических характеристик, начиная от электрогенных свойств клеток [78] и кончая размерами целого животного [86] или его отдельными морфологическими признаками [87].

С учетом миогенной тематики настоящего сборника, в представленном обзоре связь между теплоустойчивостью и дифференциров-

кой прослежена только в мышечных волокнах. Однако многие высказанные здесь тезисы можно дополнительно аргументировать сведениями, полученными при изучении клеток других типов. Например, участие нетемпературных факторов в регуляции теплоустойчивости показано недавно на эпителиальных клетках многоклеточных животных [88, 89], на простейших [90, 91] и даже в прусах [92]. Сопряженность между электрогенезом и теплоустойчивостью имеет место также во всех исследованных клетках независимо от их гистологического профиля [78]. Наконец, изменение полного гомеостаза (и, следовательно, связанного с ним электрогенеза) является одним из способов регуляции дифференцировки не только мышечных волокон, но и немускульных клеток [93]. Поэтому можно думать, что подробно рассмотренное здесь соотношение между дифференцировкой и теплоустойчивостью в мышечных волокнах представляет частный вариант общего феномена, свойственного всем живым клеткам.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Румянцев П. П. — Цитология, 1961, 3 : 675.
- [2] Оленов Ю. М. Клеточная наследственность, дифференцировка клеток и канцерогенез как проблемы эволюционной генетики. Л., Наука, 1967.
- [3] Орбели Л. А. Избр. тр. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1961, 1 : 59.
- [4] Хлопин Н. Г. — Физиол. журн., СССР, 1950, 36 : 129.
- [5] Итина Н. А. — В кн.: Проблемы эволюции физиологических функций. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1958 : 87.
- [6] Жуков Е. К. Очерки по нервно-мышечной физиологии. Л., Наука, 1969.
- [7] Кнорре А. Г. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981 : 6.
- [8] Орбели Л. А. Избр. тр. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1961, 1 : 183.
- [9] Гинециский А. Г. Химическая передача нервного импульса и эволюция мышечной функции. Л., Наука, 1970.
- [10] Жуков Е. К., Ушаков В. Б. — В кн.: Достижения современной физиологии нервной и мышечной системы. М.—Л., Наука, 1965 : 28.
- [11] Wittemberger C. Evoluția funcției musculare la vertebrate. Bucuresti, 1971.
- [12] Жуков Е. К., Итина Н. А., Магазаник Л. Г., Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А., Свидерский В. Л., Скоробовичук Н. Ф., Ушаков В. Б. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. Л., Наука, 1974.
- [13] Верноп Н. М. — J. Physiol., 1899, 24 : 239.
- [14] Orr P. R. — Physiol. Zool., 1955, 28 : 294.
- [15] Александров С. Н., Галковская К. Ф., Лозина-Лозинский Л. К. — Цитология, 1960, 2 : 442.
- [16] Ушаков В. Б. — Цитология, 1961, 3 : 418.
- [17] Лукьяненко В. И., Николаев Л. Е. — В кн.: Изменяемость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. Л., Наука, 1967 : 149.
- [18] Васильева В. В. — Цитология, 1970, 12 : 59.
- [19] Ушаков В. Б. — Цитология, 1970, 12 : 602.
- [20] Джамусова Т. А. — Экология, 1971, № 5 : 53.
- [21] Кусакина А. А. — Цитология, 1963, 5 : 88.
- [22] Ушаков В. Б. — Физиол. журн. СССР, 1965, 51 : 388.
- [23] Чернокожева И. С. — Онтогенез, 1972, 3 : 596.

- [24] Ушаков Б. П., Чернокожева И. С. — Цитология, 1963, 5 : 238.
- [25] Ушаков В. Б., Васильева В. В. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1976, 12 : 595.
- [26] Румянцев П. П. — В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., Наука, 1964 : 171.
- [27] Gutman E. (Ed.) The denervated muscle. Prague, 1962.
- [28] Guth L. — Physiol. Rev., 1968, 48 : 645.
- [29] Ушаков В. Б. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1979, 15 : 414.
- [30] Браун А. Д., Несветаева Н. М., Фиженко Н. В. — Цитология, 1963, 5 : 335.
- [31] Заалишвили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности. Тбилиси, Мецниереба, 1971.
- [32] Данилова В. М. — В кн.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л., Наука, 1978 : 76.
- [33] Браун А. Д., Мпрович Н. И. — Вопр. мед. химии, 1956, 2 : 188.
- [34] Васильева В. В. — Цитология, 1972, 14 : 598.
- [35] Маньковська І. М. — Физиол. журн. АН УРСР, 1968, 14 : 543.
- [36] Ушаков В. Б. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1977, 13 : 579.
- [37] Reachey L. D., Huxley A. F. — J. Cell Biol., 1962, 13 : 177.
- [38] Page S. G. — J. Cell Biol., 1965, 26 : 477.
- [39] Есырев О. В., Усманова Ж. К., Князевская И. Б. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1976, 12 : 309.
- [40] Ушаков В. Б. — В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.—Л., Наука, 1965 : 55.
- [41] Турпаев Т. М. Медиаторная функция ацетилхолина и природа холинорецептора. М., Изд-во АН СССР, 1962.
- [42] Ушаков В. Б. — В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.—Л., Наука, 1965 : 70.
- [43] Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. Ацетилхолин. О молекулярном механизме действия. Л., Наука, 1970.
- [44] Ушаков В. Б. — Журн. эвол. биохим. и физиол., 1969, 5 : 547.
- [45] Hazlewood C. F., Nichols V. L. — The John Hopkins Med. J., 1969, 125 : 119.
- [46] Лызлова С. Н. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981 : 115.
- [47] Пинаев Г. П. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981 : 75.
- [48] Кусакина А. А., Глушанкова М. А., Коробцова Н. С., Нейфах А. А. — Онтогенез, 1974, 5 : 264.
- [49] Абрамова И. Б., Клячко О. С., Нейфах А. А. — Онтогенез, 1978, 9 : 291.
- [50] Схолль Е. Д. — В кн.: Проблемы цитозологии животных. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1963 : 163.
- [51] Conklin P., Heggeness F. W. — Amer. J. Physiol., 1971, 220 : 333.
- [52] Пашкова И. М. — В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.—Л., Наука, 1965 : 178.
- [53] Пашкова И. М. — Журн. общ. биол., 1962, 23 : 313.
- [54] Пашкова И. М. — В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., Наука, 1964 : 155.
- [55] Ивлева И. В. — В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л., Наука, 1964 : 158.
- [56] Пашкова И. М. — ДАН СССР, 1962, 144 : 1425.
- [57] Ушаков Б. П. — Цитология, 1970, 12 : 602.
- [58] Шляхтер Н. А. — Цитология, 1961, 3 : 95.
- [59] Бандас Е. Л., Бобович М. А. — Цитология, 1961, 3 : 100.
- [60] Ганелица Л. Ш. Влияние растяжения мышц на их устойчивость к повреждающим воздействиям. Автореф. дис., Л., 1963.
- [61] Схолль Е. Д. — В кн.: Проблемы цитозологии животных. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1963 : 220.

- [62] Дещеревский В. И., Корняпепко И. А. — Биофизика, 1964, 9 : 315.
- [63] Дещеревский В. И. — Биофизика, 1965, 10 : 708.
- [64] Александров В. Я., Арронет Н. И., Денъко Е. И., Константинова М. Ф. — Цитология, 1964, 6 : 667.
- [65] Ганелла Л. Ш. — Цитология, 1962, 4 : 223.
- [66] Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М., Мир, 1968.
- [67] Мартинек К., Клпбанов А. М., Чернышева А. В., Березин И. В. — ДАН СССР, 1975, 223 : 233.
- [68] Мартинек К., Гольдмахер В. С., Клпбанов А. М., Торчилин В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И., Березин И. В. — ДАН СССР, 1976, 228 : 1468.
- [69] Мартинек К., Гольдмахер В. С., Торчилин В. П., Мишин А. А., Смирнов В. Н., Березин И. В. — ДАН СССР, 1978, 239 : 227.
- [70] Мартинек К., Торчилин В. П., Максименко А. В., Смирнов В. Н., Березин И. В. — ДАН СССР, 1979, 247 : 1505.
- [71] Александров В. Я. — Успехи совр. биол., 1965, 60 : 28.
- [72] Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л., Наука, 1975.
- [73] Ушаков В. Б., Васильева В. В. — В кн.: Биофизика клетки. М., Наука, 1965 : 131.
- [74] Ушаков В. Б. — Цитология, 1966, 8 : 96.
- [75] Ушаков В. Б., Васильева В. В., Николаева Е. Н. — Цитология, 1971, 13 : 311.
- [76] Ушаков В. Б., Филиановская Т. Л. — Биофизика, 1967, 12 : 233.
- [77] Ушаков В. Б. — Биофизика, 1968, 13 : 182.
- [78] Ушаков В. Б. — Журн. эвол. биохим. и физпол., 1972, 8 : 298.
- [79] Ушаков В. Б. — Журн. эвол. биохим. и физпол., 1974, 10 : 3.
- [80] Кегнан Р. Р. Cell potassium. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1980.
- [81] Рапопорт С. Ш., Романенко Г. И. — Биофизика, 1972, 17 : 341.
- [82] Ritchie A. K., Fambrough D. M. — J. Gen. Physiol., 1975, 66 : 327.
- [83] Лопина О. Д., Болдырев А. А. — В кн.: Проблемы многогнеза. Л., Наука, 1981 : 126.
- [84] Скоробовичук Н. Ф. — В кн.: Проблемы многогнеза. Л., Наука, 1981 : 140.
- [85] Медников Б. М. — В кн.: Внешняя среда и развивающийся организм. М., Наука, 1977 : 7.
- [86] Тгасу С. Р. — Science, 1977, 198 : 1034.
- [87] Клпменко В. В., Воробьева Л. И., Шахбазов В. Г. — ДАН СССР, 1980, 252 : 732.
- [88] Васильева В. С., Жучихина А. А., Пропп Л. Н., Сергеева Э. П. — Биология моря, 1979, № 6 : 52.
- [89] Дрегольская И. Н., Коротнева Н. В. — Журн. общ. биол., 1980, 41 : 286.
- [90] Jeon K. W., Ahn K. I. — Science, 1978, 202 : 635.
- [91] Ирлина И. С. — Цитология, 1980, 22 : 462.
- [92] Сухов К. С., Извекова Л. И., Подъяпольская Т. С., Делова И. Д. — Известия АН СССР, сер. биол., 1977, № 6 : 926.
- [93] Костенко М. А. — Успехи совр. биол., 1980, 90 : 221.

СОДЕРЖАНИЕ

От редакторов	3
Список сокращений	5
<i>А. Г. Кнорре. Происхождение и эволюция мышечных тканей</i>	6
Введение	6
Мышечные ткани соматического типа	8
Мышечные ткани целомического типа	12
Гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов	15
Мышечная ткань нейтрального происхождения	16
Миоэпидермальные клетки желез	17
Заключение	17
Литература	20
<i>П. П. Румянцев, И. Л. Ерохина. Морфологические аспекты дифференцировки и пролиферации в гистогенезе скелетных, сердечной и гладких мышц позвоночных</i>	22
Введение	22
Соматический миогенез	22
Кардиомиогенез	32
Развитие гладких мышц	41
Заключение	46
Литература	47
<i>З. А. Подлубная. Формирование сократительных структур в миогенезе</i>	51
Введение	51
Структура миофибрилл	52
Структура, компоненты и реконструкция тонкой нити	53
Структура, компоненты и реконструкция толстой нити	56
Структура М-, Z- и N-полос	60
Сборка миофибрилл в миогенезе	64
Литература	69
<i>Г. П. Пинаев. Синтез специфических сократительных белков как биохимическая основа дифференцировки миогенных клеток</i>	75
Введение	75
Смена изоформ сократительных белков в миогенезе	76
Миозин	77
Актин	79
Тропомиозин	80
Тропомины	80
Когда начинается синтез специфических сократительных белков?	80
Факторы, влияющие на смену синтеза изоформ сократительных белков	82
Проблема координированного синтеза сократительных белков в ходе миогенеза	83
Полисомы и синтез на них сократительных белков	85
	265

Миозиновая информационная РНК	85
Появление полисом и синтез информационной РНК в процессе дифференцировки	86
Смена популяций информационной РНК	87
Посттранскрипционная модификация РНК	88
Контроль на этапе трансляции	89
Образование рибонуклеопротеидных частиц	89
Факторы инициации трансляции	90
Специфические РНК, блокирующие трансляцию	91
Заключение	91
Литература	94
<i>С. Ю. Хайтлина. Изменения физико-химических свойств сократительных белков в ходе миогенеза</i>	<i>98</i>
Введение	98
Основные свойства «саркомерных» и цитоплазматических белков	98
Изменение первичной структуры и субъединичного состава сократительных белков в ходе миогенеза	101
Изменение функциональных свойств сократительных белков в ходе миогенеза	106
Миозин	106
Актин	108
Тропомиозин-тропоминовый комплекс	110
Литература	111
<i>С. Н. Лызлова. Некоторые аспекты энергетического обеспечения развивающихся мышц</i>	<i>115</i>
Введение	115
Изменения в энергетическом метаболизме при дифференцировке мышечных клеток <i>in vivo</i>	116
Изменения в энергетическом метаболизме при дифференцировке мышечных клеток <i>in vitro</i>	121
Литература	124
<i>О. Д. Лопина, А. А. Болдырев. Система электромеханической связи в развивающихся мышечных клетках</i>	<i>126</i>
Литература	138
<i>Н. Ф. Скоробовичук. Формирование функциональных свойств скелетных мышечных волокон в процессе онтогенетического развития животных</i>	<i>140</i>
Введение	140
Формирование возбудимых свойств	142
Мембранный потенциал покоя	142
Изменение пассивных электрических свойств поверхностной мембраны в процессе развития	145
Потенциал действия развивающихся мышц	146
Изменение силы и скорости сокращения скелетных мышц в ходе миогенеза	153

Заключение	156
Литература	157
<i>И. И. Разумовская, С. А. Дамбинова. Биохимические аспекты участия нервной системы в развитии и специализации скелетных мышц</i>	
	160
Введение	160
Мембранная система приема нейромедиатора	160
Внутриклеточные посредники	163
Роль инактивации в синтезе специфических белков мышц	168
Заключение	171
Литература	171
<i>Э. Г. Улумбеков. Развитие механизмов регуляции скорости сокращения мышечных волокон в миогенезе</i>	
	175
Введение	175
Молекулярные основы признака: феномены и возможные механизмы регуляции	176
Десфинитивные миозины	176
Быстрый миозин	176
Медленный миозин	178
Фосфорилирование миозина	178
Эмбриональный миозин	179
Смена миозинов в эмбриогенезе	179
Гипотезы регуляции смены миозинов	180
Гибридный миозин	181
Регуляция трансляции ЛЦЗ	181
Возможные факторы регуляции	182
Миогенные фенотипы и их пластичность	183
Литература	185
<i>И. И. Фридлянская. Использование клеточных культур для изучения миогенеза</i>	
	188
Введение	188
Техника культивирования мышечных клеток	188
Первичные культуры	188
«Чистые» популяции мышечных клеток	190
Постоянные миогенные клеточные линии	192
Дифференцировка миогенных клеток в культуре	193
Пролиферация и дифференцировка клеток	193
Экспрессия тканеспецифических особенностей мышечных клеток	196
Клональный анализ миогенеза	199
Генетический подход к изучению закономерностей миогенеза	200
Культура клеток патологических мышц	200
Генетические варианты миогенных клеточных линий	203
Гибриды миогенных клеток	204
Гибриды миогенных клеток	205
Заключение	206
Литература	206
	267

<i>Л. Д. Лиознер. Регенерация мышц</i>	209
Литература	218
<i>Ю. Б. Вахтин, И. И. Швембергер. Злокачественные миобласты скелетных мышц</i>	220
Введение	220
Кинетика роста	221
Карнотипическая гетерогенность	222
Эпигенетическая гетерогенность	225
Гетерогенность клеточных популяций рабдомиосарком по признакам с неясной наследственной обусловленностью	228
Отбор в клеточных популяциях рабдомиосарком	230
Ультраструктура опухолевых миобластов	232
Миофибриллярные структуры в опухолевых миобластах	235
Атипия миофибриллогенеза в опухолевых миобластах	238
Проблема гистогенеза рабдомиосарком: современное состояние и пути решения	239
Литература	242
<i>В. Б. Ушаков. Дифференцировка и теплоустойчивость в мышечных волокнах</i>	245
Введение	245
Сдвиги теплоустойчивости мышечных волокон при дифференцировке и дедифференцировке	246
Сравнительно-физиологические данные о сопряженных изменениях теплоустойчивости и дифференцировке в мышечных волокнах	246
Снижение теплоустойчивости мышечных волокон в раннем постнатальном онтогенезе	247
Возрастание теплоустойчивости мышечных волокон при функциональных расстройствах и дедифференцировке	248
Сдвиги теплоустойчивости в разных функциональных системах мышечных волокон при дифференцировке и дедифференцировке	249
Сократительная система	250
Система электромеханической связи	251
Возбудимая система	251
Синхронность, однозначность и взаимная пропорциональность изменений теплоустойчивости в разных функциональных системах	252
О биологическом смысле дифференцировки мышечных волокон по признаку теплоустойчивости	254
Дифференцировка и температурный режим работы мышц	255
Нетемпературная регуляция теплоустойчивости мышечных волокон, моделей и белков	256
Сдвиги теплоустойчивости мышечных волокон как побочный результат изменений электрогенных свойств и поверхностной мембраны	258
Заключение	261
Литература	262

РЕФЕРАТЫ

УДК 591.35 : 576.72

Происхождение и эволюция мышечных тканей. К о р р е А. Г. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 6—21.

Рассмотрены эмбриональные источники и некоторые свойства мышечных тканей разных гистогенетических профилей: соматического типа, целомического типа, гладкая мышечная ткань внутренностей и сосудов, мышечная ткань нейрального происхождения, миоэпидермальные клетки желез. Лит. — 47 назв.

УДК 591.35 : 591.473 + 591.8.088.9 + 576.31

Морфологические аспекты дифференцировки и пролиферации в гистогенезе скелетных, сердечной и гладких мышц позвоночных. П. П. Р у м я н ц е в, И. Л. Е р о х и н а. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 22—50.

На основании данных автордиографии, электронной микроскопии, электронно-микроскопической автордиографии и других методов рассматриваются взаимоотношения процессов пролиферации и дифференцировки в развивающихся скелетных, сердечной и гладких мышцах позвоночных. В соматическом миогенезе синтезируют ДНК и делятся митозом только одноядерные миобласты. Выход клеток из митотического цикла является необходимым предварительным условием для начала миофибриллогенеза и слияния миобластов. В многоядерных синцитиях, образующихся путем слияния миобластов, ядра не синтезируют ДНК и не делятся. В кардиомиогенезе, напротив, миоциты сердца способны проходить митотический цикл, несмотря на наличие высокоорганизованных миофибрилл, которые распадаются при митозе на саркомеры и мелкие пучки миофиламентов в результате резорбции дисков Z; кардиальному миогенезу не свойственно также наличие способных к слиянию миобластов, играющих большую роль в гистогенезе скелетных мышц. В лейомиогенезе, как и в кардиомиогенезе, синтезируют ДНК и делятся митозом одноядерные клетки, содержащие миофиламенты, т. е. синтез мышечных белков и процессы пролиферации совмещаются в одних и тех же клетках. Лит. — 151 назв., ил. — 17, табл. — 4.

УДК 591.473 : 577.3 : 591.1.05

Формирование сократительных структур в миогенезе. П о д л у б н а я З. А. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 51—74.

В работе сделан обзор данных по структуре сократительного аппарата поперечно-полосатых мышц позвоночных и по реконструкции отдельных элементов саркомера *in vitro*. Описаны основные стадии сборки сократительного аппарата в процессе миогенеза. Лит. — 201 назв., ил. — 19.

УДК 591.473 : 577.3 : 591.1.05

Синтез специфических сократительных белков как биохимическая основа дифференцировки миогенных клеток. П и н а е в Г. П. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 75—97.

В обзоре даны современные представления о синтезе сократительных белков, специфичных для мышечных клеток. Приведены данные о смене изоформ основных сократительных белков в ходе миогенеза и сопоставлены сроки появления определенных изоформ с этапами морфогенеза. Подробно рассмотрены стадии синтеза сократительных белков и формы контроля за этим процессом. Дана характеристика информационных РНК, изменения состава популяции 26S РНК в ходе ядерного и цитоплазматического процессинга и взаимодействия РНК с рибосомами. Описаны факторы, влияющие на процесс трансляции. Обсуждается значение смены изоформ белков для формирования сократительного аппарата, характерного для зрелой мышечной клетки. Лит. — 115 назв., ил. — 4.

УДК 591.473 : 577.3 : 591.1.05

Изменения физико-химических свойств сократительных белков в ходе миогенеза. Х а й т-
л и н а С. Ю. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 98—114.

Рассмотрены основные свойства «саркомерных» и цитоплазматических сократительных белков, а также изменения первичной структуры и субъединичного состава сократительных белков в ходе миогенеза. Приводятся данные об изменении функциональных свойств миозина, актина и белков тропомиозин—тропонинного комплекса в миогенезе. Лит. — 117 назв., табл. — 4.

УДК 591.473 : 577.150.6 : 591.1.05

Некоторые аспекты энергетического обеспечения развивающихся мышц. Л ы з-
л о в а С. П. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 115—125.

Рассмотрен экспериментальный материал о характере становления в развивающихся скелетных мышцах некоторых биохимических показателей, характеризующих энергетический метаболизм (АТФ, АДФ, КФ, креатина, миозиновой АТФазы, креатинкиназы и альдолазы). Описаны изменения, происходящие при дифференцировке мышечных клеток *in vivo* и *in vitro*. Обсуждено явление синхронности возникновения биохимических признаков, определяющих структурную и метаболическую специфичность мышечной ткани на разных этапах ее развития. Лит. — 51 назв., ил. — 5, табл. — 2.

УДК 591.35 : 591.473 : 591.05

Система электромеханической связи в развивающихся мышечных клетках. Л о-
п и н а О. Д., Болдырев А. А. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 126—139.

Рассмотрены данные о возникновении и изменении в процессе онтогенеза системы электромеханической связи в быстрых мышцах: формирование возбудимой плазматической мембраны, образование саркоплазматического ретикулума и белковых комплексов, участвующих в регуляции сократительного акта (тропонин—тропомиозиновый белковый комплекс, легкие цепи миозина). Приведены данные о синтезе отдельных компонентов плазматической мембраны и мембраны саркоплазматического ретикулума на различных этапах развития культуры мышечной ткани, рассмотрена роль Ca^{2+} в инициации синтеза специфичных для мышечной ткани белков и влияние иннервации на состав и свойства отдельных компонентов системы. Постулируется существование трех этапов в процессе формирования электромеханической связи: 1) синтез специфичных для возбудимой плазматической мембраны белков; 2) синтез белков мембраны саркоплазматического ретикулума и белков, регулирующих сокращение; 3) преобразование мембранных структур и белковых регуляторных комплексов под действием нервной системы. Лит. — 48 назв., ил. — 2, табл. — 2.

УДК 591.175 : 591.35 : 612.014.423

Формирование функциональных свойств скелетных мышечных волокон в процессе онтогенетического развития животных. С к о р о б о в и ч у к Н. Ф. — В кн.: Проблемы миогенеза. Л., Наука, 1981, с. 140—159.

Представлен обзор работ, демонстрирующих формирование возбудимых и сократительных свойств скелетных мышечных волокон в процессе их онтогенетической дифференцировки, осуществляющейся либо в условиях культуры мышечной ткани, либо в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе. Показано, что чем более ранней является стадия развития мышечной клетки, тем более низким оказывается уровень ее функциональной специализации. Дефинитивные функциональные характеристики, свойственные зрелой мышечной клетке в организме, достигаются только под влиянием нервной системы. Лит. — 78 назв.

УДК 591.473 : 577.150.6 : 577.17

Биохимические аспекты участия нервной системы в развитии и специализации скелетных мышц. Разумовская И. П., Дамбинова С. А. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л. Наука, 1981, с. 160—174.

Обобщаются данные о влиянии развивающейся иннервации скелетных мышц на их дифференцировку и специализацию в процессе миеогенеза. Рассматривается развитие холинорецептивной системы. Анализируется роль внутриклеточных посредников (циклических нуклеотидов и кальция) в дифференцировке мышечных клеток и реализации нейротрофических эффектов. Обсуждаются пути влияния нервной системы на синтез специфических белков мышц. Лит. 93 назв.

УДК 591.473 : 577.150.6 : 577.3 : 591.1.05

Развитие механизмов регуляции скорости сокращения мышечных волокон в миеогенезе. Улумбеков Э. Г. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981, с. 175—187.

Рассматривается развитие механизмов регуляции скорости сокращения дифференцирующихся фазных скелетных мышечных волокон, в частности вклад легкой цепи 3 в формирование этого признака. Приведены данные о смене эмбрионального на definitive миозины и становлении изоферментных спектров быстрого и медленного миозинов. Сформулировано представление о пластичности созревающих и дифференцированных фенотипов и множественности факторов регуляции экспрессии признаков скелетного мышечного волокна. Лит. — 95 назв.

УДК 578.085.23 : 591.473 : 577.95

Использование клеточных культур для изучения миеогенеза. Фридлянская И. И. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981, с. 188—208.

В представленном обзоре описаны успехи и перспективы использования клеточных культур мышечных клеток для изучения разных аспектов миеогенеза: образования дифференцированных клеток из недифференцированных, экспрессии маркерных для мышечной ткани признаков, обособления мышечных клеток в онтогенезе и др. Кроме того показаны возможности применения культур мышечных клеток для исследования общих закономерностей дифференцировки: соотношения процессов пролиферации и дифференцировки, роли ядра и цитоплазмы в реализации программы развития. Лит. — 102 назв., табл. — 1.

УДК 591.473 : 577.99 : 591.169

Регенерация мышц Лнознер Л. Д. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981, с. 209—219.

Приведены многочисленные данные, убедительно свидетельствующие о наличии у скелетной, гладкой и сердечной мускулатуры птиц и млекопитающих способности к регенерации. Особенно подробно рассмотрены вопросы, связанные с восстановлением скелетной мускулатуры: зависимость восстановления мышцы от способа ее повреждения, условий регенерации, от кровоснабжения и иннервации. Изложены существующие представления о механизме регенерации скелетных мышц, в частности, теории миобластов и клеток-сателлитов. Отмечены особенности регенерации миокарда. Лит. — 53 назв.

УДК 591.473 : 616.74 : 616-033.2

Злокачественные миобласты скелетных мышц. Вахтин Ю. Б., Швембергер И. И. — В кн.: Проблемы миеогенеза. Л., Наука, 1981, с. 220—244.

Обзор собственных и литературных данных о клеточных популяциях злокачественных миобластов, формирующих опухоли скелетных мышц человека и животных—рабдомиосаркомы. Освещается происхождение злокачественных миобластов, кинетика роста,

карнотипическая и эпигенетическая гетерогенность популяций, отбор в клеточных популяциях рабдомиосарком. Особое внимание уделено полиморфизму популяций злокачественных миобластов по признакам многократной дифференцировки и ультраструктуре злокачественных миобластов разного типа. Лит. — 52 назв., ил. — 15.

УДК 591.173 : 577.7 : 577.42

Дифференцировка и теплоустойчивость в мышечных волокнах. Ушаков В. Б. — В кн.: Проблемы мюогенеза. Л., Наука, 1981, с. 245—264.

В обзоре приведены данные о соотношении между степенью морфологической, биохимической и физиологической дифференцировки мышечных волокон и их способностью противостоять повреждающему действию нагрева. Показано, что углублению дифференцировки волокон соответствует снижение теплоустойчивости всех функциональных систем — возбудимой, электромеханической связи, сократительной. Обсуждается биологический смысл снижения теплоустойчивости волокон при дифференцировке и увеличения устойчивости в ходе дедифференцировки. Лит. — 92 назв., ил. — 2.

